

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ТРАНСАМИНАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ БАКТЕРИИ *Aminobacterium colombiense* С D-ЦИКЛОСЕРИНОМ

© 2023 г. С. А. Шилова^{1,*}, И. О. Матюта¹, Е. Ю. Безсуднова¹, М. Е. Миняев³,
А. Ю. Николаева^{1,2}, В. О. Попов¹, К. М. Бойко¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

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

³Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

*E-mail: zavvalovasonya@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.11.2022 г.

После доработки 08.11.2022 г.

Принята к публикации 14.11.2022 г.

D-циклосерин ингибирует пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты как обратимо, так и необратимо. Как ингибитор аланинрацемазы D-циклосерин применяется в лекарственной терапии при лечении туберкулеза. Известны несколько продуктов взаимодействия D-циклосерина и PLP в активном центре фермента. Представлена кристаллическая структура комплекса PLP-зависимой трансаминазы D-аминокислот из бактерии *Aminobacterium colombiense* (Amico) с D-циклосерином, полученная с разрешением 1.9 Å, в которой впервые обнаружен аддукт PLP и D-циклосерина с раскрытым кольцом. Кроме того, взаимодействие D-циклосерина и Amico охарактеризовано кинетическими и спектральными методами, определены разнообразные продукты взаимодействия D-циклосерина и PLP в активном центре трансаминазы, проанализирована координация аддуктов D-циклосерина и PLP в активном центре Amico. В ходе исследований установлено, что продуктами взаимодействия D-циклосерина с PLP в активном центре Amico являются несколько соединений, в том числе аддукты PLP и DCS в циклической и разомкнутой формах, оксим, образованный PMP и β-аминоокси-D-аланином, а также PMP и β-аминооксипируват.

DOI: 10.31857/S0023476123600775, EDN: HYQYFH

ВВЕДЕНИЕ

D-циклосерин ((4R)-4-амино-1,2-оксазолидин-3-он, DCS) — циклический аналог серина (рис. 1) — эффективно взаимодействует с пиридоксаль-5'-фосфатом (PLP) как в буфере, так и в активном центре PLP-зависимых ферментов, трансаминаз, аланинрацемаз и т.д. [1–4]. Ранее считалось, что DCS необратимо ингибирует PLP-зависимые ферменты с образованием ароматического аддукта гидроксиизоксазола и пиридоксамин-5'-фосфата (гидроксиизоксазол-PMP) [1, 4, 5]. Однако в настоящее время показано, что DCS может ингибировать PLP-зависимые ферменты как необратимо, так и обратимо в зависимости от условий реакции [2, 3, 6]. Реактивация фермента возможна как высокими концентрациями субстрата, так и путем вытеснения аддукта DCS и PLP избытком свободного PLP при определенных значениях pH [2, 6, 7]. В лекарственной терапии DCS относят к антибиотикам: ингибируя PLP-зависимую аланинрацемазу, DCS подавляет формирование кле-

точной стенки бактерий [8, 9]. Применяется в лечении туберкулеза [10].

Охарактеризованные масс-спектрометрически и спектральными методами аддукты DCS и PLP представляют собой разнообразные по структуре соединения и включают в себя как производные циклической формы DCS (внешний альдимин 1, кетимин 1 и гидроксиизоксазол), так и продукты раскрытия цикла в результате гидролиза амидной связи и последующей перегруппировки (внешний альдимин 2, кетимин 2 и оксим, образованный PLP и β-аминоокси-D-аланином (оксим)) (рис. 1) [2, 6]. Аддукт гидроксиизоксазол-PMP наиболее стабильная из циклических форм DCS, которая, однако, находится в равновесии с внешним альдимином 1 (рис. 1) [2]. При взаимодействии DCS с PLP в форме внутреннего альдимины в аланинрацемазе образуется аддукт гидроксиизоксазол-PMP, который затем через ряд промежуточных соединений внешний альдимин 1, внешний альдимин 2 и т.д. превращается в

