

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ D-ЦИКЛОСЕРИНОМ ТРАНСАМИНАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ *Haliscomenobacter hydrossis*

© 2023 А.К. Бакунова^{1*}, И.О. Матюта¹, А.Ю. Николаева^{1,2},
К.М. Бойко¹, В.О. Попов^{1,3}, Е.Ю. Безсуднова^{1*}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Институт биохимии имени А.Н. Баха, 119071 Москва, Россия;
электронная почта: a.bakunova@fbras.ru, eubez@inbi.ras.ru

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.08.2022

После доработки 10.02.2023

Принята к публикации 11.02.2023

D-Циклосерин ингибирует пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты с различной эффективностью в зависимости от организации активного центра фермента и механизма катализируемого превращения. D-Циклосерин взаимодействует с PLP-формой фермента подобно субстратам (аминокислотам) и преимущественно обратимо. Известно несколько продуктов взаимодействия PLP с D-циклосерином, при этом для некоторых ферментов образование стабильного ароматического гидроксизоксазол-пиридоксамин-5'-фосфата при определённых значениях pH приводит к необратимому ингибированию. Цель данной работы состояла в определении механизма ингибирования D-циклосерином PLP-зависимой трансаминазы D-аминокислот из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis*, которая характеризуется иной, чем у канонических трансаминаз D-аминокислот, организацией активного центра. Спектральными методами обнаружено несколько продуктов взаимодействия D-циклосерина и PLP в активном центре трансаминазы: оксим, образованный PLP и β -аминоокси-D-аланином; кетимин, образованный пиридоксамин-5'-фосфатом и D-циклосерином в циклической форме; и пиридоксамин-5'-фосфат. Образование гидроксизоксазол-пиридоксамин-5'-фосфата не установлено. Методом рентгеноструктурного анализа получена пространственная структура комплекса трансаминазы с D-циклосерином. В активном центре трансаминазы обнаружен кетимин, образованный пиридоксамин-5'-фосфатом и циклической формой D-циклосерина. Кетимин находится в двух положениях, в которых он образует водородные связи с разными остатками активного центра. Кинетическими и спектральными методами показаны обратимость ингибирования D-циклосерином трансаминазы из *H. hydrossis* и восстановление активности фермента как избытком кетосубстрата, так и избытком кофактора. Полученные результаты подтверждают взаимопревращение аддуктов D-циклосерина и PLP, а также обратимость ингибирования D-циклосерином PLP-зависимых трансаминаз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трансаминаза D-аминокислот, D-циклосерин, обратимое ингибирование, флуоресценция, рентгеноструктурный анализ.

DOI: 10.31857/S0320972523050111, EDN: AYYWPB

ВВЕДЕНИЕ

D-Циклосерин, циклический аналог D-серина, известен как ингибитор пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимых ферментов, включая трансаминазы, декарбоксилазы и рацемазы [1–5]. D-Циклосерин относится к антибиотикам широкого спектра действия, например, D-цикло-

серин применяется в терапии туберкулёза, как ингибитор PLP-зависимой аланинрацемазы у бактерии *Mycobacterium tuberculosis* (UniProt код: P9WQA9) [6]. Подобно субстратам (аминокислотам), D-циклосерин вступает в реакцию с кофактором PLP в активном центре фермента и образует внешний альдимин по механизму нуклеофильного замещения у C4'-атома PLP,

Принятые сокращения: PLP – пиридоксаль-5'-фосфат; PMP – пиридоксамин-5'-фосфат; TA_Halhy – трансаминаза D-аминокислот из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis*.

* Адресат для корреспонденции.

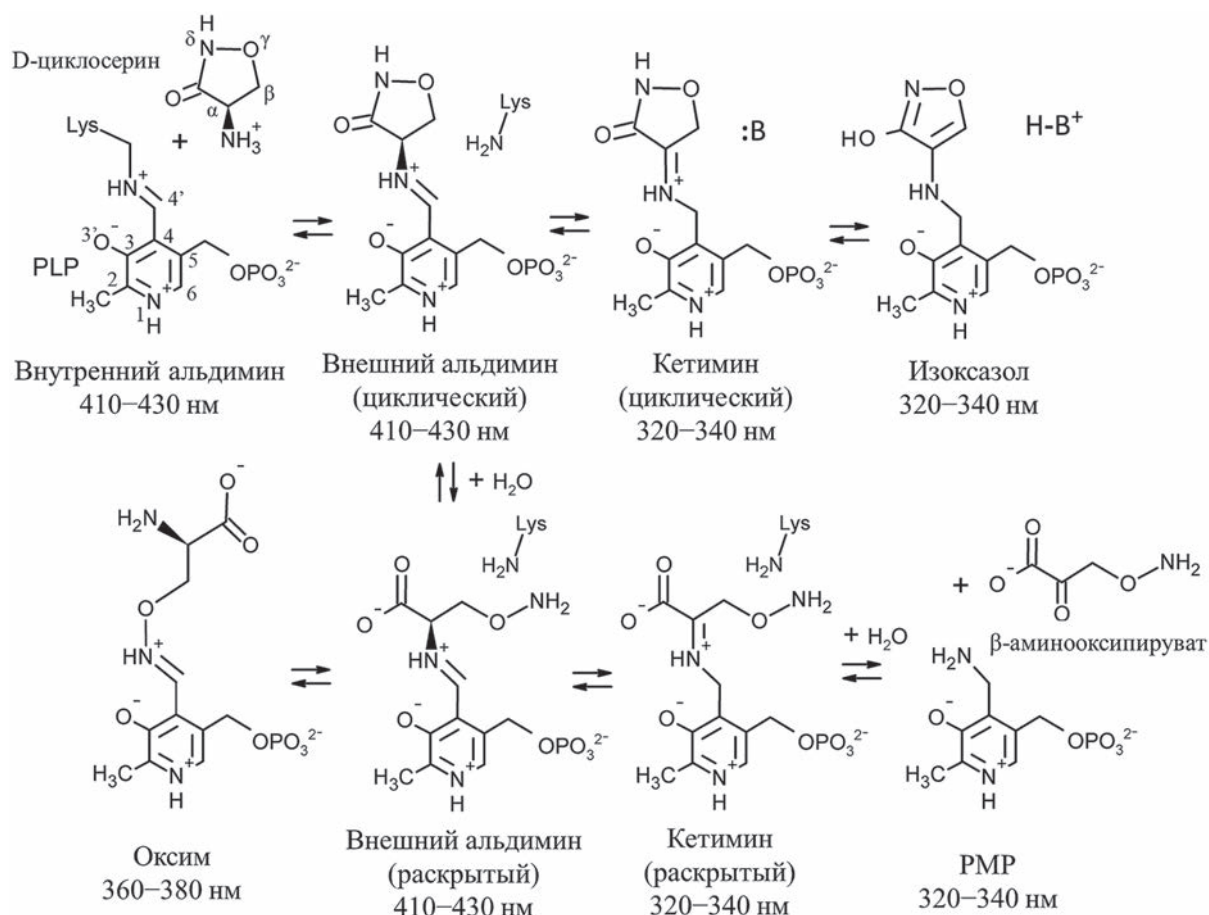


Схема превращения D-циклосерина в активном центре PLP-зависимых ферментов с указанием максимумов поглощения образующихся соединений

далее протекает стереоселективный 1,3-перенос протона при содействии аминогруппы каталитического остатка лизина с образованием кетимина — аддукта пиридоксамин-5'-фосфата (РМР) и кетопроизводного D-циклосерина (схема). Кетимин далее превращается в стабильное ароматическое соединение — аддукт гидроксиизоксазола и РМР (изоксазол) — путём отщепления протона от Cβ-атома [1–3]. Ранее этот путь превращения считался необратимым [1–3], однако недавно методами ЯМР и флуоресцентной спектроскопии установлено, что и в растворе, и в активном центре аланин-рацемаз изоксазол со временем превращается в оксим, образованный РМР-формой кофактора и β-аминоокси-D-аланином [7]. Образование оксима происходит в результате внутримолекулярной перегруппировки, которой предшествует гидролиз D-циклосерина до β-аминоокси-D-аланина (раскрытая форма D-циклосерина). Кроме того, при изучении ингибирования аланин-глиоксалат-трансаминазы человека (UniProt код: P21549) D-циклосерином обнаружен третий путь превращения D-циклосерина в активном центре фермента через образование раскрытого кетимина, аддукта РМР-формы ко-

фактора и β-аминооксипирувата, с последующим его разложением и накоплением РМР в активном центре трансаминазы [4]. На сегодня проведённые исследования позволяют представить взаимодействие D-циклосерина и РМР в активном центре фермента в виде схемы, где все стадии обратимы и образующиеся соединения переходят друг в друга.

