

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ И КОМПЛЕКСОВ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ *Serratia proteamaculans*

© 2020 г. Д. Е. Петренко^{1,*}, А. Ю. Николаева¹, В. А. Лазаренко¹, П. В. Дороватовский¹,
В. И. Тимофеев^{1,2}, А. В. Власкина¹, Д. А. Корженевский¹, А. Г. Михайлова³,
К. М. Бойко⁴, Т. В. Ракитина^{1,3,**}

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

⁴ Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”, Москва, Россия

*E-mail: dmitry.e.petrenko@gmail.com

**E-mail: taniarakitina@yahoo.com

Поступила в редакцию 04.06.2020 г.

После доработки 04.06.2020 г.

Принята к публикации 11.06.2020 г.

Выполнены структурные исследования бактериальной олигопептидазы В (OpV), принадлежавшей к наименее исследованной группе ферментов семейства пролилолигопептидаз. С целью получения пространственных структур OpV из *Serratia proteamaculans* (PSP), находящейся на разных стадиях каталитического цикла, осуществлен подбор условий кристаллизации мутантных форм фермента, его комплексов с пептидами, имитирующими субстраты и продукты катализа, а также комплекса с ингибитором – аналогом переходного состояния. Проведены наработка кристаллов, рентгеноструктурные эксперименты и предварительный анализ дифракционных наборов. Собранные дифракционные наборы позволяют получить структурные данные, необходимые для описания каталитического цикла бактериальных OpV.

DOI: 10.31857/S0023476120060259

ВВЕДЕНИЕ

Олигопептидазы В (OpV) – это трипсиноподобные сериновые пептидазы, относящиеся к семейству пролилолигопептидаз (POP). Характерной особенностью POP является двухдоменная 3D-архитектура, включающая в себя С-концевой α/β -гидролазный каталитический домен и N-концевой 7–8-лопастный β -пропеллерный домен, препятствующий проникновению субстратов размером более 3 кДа к каталитической триаде, локализованной во внутренней полости границы между доменами [1]. Олигопептидазы В найдены в бактериях, протозойных паразитах (трипаносомах и лейшманиях) и растениях [2]. Известно, что они являются факторами патогенеза при паразитарных и некоторых бактериальных инфекциях и являются потенциальными мишенями для разработки терапевтических средств [3]. В острых фазах заболевания эти трипсиноподобные ферменты попадают в кровь больных, где гидролизуют ряд физиологически важных пептидов, включая предсердный натрийуретический фактор, что вызывает серьезные нарушения в системе кровото-

рения [4]. Кроме того, было показано, что именно OpV обеспечивают резистентность бактерий к антимикробным пептидам, обогащенным основными аминокислотными остатками [5]. Поиск специфических ингибиторов OpV для последующего дизайна лекарственных средств, в том числе антипаразитарных препаратов, требовал знания пространственной структуры данного фермента. Такие данные, полученные для ферментов из лейшмании *Leishmania major* и трипаносомы *Trypanosoma brucei*, позволили предложить механизм каталитической активации OpV простейших [6, 7]. Однако из-за аминокислотных замен в ключевых позициях реализация данного механизма в бактериальных OpV была маловероятна [8–11]. В 2019 г. получена первая пространственная структура бактериальной OpV из *Serratia proteamaculans* (PSP, PDB ID 6TF5) [12]), которая должна была прояснить, каким образом происходит активация бактериальных ферментов данного класса. Однако анализ структуры показал, что фермент в кристалле имеет каталитически неактивную конфор-

Таблица 1. Список исследуемых мутантных форм и комплексов PSP

Образец	Описание	Цель исследований
PSP_S532A	Каталитически не активный мутант	Изучение влияния функционально значимых мутаций на конфигурацию активного центра и общий фолдинг белка
PSP_E125A	Мутант с увеличенной каталитической активностью	
PSP_S532A + ZAKIR	Комплекс с аналогом субстрата	Получение и исследование структуры PSP в каталитически активном состоянии
PSP + ZAAK	Комплексы с аналогами продуктов каталитической реакции, различающимися аминокислотными остатками в P1- и P2-позициях ¹	Изучение выхода продукта реакции из активного центра и влияния аминокислотных остатков в P1- и P2-позициях
PSP + ZALR		
PSP + ZADR		
PSP + ZAAR		
PSP-TLCK	Комплекс с необратимым ингибитором – аналогом переходного состояния	Получение и исследование структуры PSP в каталитически активном состоянии

¹ PSP специфически гидролизует пептидные связи по карбоксильной группе аргинина или лизина (P1-позиция), природа предшествующего аминокислотного остатка (P2-позиция) влияет на эффективность гидролиза, но механизм этого влияния не известен.