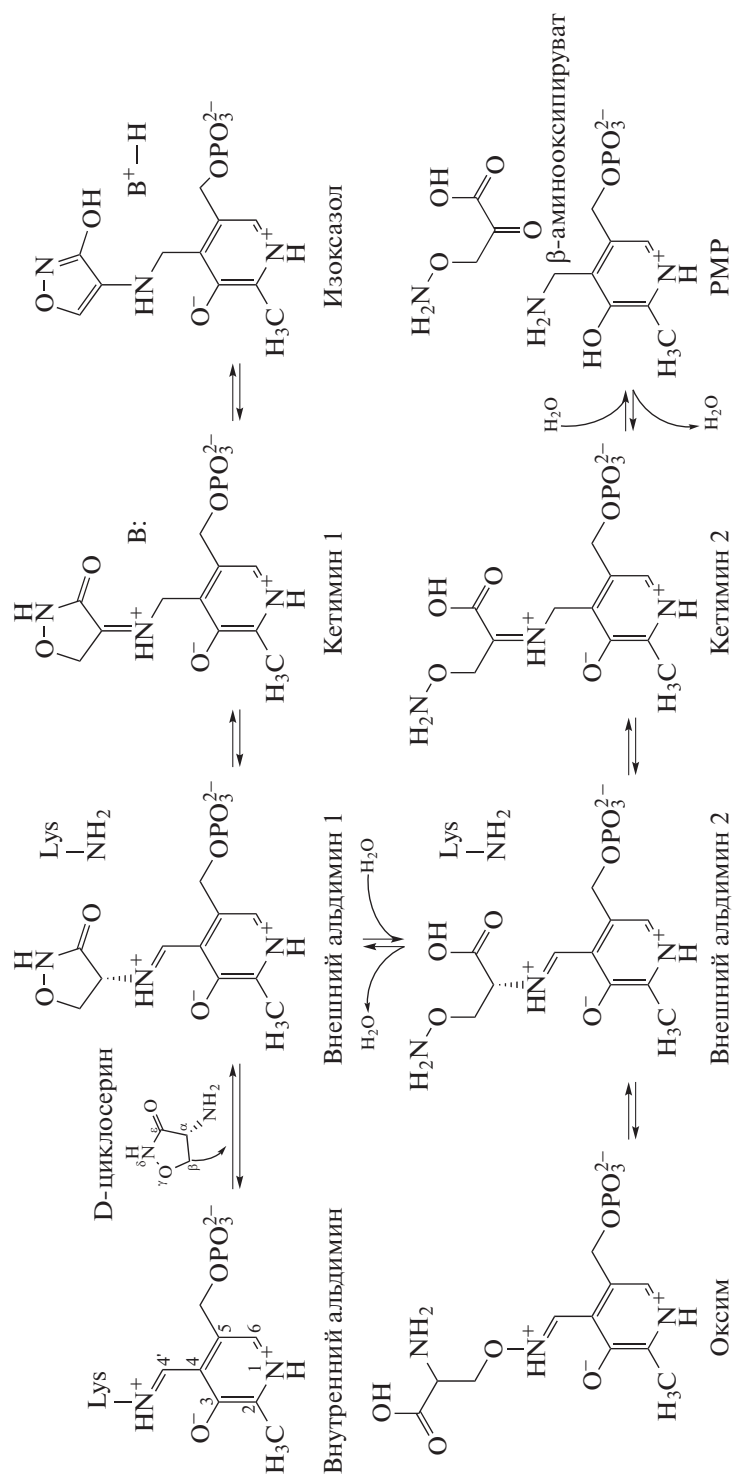


Рис. 1. Схема взаимодействия кофактора РЛР с DCS в активном центре РЛР-зависимых ферментов [4, 6].

оксим или изомеризуется в кетиминную форму и гидролизуется до РМР и β -аминооксипирувата (рис. 1) [2, 6].