В кристаллографических исследованиях комплексов РМР-зависимых ферментов с D-циклосерином описаны разнообразные продукты ингибирования: изоксазол; внешний альдимин, образованный РМР-формой кофактора и циклической формой D-циклосерина (циклический альдимин); кетимин, образованный РМР-формой кофактора и циклической формой кетопроизводного D-циклосерина (циклический кетимин) и РМР. В большинстве депонированных структур встречается изоксазол (PDB коды: 5U3F, 3E6E, 1VFS, 1EPV, 2DAA) [1–3, 8, 9] или циклический альдимин (PDB коды: 2RJH, 1I2L, 1D7S, 5FAJ, 3TCM, 4D9F) [5, 10–13].

Среди РМР-зависимых трансаминаз ингибирование D-циклосерином детально изучено для трансаминазы разветвлённых L-аминокис-

лот из *M. tuberculosis* (UniProt код: P9WQ75) [3], для трансаминазы D-аминокислот из *Bacillus* sp. (UniProt код: P19938) [1] и для аланин-глиоксилат-трансаминазы человека [4]. Ферментативное трансаминирование протекает по механизму последовательного двойного замещения, в реакции участвуют два субстрата (аминокислота/амин и кетокислота/кетон), полная реакция трансаминирования является суммой двух полуреакций. В первой полуреакции аминокислота/амин (субстрат аминодонор) реагирует с PLP в активном центре фермента, превращаясь в кетокислоту/кетон, при этом кофактор переходит в РМР-форму. Во второй полуреакции другая кетокислота/кетон (субстрат аминорецептор) превращается в новую аминокислоту/амин, исходная PLP-форма кофактора регенерируется [14–16]. С трансаминазами D-цикloserин вступает в первую полуреакцию (схема), продуктами которой могут быть изоксазол и циклический кетимин, а в результате гидролиза D-цикloserина накапливаются оксим, раскрытый кетимин и РМР [1, 3, 4]. Для ряда ферментов эффективность ингибирования D-цикloserином растёт во времени, что объясняется сходством механизмов взаимодействия ингибитора и субстрата аминокислоты с ферментом (первая полуреакция). Если наблюдаемая константа скорости полуреакции между ферментом и D-цикloserином значительно меньше наблюдаемой константы скорости полуреакции фермента со специфическим субстратом, то наибольшая степень ингибирования достигается через некоторое время [2–4].

Для трансаминаз описаны как обратимое, так и необратимое ингибирование D-цикloserином. Например, активность трансаминаз из *M. tuberculosis* и *Bacillus* sp. необратимо ингибируется D-цикloserином при pH 8,0–8,5 [3, 17]. Однако активность трансаминазы из *Bacillus* sp. восстанавливается при pH 6,5–7,5 в результате добавления PLP к ферменту [17]. О восстановлении активности трансаминазы из *M. tuberculosis* сведений нет. Основным продуктом взаимодействия этих трансаминаз с D-цикloserином является изоксазол, образование которого подтверждено рентгеноструктурным анализом комплексов ферментов с ингибитором [1, 3]. Для аланин-глиоксилат-трансаминазы человека ингибирование D-цикloserином является обратимым, образование изоксазола не зафиксировано [4]. Спектральными методами показано образование оксима; рентгеноструктурным анализом в активном центре комплекса фермента с D-цикloserином обнаружена РМР-форма кофактора. Кро-

ме того, для аланинглиоксилаттрансаминазы человека наблюдается восстановление активности избытком субстрата [4]. Перечисленные трансаминазы различаются укладкой PLP-связывающего домена и составом функциональных групп в активном центре.

Настоящая работа является продолжением исследований взаимодействия D-цикloserина с PLP-зависимыми трансаминазами. Объектом исследования является трансаминаза D-аминокислот (EC 2.6.1.21) из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy; UniProt код: F4KWH0) [18]. TA_Halhy активна в реакции трансаминирования с разнообразными кетокислотами, наилучшим субстратом среди аминокислот (субстратом аминодонором) является D-глутаминовая кислота. Функциональной единицей TA_Halhy является гомодимер, содержащий два симметричных активных центра. Как и во всех трансаминазах, активный центр TA_Halhy формируется остатками обеих субъединиц и молекулой PLP, ковалентно связанной с боковой группой остатка лизина (внутренний альдимин). От известных канонических трансаминаз D-аминокислот, включая трансаминазу D-аминокислот из *Bacillus* sp., TA_Halhy отличается составом функциональных групп в активном центре. Так, в активном центре канонических трансаминаз D-аминокислот присутствует триада остатков аргинина, тирозина и гистидина, боковые группы которых сближены в пространстве и образуют сайт связывания α -карбоксильной группы субстрата. В активном центре TA_Halhy нет канонической триады, но имеются четыре положительно заряженных остатка – три остатка аргинина и один остаток лизина, которые, по-видимому, взаимодействуют с α -карбоксильной группой субстрата [18].

Цель данной работы состояла в определении механизма ингибирования TA_Halhy D-цикloserином. Детальное исследование взаимодействия D-цикloserина с TA_Halhy проводили спектральными и кинетическими методами. Методом рентгеноструктурного анализа установлена пространственная структура комплекса TA_Halhy с D-цикloserином с разрешением 1,4 Å и определены остатки, координирующие молекулу ингибитора в активном центре фермента. Проведённые исследования позволили изучить механизм ингибирования TA_Halhy D-цикloserином, в том числе установить обратимость ингибирования TA_Halhy D-цикloserином, определить основные продукты взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином и предложить способы восстановления активности ингибированного фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантной TA_Halhy. Наработку и очистку TA_Halhy проводили, как описано ранее [18]. Рекомбинантную TA_Halhy выделяли из биомассы штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)pLys («Stratagene», США), несущего экспрессионный вектор pET_21d_Halhy_2446. Рекомбинантную TA_Halhy, содержащую 6-His-фрагмент на C-конце, отделяли с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на колонке HisTrap HP («Cytiva», США). Далее 6-His-фрагмент отщепляли TEV-протеазой, TA_Halhy отделяли от TEV-протеазы и продуктов протеолиза с помощью повторной металл-хелатной аффинной хроматографии. В заключение проводили гель-фильтрацию в 20 mM HEPES/NaOH буфере (pH 7,5) с добавлением 150 mM NaCl, 100 мкМ PLP и 1 mM ди-тиотреитола. Очищенную TA_Halhy хранили в 50%-ном глицерине при -20°C . Чистоту и гомогенность препарата контролировали ДДС-ПААГ-электрофорезом. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

PLP-форму TA_Halhy получали инкубированием фермента в концентрации 2,5 мг/мл (74 мкМ) с избытком PLP (700 мкМ) в присутствии 10 mM α -кетоглутарата в течение 30 мин при 40°C . Кетосубстрат и несвязавшийся PLP удаляли переводом в другой буфер, используя колонку HiTrap Desalting («Cytiva»), уравновешенную 50 mM К-фосфатным буфером (pH 8,0).

