

Citrobacter freundii метионин- γ -лиаза: роль серина 339 в катализе реакций γ - и β -элиминирования

Н. В. Ануфриева¹, Е. А. Морозова¹, С. В. Ревтович¹, Н. П. Бажулина¹, В. П. Тимофеев¹,
Я. В. Ткачев¹, Н. Г. Фалеев², А. Д. Никулин³, Т. В. Демидкина^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991 Россия

³Институт белка РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

*E-mail: tvdemidkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.10.2020

Принята к печати 21.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11242

РЕФЕРАТ Остаток активного центра *Citrobacter freundii* метионин- γ -лиазы (МГЛ) серин 339 является консервативным у большинства пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов структурного подкласса цистатионин- β -лиазы, к которому принадлежит МГЛ. Механизм реакции γ -элиминирования, катализируемой МГЛ, изучен недостаточно. Методом сайт-направленного мутагенеза серин 339 был заменен на аланин. Замена серина 339 на аланин привела к существенному (на два порядка) снижению эффективности катализа мутантной формой фермента реакций γ - и β -элиминирования. Скорости обмена C- α - и C- β -протонов аминокислот в комплексах фермента с конкурентными ингибиторами снизились на один-два порядка. Спектральные характеристики мутантной формы фермента свидетельствуют, что замена не приводит к существенным изменениям конформации и таутомерии внутреннего альдимида МГЛ. Получены кристаллы холофермента и его пространственная структура определена с разрешением 1.7 Å. Замена серина 339 на аланин не повлияла на общий ход полипептидной цепи субъединицы МГЛ и тетрамерную организацию молекулы фермента. Анализ кинетических, спектральных данных и известных пространственных структур *C. freundii* МГЛ свидетельствует, что остаток серина 339 необходим для эффективного катализа реакций γ - и β -элиминирования на стадии отрыва C- α -протона внешнего альдимида и в реакции γ -элиминирования на стадиях протонирования C4'-атома кофермента и отрыва C- β -протона в кетиминном интермедиате.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метионин- γ -лиаза, пиридоксаль-5'-фосфат, Ser339, мутантная форма, кинетические параметры, спектральные характеристики, пространственная структура.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МГЛ – метионин- γ -лиаза; ПЛФ – пиридоксаль-5'-фосфат; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; НОНхонН – D-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ)-зависимые ферменты определяют жизнедеятельность большинства про- и эукариот. Особенностью этих биокатализаторов является возможность осуществления широкого спектра химических превращений аминокислот и аминов с участием кофактора. Субстратная и реакционная специфичности каждого конкретного фермента обеспечиваются взаимодействием кофактора и субстрата с апоферментом. Исследования ПЛФ-зависимых ферментов и данные рентгеноструктурного анализа позволили существенно продвинуть знания о взаимоотношении структу-

ра-функция в ферментативном катализе и еще в 1995 году использовать рациональный дизайн для изменения субстратной специфичности в ПЛФ-зависимом катализе [1]. Определение кристаллических структур ПЛФ-зависимых ферментов, принадлежащих к различным классам, способствовало расширению знания о критических остатках для химически различных ферментативных реакций и формулировке ряда принципиальных идей в области биокатализа. Замена коферментсвязывающей белковой матрицы на матрицу суперсемейства иммуноглобулинов показала правильность основных выводов о механизмах превращений аминокислот

этим ферментами и возможности предсказания изменения ферментативной активности [2–5].

Метионин- γ -лиаза (МГЛ, [КФ 4.4.1.11]) – ПЛФ-зависимый фермент, катализирующий реакции γ -элиминирования *L*-метионина, β -элиминирования *L*-цистеина и их *S*-замещенных производных, а также реакции γ - и β -замещения *L*-метионина, *L*-цистеина и их аналогов [6, 7]. Фермент найден у патогенных простейших [8, 9], в ряде бактерий, в том числе патогенных [10–14], грибах [15] и растениях [16].

Недавно нами было показано, что МГЛ катализирует реакцию β -элиминирования сульфоксидов *S*-замещенных аналогов цистеина с образованием тиосульфидов [17, 18]. Антибактериальная активность тиосульфидов, получаемых «фармакологической парой» МГЛ/сульфоксид *S*-замещенного *L*-цистеина, показана *in vitro* против ряда бактерий [18–20] и *in vivo* против *Pseudomonas aeruginosa* [21]. Перспективность применения фермента в качестве противоопухолевого агента показана *in vitro* и *in vivo* [22–25].

Механизмы физиологической реакции и реакций β -элиминирования и замещения, катализируемых МГЛ, мало исследованы. Исследование этих механизмов вносит вклад не только в фундаментальную энзимологию, оно необходимо для создания новых антибактериальных и противоопухолевых препаратов.

МГЛ принадлежит к структурному подклассу цистатионин- β -лиазы с типом укладки I полипептидной цепи ПЛФ-зависимых ферментов [26]. В тетрамерной молекуле МГЛ, образованной четырьмя идентичными полипептидными цепями, две субъединицы формируют два так называемых «каталитических димера», в каждом из которых аминокислотные остатки из двух субъединиц образуют два активных центра [27, 28].

Определение трехмерных структур комплексов МГЛ с конкурентными ингибиторами, глицином [29], циклосерином [30] и норлейцином [31, 32] показало, что остаток активного центра фермента, Ser339, консервативный в подклассе цистатионин- β -лиазы, участвует, по всей вероятности, в оптимальной для катализа ориентации боковой группы Lys210, связывающей кофермент.

Для изучения роли остатка Ser339 в катализе реакций γ - и β -элиминирования методом сайт-направленного мутагенеза получена мутантная форма фермента с заменой Ser339Ala, определены пространственная структура холофермента, стационарные кинетические параметры реакций γ - и β -элиминирования ряда субстратов, скорости обмена *S*- α - и *S*- β -протонов аминокислот в ком-

плексах Ser339Ala МГЛ с ингибиторами и спектральные характеристики мутантной формы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы

В работе использованы: *L*-метионин, *L*-норвалин, *L*-норлейцин, *L*- α -аминомасляная кислота, глицин, *L*-аланин, *L*-гомосерин, *L*-гомоцистеин, *L*-фенилаланин, *DL*-пеницилламин, фенилметилсульфонилфторид, лактатдегидрогеназа из мышцы кролика (ЛДГ), дитиотреитол (ДТТ), NADH и D₂O (Sigma, США); пиридоксаль-5'-фосфат (Merck, Германия); *S*-этил-*L*-цистеин, *S*-метил-*L*-цистеин, *S*-бензил-*L*-цистеин, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), протаминсульфат, додецилсульфат натрия (SDS) (Serva, США); лактоза (Panreas, Испания); глюкоза, глицерин, сульфат магния, сульфат аммония, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двухзамещенный, уксусная кислота, уксусный ангидрид, триэтанолламин, HClO₄ («Реахим», Россия); дрожжевой экстракт, триптон (Difco, США); DEAE-целлюлоза (Whatmann, Англия); супердекс 200 (Amersham Biosciences, Швеция); плазмиды Bluescript II SK(+/-) и pET28 (Novagen, США); набор для выделения ДНК, эндонуклеазы рестрикции Bsp119I и BveI (Fermentas, Литва). *O*-Ацетил-*L*-гомосерин получен ацетилированием *L*-гомосерина [33]; *D*-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназа (НОНхонДН) получена согласно [34].

Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали плазмиду mgIBlue, полученную клонированием гена МГЛ в вектор Bluescript II SK(+/-). Для замены Ser339 на Ala использовали следующие синтетические олигонуклеотиды (F – прямой праймер, R – обратный праймер):
 (F) TATCAGCTTCGAATCGCTGGC,
 (RS339/A) GTATCACCGAGAGCGACCGCGA,
 (FS339/A) TCGCGGTCTGCTCTCGGTGATAC,
 (R) ATACCTGCTTTAAGCCGCTCTTCTGGCGCA.