Известны несколько кристаллических структур комплексов PLP-зависимых ферментов с DCS. Среди них комплексы с трансаминазой разветвленных L-аминокислот из *Mycobacterium tuberculosis* (PDB ID 5U3F), с аланинрацемазой из *M. tuberculosis* (PDB ID 1XFC) и *Streptomyces lavendulae* (PDB ID: 1VFS), а также с трансаминазой D-аминокислот из *Bacillus* sp.YM-1 (PDB ID 2DAA). Во всех структурах в активном центре ферментов находится аддукт гидроксиизоксазол-РМР. Также в результате сокристаллизации PLP-формы аланин:глиоксилат аминотрансферазы человека с DCS была получена структура фермента с кофактором в форме РМР в активном центре (PDB ID 6RV0) [6]. В настоящей работе в активном центре трансаминазы D-аминокислот из бактерии *Amicobacterium colombiense* (**Amico**) впервые обнаружен другой аддукт: соединение кофактора и DCS в разомкнутой форме в виде кетимина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование, экспрессия и очистка Amico. Нуклеотидная последовательность гена *Amico*_1844 была взята из базы данных NCBI и оптимизирована для экспрессии в клетках *E. coli* с помощью Web-сервиса Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>). На 5'- и 3'-концы последовательности добавляли сайты эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII соответственно. Синтетический ген (ООО "АТГ Сервис Ген" (Санкт-Петербург, Россия)) в составе модифицированного вектора pET-21d [11] был встроен в клетки *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS. Трансформированные клетки растели в среде LB/ампициллин при 37°C до $A_{600} = 0.8$, индуцировали экспрессию 0.2 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) и инкубировали при 30°C в течение 18 ч. Далее клетки центрифугировали и ресуспендировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 10% глицерина, 5 мМ β -меркаптоэтанола, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 0.5 М мочевины и 100 мкМ PLP, и разрушали ультразвуком. Клеточный экстракт центрифугировали при 18 500 g в течение 45 мин и наносили супернатант на колонку HisTrap HP (Cytiva, США), уравновешенную 50 мМ калий-фосфатным буфером, pH 8.0, содержащим 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида и 0.1% тритона X-100. Рекombинантный Amico с His₆TEV-тагом на N-конце элюировали линейным градиентом имидазола (20–500 мМ) в том же буфере без фенилметилсульфонилфторида и Тритона X-100. Собранную фракцию фермента инкубировали с 300 мкМ PLP при 25°C в течение 1 ч, затем добав-

ляли 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 10% глицерина, 5 мМ β -меркаптоэтанола и TEV-протеазу (1 мг на 10 мг белка), смесь инкубировали в течение 16 ч при 4°C, диализировали против 50 мМ калий-фосфатного буфера, pH 8.0, содержащего 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 10% глицерина и 20 мкМ PLP при 25°C в течение 2 ч и далее Amico отделяли от TEV-протеазы и продуктов гидролиза повторной металл-хелатной хроматографией с помощью колонки HisTrap HP (Cytiva). Собранную фракцию Amico концентрировали и наносили на колонку Superdex 200 10/300 GL (Cytiva), уравновешенную 20 мМ HEPES-буфером, pH 8.0, содержащим 50 мМ NaCl и 100 мкМ PLP. Собранную фракцию Amico (димера по результатам гель-фильтрации) разбавляли в 20 мМ HEPES-буфере, pH 8.0, до 2 мг/мл, наносили на колонку MonoQ 10/100 GL (Cytiva), уравновешенную 20 мМ HEPES, pH 8.0, и элюировали линейным градиентом NaCl (20–500 мМ). Собранные фракции Amico переносили в 20 мМ HEPES-буфер, pH 8.0, содержащий 50 мМ NaCl, 100 мкМ PLP и 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), и концентрировали до 17 мг/мл. Данную фракцию Amico хранили при –70°C и использовали для кристаллизации и биохимической характеристики.

Степень отщепления His₆-тага и чистоту белка анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{280} = 0.615$ мл/мг·см, рассчитанный с помощью Web-сервиса ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Определение активности Amico в полной реакции трансаминирования. Активность Amico определяли в полной реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом в 50 мМ CHES-буфере, pH 9.0, при 60°C по накоплению продукта реакции – пирувата. За накоплением пирувата следили по сопряженной ферментативной реакции восстановления пирувата лактатдегидрогеназой (ЛДГ) из мышц кролика (Roche, США) при участии восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH). Скорость реакции определяли спектрофотометрически по наклону начального линейного участка убыви оптической плотности при 340 нм от времени. Убыль при 340 нм соответствовала окислению кофактора NADH ($\epsilon_{340}(\text{NADH}) = 6.22 \text{ мМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$). Эксперимент проводили с использованием спектрофотометра SPECTROstar Omega (BMG Labtech GmbH, Германия). За единицу ферментативной активности (U) принимали количество образованного пирувата (мкмоль) в минуту. Стандартная реакционная смесь содержала 50 мМ D-аланина,