Кинетический анализ. Для анализа ингибирования TA_Halhy D-цикloserином были получены полные кинетические кривые реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом в присутствии разных концентраций D-цикloserина (3–50 мкМ) без предварительного инкубирования TA_Halhy с ингибитором. Накопление продукта реакции — пирувата — определяли по убыли NADH в сопряженной ферментативной реакции с лактатдегидрогеназой из мышцы кролика (LDH) («Sigma», США). Расходование NADH определяли спектрофотометрически при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) с использованием спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis («Thermo Scientific», США). Реакцию трансаминирования, катализируемую TA_Halhy, проводили в 50 mM К-фосфатном буфере (pH 8,0) при 40°C с субстратами D-аланином (5 mM) и α -кетоглутаратом (2 mM) с добавлением 30 мкМ PLP, 0,33 mM NADH, 5 мкг/мл LDH (удельная активность препарата составляет 200 мкмоль/мин на 1 мг белка). В условиях трансаминазной реакции препарат LDH был стабилен. Тем-

пературной инактивации TA_Halhy при 40°C не наблюдалось [18]. Реакцию инициировали добавлением α -кетоглутарата после инкубирования реакционной смеси с TA_Halhy в концентрации 0,35 мкг/мл (10 нМ) в течение 15 мин. D-Цикloserин к реакционной смеси добавляли вместе с α -кетоглутаратом.

Кинетические кривые аппроксимировали интегральным уравнением для медленно связывающегося ингибитора (1) [19]:

$$A_t = A_0 - v' \times t - \frac{v_0 - v'}{k_{\text{инг}}} \times (1 - \exp(-k_{\text{инг}} \times t)), \quad (1)$$

где A_t — значение поглощения в момент времени t ; A_0 — значение поглощения в начальный момент времени; v' — скорость ферментативной реакции после установления равновесия между ферментом и ингибитором; v_0 — начальная скорость ферментативной реакции; $k_{\text{инг}}$ — наблюдаемая константа скорости ингибирования.

Параметры ингибирования рассчитывали по уравнению (2) [19]:

$$k_{\text{инг}} = k_{\text{дисс}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_I^{\text{каж}}}\right), \quad (2)$$

где $k_{\text{дисс}}$ — константа скорости диссоциации комплекса фермент–ингибитор, $[I]$ — концентрация ингибитора, $K_I^{\text{каж}} = k_{\text{дисс}}/k_{\text{асс}}$ — константа диссоциации комплекса фермент–ингибитор при заданной концентрации субстрата, $k_{\text{асс}}$ — константа скорости ассоциации фермента с ингибитором. Каждое измерение проводили в трёх повторностях.

Спектральный анализ. Эксперименты проводили в 50 mM К-фосфатном буфере (pH 8,0) при 40°C . К PLP-форме TA_Halhy в концентрации 0,85 мг/мл (25 мкМ) добавляли D-цикloserин в концентрации 25 mM и выдерживали смесь в течение 30 мин. Белковую фракцию отделяли от низкомолекулярных компонентов, используя колонку HiTrap Desalting. Кроме того, фракцию низкомолекулярных компонентов получали ультрафильтрацией с использованием центрифужного концентратора (30 кДа MWCO; «Millipore», США). Спектры поглощения фракций регистрировали с помощью спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis, концентрация белка не превышала 0,85 мг/мл (25 мкМ). Спектры флуоресценции фракций регистрировали в диапазоне 345–600 нм при длинах волн возбуждения 337 и 380 нм с помощью спектрофлуориметра FluoroMax-4 («Horiba Scientific», Япония), концентрация белка не превышала 0,17 мг/мл (5 мкМ). За накоплением свободного РМР в растворе при разложении продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином следили по убыли

Параметры съёмки и данные кристаллографического уточнения структуры комплекса TA_Nalhy с D-цикло-
серинном

Параметры съёмки	
Пространственная группа	C2
$a; b; c, \text{\AA}$	86,9; 71,94; 53,09
$\alpha; \beta; \gamma, \text{град}$	90,00; 101,47; 90,00
T, K	100
$\lambda, \text{\AA}$	0,9
Разрешение, $\text{\AA}$	42,52–1,41 (1,43–1,41)
Число независимых рефлексов	61 465 (3027)
Полнота набора, %	99,7 (99,9)
$I/\sigma(I)$	6,5 (0,6)
$R_{\text{meas}}, \%$	8,6 (4,7)
$CC_{1/2}, \%$	99,8 (94,6)
Уточнение	
$R_{\text{fact}}, \%$	17,2
$R_{\text{free}}, \%$	20,3
Общий средний B -фактор	23,9
Средний B -фактор по белку	22,8
Средний B -фактор по растворителю	32,8
Средний B -фактор по D-циклосерину	25,3
Число неводородных атомов	
Белок	2306
Растворитель	267
D-циклосерин	29
Всего	2608
Среднеквадратичные отклонения	
Длины связей, $\text{\AA}$	0,016
Валентные углы, град	2,006
График Рамачандрана	
Наиболее благоприятные, %	97,9
Допустимые, %	2,1
Код PDB	8АНУ

Примечание. В скобках приведены значения для последнего слоя.

поглощения при 337 нм. За регенерацией PLP-формы TA_Nalhy при добавлении α -кетоглутарата следили по росту поглощения при 416 нм. Для расчёта наблюдаемых констант скоростей $k_{\text{набл}}$ указанных процессов экспериментальные значения аппроксимировали уравнением кинетики первого порядка (3):

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty) \times \exp(-k_{\text{набл}} \times t), \quad (3)$$

где A_t – значение поглощения в момент времени t , A_∞ – предельное значение поглощения, A_0 – значение поглощения в начальный момент времени. Каждое измерение проводили в трёх повторностях.

Получение кристаллов комплекса TA_Nalhy с D-циклосеринном. Кристаллы комплекса TA_Nalhy с D-циклосеринном получали настаиванием. Для этого кристалл PLP-формы TA_Nalhy, полученный как описано ранее [18], вылавливали петлёй и помещали в раствор, содержащий, помимо компонентов противораствора (0,1 М Na-ацетатного буфера (pH 4,8), 20% (v/v) PEG 3350), D-циклосерин в концентрации 10 мМ, до частичного обесцвечивания кристалла (около 10 с).

Сбор и обработка дифракционных данных. Непосредственно перед рентгеноструктурным экспериментом кристаллы TA_Nalhy помещали в криораствор, содержащий, помимо компонентов противораствора, 25% (v/v) глицерина и D-циклосерин в концентрации 10 мМ, после чего кристалл в петле замораживали в парах азота. Дифракционные данные, собранные при температуре -173°C на станции BL41XU синхротронного источника Spring8 (Япония), обрабатывали с использованием программы Dials [20] из пакета CCP4 [21]. Статистика собранного набора данных приведена в таблице.

Решение и уточнение структуры. Решение структуры проведено методом молекулярного замещения при помощи программы MOLREP [22]. В качестве стартовой модели использовали структуру холоформы трансаминазы D-аминокислот из *H. hydrossis* (PDB код: 7P7X). Кристаллографическое уточнение структуры проведено с использованием программ Refmac5 [23] и Coot [24] с использованием изотропных тепловых факторов и атомов водорода в фиксированных положениях до достижения R -факторами значений: $R_{\text{work}} = 17,2\%$, $R_{\text{free}} = 20,3\%$ (таблица). В независимой части кристалла комплекса TA_Nalhy с D-циклосеринном находится субъединица белка (283 видимых остатка), 267 молекул воды, одна молекула PLP в комплексе с D-циклосеринном

в двух положениях, а также одна молекула глицерина из криораствора. Визуальный анализ структурных данных проводили с использованием программ Coot и PyMOL Molecular Graphics System, Version 4.6 («Schrödinger», USA). Сравнение структур проводили с использованием сервиса PDBeFOLD [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ингибирование TA_Halhy D-цикloserином.

Вид полных кинетических кривых реакции трансаминирования, катализируемой TA_Halhy, при разных концентрациях D-цикloserина соответствовал росту эффективности ингибирования TA_Halhy D-цикloserином со временем (рис. 1, а). Рассчитанные из кинетических кривых значения v_0 не зависели от концентрации D-цикloserина, при этом константы скорости ингибирования линейно зависели от концентрации ингибитора (рис. 1, б), что соответствовало одностадийному механизму образования комплекса фермента с ингибитором: $E + I \rightarrow EI$ [19]. Константа скорости ассоциации фермента с ингибитором ($k_{\text{асс}}$) составила $0,040 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1} \cdot \text{мкМ}^{-1}$, константа скорости диссоциации ($k_{\text{дисс}}$) — $0,086 \pm 0,014 \text{ мин}^{-1}$, кажущаяся константа диссоциации комплекса фермент–ингибитор ($K_i^{\text{каж}}$) — $2,1 \pm 0,4 \text{ мкМ}$. Проведённый кинетический анализ позволил количественно охарактеризовать процессы образования и диссоциации комплекса фермента с ингибитором, дальнейшие превращения D-цикloserина в активном центре TA_Halhy были проанализированы спектраль-

ными методами и рентгеноструктурным анализом.