После проведения ПЦР из реакционной смеси выделяли ампликон (использовали набор для выделения ДНК). Очищенный препарат ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции Bsp119I и BveI и лигировали с вектором mgIBlue, обработанным этими же ферментами. Полученную смесь трансформировали электропорацией в клетки *Escherichia coli* DH10B и выращивали на твердой среде (1.8% агар на среде Лурия–Бертани (LB) с ампициллином). Выраженные колонии переносили в жидкую

среду LB с добавлением ампициллина и растили в течение 15–18 ч. Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора для выделения плазмид и идентифицировали путем аналитической рестрикции. Фрагмент, содержащий замену Ser339Ala, был переклонирован из плазмиды mg1Blue в pET28. Точность клонирования контролировали путем секвенирования вставки ДНК (ЦКП «Геном», Москва). Клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой, содержащей необходимую вставку.

Выращивание бактериальной массы и очистка фермента

Клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиду с геном мутантной формы, выращивали и очищали фермент как описано ранее [35]. Концентрацию очищенных препаратов фермента определяли по поглощению при 278 нм, используя коэффициент поглощения $A_{1\text{см}}^{0.1\%} = 0.8$ [36].

Гомогенность препаратов проверяли ПААГ-электрофорезом в денатурирующих условиях [37]. Активность в процессе очистки определяли в реакции β-элиминирования, активность конечного препарата определяли в реакциях β- и γ-элиминирования. Реакционная смесь содержала 100 мМ калий-фосфатный буфер, pH 8.0, 0.1 мМ ПЛФ, 1 мМ ДТТ, 0.2 мМ NADH, 10 ед. ЛДГ и 30 мМ S-этил-L-цистеин (реакция β-элиминирования) или 70 мкг НОНхоДН и 30 мМ L-метионин (реакция γ-элиминирования). За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1.0 мкМ/мин кетокислоты. Удельная активность препаратов фермента 95%-ной чистоты была равна 0.31 ед/мг в реакции γ-элиминирования L-метионина и 1.03 ед/мг в реакции β-элиминирования S-этил-L-цистеина.

Кинетические исследования

Кинетические параметры реакций γ- и β-элиминирования определяли при 30°C в сопряженной реакции с НОНхоДН или ЛДГ по уменьшению поглощения NADH при 340 нм ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Реакционные смеси содержали 100 мМ калий-фосфатный буфер, pH 8.0, 0.1 мМ ПЛФ, 1 мМ ДТТ, 0.2 мМ NADH, 70 мкг НОНхоДН или 10 ед. ЛДГ и варьируемые количества субстратов в общем объеме 1 мл. Реакцию инициировали добавлением 10 мкг фермента.

Ингибирование реакции γ-элиминирования L-метионина различными аминокислотами исследовали в условиях, описанных выше, варьируя количества ингибитора в пробах.

Кинетические параметры обрабатывали согласно уравнению Михаэлиса–Ментен, используя програм-

му EnzFitter [38]. В расчетах использовали величину молекулярной массы субъединицы фермента, равную 43 кДа. Значения констант ингибирования также определяли с помощью программы EnzFitter [38].

Изотопный обмен C-α- и C-β-протонов ингибиторов в комплексах с ферментом

Кинетику реакций изотопного обмена C-α- и C-β-протонов ингибиторов на дейтерон, катализируемых мутантной формой, регистрировали с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии. Реакцию проводили в D₂O, содержащей 50 мМ калий-фосфат (pD = 7.6), 0.1 мМ ПЛФ и ингибитор в общем объеме 0.5 мл при 30°C и концентрации L-аланина и L-норлейцина 144.23 и 98.04 мМ. Реакцию инициировали, добавляя 0.3–0.7 мг фермента. Спектры ¹H-ЯМР записывали через определенные интервалы времени на спектрометре Bruker AMXIII-400 с рабочей частотой 400 МГц. Сигналы C-α- и C-β-протонов интегрировали с помощью модифицированной программы автоматизации enzkin, входящей в состав XWIN_NMR-программ. Кинетические кривые накопления дейтерированных продуктов обрабатывали по методу, описанному в [39].

Изотопный обмен протонов глицина проводили в D₂O, pD = 7.6, содержащей 50 мМ калий-фосфат, 0.1 мМ ПЛФ, 60 мг глицина и 3.6 мг фермента. После инкубирования в течение 72 ч при 30°C фермент инактивировали нагреванием (90°C, 5 мин) и отделяли центрифугированием. Растворитель удаляли на ротационном испарителе. Для определения конфигурации у C-α-атома дейтерированный продукт был превращен в дипептид, L-фенилаланил-[D]-глицин в реакции с Вос-L-Phe-ONp [40, 41]. Дипептид растворяли в 0.5 мл D₂O, и ¹H-ЯМР-спектр записывали на спектрометре Bruker AMXIII-400 с рабочей частотой 400 МГц.

Спектральные исследования

Спектры поглощения холофермента и его комплекса с метионином регистрировали при 25°C на спектрофотометре Cary-50 (Varian, США) в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 1 мМ ДТТ, 1 мМ EDTA, 20 мМ L-метионина при концентрации фермента 1 мг/мл.

Получение холофермента и апофермента

Апофермент и холофермент получали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 1 мМ ДТТ, 1 мМ EDTA. Холофермент получали добавлением 50-кратного молярного избытка ПЛФ. Смесь инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Избыток ПЛФ удаляли диализом. Для получения апофермента к препарату добавляли 100-кратный моляр-

ный избыток *DL*-пеницилламина [42]. Смесь инкубировали в течение 1 ч при 25°C. *DL*-пеницилламин удаляли диализом. Процедуру повторяли до тех пор, пока активность фермента не снизилась до 1% от начальной. Содержание ПЛФ в препарате определяли в 100 мМ NaOH, используя значение молярного коэффициента поглощения ПЛФ при 390 нм, равное 6600 М⁻¹ см⁻¹ [43].

Определение константы диссоциации кофермента

Для определения константы диссоциации ПЛФ использовали метод ультрафильтрации [44]. Варьируемые количества ПЛФ (в диапазоне 5 × 10⁻³–1.2 × 10⁻¹ мМ) добавляли к 8 × 10⁻³ мМ раствору апофермента в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 1 мМ ДТТ и 1 мМ EDTA. После 30 мин инкубации при 30°C свободный ПЛФ отделяли ультрафильтрацией на Centricon-30 microconcentrator (Amicon, США) центрифугированием в течение 5 мин при 5000 об/мин и 4°C. Содержание ПЛФ в каждой пробе определяли в 100 мМ NaOH. Данные обрабатывали в координатах Скэтчарда [45].

Кристаллизация и сбор данных

Кристаллы МГЛ Ser339Ala получали методом диффузии паров в висящей капле в условиях, приведенных в [28]. Кристаллы, пригодные для сбора дифракционных данных, образовывались в течение 10 дней и имели ромбическую форму. Дифракционные данные были собраны на источнике синхротронного излучения, линия BESSY BEAMLINe 14.1 (Берлин, Германия), с использованием детектора MARMOSAIC 225 mm CCD при 100 К и обработаны в программном комплексе XDS [46] (табл. 1).