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки кристалла комплекса трансаминазы Amico с D-циклосерином

Пр. гр.	$P2_12_1$
$a, b, c, \text{\AA}$	61.97, 90.03, 100.29
α, β, γ , град	90.00, 90.00, 90.00
T , К	100
λ , $\text{\AA}$	0.9
Разрешение, $\text{\AA}$	21.15–1.90 (1.94–1.90)*
Число независимых рефлексов	44377 (2782)
Полнота набора, %	98.9 (94.7)
$I/\sigma(I)$	13.9 (0.5)
R_{pim} , %	5.7 (126)
$CC_{1/2}$, %	99.5 (41.7)

* В скобках приведены значения для последнего слоя высокого разрешения.

Таблица 2. Данные уточнения комплекса трансаминазы Amico с D-циклосерином

R_{fact} , %	21.9
R_{free} , %	26.2
Общий средний B -фактор	32.8
Средний B -фактор по белку	32.7
Средний B -фактор по лигандам	40.0
Средний B -фактор по растворителю	34.3
Число неводородных атомов	
Белок	4343
Лиганды	77
Растворитель	239
Всего	4659
Среднеквадратичные отклонения	
Длины связей, $\text{\AA}$	0.0116
Валентные углы, град	1.7570
График Рамачандрана	
Наиболее благоприятные, %	98.2
Допустимые, %	1.6
Код PDB	8AIE

5 мМ α -кетоглутарата, 60 мкМ PLP, 0.0025 мг/мл Amico, 0.33 мМ NADH и 4 U/мл ЛДГ. Реакцию запускали аминокислотой после прогревания реакционной смеси в течение 10 мин.

Ингибирование Amico DCS оценивали по значению концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) в стандартной реакции трансаминирования (описана выше). Концентрацию DCS варьировали в пределах 0.1–20 мМ.

Получение холоформы Amico. Amico (10 мг/мл) инкубировали с 600 мкМ PLP и 5 мМ пируватом при 25°C в течение 1 ч и далее переводили на колонке HiTrap (Cytiva) в 50 мМ CHES-буфер, pH 9.0.

Спектральный анализ взаимодействия Amico с DCS. Холоформу Amico (30 мкМ) инкубировали в 50 мМ CHES-буфере, pH 9.0, при 40°C в течение 1 ч с 30 мМ DCS. Продукты взаимодействия анализировали спектральными методами. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне длин волн 300–500 нм с использованием спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis (Thermo Scientific, США). Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне длин волн 350–570 нм при длине волны возбуждения 328 нм и в диапазоне длин волн 390–570 нм при длине волны возбуждения 380 нм с использованием спектрофлуориметра Fluoro-Max-4 (Horiba Scientific, Япония).

Кристаллизацию Amico проводили методом диффузии в парах (“висячая капля”) при 15°C. Состав противораствора: 0.2 М нитрата натрия, 0.1 М бис-трис-пропан, pH 6.5, 20% ПЭГ 3350. 17 мг/мл фермента смешивали с противораствором в отношении 1:1 (объем капли составлял 3 мкл). Кристаллы достигали максимального размера за 14 дней и представляли собой сростки неправильной огранки со средней длиной наибольшей грани ~100 мкм. Комплекс Amico с DCS получали путем настаивания кристалла холоформы в противорастворе, содержащем 100 мМ DCS, в течение 2 мин. Затем кристалл переносили в криораствор, содержащий противораствор и 20% этиленгликоля, и замораживали в парах жидкого азота.

Сбор данных, решение и уточнение. Дифракционный набор собирали при температуре 100 К на рентгеновском дифрактометре Rigaku XtaLAB Synergy-S в ИОХ РАН (Москва). Дифракционная картина фиксировалась детектором HyPix-3000. Обработку данных проводили при помощи программы CrysAlisPro [12] (табл. 1). Решение структуры проводили методом молекулярного замещения с использованием программы MOLREP [13] и структуры холоформы данного фермента (PDB ID – 8AHR) в качестве начальной модели. Для уточнения пространственной структуры использовали программу Refmac5 из комплекса CCP4 [14]. Визуальный контроль уточнения проводили в программе Coot [15]. Данные уточнения структуры приведены в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Взаимодействие DCS с Amico. Ингибирование DCS стандартной реакции трансаминирования, катализируемой Amico, характеризовали величиной IC_{50} , которая составила 3.4 ± 1.1 мМ при 60°C в 50 мМ CHES-буфере, pH 9.0. Продукты взаимо-