Спектральный анализ продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином. PLP-форма Halhy имеет максимумы поглощения при 280 нм и 416 нм (рис. 2, а), что соответствует внутреннему альдиминому TA_Halhy. Выдерживание 25 мкМ PLP-формы TA_Halhy в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 8,0), содержащем 25 мМ D-цикloserина, в течение 30 мин при 40 °С приводило к снижению поглощения при 416 нм и росту поглощения при 337 нм. Конечный спектр имел максимумы поглощения при 280 нм и 337 нм с плечом при 380 нм (рис. 2, а). Максимум при 337 нм указывал на образование аддуктов кофактора и D-цикloserина с sp^3 -гибридизацией C4'-атома кофактора, а именно: циклического кетимина, раскрытого кетимина, изоксазола и РМР [26, 27]. Плечо при 380 нм указывало на присутствие среди продуктов оксима [28]. После перевода в другой буфер спектр продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином имел максимумы при 280 нм и 337 нм, плеча при 380 нм не наблюдалось, т.е. оксим в препарате фермента отсутствовал (рис. 2, б). Спектр низкомолекулярной фракции указывал на частичный выход в раствор продуктов взаимодействия кофактора и D-цикloserина, в том числе РМР и оксима (рис. 2, б). Дальнейшее выдерживание препарата после смены буфера (рис. 2, в) привело к сдвигу максимума поглощения с 337 нм на 324 нм, что соответствовало разложению продуктов взаимодействия до β -аминооксипирувата и РМР и их высвобождению из активного центра (спектр погло-

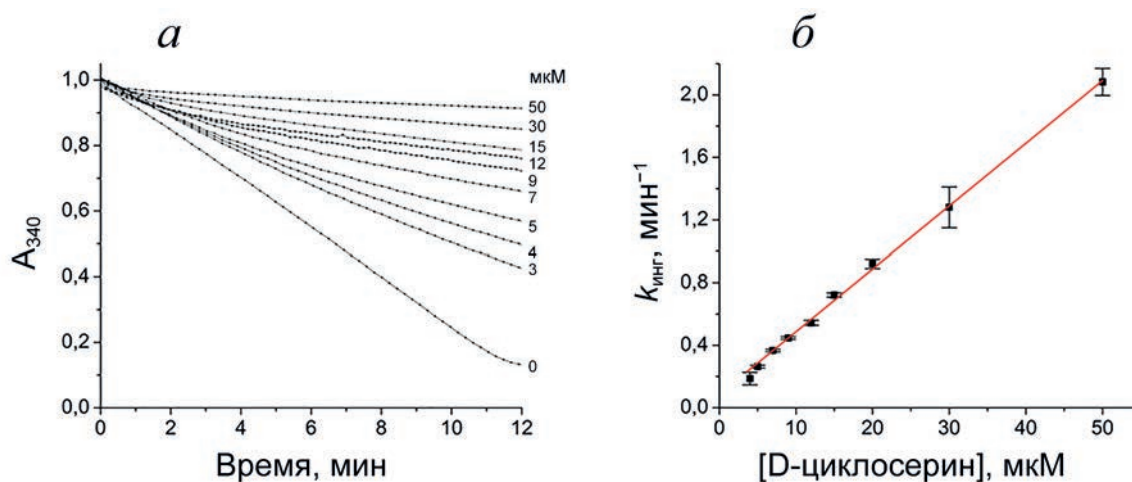


Рис. 1. Ингибирование D-цикloserином активности TA_Halhy в реакции трансаминирования между D-аланином (5 мМ) и α -кетоглутаратом (2 мМ) при 40 °С: а — кинетические кривые реакции, полученные при разных концентрациях добавленного D-цикloserина (указаны справа); б — зависимость наблюдаемой константы скорости ингибирования от концентрации D-цикloserина: экспериментальные значения показаны точками и представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, линейная аппроксимация показана красной линией

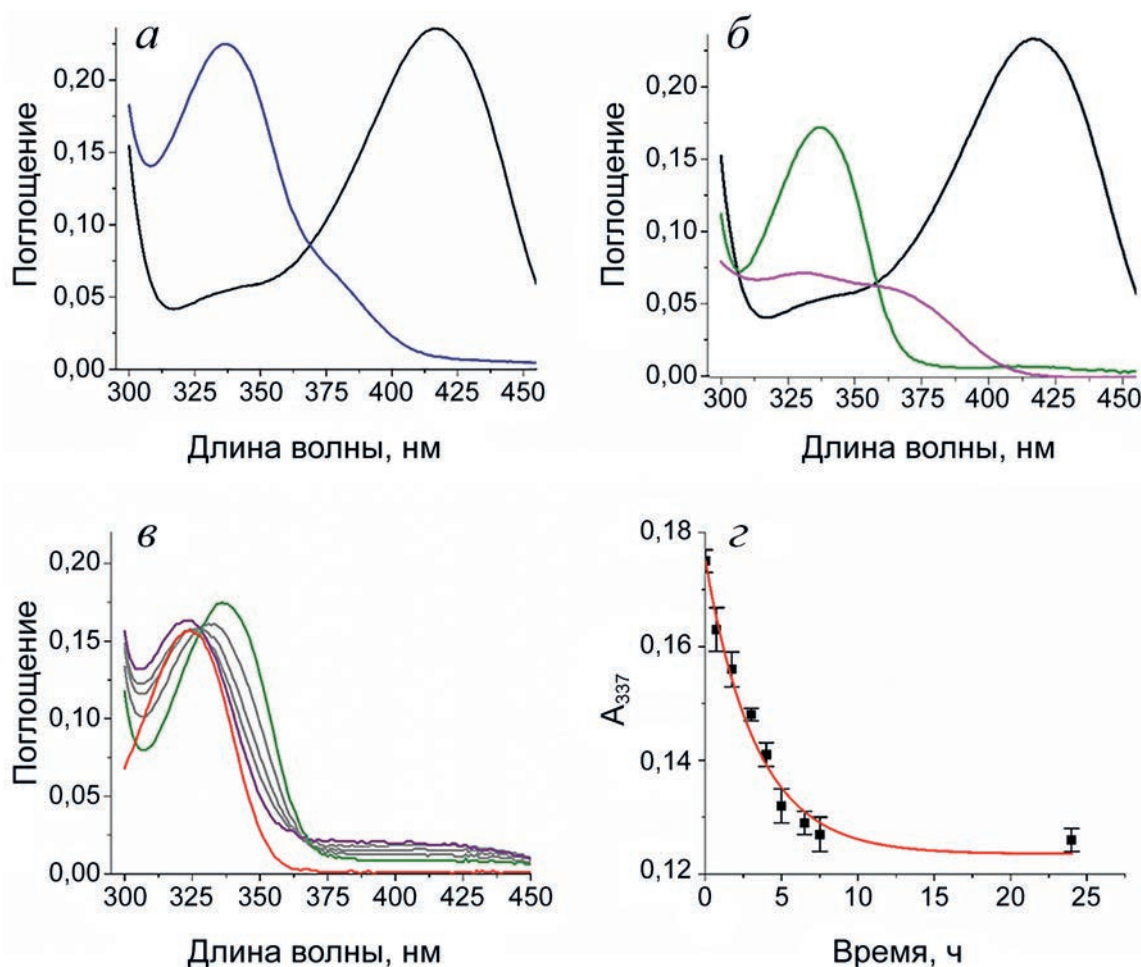


Рис. 2. Взаимодействие PLP-формы TA_Halhy (25 мкМ) с D-циclosеринном в концентрации 25 мМ при 40 °С: а – спектр поглощения PLP-формы TA_Halhy до (чёрный) и после 30 мин инкубирования с D-циclosеринном (синий); б – спектр поглощения PLP-формы TA_Halhy до (чёрный) и после 30 мин инкубирования с D-циclosеринном с последующим переводом в новый буфер (зелёный), спектр поглощения низкомолекулярной фракции (розовый); в – изменения в спектре поглощения продуктов взаимодействия PLP-формы TA_Halhy с D-циclosеринном после 30 мин инкубирования: сразу после смены буфера (зелёный), через 2, 4, 6 ч (серый) и через 24 ч (фиолетовый), спектр поглощения свободного РМР в концентрации 25 мкМ (красный); г – зависимость поглощения при 337 нм от времени (из спектров на рис. 2, в): экспериментальные значения показаны точками и представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, аппроксимация показана красной линией

щения РМР, связанного в активном центре TA_Halhy, имеет максимум при 337 нм, спектр поглощения свободного РМР в К-фосфатном буфере (рН 8,0) имеет максимум при 324 нм (рис. 2, в)). Наблюдаемая константа скорости накопления свободного РМР составила $0,37 \pm 0,07 \text{ ч}^{-1}$ (рис. 2, г). Таким образом, в результате проведённого спектрального анализа установлено взаимодействие D-циclosерина с кофактором PLP в активном центре TA_Halhy, определены продукты взаимодействия, их постепенное разложение и, как следствие, накопление в растворе свободного РМР и апоформы TA_Halhy.