Определение и уточнение пространственной структуры Ser339Ala МГЛ

Структура МГЛ Ser339Ala решена методом молекулярного замещения с помощью программного комплекса CCP4 [47] и использованием в качестве модели определенной нами ранее структуры *S. freundii* МГЛ (1.35 Å, код PDB 2RFV), из которой были исключены подвижные участки фермента, молекулы воды и кофермент. Для полученной модели была рассчитана карта электронной плотности. Дальнейший расчет структуры проводили с использованием протоколов уточнения Phenix [48] с минимизацией энергии и оптимизацией геометрии модели с последующей ручной правкой в программе COOT [49]. Процесс уточнения контролировали с использованием фактора достоверности модели

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционных данных и уточненной структуры Ser339Ala МГЛ

Пространственная группа	<i>I</i> 222
Параметры элементарной ячейки, Å	$a = 56.66, b = 123.09,$ $c = 128.79$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Длина волны, Å	0.91841
Разрешение, Å	30.0–1.70 (1.79–1.70)
Полнота набора, %	99.4 (97.5)
Избыточность	7.0 (6.3)
$R_{\text{merge}}, \%$	4.5 (34.9)
Неупорядоченные аминокислотные остатки в структуре белка	1, 46–61, 398
Число неводородных атомов белка	2879
Число молекул воды	393
Число уникальных отражений	49574 (7001)
R/R_{free}	0.173/0.205 (0.243/0.285)
Средний температурный фактор $B, \text{Å}^2$	29.28
макромолекулы	27.51
растворителя	41.64
Среднеквадратическое отклонение от идеальных значений	
длин связей	0.007 Å
валентных углов	1.095°
хиральных углов	0.047°
планарных углов	0.005°
Область расположения аминокислотных остатков на карте Рамачандрана	
наиболее предпочтительная, %	98.64
дополнительно разрешенная, %	1.36
допустимая, %	0.0

Примечание. В скобках приведены значения для слоя высокого разрешения.

R_{free} , рассчитанный по 5% отражений, исключенных из уточнения. Окончательная модель уточнена до разрешения 1.70 Å с показателями R_{work} и R_{free} 17.3 и 20.5%. Модель содержит 2879 неводородных атомов белка и 393 молекулы воды; боковая группа остатка Lys210 ковалентно связана с ПЛФ. Для трех цистеинов (Cys4, Cys193 и Cys245) возле атома серы наблюдалась избыточная электронная плотность, что позволило сделать вывод об их окисленных состояниях и заменить на 3-сульфеноаланины. Структура депонирована в банк данных белковых структур (код PDB 5D5S), статистика уточнения структуры приведена в табл. 1.

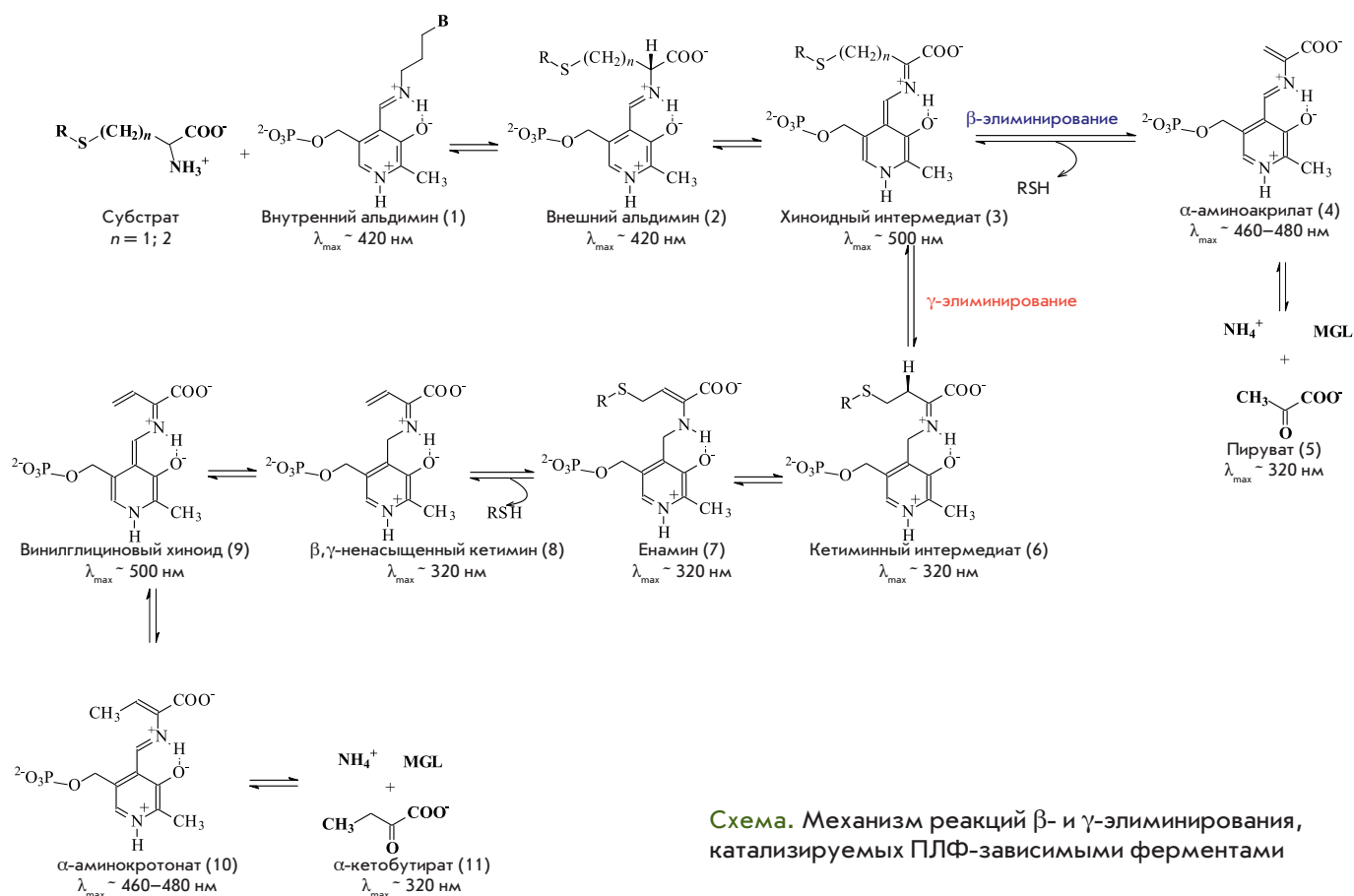


Схема. Механизм реакций β - и γ -элиминирования, катализируемых ПЛФ-зависимыми ферментами

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Механизм реакций γ - и β -элиминирования, приведенный на *схеме*, предложен в работах [50, 51]. Благодаря наличию кофермента, ПЛФ-зависимые ферменты обладают уникальными спектральными свойствами, позволяющими идентифицировать интермедиаты ферментативной реакции. Основные полосы поглощения внутреннего альдимина и интермедиатов реакций γ - и β -элиминирования приведены на *схеме* согласно [52].

В ПЛФ-зависимых ферментах, катализирующих разнообразные реакции, начинающиеся с отрыва С- α -протона во внешнем альдимине, основанием, акцептирующим этот протон, является остаток лизина, связывающий кофермент. Предполагается, что в реакции β -элиминирования серосодержащих аминокислот, катализируемых ферментами подкласса цистатионин- β -лиазы, коферментсвязывающий остаток лизина является также общим кислотным катализатором на стадии элиминирования уходящей группы [51, 53].

В работе [54] авторы предположили, что коферментсвязывающий остаток лизина цистатионин- γ -лиазы переносит протон от С- α -атома к С4'-атому

ПЛФ. Исходя из структурных данных сделан вывод, что боковая цепь этого остатка может «качаться как лиана» между С- α -, С4'- и С- β -атомами субстрата, а его ϵ -аминогруппа также является основанием, акцептирующим С- β -протон.