мацию, в которой остатки активного центра разобщены между собой.

Цель данной работы – получение и рентгеноструктурный анализ кристаллов фермента, находящегося на разных стадиях каталитической активации. Для этого осуществлен подбор условий кристаллизации мутантных форм PSP, а также комплексов PSP с рядом лигандов, проведена наработка кристаллов и их рентгеноструктурный анализ (РСА). Выбор точек мутагенеза, а также лигандов для получения комплексов проводили на основе результатов предшествующих исследований нативной и рекомбинантной PSP [13–18]. Дифракционные наборы были собраны для каталитически неактивного мутанта PSP и мутанта, обладающего повышенной эффективностью катализа, для комплексов PSP с аналогами субстратов и продуктов катализа, а также с необратимым ингибитором – аналогом переходного состояния (табл. 1). Предварительный анализ рентгеноструктурных данных показал, что во всех случаях кристаллы принадлежат одной и той же пространственной группе, что указывает на то, что в отличие от протозойных аналогов каталитическая активация PSP происходит без значительных изменений взаимного расположения доменов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сайт-направленный мутагенез S532A проводили согласно [9, 10]. Синтетические олигонуклеотидные праймеры для замены кодона (5'-CACGCGCGCAAGTAAGGGCGTTTCAAAGC-3') и отбора мутантных клонов (5'-GGCTTTGAAACGSCCTT-3') были синтезированы компанией Евроген (Москва, Россия). Восемнадцать циклов полимеразной цепной реакции (ПЦР) проведены на шаблоне PSP-экспрессирующей плазмиды [9,

10] с использованием набора для ПЦР Tersus Plus (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазой рестрикции DpnI (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) и трансформировали в *E. coli*. Мутантные клоны отбирали методом ПЦР на колониях с использованием Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Москва, Россия). Плазмидную ДНК, выделенную из мутантных клонов, секвенировали для контроля отсутствия случайных мутаций, связанных с ПЦР.

Получение рекомбинантных белков. Получение рекомбинантной PSP и ее мутантов (табл. 1) проводили в системе экспрессии *E. coli*, как описано в [8–10]. При выделении белка использовали металл-хелатную афинную хроматографию, проводимую на Ni-NTA. Концентрирование белка проводили на ультрафильтрационной колонке Centricon (Merck-Millipore, США), оценку чистоты препарата осуществляли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ на ячейке для электрофореза Mini-Protean 3 (Bio-Rad, США) с последующим окрашиванием гелей с помощью Coomassie G-250. Определение концентрации белка проводили методом Брэдфорда с помощью набора Bio-Rad Protein Assay и стандарта БСА.

Кристаллизация. Подбор условий кристаллизации осуществляли методом диффузии в парах в варианте “сидячей капли”. Использовали роботизированную систему кристаллизации фирмы “Rigaku” (Япония) Ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии (РЦ МКБ) НИЦ “Курчатовский институт”, белковые препараты с концентрацией 15–21 мг/мл в буфере (20 мМ Трис pH 8.0, 100 мМ хлорид натрия, 5 мМ спермин), стандартные наборы для кристаллизации глобулярных белков компании Hampton Research (США): Crystal Screen HT, Index HT, PEG/Ion HT,

Таблица 2. Финальные условия кристаллизации исследуемых мутантных форм и комплексов PSP

Образец	Условия кристаллизации ¹	Криопротектант
PSP_S532A	0.2 M Li ₂ SO ₄ , 0.1 M Bis-Tris, pH 5.5, 23% ПЭГ 3350	Глицерин 25%
PSP_E125A	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M MES, pH 6.5, 30% ПЭГ 5000, ММЕ	
PSP_S532A + ZAKIR, настаивание 3 ч в 25 мМ лиганде	0.2 M Li ₂ SO ₄ , 0.1 M Bis-Tris, pH 5.5, 27% ПЭГ 3350	Паратон
PSP + ZAAK, сокристаллизация с 10 мМ лигандом	0.2 M C ₃ H ₂ O ₄ Na ₂ , pH 7.0, 20% ПЭГ 3350	
PSP + ZALR, сокристаллизация с 10 мМ лигандом	0.2 M C ₃ H ₂ O ₄ Na ₂ , pH 7.0, 24% ПЭГ 3350	
PSP + ZADR, сокристаллизация с 10 мМ лигандом	0.2 M C ₃ H ₂ O ₄ Na ₂ , pH 7.0, 20% ПЭГ 3350	
PSP + ZAAR, сокристаллизация с 10 мМ лигандом	0.2 M C ₃ H ₂ O ₄ Na ₂ , pH 7.0, 20% ПЭГ 3350	
PSP-TLCK	0.2 M Li ₂ SO ₄ , 0.1 M Tris, pH 8.5, 30% ПЭГ 4000	

¹ Во всех случаях кристаллизацию проводили в присутствии 5 мМ спермина при +4°C. Время роста кристаллов – 1–3 нед.

