

УДК 577.151.45 + 577.151.05

ВЛИЯНИЕ КЕТОСУБСТРАТА НА ВЫХОД ПРОДУКТА В РЕАКЦИИ ТРАНСАМИНИРОВАНИЯ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ ТРАНСАМИНАЗОЙ ИЗ *Thermoproteus Uzoniensis*

© 2020 г. Е. Ю. Безсуднова^{1,*}, Т. Н. Стеханова¹,
К. М. Бойко¹, член-корреспондент РАН В. О. Попов^{1,2}

Поступило 13.09.2019 г.
После доработки 13.09.2019 г.
Принято к публикации 13.09.2019 г.

Исследование равновесия реакций, катализируемых термостабильными ферментами, актуально для разработки биотехнологических процессов с их участием. Представлены результаты анализа равновесия реакции трансаминирования, катализируемой термостабильной трансаминазой из археи *Thermoproteus uzoniensis*. Было проведено сравнение глубины превращения субстратов в двух реакциях с L-лейцином и пируватом и L-лейцином и 2-оксобутиратом при 65°C. Установление равновесия контролировали по уменьшению концентрации 2-оксобутирата или пирувата и по накоплению кетоаналога L-лейцина. Показано, что степень превращения L-лейцина в реакции со специфическим кетосубстратом 2-оксобутиратом выше, чем в реакции с неспецифическим кетосубстратом пируватом.

Ключевые слова: трансаминазы, ферментативный катализ, химическое равновесие, обратимые реакции, аминирование, деаминирование, кетосоединения

DOI: 10.31857/S2686738920010035

Трансаминазы (ТА, ЕС 2.6.1.X) – это пиридоксаль 5'-фосфат (ПЛП)-зависимые ферменты, которые катализируют стереоселективный перенос аминокислоты с аминокислоты или амина на кетокислоту или кетон с образованием новых аминокислоты или амина и нового кетосоединения. Ферментативное трансаминирование – это реакция последовательного двойного замещения с промежуточным переносом аминокислоты на кофактор ПЛП; два субстрата последовательно связываются в одной области активного центра, все стадии реакции обратимы [1]. Как стереоселективные катализаторы переноса аминокислоты трансаминазы интересны для решения задач тонкого органического синтеза – асимметрического аминирования и разделения хиральных аминов [2]. Последнее десятилетие представило ряд ярких примеров применения ТА в синтезе фармацевтических препаратов, в том числе ситаглиптина [3] и ингибитора Smo-рецептора [4]. Однако

из-за особенностей реакции применение ТА ограничено: обратимость реакции приводит к ингибированию продуктами, последовательное связывание двух субстратов в одном центре – к ингибированию субстратами. Эффективное применение ТА невозможно как без преодоления этих двух ограничений, так и без разработки подходов к смещению равновесия реакции в сторону продуктов [2].

Как равновесный процесс трансаминирования характеризуется константой равновесия. Диапазон наблюдаемых констант равновесия для реакций трансаминирования составляет 0.016–100 [5, 6]; для некоторых реакций, например для катализируемого аланинглюксилат трансаминазой человека переноса аминокислоты между глюксилатом и L-аланином константа равновесия, достигает 9700 [7]. Цель настоящего исследования состояла в оценке влияния свойств кетосубстрата на равновесие реакции трансаминирования, катализируемой термостабильной трансаминазой из археи *Thermoproteus uzoniensis* (TUZN1299). Ранее было показано, что TUZN1299 активна с L-лейцином, L-изолейцином, L-валином, их неприродными гомологами и соответствующими кетокислотами, а также с положительно заряженными и серосодержащими аминокислотами. Оптимальный pH реакции трансаминирования

¹ Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской Академии наук, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр
“Курчатовский институт”, Москва, Россия

*e-mail: eubez@yandex.ru

Таблица 1. Кинетические параметры реакции трансминирования, катализируемой TUZN1299 при 65°C в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8