Анализ продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циclosеринном провели методом флуоресцентной спектроскопии. Спектр флуоресценции продуктов взаимодействия при воз-

буждении на 337 нм имел максимумы при 390 и 450 нм, при возбуждении на 380 нм – имел максимум при 450 нм (рис. 3), что соответствовало оксиму [26]. Максимум при 390 нм принято относить к аддуктам PLP с низкомолекулярными соединениями с sp³-гибридизацией C4'-атома PLP (циклический кетимин, раскрытый кетимин, изоксазол и РМР; схема) [26, 27]. Спектр флуоресценции продуктов взаимодействия после смены буфера при возбуждении на 337 нм имел один максимум при 390 нм. Спектры флуоресценции низкомолекулярной фракции при возбуждении на 337 нм и 380 нм соответствовали нескольким продуктам: оксиму, характеризующемуся максимумом флуоресценции при 450 нм [26], и аддуктам с sp³-гибридизацией C4'-атома, характеризующимся максимумом флуоресценции

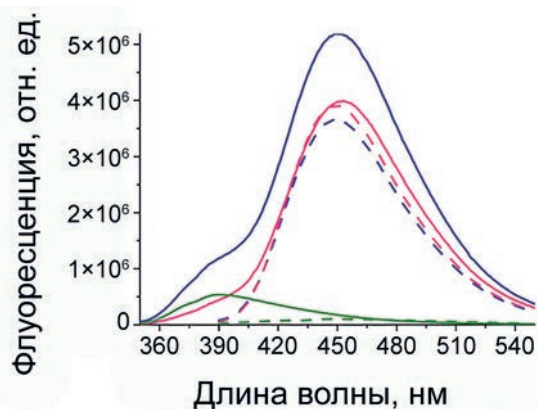


Рис. 3. Спектры флуоресценции продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циклосерином до (синий) и после смены буфера (зелёный), спектр флуоресценции низкомолекулярной фракции (розовый) при длинах волн возбуждения 337 нм (сплошная линия) и 380 нм (пунктирная линия)

при 390 нм [26, 27] (рис. 3). Таким образом, проведённый анализ подтвердил наличие среди продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циклосерином оксима и аддуктов с sp³-гибридизацией C4'-атома, причём оксим полностью высвобождается из активного центра фермента в раствор, а соединения с sp³-гибридизацией C4'-атома кофактора высвобождаются частично.

Анализ обратимости ингибирования. Обратимость ингибирования анализировали по регенерации PLP-формы TA_Halhy при добавлении к продуктам взаимодействия TA_Halhy с D-циклосерином как PLP, так и субстрата α -кетоглутарата. Для начала PLP-форму TA_Halhy (25 мкМ) выдерживали с 25 мМ D-циклосерином в 50 мМ К-фосфатном буфере (pH 8,0) при 40 °С в течение 30 мин и далее обновляли

буфер. К продуктам взаимодействия добавляли свободный PLP в концентрации 250 мкМ, что приводило в течение часа к полной регенерации PLP-формы фермента (рис. 4, а). Спектральные изменения указывали на вытеснение аддукта PLP и D-циклосерина молекулой PLP в активном центре TA_Halhy с образованием внутреннего альдимины с максимумом поглощения при 416 нм. При инкубировании продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циклосерином с субстратом α -кетоглутаратом в концентрации 10 мМ в спектре продуктов исчезал максимум поглощения при 337 нм и одновременно увеличивалось поглощение при 416 нм, что указывало на регенерацию PLP-формы фермента (рис. 4, б). Наблюдаемая константа скорости регенерации PLP-формы TA_Halhy составила $0,32 \pm 0,02 \text{ ч}^{-1}$ (рис. 4, в). Поскольку регенерация PLP-формы трансаминаз субстратом α -кетоглутаратом возможна только в полуреакции с РМР-формой фермента, то наблюдаемая регенерация субстратом PLP-формы TA_Halhy указывает на постепенное разложение продуктов взаимодействия до β -аминоксипирувата и РМР в активном центре фермента (схема) и дальнейшее превращение РМР в PLP в полуреакции с α -кетоглутаратом. Сходство величин наблюдаемых констант скоростей регенерации PLP-формы фермента и накопления свободного РМР в растворе указывает на общую лимитирующую стадию обоих процессов – образование РМР в активном центре фермента.

Анализ структуры комплекса TA_Halhy с D-циклосерином. Кристаллы комплекса TA_Halhy с D-циклосерином принадлежат к пространственной группе C2. Пространственная структура комплекса установлена с разрешением 1,4 Å

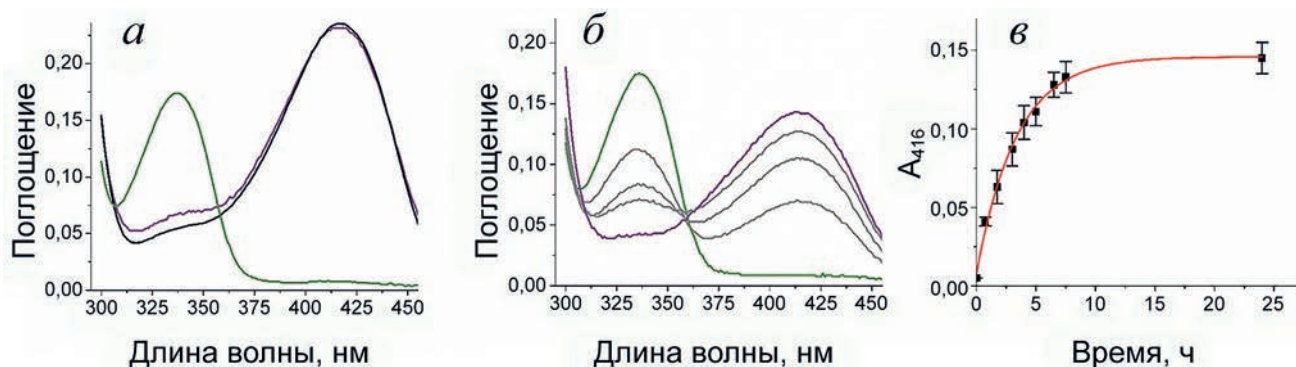


Рис. 4. Регенерация PLP-формы TA_Halhy: а – спектр поглощения 25 мкМ PLP-формы TA_Halhy до (чёрный) и после 30 мин инкубирования с D-циклосерином в концентрации 25 мМ с последующим обновлением буфера (зелёный), после добавления PLP в концентрации 250 мкМ и повторной сменой буфера через 1 ч (фиолетовый); б – спектр поглощения 25 мкМ PLP-формы TA_Halhy после 30 мин инкубирования с D-циклосерином в концентрации 25 мМ с последующей сменой буфера (зелёный) и после добавления 10 мМ α -кетоглутарата через 2, 4, 6 ч (серый), и через 24 ч (фиолетовый); в – зависимость поглощения при 416 нм от времени (из спектров на рис. 4, б): экспериментальные значения показаны точками и представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, аппроксимация показана красной линией