Анализ пространственной структуры комплекса *C. freundii* МГЛ с глицином, моделирующего структуру внешнего альдимина, позволил предположить, что ПЛФ-связывающий остаток Lys210 обеспечивает как 1,3-прототропный сдвиг С- α -протона, так и отрыв С- β -протона [29]. Исследование мутантной формы *Pseudomonas putida* МГЛ с заменой Tyr114 активного центра на Phe показало, что роль общего кислотного катализатора на стадии элиминирования уходящей группы, по всей вероятности, выполняет Tyr114 [55].

Анализ пространственных структур четырех интермедиатов, образующихся при взаимодействии МГЛ из *Entamoeba histolytica* с L-метионином, позволил предложить механизм реакции γ -элиминирования, отличный от приведенной выше схемы, исключая стадии двух хиноидных интермедиатов (*схема*, интермедиаты 3 и 9) [56]. Этот механизм постулирует образование α -аминокротоната

Таблица 2. Кинетические параметры реакций γ - и β -элиминирования

Субстрат	МГЛ, дикий тип			МГЛ, Ser339Ala		
	$k_{\text{кат}}, \text{c}^{-1}$	$K_M, \text{мМ}$	$k_{\text{кат}}/K_M, \text{М}^{-1}\text{c}^{-1}$	$k_{\text{кат}}, \text{c}^{-1}$	$K_M, \text{мМ}$	$k_{\text{кат}}/K_M, \text{М}^{-1}\text{c}^{-1}$
L-Met	$6.2 \pm 0.42^*$	$0.7 \pm 0.11^*$	8.85×10^3	0.21 ± 0.002	1.84 ± 0.15	1.77×10^2
DL-Hcy	$8.51 \pm 0.41^*$	$0.97 \pm 0.15^*$	8.77×10^3	0.28 ± 0.009	3.39 ± 0.34	8.25×10^1
S-Et-L-Hcy	$6.78 \pm 0.02^*$	$0.54 \pm 0.01^*$	1.25×10^4	0.16 ± 0.0016	0.54 ± 0.037	2.92×10^2
O-Ac-L-Hse	$2.1 \pm 0.053^{**}$	$2.91 \pm 0.18^{**}$	7.21×10^2	0.77 ± 0.011	2.07 ± 0.22	3.73×10^2
S-Me-L-Cys	$4.6 \pm 0.29^*$	$0.71 \pm 0.11^*$	6.48×10^3	0.41 ± 0.018	21.8 ± 2.25	1.88×10^1
S-Et-L-Cys	$5.03 \pm 0.16^*$	$0.17 \pm 0.02^*$	2.96×10^4	0.67 ± 0.024	6.47 ± 0.54	1.04×10^2
S-Bzl-L-Cys	$8.16 \pm 0.23^*$	$0.18 \pm 0.02^*$	4.53×10^4	1.81 ± 0.094	5.76 ± 0.59	3.14×10^2
O-Ac-L-Ser	$2.13 \pm 0.037^{***}$	$4.28 \pm 0.33^{***}$	4.98×10^2	0.047 ± 0.001	16.36 ± 1.09	2.87

*Данные [35].

**Данные [36].

***Данные [57].

вслед за β, γ -ненасыщенным кетимином в результате 1,5-сигматропного сдвига протона от $\text{C}4'$ -атома к $\text{C}\gamma$ -атому, не требующего катализа.

Параметры стационарной кинетики, ингибирование реакции γ -элиминирования и обмен С- α - и С- β -протонов в комплексах Ser339Ala МГЛ с ингибиторами

В табл. 2 приведены параметры стационарной кинетики реакций γ - и β -элиминирования, катализируемых МГЛ дикого типа [35, 36, 57] и мутантной формой. Замена остатка Ser339 на Ala привела к снижению скоростей реакций β -элиминирования в 5–10 раз и γ -элиминирования в 30–40 раз по сравнению с ферментом дикого типа. Величины K_M в большей степени увеличились для субстратов, содержащих уходящую группу в β -положении. Как результат, каталитическая эффективность обеих реакций снизилась одинаково, в среднем на два порядка. В случае субстратов с хорошо уходящей группой, каталитическая эффективность мутантной формы в реакции γ -элиминирования сравнима с эффективностью МГЛ дикого типа, но в реакции β -элиминирования O-Ac-L-Ser параметр $k_{\text{кат}}/K_M$ меньше на два порядка.

Как и для дикого типа, для мутантной формы фермента глицин, L-аланин, L- α -аминомасляная кислота, L-норвалин, L-норлейцин являются конкурентными ингибиторами физиологической реакции. Величины констант ингибирования оказались

сравнимыми с константами для МГЛ дикого типа (табл. 3).

Данные изотопного обмена протонов субстратов и ингибиторов позволяют оценить вклад отдельных стадий в ферментативную реакцию и выяснить стереохимию обмена протонов. В табл. 3 приведены результаты исследования скоростей обмена С- α - и С- β -протонов ингибиторов, катализируемого МГЛ Ser339Ala в сравнении с МГЛ дикого типа. Замена привела к замедлению скоростей обмена С- α - и С- β -протонов ингибиторов. Скорость обмена С- α -протона в комплексах мутантной формы фермента с глицином и норлейцином по сравнению с комплексами фермента дикого типа уменьшилась на два порядка, скорости обмена С- β -протонов снизились на порядок.

Изучение стереоспецифичности обмена протонов глицина ферментом дикого типа показало, что соотношение скоростей обмена *pro*-(R)- и *pro*-(S)-протонов составляет 14000 : 1 [40]. Спектр ^1H -ЯМР дипептида L-фенилаланилглицин (данные не приведены), содержавшего глицин, выделенный после инкубации мутантной формы фермента с глицином в D_2O , содержал сигнал при 3.4 м.д., характерный для метиленового *pro*-(R)-протона глицина [41].

Нам не удалось обнаружить обмен *pro*-(S)-протона после инкубации мутантной формы с глицином в течение длительного времени, поскольку это приводило к инактивации МГЛ Ser339Ala. Полученные данные показали, что, как и фермент

Таблица 3. Ингибирование реакции γ -элиминирования *L*-метионина и кинетические параметры изотопного обмена на С- α - и С- β -протонов ингибиторов

Амино-кислота	МГЛ, дикий тип			МГЛ, Ser339Ala			Количество обмениваемых С- α - и С- β -протонов
	$K_{И}$, мМ	$k_{ог}, c^{-1}$ $K_M = K_{II}$, мМ		$K_{И}$, мМ	$k_{ог}, c^{-1}$ $K_M = K_{II}$, мМ		
		α -Н	β -Н		α -Н	β -Н	
Gly	$48.49 \pm 4.37^*$	20.2*	-	22.87 ± 2.84	0.078	-	1, <i>pro</i> -(R)-протон**
<i>L</i> -Ala	$3.41 \pm 0.40^*$	2.71*	2.63*	1.25 ± 0.32	0.387	0.116	1; 3
<i>L</i> - α -Abu	$8.01 \pm 0.76^*$	-	-	4.66 ± 0.51	-	-	
<i>L</i> -Nva	$4.60 \pm 0.43^*$	-	-	1.7 ± 0.32	-	-	
<i>L</i> -Nle	$0.6 \pm 0.06^*$	41.78*	4.74*	0.89 ± 0.09	0.46	0.12	1; 2

Примечание. $K_{И}$ – константа ингибирования, K_M – константа Михаэлиса, K_{II} – константа ингибирования продуктом, характеризующая связывание фермента с продуктом изотопного обмена.

*Данные [36].