Субстрат	Косубстрат	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$	$k_{\text{cat}}/K_m, \text{с}^{-1} \text{М}^{-1}$
4-метил-2-оксовалерат	L-аланин	3.0 ± 0.3	0.15 ± 0.06	20000 ± 10000
L-лейцин	пируват	1.31 ± 0.04	0.21 ± 0.08	6240 ± 2600
2-оксобутират	L-аланин	10.2 ± 0.8	1.0 ± 0.3	10000 ± 3500
2-аминобутановая кислота	Пируват	7.2 ± 0.7	0.48 ± 0.11	15000 ± 4900
Пируват	L-лейцин	1.78 ± 0.12	16.0 ± 3.0	111 ± 28
L-аланин	4-метил-2-оксовалерата	2.7 ± 0.4	62 ± 18	43 ± 19

между 4-метил-2-оксовалератом и L-аланином составил 8.0, оптимальная температура реакции превысила 95°C [8, 9]. Активность фермента не снижалась после пяти часов инкубации при 70°C; после 24 ч инкубации при 70°C потеря активности составила менее 40% [8]. Эти свойства позволили рассматривать TUZN1299 как фермент с высоким биотехнологическим потенциалом. В этом контексте нами проведен сравнительный анализ зависимости глубины превращения субстратов от специфичности TUZN1299 к кетосубстратам для реакций трансминирования между L-лейцином и пируватом (1) и между L-лейцином и 2-оксобутиратом (2) при 65°C:

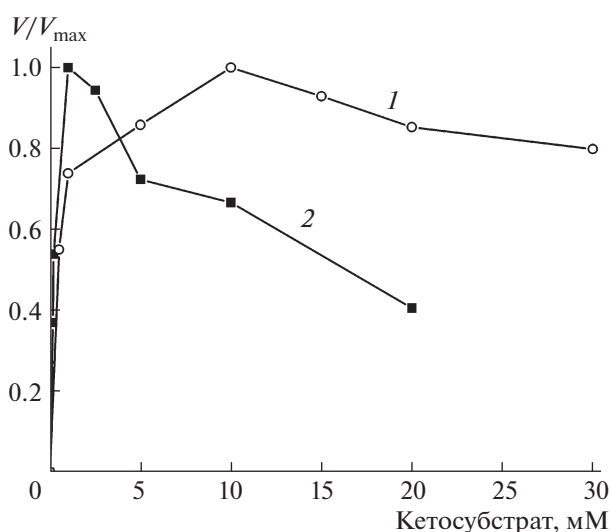
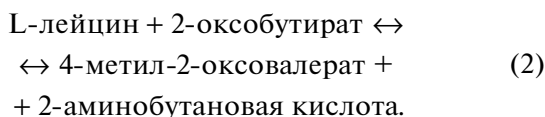
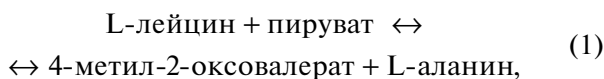


Рис. 1. Зависимость отношения наблюдаемой скорости реакции V к максимальной скорости реакции V_{max} от концентрации 2-оксобутирата (1) и 4-метил-2-оксовалерата (2) в реакции трансминирования, катализируемой TUZN1299, при 65°C в Na-фосфатном буфере, pH 8.0, в присутствии 20 мМ L-аланина.

Глубину превращения и константы равновесия обеих реакций рассчитывали из значений концентраций кетосоединений, определенных хроматографически на колонке Source 30S (GE Healthcare), уравновешенной 5 мМ H_2SO_4 с добавлением 5% ацетонитрила. Специфичность TUZN1299 при 65°C к субстратам определяли из зависимостей скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата с последующей обработкой кривой по уравнению Михаэлис–Ментен (табл. 1). Методы выделения и определения активности TUZN1299 приведены в работах [8, 9].