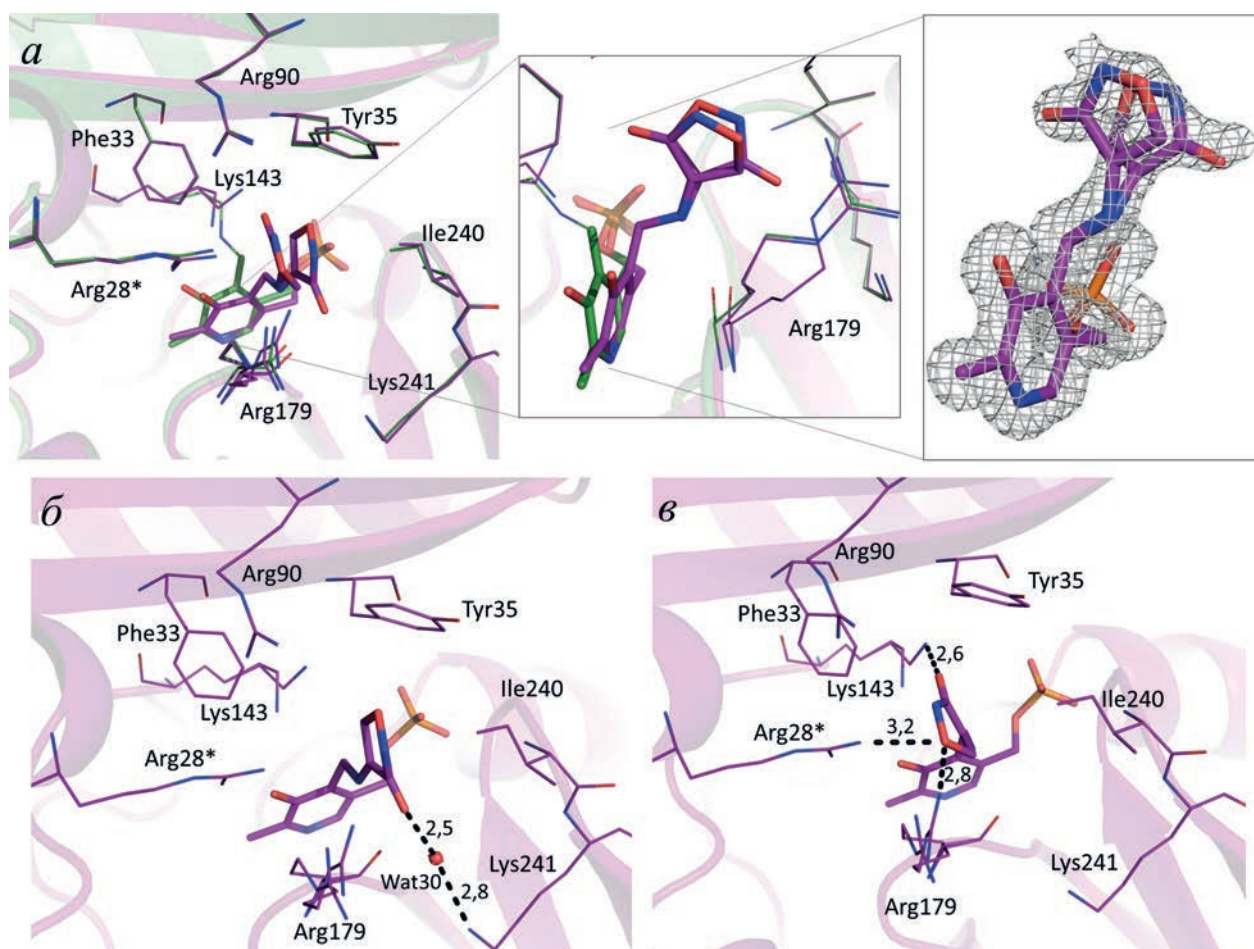


Рис. 5. Активный центр TA_Halhy в комплексе с D-циclosеринном: *a* – наложение структур комплекса TA_Halhy с D-циclosеринном (розовый; PDB код: 8AHU) и холоформы TA_Halhy (зелёный; PDB код: 7P7X), электронная плотность 2Fo-Fc на уровне срезки 1,0 σ вокруг циклического кетимина; *б* и *в* – взаимодействие циклического кетимина с остатками активного центра TA_Halhy в двух положениях (*б* и *в*) с заселённостью 0,45 и 0,55 соответственно. Молекула PLP и циклического кетимина представлены палочковой моделью, остатки активного центра представлены проволоочной моделью, электронная плотность показана сетчатой поверхностью, водородные связи показаны чёрными пунктирными линиями, длины водородных связей указаны в ангстремах. * Остатки соседней субъединицы гомодимера

и представляет собой гомодимер (PDB код: 8AHU), аналогичный гомодимеру холоформы TA_Halhy (PDB код: 7P7X), RMSD по C α -атомам не превышает 0,18 Å. Боковые группы большинства остатков, формирующих активный центр, при связывании D-циclosерина не поменяли своих положений, конформационные изменения наблюдались только для боковой группы Arg179, которая имеет два положения, и для боковой группы каталитического Lys143, которая в структуре комплекса TA_Halhy с D-циclosеринном не образует ковалентной связи с кофактором (рис. 5, *a*). Таким образом, связывание D-циclosерина не приводит к реорганизации белковой глобулы TA_Halhy, наблюдаемые изменения ограничиваются конформационными изменениями боковых групп в активном центре.

Электронная плотность, обнаруженная в активном центре TA_Halhy, соответствует двум конформациям аддукта циклического D-ци-

лосерина с молекулой PLP, при этом ковалентных связей аддукта с остатками активного центра TA_Halhy не обнаружено (рис. 5, *a*). Карбонильные атомы кислорода двух конформаций аддукта ориентированы в противоположные стороны (рис. 5, *a*). D-Циклосерин в аддукте сохранил циклическую форму, однако его кольцо не является плоским, другими словами, образование ароматического изоксазола не произошло. Детальный анализ положения аддукта в активном центре фермента показал, что плоскость пиридинового кольца молекулы кофактора отклонилась от Lys143 в сторону Arg179 на угол около 20° относительно оси, проходящей по связи C6-N1 (рис. 5, *a*). Эти изменения подтверждают реакцию между PLP и D-циclosеринном, т.к. такое смещение кофактора характерно для трансаминаз после разрыва связи кофактора с каталитическим лизином в ходе полуреакции с аминокислотой [29, 30]. Двугранный угол C3-C4-C4A(C4')-N в струк-

туре комплекса TA_Halhy с D-цикloserином составил $\sim 84^\circ$, что указывает на переход C4'-атома PLP в sp³-гибридизацию, т.е. на образование циклического кетимина. Данный угол в структурах ингибиторных комплексов трансаминаз с sp²-гибридизацией C4'-атома PLP составляет 0–40° [29, 31] и, таким образом, соответствует сопряжённой π -электронной системе между двойной связью C4' = N и пиридиновым кольцом, т.е. образованию внешнего альдими́на или оксима. Изменение гибри́дизации C4'-атома дополнительно подтверждается обесцвечиванием кристаллов PLP-формы TA_Halhy при вымачивании в растворе D-цикloserина. В активном центре TA_Halhy аддукт PLP и D-цикloserина координируется несколькими водородными связями, которые, однако, различаются для каждого из двух положений аддукта. Так, в одном положении атом кислорода карбонильной группы D-цикloserина координирован боковой группой Lys241 через молекулу воды Wat30 (рис. 5, б). Во втором положении боковые группы Arg28* и Arg179 (* – остаток, принадлежащий соседней субъединице) образуют две водородные связи с атомом O γ , а N ϵ -атом боковой группы каталитического остатка лизина образует водородную связь с атомом кислорода карбонильной группы D-цикloserина (рис. 5, в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведённых экспериментов установлено, что D-цикloserин обратимо ингибирует трансаминазу D-аминокислот из *H. hydrossis*, при этом D-цикloserин медленно связывается с ферментом. Подтверждено образование трёх продуктов взаимодействия: оксима, циклического кетимина и РМР. Образование оксима не является необратимым ингибированием для TA_Halhy, так как образующаяся в результате диссоциации оксима апоформа фермента полностью переходит в активную PLP-форму при добавлении PLP. Остальные соединения (циклический альдимин, раскрытый альдимин и раскрытый кетимин) также образуются в ходе взаимодействия, так как, согласно схеме, накопление РМР возможно только в результате превращения этих соединений. Изоксазол среди продуктов взаимодействия не обнаружен. Тем не менее, принимая во внимание подтверждённую недавно обратимость стадии превращения циклического кетимина в изоксазол [7], обратимое образование изоксазола из циклического кетимина не исключено и для TA_Halhy.