**Данные [40].

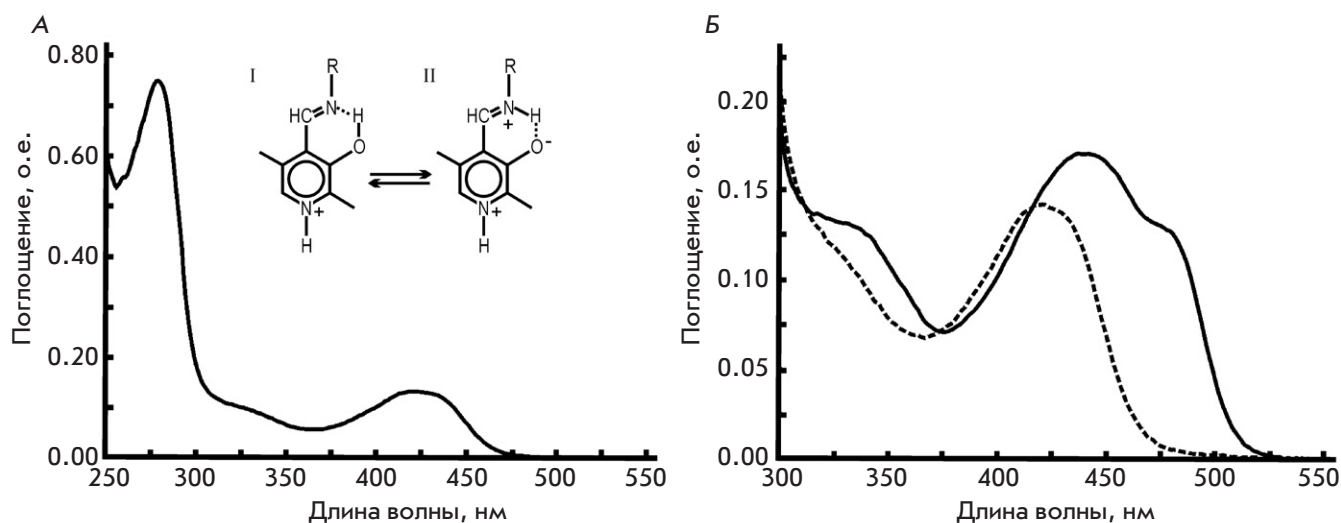


Рис. 1. Спектры поглощения: холофермента МГЛ Ser339Ala (А); комплексов МГЛ с *L*-метионином: МГЛ дикого типа (сплошная линия) и МГЛ Ser339Ala (пунктирная линия) (Б). Спектры снимали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 8.0, содержащем 1 мМ ДТТ, 1 мМ EDTA при концентрации фермента 1 мг/мл

дикого типа, мутантная форма МГЛ преимущественно обменивает *pro*-(R)-протон.

Спектральные исследования

На рис. 1 приведены спектры поглощения холофермента Ser339Ala и его комплекса с *L*-метионином. Спектр поглощения мутантной формы фермента имеет типичный для альдиминов ПЛФ вид с основной полосой в области 420 нм и полосой в области 320 нм.

Данные логнормального разложения спектра холофермента, которое проводили, как опи-

сано для фермента дикого типа [37], приведены в табл. 4. Внутренний альдимин мутантной формы описывается четырьмя структурами: кетоенамин, его таутомер, енолимин (рис. 1А; структуры II, I) и два конформера кетоенамина – конформер, у которого альдиминная группа находится в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового цикла (табл. 4, структура II⁺), и конформер с альдиминной связью, выведенной из плоскости кольца кофермента, но с сохранением сопряжения с π -электронами кольца кофермента и водородной связи между альдиминным атомом азота и 3'-оксигруппой кофер-

Таблица 4. Параметры полос спектра поглощения внутреннего альдимида Ser339Ala МГЛ

Структура	E , эВ	$\nu \times 10^{-3}$, см ⁻¹	λ , нм	$\varepsilon \times 10^{-3}$, М ⁻¹ см ⁻¹	$W \times 10^{-3}$, см ⁻¹	ρ	f	n , %
II ¹	2.92	23.58	424.1	10.46	3.58	1.55	0.18	52.9
II ²	3.24	26.10	383.1	8.27	3.87	1.37	0.03	10.4
I	3.63	29.26	341.8	9.75	3.65	1.23	0.06	20.0
II ⁺	3.80	30.67	326.1	8.50	3.47	1.29	0.05	16.7
II ^{2*}	4.28	34.52	289.7	12.20	5.06	1.20	0.29	
*	4.55	36.56	272.8	23.10	4.56	1.39	0.79	

Примечание. E – энергия электронного перехода; ν – волновое число; λ – длина волны; ε – коэффициент молярного поглощения; W – полуширина; ρ – асимметрия; f – сила осциллятора; n – содержание таутомеров и конформеров.

Надстрочные индексы (1, 2) относятся к первому и второму электронным переходам структуры II. Надстрочные индексы (+, 2) относятся к двум конформерам структуры II (конформер с альдиминной связью, находящейся в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового цикла, и конформер с альдиминной связью, частично выведенной из плоскости пиридинового кольца, но сохраняющей сопряжение с π -электронами кольца кофактора и водородную связь между альдиминным азотом и 3'-оксигруппой кофермента).

*Экспериментальная информация об этих полосах недостаточна.

мента (табл. 4, структура II²). Параметры полос поглощения, полученные при разложении спектра, приведены в табл. 4.

Найденные структуры и параметры их полос поглощения оказались практически такими же, как у фермента дикого типа [36]. Величина константы диссоциации комплекса ПЛФ для МГЛ дикого типа составляет 6.24×10^{-4} мМ [57]. Константа диссоциации ПЛФ мутантной формы фермента составила 1.01×10^{-3} мМ. Таким образом, замена несущественно повлияла на родство апофермента к коферменту и на конформацию и таутомерию внутреннего альдимида. Она привела к некоторому изменению количественного состава таутомеров и конформеров внутреннего альдимида. Реакционноспособной формой внутреннего альдимида является кетоенамин. В холоферменте дикого типа его содержание составляет 67.6% [36], в холоферменте мутантной формы – 52.9% (табл. 4).

В спектрах поглощения и кругового дихроизма комплекса МГЛ дикого типа с L -метионином имеются полосы с максимумами при 440 и 480 нм [36]. Эти полосы в спектрах ПЛФ-зависимых ферментов относят к интермедиатам реакций β - и γ -элиминирования – α -аминокротонату или α -аминоакрилату [54]. Наличие α -аминокротоната в спектре комплекса МГЛ дикого типа с L -метионином и кинетические данные взаимодействия фермента дикого типа с рядом субстратов и ингибиторов позволили предположить, что скоростьлимитирующая стадия физиологической реакции следует после стадии образования α -аминокротоната [36]. В спектре поглощения комплекса мутантной формы фермента

с L -метионином отсутствует поглощение в области 440–480 нм. Следовательно, замена Ser339 на Ala привела к торможению реакции γ -элиминирования на стадии/ях, следующих за стадией внешнего альдимида.

Пространственная структура холофермента мутантной формы

Пространственная структура Ser339Ala МГЛ определена с разрешением 1.7 Å. Замена серина 339 на аланин не повлияла на пространственную структуру фермента. Общий ход полипептидной цепи Ser339Ala МГЛ остается практически таким же, как у холофермента МГЛ дикого типа (рис. 2А). Среднеквадратическое отклонение положений α -атомов Ser339Ala МГЛ по сравнению с их положениями в структуре фермента дикого типа (код PDB 2RFV) составляет 0.29 Å². Как и в определенных нами ранее структурах *C. freundii* МГЛ [29–31], а также в структурах МГЛ из других микроорганизмов, для структуры Ser339Ala МГЛ характерна подвижность фрагментов N- и C-концевых участков полипептидной цепи (рис. 2А) [28]. Из-за высокой подвижности N-концевого фрагмента в структуре Ser339Ala МГЛ не локализован длинный участок, состоящий из 16 аминокислот (46–61), включающий остатки тирозина 58 и аргинина 60, боковые группы которых образуют водородные связи с O2P-атомом фосфатной «ручки» кофермента (рис. 2Б).