Как следует из табл. 1, при 65°C TUZN1299 наиболее специфична к 4-метил-2-оксовалерату. При этом 4-метил-2-оксовалерат значительно ингибирует активность TUZN1299 (рис. 1). По-видимому, по этой причине k_{cat} реакций деаминации L-лейцина и аминирования 4-метил-2-оксовалерата ниже k_{cat} реакций деаминации 2-аминобутановой кислоты и аминирования 2-оксобутирата, который не ингибирует активность TUZN1299 (рис. 1). 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, т.е. 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 системе, которая содержала только субстраты (L-лейцин и кетосубстрат) в концентрациях 10 мМ, установление равновесия контролировали по уменьшению концентрации 2-оксобутирата или пирувата и по накоплению 4-метил-2-оксовалерата (рис. 2). Начальные скорости реакций (1) и (2) составили 1.2 и 4.5 U/mg соответственно. Равновесие в реакциях было достигнуто через 4 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-оксвалерата 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°C. 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-оксвалерата достигла 2.1 и 5.63 мМ соответственно. Важно отметить, что в обеих реакциях равновесная концентрация 4-метил-2-оксвалерата превысила порог ингибирования (рис. 1).

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-оксвалерата неизбежно приводит к снижению скорости прямой реакции. В то же время реакция (2) останавливается при более высокой концентрации 4-метил-2-оксвалерата. Другими словами, в реакции со специфическим 2-оксобутиратом ингибирующий эффект продукта 4-метил-2-оксвалерата ниже и глубина аминирования 2-оксобутирата выше, чем аналогичные характеристики в реакции с пируватом. Учитывая имеющиеся кинетические параметры (табл. 1), можно утверждать, что отношение $[S]/K_m > 1$ является исходным условием для 2-оксобутирата и быстро достигается для 4-метил-2-оксвалерата 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-оксвалерата. 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-оксвалератом – зависят от природы кетосубстрата. Специфичный кетосубстрат, который не ингибирует TUZN1299, сдвигает равновесие в сторону продуктов. Для эффективного аминирования кетосоединений с применением TUZN1299 рекомендуется учитывать свойства образующегося кетопродукта и подбирать аминокислотный субстрат так, чтобы k_{cat} аминирования кетосубстрата в прямой реакции оказывалась выше k_{cat} аминирования кетопродукта в обратной реакции при насыщающих концентрациях обоих кетосоединений.

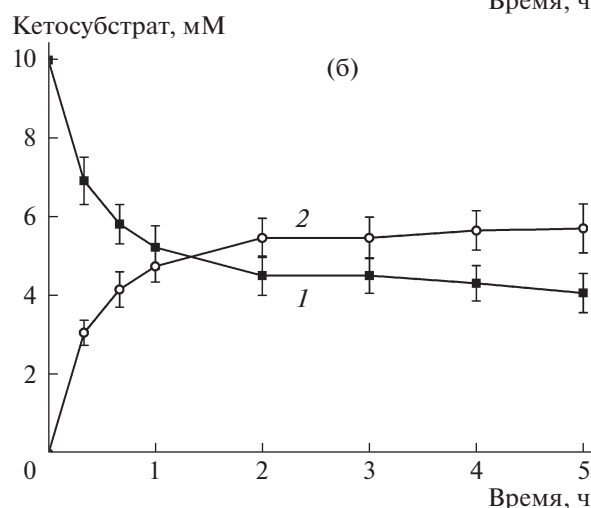
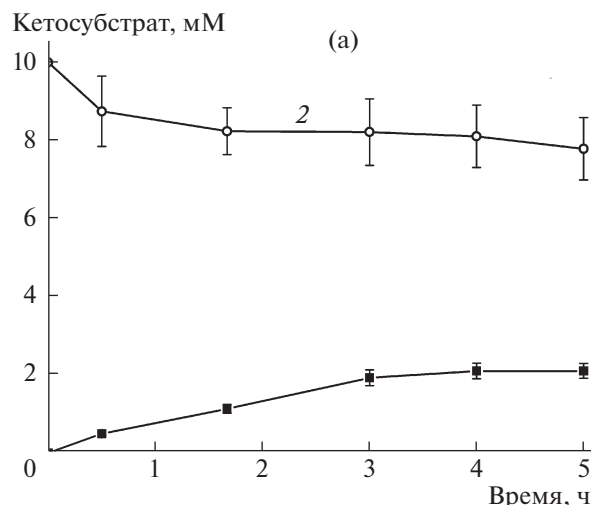