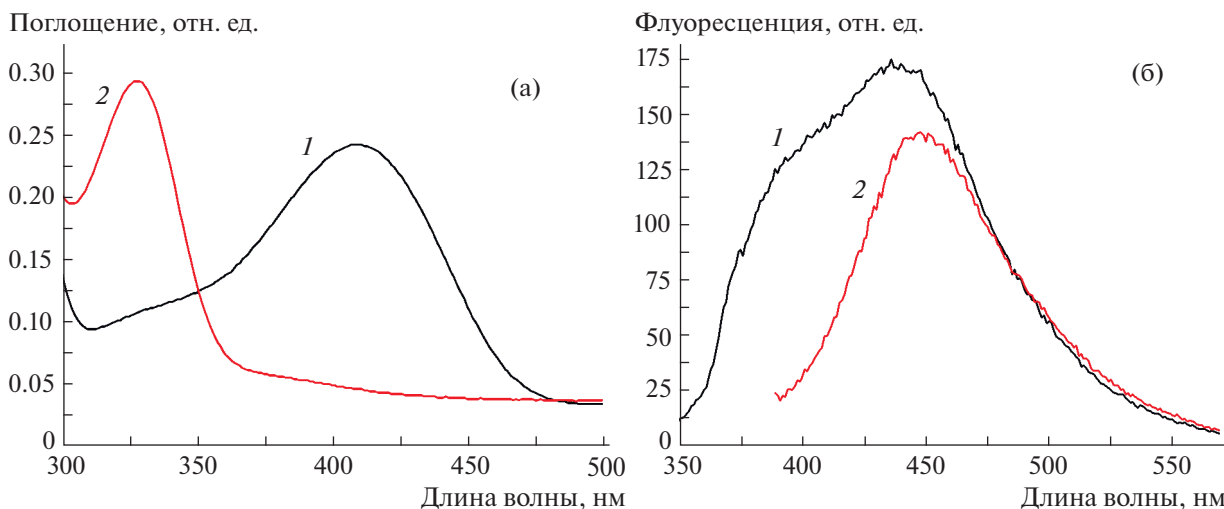


Рис. 2. Спектры поглощения и флуоресценции продуктов взаимодействия холоформы Amico с DCS: а – спектры поглощения 30 мкМ холоформы Amico (1) и 30 мкМ холоформы Amico после добавления 30 мМ DCS (2); б – спектры флуоресценции продуктов взаимодействия холоформы Amico (30 мкМ) и 30 мМ DCS при длине волны возбуждения 328 нм (1) и 380 нм (2).

действия DCS с холоформой Amico анализировали спектральными методами. Спектр поглощения холоформы Amico имеет максимум при 409 нм, соответствующий внутреннему альдиминому фермента (рис. 2). При добавлении DCS к холоформе Amico в спектре поглощения наблюдались снижение оптической плотности при 409 нм и появление максимума при 328 нм с плечом в области 380 нм (рис. 2а). Далее были проанализированы спектры флуоресценции продуктов взаимодействия DCS с холоформой Amico при длинах волн возбуждения, соответствующих максимумам на спектре поглощения – 328 и 380 нм. В спектрах флуоресценции смеси Amico с DCS наблюдались два максимума при 390 и 450 нм при длине волны возбуждения 328 нм и один максимум при 450 нм при длине волны возбуждения 380 нм (рис. 2б). Максимумы в спектре поглощения при 328 нм и в спектре флуоресценции при 390 нм (при возбуждении при 328 нм) соответствуют соединениям с sp^3 -гибридизацией C4'-атома кофактора [16], такими соединениями являются кофактор в форме пиридоксамин-5'-фосфата (PMP), аддукт гидроксиизоксазол-PMP, а также аддукты PLP и циклического или разомкнутого DCS в форме кетиминов (рис. 1). Плечо в спектре поглощения в области 380 нм и максимум в спектре флуоресценции при 450 нм соответствуют поглощению/эмиссии оксима, образованного PLP и β -аминоокси-D-аланином (рис. 1) [16]. Таким образом, из представленных на рис. 1 аддуктов PLP и DCS при взаимодействии DCS с PLP в активном центре Amico образуются кетимины (возможно кетимин 1 и кетимин 2), оксим и кофактор

в форме PMP, не исключено также образование аддукта гидроксиизоксазол-PMP.