Активная PLP-форма TA_Halhy может быть восстановлена двумя путями: избытком кофактора PLP, в результате вытеснения аддуктов PLP и D-цикloserина из активного центра фермента, и избытком α -кетоглутарата, в результате образования РМР и его последующего перехода в PLP-форму в полуреакции с α -кетоглутаратом. Следует отметить, что описанная в данной работе регенерация PLP-формы TA_Halhy добавлением PLP в концентрации 250 мкМ не имеет биологического смысла, так как физиологическая концентрация PLP в клетке не превышает 1 мкМ [32]. Однако регенерация PLP-формы TA_Halhy избытком кетосубстрата α -кетоглутарата возможна и в клетке, так как разложение кетимина (как циклического, так и раскрытого) с образованием РМР-формы фермента протекает спонтанно, а концентрация свободного α -кетоглутарата в клетке достигает 2 мМ [33].

Опираясь на схему, механизм ингибирования TA_Halhy D-цикloserином можно представить следующим образом: в активном центре аминокислот D-цикloserина замещает боковую группу каталитического лизина с образованием внешнего циклического альдими́на, который далее обратимо превращается в циклический кетимин, а через раскрытый альдимин – в оксим или раскрытый кетимин с последующим разложением до РМР и β -амино-оксипировата с дальнейшим высвобождением продуктов из активного центра фермента. Значение кажущейся константы диссоциации комплекса TA_Halhy с D-цикloserином составляет $2,1 \pm 0,4$ мкМ и значительно ниже, чем значения используемых концентраций субстратов в трансаминазной реакции (5 мМ D-аланина и 2 мМ α -кетоглутарата) и чем значения констант Михаэлиса для данных субстратов (K_m составляет 23 ± 1 и $2,3 \pm 0,2$ мМ для D-аланина и α -кетоглутарата соответственно [18]).

Поскольку D-цикloserин взаимодействует с ферментом аналогично субстратам (D-аминокислотам), анализ положения циклического кетимина в активном центре TA_Halhy позволил уточнить остатки, способные связывать субстрат в активном центре фермента. В связывании D-цикloserина в активном центре TA_Halhy участвуют боковые группы четырёх остатков: Arg28*, Lys143, Arg179 и Lys241 (* – остаток, принадлежащий соседней субъединице). Для сравнения, в активном центре канонической трансаминазы из *Bacillus* sp. D-цикloserин координирован боковыми группами остатков Tyr31, Arg98*, His100* канонической триады, образующей сайт связывания α -карбоксильной группы субстратов [1].

Полученный комплекс ТА_Halhy с D-цикло-серином указывает на неканонический тип связывания α -карбоксильной группы в активном центре ТА_Halhy с участием удалённых в пространстве остатков Arg28*, Arg179 и Lys241. Участие каталитического Lys143 в связывании D-циклосерина является результатом незавершённости полуреакции и артефактом кристаллизации.

Таким образом, несмотря на отличную от канонической организацию активного центра, трансаминаза D-аминокислот из *H. hydrossis* ингибируется D-циклосерином. Связывание D-циклосерина в активном центре фермента отличается от описанных ранее вариантов связывания субстратов в активном центре трансаминаз. D-Циклосерин является эффективным, но обратимым ингибитором трансаминазы из *H. hydrossis*. Обобщая, стоит отметить, что наблюдаемая для разнообразных PLP-зависимых ферментов обратимость ингибирования D-циклосерином и восстановление их активности избытком кофактора или субстрата снижает эффективность применения D-циклосерина как антибактериального препарата, однако не отменяет использование D-циклосерина как регулятора активности ферментов в биохимических экспериментах и при разработке биотехнологических процессов.

Вклад авторов. А.К. Бакунова — планирование экспериментов; Е.Ю. Безсуднова и В.О. Попов — концепция и руководство работой; А.К. Бакунова, А.Ю. Николаева, И.О. Матюта, К.М. Бойко — проведение экспериментов; А.К. Бакунова, И.О. Матюта, К.М. Бойко, Е.Ю. Безсуднова — обсуждение результатов исследования; А.К. Бакунова, Е.Ю. Безсуднова — написание текста; А.К. Бакунова, К.М. Бойко, А.Ю. Николаева, Е.Ю. Безсуднова, В.О. Попов — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00164) в части проведения кинетических экспериментов и кристаллизации комплекса, решения и уточнения структуры. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в части проведения спектральных исследований. Рентгеноструктурный эксперимент выполнен при поддержке Федерального космического агентства (проект КЭ (ЦР) «Кристаллизатор»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peisach, D., Chipman, D. M., Van Ophem, P. W., Manning, J. M., and Ringe, D. (1998) D-Cycloserine inactivation of D-amino acid aminotransferase leads to a stable noncovalent protein complex with an aromatic cycloserine-PLP derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2268-2274, doi: 10.1021/ja973353f.
2. Fenn, T. D., Stamper, G. F., Morollo, A. A., and Ringe, D. (2003) A side reaction of alanine racemase: transamination of cycloserine, *Biochemistry*, **42**, 5775-5783, doi: 10.1021/bi02702 2d.
3. Amorim Franco, T. M., Favrot, L., Vergnolle, O., and Blanchard, J. S. (2017) Mechanism-based inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* branched-chain aminotransferase by d- and l-cycloserine, *ACS Chem. Biol.*, **12**, 1235-1244, doi: 10.1021/acscchembio.7b00142.
4. Dindo, M., Grottelli, S., Annunziato, G., Giardina, G., Pieroni, M., Pampalona, G., Faccini, A., Cutruzzolà, F., Laurino, P., Costantino, G., and Cellini, B. (2019) Cycloserine enantiomers are reversible inhibitors of human alanine:glyoxylate aminotransferase: implications for Primary Hyperoxaluria type 1, *Biochem. J.*, **476**, 3751-3768, doi: 10.1042/BCJ20190507.
5. Malashkevich, V. N., Strop, P., Keller, J. W., Jansonius, J. N., and Toney, M. D. (1999) Crystal structures of dialkylglycine decarboxylase inhibitor complexes, *J. Mol. Biol.*, **294**, 193-200, doi: 10.1006/jmbi.1999.3254.
6. Caminero, J. A., Sotgiu, G., Zumla, A., and Migliori, G. B. (2010) Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, *Lancet. Infect. Dis.*, **10**, 621-629, doi: 10.1016/S1473-3099(10)70139-0.
7. De Chiara, C., Homšak, M., Prosser, G. A., Douglas, H. L., Garza-Garcia, A., Kelly, G., Purkiss, A. G., Tate, E. W., and de Carvalho, L. P. S. (2020) D-Cycloserine destruction by alanine racemase and the limit of irreversible inhibition, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 686-694, doi: 10.1038/s41589-020-0498-9.
8. Priyadarshi, A., Lee, E. H., Sung, M. W., Nam, K. H., Lee, W. H., Kim, E. E., and Hwang, K. Y. (2009) Structural insights into the alanine racemase from *Enterococcus faecalis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 1030-1040, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.03.006.
9. Noda, M., Matoba, Y., Kumagai, T., and Sugiyama, M. (2004) Structural evidence that ala-