Рис. 2. Установление равновесия в реакции трансаминирования, катализируемой TUZN1299, в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8.0 при 65°C. а – 1.2 мкМ TUZN1299, 10 мМ L-лейцина, 10 мМ пирувата; 1 – убыль пирувата, 2 – накопление 4-метил-2-оксвалерата. б – 1.2 мкМ TUZN1299, 10 мМ L-лейцина, 10 мМ 2-оксобутирата; 1 – убыль 2-оксобутирата, 2 – накопление 4-метил-2-оксвалерата.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана Российским научным фондом, грант № 19–14–00164 (определение констант равновесия и глубины превращения).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Elit A.C., Kirsch J.F.* Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. С. 383–415. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074021>
2. *Slabu I., Galman J.L., Lloyd R.C., et al.* Discovery, Engineering, and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts // *ACS Catal.* 2017. V. 7. С. 8263–8284. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02686>

3. *Savile C.K., Janey J.M., Mundorff E.C., et al.* Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Sitagliptin Manufacture // *Science*. 2010. V. 329. C. 305–309. <https://doi.org/10.1126/science.1188934>
4. *Peng Z., Wong J.W., Hansen E.C., et al.* Development of a Concise, Asymmetric Synthesis of a Smoothed Receptor (SMO) Inhibitor: Enzymatic Transamination of a 4-Piperidinone with Dynamic Kinetic Resolution // *Org. Lett.* 2014. V. 16. C. 860–863. <https://doi.org/10.1021/ol403630g>
5. *Goldberg R.N., Tewari Y.B.* Thermodynamics of Enzyme-Catalyzed Reactions: Part 2. Transferases // *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 1994. V. 23. C. 547–617. <https://doi.org/10.1063/1.555948>
6. *Tewari Y.B., Kishore N., Goldberg R.N., et al.* An Equilibrium and Calorimetric Study of Some Transamination Reactions // *J. Chem. Thermodynamics*. 1998. V. 30. C. 777–793. <https://doi.org/10.1006/jcht.1998.0342>
7. *Cellini B., Bertoldi M., Montioli R., et al.* Human wild-type Alanine: Glyoxylate Aminotransferase and Its Naturally Occurring G82E Variant: Functional Properties and Physiological Implications // *Biochem. J.* 2007. V. 408. C. 39–50. <https://doi.org/10.1042/BJ20070637>
8. *Boyko K.M., Stekhanova T.N., Nikolaeva A.Y., et al.* First Structure of Archaeal Branched-Chain amino Acid Aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* Specific for l-amino Acids and R-amines // *Extremophiles*. 2016. V. 20. C. 215–225.
9. *Bezsudnova E.Y., Stekhanova T.N., Suplatov D.A., et al.* Experimental and Computational Studies on the Unusual Substrate Specificity of Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. V. 607. C. 27–36. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0816-z>
10. *Eisenthal R., Danson, M.J., Hough, D.W.* Catalytic Efficiency and Kcat/KM: A Useful Comparator? // *TRENDS in Biotech.* 2007. T. 25. C. 247–249. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.03.010>

EFFECT OF KETOSUBSTRATE ON PRODUCT YIELD IN TRANSAMINATION REACTION CATALYZED BY TRANSAMINASE FROM *Thermoproteus uzoniensis*

**E. Yu. Bezsudnova^{a, #}, T. N. Stekhanova^a, K. M. Boyko^a,
and Corresponding Member of the RAS V. O. Popov^{a, b}**

^a *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences”, Moscow, Russian Federation*

^b *National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: eubez@yandex.ru*

The study of the equilibrium of reactions catalyzed by thermostable enzymes is in demand for the development of biotechnological enzyme processes. The results of the analysis of equilibrium of transamination reaction catalyzed by thermostable transaminase from the archaeon *Thermoproteus uzoniensis* are presented below. A comparison of the conversion of substrates was performed for reactions with L-leucine and pyruvate and L-leucine and 2-oxobutyrate at 65°C. The establishment of the equilibrium was controlled by a decrease in the concentration of 2-oxobutyrate or pyruvate and by the accumulation of the keto analog of L-leucine. It was shown that the degree of conversion of L-leucine in the reaction with specific 2-oxobutyrate is higher than in the reaction with non-specific pyruvate.

Keywords: transaminases, biocatalysis, chemical equilibrium, reversible reactions, amination, deamination, keto compounds