Средний температурный B-фактор аминокислотных остатков, принадлежащих подвижному C-концевому фрагменту (54.02 Å², остатки 353–368), в 2 раза выше среднего температурного фактора

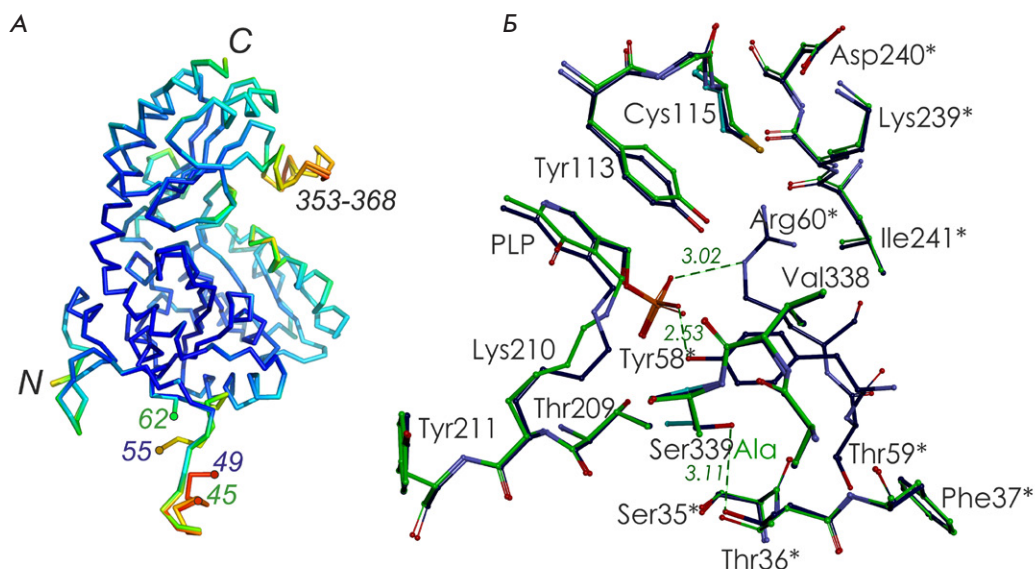


Рис. 2. Наложение структур *C. freundii* МГЛ дикого типа (код PDB 2RFV; зеленый) и Ser339Ala МГЛ (код PDB 5D5S; темно-синий): А – общий ход полипептидной цепи с окраской по В-фактору от темно-синего до красного при увеличении значения; Б – фрагменты активных центров; звездочками отмечены остатки, принадлежащие соседней субъединице каталитического димера. PLP – кофермент

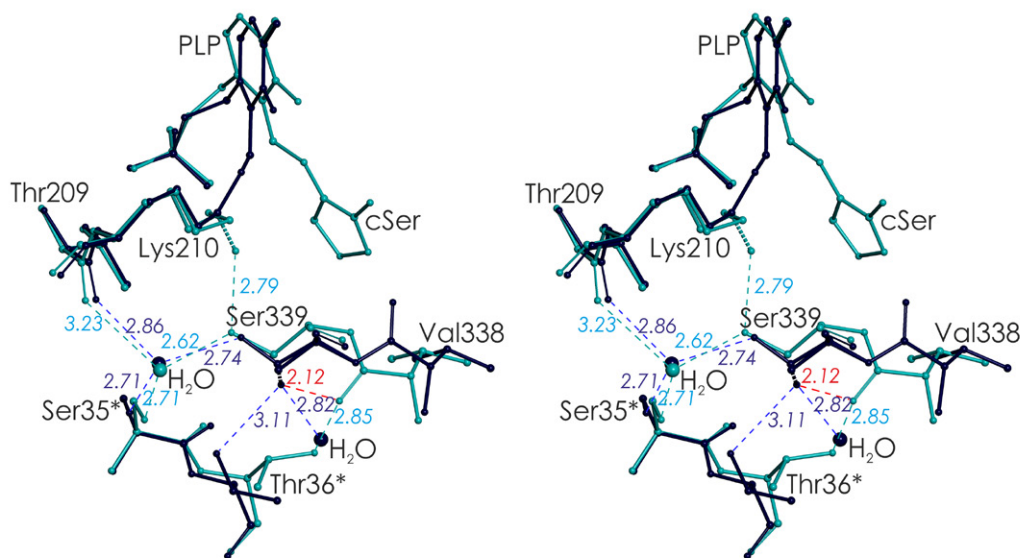


Рис. 3. СтереоиЗОбражение наложения фрагментов активного центра МГЛ *C. freundii*: холофермент дикого типа (код PDB 2RFV, темно-синий) и комплекс с *L*-циclosерином (код PDB 4OMA, голубой). Звездочками отмечены остатки, принадлежащие соседней субъединице каталитического димера. Альтернативные положения аминокислотных остатков показаны штриховыми линиями

стабильных участков фермента. Такая мобильность может быть связана с обеспечением вывода из активного центра фермента продуктов реакций γ - и β -элиминирования [30]. Замена серина 339 на аланин привела к потере водородной связи между ним и остатком треонина 36 соседней субъединицы каталитического димера (рис. 2Б), однако это не вызвало изменений в тетрамерной организации молекулы Ser339Ala МГЛ.

Пространственные структуры ковалентных и нековалентных комплексов МГЛ с ингибиторами, роль Ser339 в катализе реакций γ - и β -элиминирования

В пространственной структуре холофермента *C. freundii* МГЛ дикого типа (код PDB 2RFV) боковая

цепь Ser339 находится в двух равновероятных положениях (рис. 3). В одном из них она располагается в области активного центра фермента рядом с Lys210, во втором – в области межсубъединичного взаимодействия с N-концевым доменом соседней субъединицы каталитического димера. Оба положения боковой цепи Ser339 стабилизированы водородными связями и хорошо различимы на карте электронной плотности.

В пространственных структурах комплексов МГЛ с ингибиторами, моделирующими комплекс Михаэлиса, внешний альдимин и кетиминный интермедиа, боковая цепь Ser339 занимает единственное положение, при котором его О γ -атом направлен в сторону Lys210 [29–32]. При связывании МГЛ с ингибиторами их карбоксильные группы

«выталкивают» карбонильную группу пептидной связи между Ser339 и Val338 из полости активного центра в область межсубъединичных контактов и C=O-группа поворачивается на 180° [29, 32]. При таком повороте расстояние между Oγ-атомом Ser339 и атомом кислорода главной цепи Val338 сокращается до 2.12 Å, это приводит к выталкиванию Oγ-атома Ser339 в область активного центра фермента (рис. 3). Так обеспечивается единственное положение боковой группы Ser339, при котором его Oγ-атом образует с Nζ-атомом Lys210 водородную связь. Ее расстояние составляет 2.85 Å в комплексе Cys115His МГЛ с *L*-норлейцином, моделирующим внешний альдимин [31], и 2.79 Å в комплексе *C. freundii* МГЛ с *L*-цикloserином, моделирующим кетиминный интермедиат [30] (рис. 3).

Выше отмечалось, что N-концевой фрагмент МГЛ подвижен как в структурах холофермента дикого типа, так и в холоферменте Ser339Ala МГЛ. Связывание ингибиторов МГЛ дикого типа приводит к стабилизации этого фрагмента [30, 32]. Вероятно, такая стабилизация имеет место и при связывании субстратов и ингибиторов Ser339Ala МГЛ.

На рис. 4 представлены фрагменты активного центра комплекса *C. freundii* МГЛ с *L*-цикloserином, в которых наблюдаются два положения боковой цепи Lys210.