Анализ структуры комплекса Amico с DCS. Кристаллы Amico относятся к орторомбической сингонии (пр. гр. $P2_12_12_1$). На независимую часть элементарной ячейки приходится две субъединицы фермента, образующие классический функциональный димер с двумя активными центрами [17]. Общая архитектура субъединицы Amico в комплексе с DCS совпадает с таковой у холоформы фермента (PDB ID: 8AHR) – RMSD по C α -атомам составляет 0.39 Å² (рис. 3а).

В обоих активных центрах димера Amico обнаружена электронная плотность, соответствующая аддукту кофактора PLP и DCS (рис. 3б, 3в). При взаимодействии DCS с внутренним альдимином происходит поворот плоскости кольца PLP относительно оси, проходящей через атомы N1 и C6, на 35° и 25° в сторону связываемого лиганда в субъединицах А и В соответственно (рис. 4а). Атом иминного азота отклонен от плоскости пиридинового кольца кофактора на 70° и 60° в субъединицах А и В соответственно, что исключает присутствие аддуктов в форме внутреннего альдимины [18, 19] и указывает на присутствие аддуктов – кетиминов. В субъединице А электронная плотность соответствует кетимину 1 (аддукту PLP и циклического DCS в лактамной форме, рис. 1) с заселенностью 0.65 (рис. 4б), а в субъединице В – кетимину 2 (аддукту PLP и разомкнутого DCS, рис. 1) с заселенностью 0.75 (рис. 4в). Второе состояние кофактора в обеих субъединицах одинаковое и соответствует молекуле PMP с заселенностями 0.35 и 0.25 в субъединицах А и В соответ-

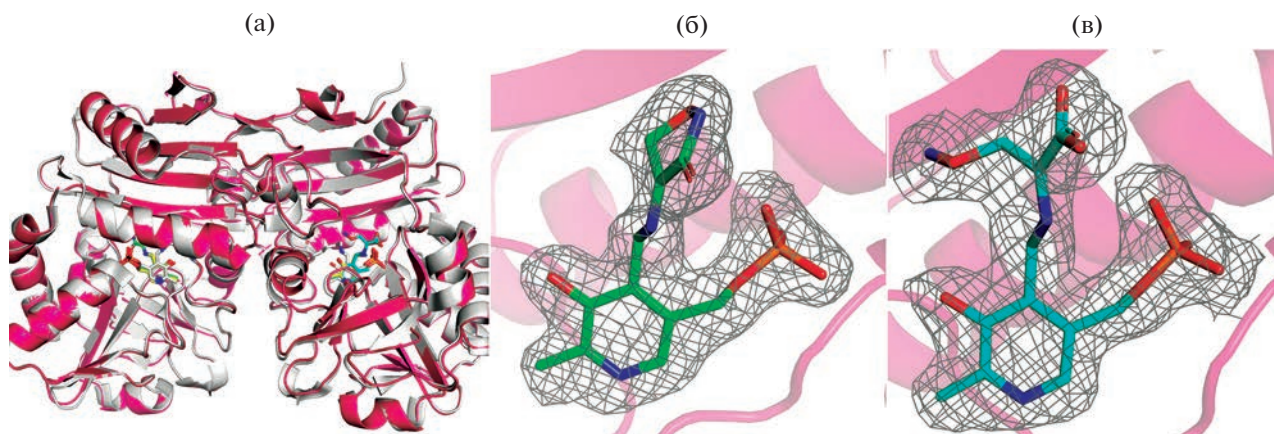


Рис. 3. Пространственная структура комплекса Amico с DCS: а — наложение функциональных димеров холоформы Amico (серый) и комплекса Amico с DCS (малиновый); б, в — электронные плотности аддуктов PLP и DCS в субъединицах А и В соответственно. Зеленым цветом показан аддукт PLP и циклического DCS, голубым — аддукт PLP и разомкнутого DCS, серым — omit-карта электронной плотности Fo-Fc с уровнем срезки 3σ .