- nine racemase from a D-cycloserine-producing microorganism exhibits resistance to its own product, *J. Biol. Chem.*, **279**, 46153-46161, doi: 10.1074/jbc.M404605200.
10. Wu, D., Hu, T., Zhang, L., Chen, J., Du, J., Ding, J., Jiang, H., and Shen, X. (2008) Residues Asp164 and Glu165 at the substrate entryway function potently in substrate orientation of alanine racemase from *E. coli*: enzymatic characterization with crystal structure analysis, *Protein Sci.*, **17**, 1066-1076, doi: 10.1110/ps.083495908.
11. Tassoni, R., van der Aart, L. T., Ubbink, M., van Wezel, G. P., and Pannu, N. S. (2017) Structural and functional characterization of the alanine racemase from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **483**, 122-128, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.183.
12. Duff, S. M. G., Rydel, T. J., McClerren, A. L., Zhang, W., Li, J. Y., Sturman, E. J., Halls, C., Chen, S., Zeng, J., Peng, J., Kretzler, C. N., and Evdokimov, A. (2012) The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure, *Arch. Biochem. Biophys.*, **528**, 90-101, doi: 10.1016/j.abb.2012.06.006.
13. Bharath, S. R., Bisht, S., Harijan, R. K., Savithri, H. S., and Murthy, M. R. N. (2012) Structural and mutational studies on substrate specificity and catalysis of *Salmonella typhimurium* D-cysteine desulfhydrase, *PLoS One*, **7**, e36267, doi: 10.1371/journal.pone.0036267.
14. Braunstein, A. E. (1973) Amino group transfer, *The enzymes*, (Boyer, P., ed.) Academic Press, N.Y., pp. 379-481, doi: 10.1016/S1874-6047(08)60122-5.
15. Eliot, A. C., and Kirsch, J. F. (2004) Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 383-415, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074021.
16. Toney, M. D. (2011) Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1814**, 1407-1418, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.05.019.
17. Soper, T. S., and Manning, J. M. (1981) Different modes of action of inhibitors of bacterial D-amino acid transaminase. A target enzyme for the design of new antibacterial agents, *J. Biol. Chem.*, **256**, 4263-4268, doi: 10.1016/s0021-9258(19)69428-7.
18. Bakunova, A. K., Nikolaeva, A. Y., Rakitina, T. V., Isaikina, T. Y., Khrenova, M. G., Boyko, K. M., Popov, V. O., and Bezsudnova, E. Y. (2021) The uncommon active site of D-amino acid transaminase from *Halicomonobacter hydrossis*: biochemical and structural insights into the new enzyme, *Molecules*, **26**, 5053, doi: 10.3390/molecules26165053.
19. Morrison, J. F., and Walsh, C. T. (1998) The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **61**, 201-301, doi: 10.1002/9780470123072.ch5.
20. Winter, G., Waterman, D. G., Parkhurst, J. M., Brewster, A. S., Gildea, R. J., Gerstel, M., Fuentes-Montero, L., Vollmar, M., Michels-Clark, T., Young, I. D., Sauter, N. K., and Evans, G. (2018) DIALS: implementation and evaluation of a new integration package, *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, **74**, 85-97, doi: 10.1107/S2059798317017235.
21. Collaborative Computational Project, N. 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **50**, 760-763, doi: 10.1107/S0907444994003112.
22. Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement, *J. Appl. Crystallogr.*, **30**, 1022-1025, doi: 10.1107/S0021889897006766.
23. Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., and Vagin, A. A. (2011) REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 355-367, doi: 10.1107/S0907444911001314.
24. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2126-2132, doi: 10.1107/S0907444904019158.
25. Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2256-2268, doi: 10.1107/S0907444904026460.
26. Beeler, T., and Churchich, J. E. (1976) Reactivity of the phosphopyridoxal groups of cystathionase, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5267-5271, doi: 10.1016/S0021-9258(17)33156-3.
27. Honikel, K. O., and Madsen, N. B. (1972) Comparison of the absorbance spectra and fluorescence behavior of phosphorylase b with that of model pyridoxal phosphate derivatives in various solvents, *J. Biol. Chem.*, **247**, 1057-1064, doi: 10.1016/S0021-9258(19)45615-9.
28. Delbaere, L. T. J., Kallen, J., Markovic-Housley, Z., Khomutov, A. R., Khomutov, R. M., Karpeisky, M. Y., and Jansonius, J. N. (1989) Complexes of aspartate aminotransferase with hydroxylamine derivatives: spectral studies in solution and in the crystalline state, *Biochimie*, **71**, 449-459, doi: 10.1016/0300-9084(89)90175-2.
29. Okada, K., Hirotsu, K., Hayashi, H., and Kagamiyama, H. (2001) Structures of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase and its complexes with 4-methylvalerate and 2-methylleucine: induced fit and substrate recognition of the enzyme, *Biochemistry*, **40**, 7453-7463, doi: 10.1021/bi010384l.
30. Peisach, D., Chipman, D. M., Van Ophem, P. W., Manning, J. M., and Ringe, D. (1998) Crystallographic study of steps along the reaction pathway of D-amino

- acid aminotransferase, *Biochemistry*, **37**, 4958-4967, doi: 10.1021/bi972884d.
31. Marković-Housley, Z., Schirmer, T., Hohenester, E., Khomutov, A. R., Khomutov, R. M., Karpeisky, M. Y., Sandmeier, E., Christen, P., and Jansonius, J. N. (1996) Crystal structures and solution studies of oxime adducts of mitochondrial aspartate aminotransferase, *Eur. J. Biochem.*, **236**, 1025-1032, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.01025.x.
 32. Di Salvo, M. L., Contestabile, R., and Safo, M. K. (2011) Vitamin B(6) salvage enzymes: mechanism, structure and regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 1597-1608, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.12.006.
 33. Thirstrup, K., Christensen, S., Møller, H. A., Ritzén, A., Bergström, A. L., Sager, T. N., and Jensen, H. S. (2011) Endogenous 2-oxoglutarate levels impact potencies of competitive HIF prolyl hydroxylase inhibitors, *Pharmacol. Res.*, **64**, 268-273, doi: 10.1016/j.phrs.2011.03.017.

MECHANISM OF D-CYCLOSERINE INHIBITION OF D-AMINO ACID TRANSAMINASE FROM *Haliscomenobacter hydrossis*

A. K. Bakunova^{1*}, I. O. Matyuta¹, A. Yu. Nikolaeva^{1,2}, K. M. Boyko¹,
V. O. Popov^{1,3}, and E. Yu. Bezsudnova^{1*}

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; e-mail: a.bakunova@fbras.ru, eubez@inbi.ras.ru*

² *Kurchatov Complex of NBICS-Technologies, National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia*

³ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

D-cycloserine inhibits pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent enzymes. The inhibition efficiency depends on the organization of their active center and the mechanism of the catalyzed reaction. D-cycloserine interacts with the PLP form of enzyme similarly to substrate amino donor, and the interaction is predominantly reversible. Inhibition products include hydroxyisoxazole-pyridoxamine-5'-phosphate, oxime between PLP and β -aminoxy-D-alanine, ketimine between pyridoxamine-5'-phosphate and cyclic or open forms of D-cycloserine, pyridoxamine-5'-phosphate, etc. For some enzymes the formation of a stable aromatic product – hydroxyisoxazole can lead to irreversible D-cycloserine inhibition at certain pH value. The aim of this work was to study the mechanism of D-cycloserine inhibition of PLP-dependent D-amino acid transaminase from the bacterium *Haliscomenobacter hydrossis*. Spectral methods revealed several products of the interaction of D-cycloserine with PLP in the active site of transaminase: oxime between PLP and β -aminoxy-D-alanine, ketimine between pyridoxamine-5'-phosphate and cyclic or open forms of D-cycloserine, pyridoxamine-5'-phosphate. The formation of hydroxyisoxazole-pyridoxamine-5'-phosphate was not observed. The 3D structure of the complex of transaminase with D-cycloserine was obtained by X-ray diffraction analysis. In the active site of transaminase, a ketimine adduct between pyridoxamine-5'-phosphate and D-cycloserine in the cyclic form was found; the ketimine occupied two positions and was coordinated via hydrogen bonds with different active site residues. Using kinetic and spectral methods we have shown that D-cycloserine inhibition is reversible, and the activity of transaminase from *H. hydrossis* can be restored by adding an excess of keto substrate as well as by adding an excess of cofactor. The results obtained confirm the reversibility of D-cycloserine inhibition and the conversion of various adducts of D-cycloserine and PLP into each other.

Keywords: D-amino acid transaminase, D-cycloserine, reversible inhibition, fluorescence, X-ray diffraction analysis