В одном положении, аналогичном положению боковой цепи Lys210 в структуре комплекса мутантной формы с норлейцином [31], моделирующего внешний альдимин, Nζ-атом Lys210 стабилизирован водородными связями с гидроксильными группами боковых цепей Ser339 и Tyr58* (2.79 Å и 2.82 Å; рис. 4А). Боковая группа Lys210 практически перпендикулярна плоскости кольца кофермента и находится на расстоянии 3.28 Å от C-α-pro-(R)-протона и 3.15 Å от Cβ-атома *L*-цикloserина (рис. 4Б). Такое положение благоприятно для обеспечения отрыва C-α-pro-(R)-протона или C-β-протона боковой аминогруппой Lys210.

В другом положении Nζ-атом Lys210 находится на расстоянии водородной связи от гидроксильных групп боковых цепей Ser207 и Tyr58* (3.30 Å и 2.96 Å; рис. 4А). В этом положении Nζ-атом Lys210 находится наиболее близко (3.23 Å) к C4'-атому ПЛФ, в то время как расстояние до Cα-атома субстрата увеличивается на 0.43 Å (рис. 4Б). Это положение боковой группы Lys210 благоприятно для переноса C-α-протона к C4'-атому кофермента.

Таким образом, если Tyr58* участвует в стабилизации обоих положений Nζ-атома Lys210, то боковые группы Ser339 и Ser207, располагающиеся с противоположных сторон от Lys210, обеспечивают оптимальное положение его ε-аминогруппы на ста-

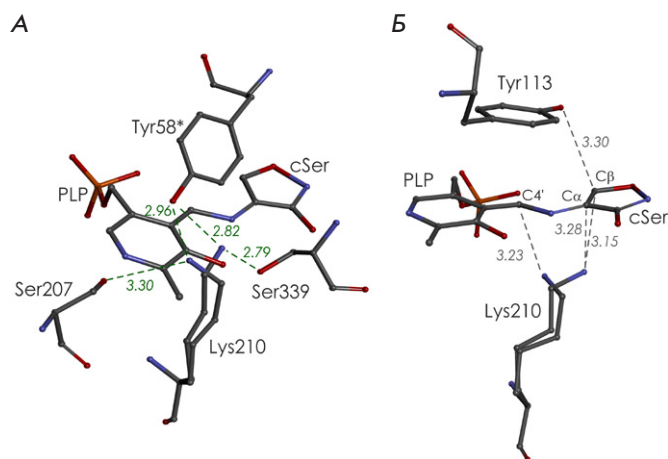


Рис. 4. А – окружение Lys210 в активном центре комплекса *C. freundii* МГЛ с *L*-цикloserином (код PDB 4OMA). Звездочками обозначены аминокислотные остатки, принадлежащие второй субъединице каталитического димера. Б – положение Nζ-атома азота боковой цепи Lys210 относительно C4'-атома ПЛФ, C-α- и C-β-атомов ингибитора

диях отрыва C-α-протона во внешнем альдимине, протонировании C4'-атома ПЛФ и отрыва C-β-протона в кетиминном интермедиате.

В комплексах мутантной формы с субстратами и ингибиторами группа Lys210 может образовывать только одну водородную связь с гидроксильной группой Tyr58*. Это будет приводить к нарушению оптимальной для отрыва C-α-протона конформации боковой группы Lys210 и понижению ее рKa. Очевидно, этим объясняется уменьшение наблюдаемой скорости обмена C-α-протона ингибиторов. Ранее предположили, что обмен C-β-протонов осуществляется по механизму с обращением конфигурации, когда первый протон отрывается боковой группой Lys210, а второй протон приходит с противоположной стороны от боковой группы Tyr113. В результате оба C-β-протона обмениваются с одинаковой скоростью [29]. В случае мутантной формы Ser339Ala реакция изотопного обмена C-β-протонов замедляется и оба β-протона обмениваются с одинаковой скоростью.

Вероятно, водородная связь между Nζ-атомом Lys210 и Oγ-атомом Ser339 обеспечивает как оптимальное для отрыва C-α- и C-β-протонов положение аминогруппы Lys210, так и стабилизацию ее аммонийной формы для 1,3-прототропного сдвига C-α-протона к C4'-атому кофермента и эффективный обмен C-α- и C-β-протонов в комплексах с субстратами и ингибиторами. Присутствие в спектре поглощения комплекса Ser339Ala с *L*-метионином полосы

поглощения внешнего альдимида также позволяет считать, что замена серина 339 на аланин приводит к торможению физиологической реакции на стадии отрыва C- α -протона во внешнем альдимида.

Если образование α -аминокротоната происходит по механизму, предложенному в работе [50], ϵ -аминогруппа Lys210 может принимать участие как основание или кислота на стадиях физиологической реакции, следующих за элиминированием метилмеркаптана, и замена Ser339 может приводить к замедлению этих стадий физиологической реакции.

Замена серина 339 на аланин приводит к торможению реакции β -элиминирования на стадии отрыва C- α -протона внешнего альдимида. Поскольку в ПДФ-зависимых реакциях β -элиминирования серосодержащих аминокислот Lys210 постулируется как общий кислотный катализатор [54], возможно, гидроксильная группа Ser339 обеспечивает оптимальные для катализа положение и основность Lys210.

Ранее подобную роль остатка серина, соответствующего Ser339 МГЛ, предложили для двух ферментов структурного подкласса, к которому принадлежит МГЛ, цистатионин- γ -синтазы [58] и цистатионин- β -лиазы [59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано участие остатка Ser339 в механизме реакций γ - и β -элиминирования, катализируемых МГЛ из *C. freundii*. Используя рентгеноструктурные, кинетические и спектральные данные, установлено, что Ser339 необходим для обеспечения оптимального положения боковой группы Lys210 на стадии отрыва C- α -протона субстрата в реакции β -элиминирования и стадиях отрыва C- α - и C- β -протонов субстрата в реакции γ -элиминирования. Предположено, что в реакции γ -элиминирования остаток Ser339 обеспечивает необходимую основность боковой аминогруппы Lys210 на стадии 1,3-прототропного сдвига C- α -протона субстрата к C4'-атому кофермента. Понимание механизмов реакций γ - и β -элиминирования, катализируемых МГЛ, не только вносит вклад в фундаментальную энзимологию, оно необходимо для создания новых антибактериальных и противоопухолевых препаратов, основанных на изменении/улучшении субстратной и реакционной специфичности фермента. ●