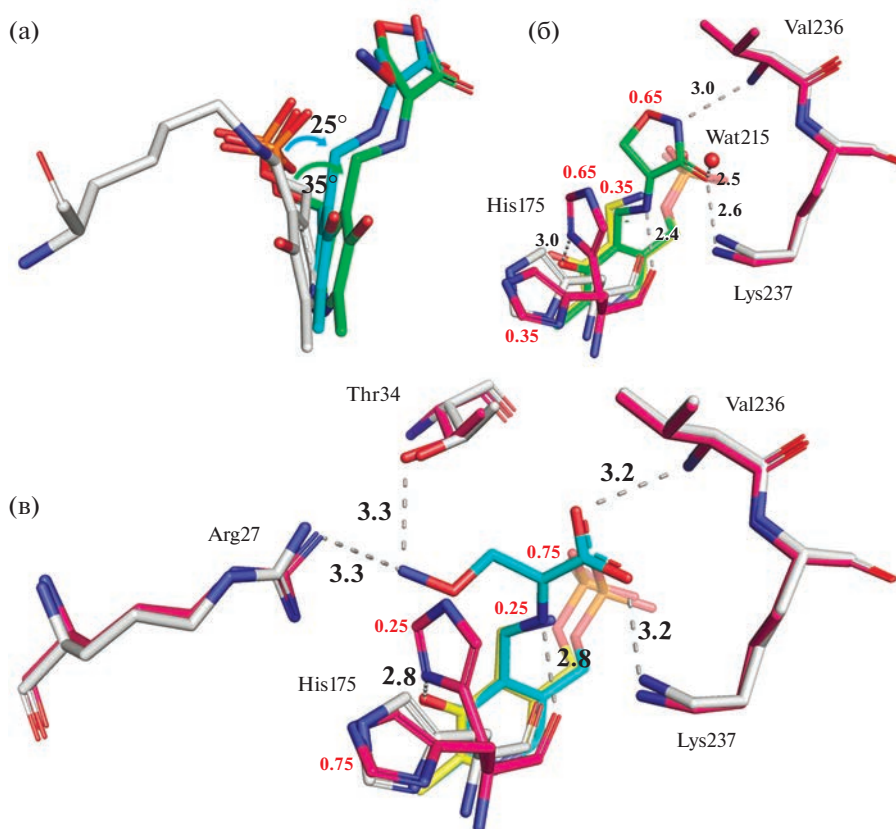


Рис. 4. Наложение пространственных структур активных центров холоформы Amico и его комплекса с DCS: а — наложение кофактора PLP в холоформе Amico и в комплексе Amico с DCS; б, в — активные центры комплекса Amico с DCS в субъединицах А и В соответственно. Серым цветом показаны аминокислотные остатки холоформы Amico, малиновым — остатки комплекса Amico с DCS, зеленым — аддукт PLP и циклического DCS, голубым — аддукт PLP и разомкнутого DCS, желтым — молекула PMP. Водородные связи показаны пунктирной линией, а соответствующие расстояния приведены в Å. Цифрами указана заселенность соответствующего состояния.

ственно (рис. 4б, 4в). По-видимому, за время настаивания кристалла холоформы Amico в растворе DCS амидная группа последнего частично

гидролизуется в активном центре фермента с образованием разомкнутого внешнего альдимины (внешний альдимин 2), который затем частично

превращается в кетимин 2 и гидролизует до молекулы РМР (рис. 1).