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований государственных академий наук (№ 01201363820) и при поддержке РФФИ (проекты № 14-04-00349 и 14-04-31398).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Onuffer J.J., Kirsch J.F. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 9. P. 1750–1757.
- Vacca R.A., Giannattasio S., Capitani G., Marra E., Christen P. // *BMC Biochem.* 2008. V. 9. P. 17.
- Golinelli-Pimpaneau B., Lüthi C., Christen P. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 33. P. 23969–23977.
- Belogurov A. Jr., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *Bioessays.* 2009. V. 31. № 11. P. 1161–1171.
- Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87–95.
- Tanaka H., Esaki N., Soda K. // *Enzyme Microb. Technol.* 1985. V. 7. P. 530–537.
- Фалеев Н.Г., Троицкая М.В., Ивойлов В.С., Карпова В.В., Беликов В.М. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1994. Т. 30. № 3. С. 458–463.
- Tokoro M., Asai T., Kobayashi S., Takeuchi T., Nozaki T. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 43. P. 42717–42727.
- Lockwood B., Coombs G. // *Biochem. J.* 1991. V. 279. № 3. P. 675–682.
- Kreis W., Hession C. // *Cancer Res.* 1973. V. 33. № 8. P. 1862–1865.
- Yoshimura M., Nakano Y., Yamashita Y., Oho T., Saito T., Koga T. // *Infection Immunity.* 2000. V. 68. № 12. P. 6912–6916.
- Nakayama T., Esaki N., Lee W.-J., Tanaka I., Tanaka H., Soda K. // *Agric. Biol. Chem.* 1984. V. 48. P. 2367–2369.
- Ревтович С.В., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Демидкина Т.В. // *ДАН.* 2012. Т. 445. № 2. С. 214–220.
- Kulikova V.V., Morozova E.A., Revtovich S.V., Kotlov M.I., Anufrieva N.V., Bazhulina N.P., Raboni S., Faggiano S., Gabellieri E., Cion P., et al. // *IUBMB Life.* 2017. V. 69. № 9. P. 668–676.
- El-Sayed A.S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86. № 2. P. 445–467.
- Goyer A., Collakova E., Shachar-Hill Y., Hanson A.D. // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. № 2. P. 232–242.
- Morozova E.A., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Kulikova V.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2014. V. 70. № 11. P. 3034–3042.
- Ануфриева Н.В., Морозова Е.А., Куликова В.В., Бажулина Н.П., Манухов И.В., Дёгтев Д.И., Гнучих Е.Ю., Родионов А.Н., Завильгельский Г.Б., Демидкина Т.В. // *Acta Naturae.* 2015. Т. 7. № 4 (27). С. 141–148.
- Kulikova V.V., Anufrieva N.V., Revtovich S.V., Chernov A.S., Telegin G.B., Morozova E.A., Demidkina T.V. // *IUBMB Life.* 2016. V. 68. № 10. P. 830–835.
- Morozova E.A., Kulikova V.V., Rodionov A.N., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Demidkina T.V. // *Biochimie.* 2016. V. 128–129. P. 92–98.
- Куликова В.В., Чернуха М.Ю., Морозова Е.А., Ревтович С.В., Родионов А.Н., Коваль В.С., Аветисян Л.Р., Кулястова Д.Г., Шагинян И.А., Демидкина Т.В. // *Acta Naturae.* 2018. Т. 10. № 3 (38). С. 83–87.
- Yoshioka T., Wada T., Uchida N., Maki H., Yoshida H., Ide N., Kasai H., Hojo K., Shono K., Maekawa R., et al. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. № 12. P. 2583–2587.

23. Miki K., Al-Refai W., Xu M., Jiang P., Tan Y., Bouvet M., Zhao M., Gupta A., Chishima T., Shimada H., et al. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. № 10. P. 2696–2702.
24. Tan Y., Xu M., Hoffman R.M. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. № 4. P. 1041–1046.
25. Hoffman R.M. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015. V. 15. № 1. P. 21–31.
26. Käck H., Sandmark J., Gibson K., Schneider G., Lindqvist Y. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 291. № 4. P. 857–876.
27. Mamaeva D.V., Morozova E.A., Nikulin A.D., Revtovich S.V., Nikonov S.V., Garber M.B., Demidkina T.V. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2005. V. 61. № 6. P. 546–549.
28. Nikulin A., Revtovich S., Morozova E., Nevskaya N., Nikonov S., Garber M., Demidkina T. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2008. V. D64. № 2. P. 211–218.
29. Revtovich S.V., Faleev N.G., Morozova E.A., Anufrieva N.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *Biochimie.* 2014. V. 101. P. 161–167.
30. Kuznetsov N.A., Faleev N.G., Kuznetsova A.A., Morozova E.A., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Nikulin A.D., Fedorova O.S., Demidkina T.V. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 1. P. 671–681.
31. Revtovich S.V., Morozova E.A., Kulikova V.V., Anufrieva N.V., Osipova T.I., Koval V.S., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *BBA-Proteins Proteom.* 2017. V. 1865. № 9. P. 1123–1128.
32. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Хурс Е.Н., Закомырдина Л.Н., Никулин А.Д., Демидкина Т.В., Хомутов Р.М. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. № 5. С. 690–698.
33. Nagai S., Flavin M. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. № 17. P. 3884–3895.
34. Morneau D.J.K., Abouassaf E., Skanes J.E., Aitken S.M. // *Anal. Biochem.* 2012. V. 423. № 1. P. 78–85.
35. Манухов И.В., Мамаева Д.В., Морозова Е.А., Расторгуев С.М., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В., Завильгельский Г.Б. // *Биохимия.* 2006. Т. 71. № 4. С. 454–463.
36. Морозова Е.А., Бажулина Н.П., Ануфриева Н.В., Ткачев Я.В., Стрельцов С.А., Тимофеев В.П., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. № 10. С. 1435–1445.
37. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
38. Cleland W.W. // *Methods Enzymol.* 1979. V. 63. P. 103–138.
39. Фалеев Н.Г., Рувинов С.Б., Бахмутов В.И., Демидкина Т.В., Мягких И.В., Беликов В.М. // *Молекуляр. биология.* 1987. Т. 21. С. 1636–1644.
40. Koulikova V.V., Zakomirdina L.N., Gogoleva O.I., Tsvetkova M.A., Morozova E.A., Komissarov V.V., Tkachev Y.V., Timofeev V.P., Demidkina T.V., Faleev N.G. // *Amino Acids.* 2011. V. 41. № 5. P. 1247–1256.
41. Kainosho M., Ajisaka K., Kamisaku M., Murai A., Kyogoku Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975. V. 64. № 1. P. 425–432.
42. Morino Y., Snell E.E. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. № 23. P. 5591–5601.
43. Peterson E.A., Sober H.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1954. V. 76. P. 169–175.
44. Osterman A.L., Brooks H.B., Rizo J., Phillips M.A. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 15. P. 4558–4567.
45. Scatchard G. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1949. V. 51. P. 660–672.
46. Kabsch W. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. № 2. P. 125–132.
47. 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., McCoy A., et al. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2011. V. 67. № 2. P. 235–242.
48. Adams P.D., Grosse-Kunstleve R.W., Hung L.-W., Ioerger T.R., McCoy A.J., Moriarty N.W., Read R.J., Sacchettini J.C., Sauter N.K., Terwilliger T.C. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2002. V. 58. № 11. P. 1948–1954.
49. Emsley P., Lohkamp B., Scott W., Cowtan K. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. № 4. P. 486–501.
50. Brzovic P., Holbrook E.L., Greene R.C., Dunn M.F. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. № 2. P. 442–451.
51. Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.D., Messerschmidt A. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 262. № 2. P. 202–224.
52. Davis L., Metzler D. *The Enzymes.* 3rd Edn. V. 7 / Ed. Boyer P.D. N.Y.: Acad. Press, 1972. P. 33–74. <https://www.elsevier.com/books/the-enzymes/boyer/978-0-12-122707-4>
53. Clausen T., Huber R., Prade L., Wahl M.C., Messerschmidt A. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 23. P. 6827–6838.
54. Messerschmidt A., Worbs M., Steegborn C., Wahl M.C., Huber R., Laber B., Clausen T. // *Biol. Chem.* 2003. V. 384. № 3. P. 373–386.
55. Inou H., Inagaki K., Adachi N., Tamura T., Esaki N., Soda K., Tanaka H. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. V. 64. № 11. P. 2336–2343.
56. Sato D., Shiba T., Karaki T., Yamagat W., Nozaki T., Nakazawa T., Harada S. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4874.
57. Anufrieva N.V., Faleev N.G., Morozova E.A., Bazhulina N.P., Revtovich S.V., Timofeev V.P., Tkachev Y.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1854. № 9. P. 1220–1228.
58. Jaworski A.F., Lodha P.H., Manders A.L., Aitken S.M. // *Protein Sci.* 2012. V. 21. № 11. P. 1662–1671.
59. Lodha P.H., Aitken S.M. // *Biochemistry.* 2011. V. 50. № 45. P. 9876–9885.