Полученная структура комплекса Amico с DCS позволяет проанализировать связывание кетими- на 1 и кетимина 2 в активном центре фермента. Положения аминокислотных остатков в актив- ном центре в комплексе Amico с DCS не измени- лись по сравнению с холоформой Amico, за ис- ключением остатка His175 (рис. 4б, 4в). Для него наблюдается двойное положение боковой группы в каждой субъединице. В субъединице А состоя- нию кофактора в форме кетимина 1 соответствует положение His175, направленное в активный центр, тогда как состоянию кофактора в форме РМР соответствует положение His175, направ- ленное из активного центра (рис. 4б). В субъеди- нице В состоянию кофактора в форме кетимина 2 соответствует положение His175, направленное из активного центра, тогда как состоянию кофак- тора в форме РМР соответствует положение His175, направленное в активный центр (рис. 4в). Иминный азот кетимина в обеих субъединицах координируется карбонильной группой основ- ной цепи остатка His175. В случае кетимина 1 кар- бонильный кислород лактамной формы DCS ко- ординируется молекулой воды и ϵ -аминогруппой остатка Lys237, аминогруппа оксазолидинового кольца координируется атомом азота основной цепи остатка Val236 (рис. 4б). В субъединице В остатки Val236 и Lys237 также координируют карбоксильную группу кетимина 2, а здесь остат- ки Arg27 и Thr34 образуют водородные связи с аминогруппой разомкнутого кетимина, pK_a кото- рой составляет около 5 [20] (рис. 4в). В условиях кристаллизации Amico при pH 6.5 аминогруппа разомкнутого кетимина депротонирована и мо- жет образовывать водородную связь с гуанидино- вой группой аргинина.

Таким образом, при взаимодействии Amico с DCS в активном центре фермента образуются не- сколько промежуточных соединений, в том числе аддукты PLP и DCS в циклической и разомкну- той формах, продукт перегруппировки внешнего альдими- на 2 — оксим, образованный PLP и β -аминоокси-D-аланином, и РМР. Кетимины (ад- дукты PLP и DCS в циклической и разомкнутой формах) были обнаружены в активном центре Amico. Остатки активного центра Amico Arg27, Thr34, His175, Val236 и Lys237 вовлечены в связы- вание аддуктов PLP и DCS и могут быть функци- онально важными для катализа Amico.

Работы по экспрессии и выделению белка, а также уточнению пространственной структуры и ее анализу выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00164). Работы по кристаллизации и рентгено- структурному эксперименту выполнены при под-

держке Министерства науки и высшего образова- ния Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peisach D., Chipman D.M., Van Ophem P.W. et al. // J. Am. Chem. 1998. V. 120. P. 2268. <https://doi.org/10.1021/ja973353f>
2. Chiara C. de, Homšak M., Prosser G.A. et al. // Nat. Chem. Biol. 2020. V. 16. P. 686. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0498-9>
3. Soper T.S., Manning J.M. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 4263. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69428-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69428-7)
4. Amorim Franco T.M., Favrot L., Vergnolle O., Blanchard J.S. // ACS Chem. Biol. 2017. V. 12. P. 1235. <https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00142>
5. Braunstein A.E. // The Enzymes / Ed. Boyer P.D. London: Academic Press, 1973. P. 379.
6. Dindo M., Grottelli S., Annunziato G. et al. // Biochem. J. 2019. V. 476. P. 3751. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190507>
7. Soper T.S., Jones W.M., Lerner B. et al. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3170. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40367-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40367-X)
8. Strominger J.L., Ito E., Threnn R.H. // J. Am. Chem. Soc. 1960. V. 82. P. 998. <https://doi.org/10.1021/ja01489a058>
9. Walsh C.T. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 2393. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81624-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81624-1)
10. Caminero J.A., Sotgiu G., Zumla A., Migliori G.B. // Lancet Infect. Dis. 2010. V. 10. P. 621. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70139-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70139-0)
11. Boyko K., Gorbacheva M., Rakitina T. et al. // Res. Commun. 2014. V. 71. P. 24. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14025333>
12. Agilent. CrysAlisPRO. Agilent Technologies UK Ltd, 2013.
13. Vagin A., Teplyakov A. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 22. <https://doi.org/10.1107/S09074444909042589>
14. Murshudov G.N., Skubak P., Lebedev A.A. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 355. <https://doi.org/10.1107/S09074444911001314>
15. Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126. <https://doi.org/10.1107/S09074444904019158>
16. Beeler T., Churchich J.E. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 5267. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33156-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33156-3)
17. Bezsudnova E.Y., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y. et al. // Biochimie. 2019. V. 158. P. 130. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.12.017>
18. Marković-Housley Z., Schimer T., Hohenester E. et al. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 236. P. 1025. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1996.01025.X>
19. Okada K., Hirotsu K., Hayashi H., Kagamiyama H. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 7453. <https://doi.org/10.1021/BI010384L>
20. Khomutov A.R., Vepsäläinen J.J., Shvetsov A.S. et al. // Tetrahedron. 1996. V. 52. P. 13751. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00836-8](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00836-8)