PEGRx HT, набор TOP96 компании Anatrace (США) и кристаллизационные планшеты на 96 лунок (ArtRobbins), каждая из которых содержала три подлунки для варьирования концентрации белка в рамках одного условия кристаллизации. Соотношения белка и противораствора в подлуночках были следующими: 1 : 1, 2 : 1 и 1 : 2, суммарный объем белка в лунке – 0.1 мкл для соотношений 1 : 1 и 2 : 1 и 0.2 мкл для соотношения 1 : 2. Объем противораствора составлял 50 мкл. Планшеты инкубировали при температуре +4°C с инспекцией результатов раз в семь дней. Время роста большинства кристаллов составляло от 8 до 14 дней.

Для получения кристаллов комплексов использовали метод сокристаллизации: к раствору белка перед кристаллизацией добавляли соответствующий лиганд (табл. 2) в концентрации 10 мМ. Если рост кристаллов не наблюдался, проводили настаивание кристаллов свободной формы фермента в присутствии 25 мМ лиганда в течение 3 ч.

Оптимизацию условий проводили при температуре +4°C методом диффузии в парах в варианте “висячей капли” в 24-луночных планшетах фирмы “VDX” (США). Кристаллизационная капля состояла из 3 мкл белкового раствора, смешанного с осадителем в равных пропорциях и уравновешенного против 400 мкл осадителя в герметичном резервуаре. Финальные условия кристаллизации собраны в табл. 2.

Сбор и обработка дифракционных данных на синхротронном источнике НИЦ “Курчатовский институт”. Перед сбором дифракционных данных кристаллы вылавливали петлей и переносили в криораствор, содержащий паратон, либо кристаллизационный раствор с добавлением глицерина до финальной концентрации в 25% (табл. 2).

В случае работы с кристаллами комплексов в криораствор также добавляли соответствующий лиганд в требуемой концентрации.

Сбор дифракционных данных проводили на станции Белок ($\lambda = 0.787 \text{ \AA}$) Курчатовского источника синхротронного излучения в прямой геометрии ($\theta = 0^\circ$) при температуре 100 К. Было собрано 350 дифракционных картин с шагом в 1° , расстояние образец–детектор 140 мм. Картинки дифракции детектировали с помощью двумерного детектора Rayonix MARCCD.

Данные проиндексированы и проинтегрированы с помощью программы Mosflm из пакета CCP4 [19]. Статистики наборов данных приведены в табл. 3.

Сбор и обработка дифракционных данных на синхротронном источнике SPring-8, Япония. Криопротектирование кристаллов проводили аналогично тому, как описано в предыдущем разделе.

Сбор дифракционных данных проводили на синхротронном источнике SPring-8, Япония (станция BL41XU). Эксперимент выполнен при температуре 100 К. Картинки дифракции детектировали с помощью детектора Pilatus 6M. Для расчета стратегии сбора данных использовали программы HKL2000 и Mosflm. Дифракционные данные были обработаны, как описано выше. Статистики наборов данных и обработки приведены в табл. 4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отличие от своих протозойных аналогов бактериальные OpB плохо поддаются кристаллизации, поэтому ранее для изучения механизма катализа OpB из *S. Proteamaculans* (PSP) использовались методы моделирования по гомологии и

Таблица 3. Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов, полученных для комплекса PSP-TLCK и мутантных белков на синхротронном источнике НИЦ “Курчатовский институт”

	PSP_S532A	PSP_E125A	PSP-TLCK
Пр. гр.	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
$a, b, c, \text{Å}; \alpha = \beta = \gamma, \text{град}$	70.71, 100.40, 108.67; 90	68.84, 98.56, 108.26; 90	73.32, 101.10, 108.76; 90
$T, \text{К}$	100	100	100
$\lambda, \text{Å}$	0.787	0.787	0.787
Разрешение, Å	47.8–1.88 (1.93–1.88)	44.9–2.72 (2.79–2.72)	30.0–2.30 (2.36–2.30)
Число независимых рефлексов	63282 (4622)	20453 (1476)	35505 (2598)
Повторяемость	7.25 (4.31)	6.18 (5.96)	7.92 (6.14)
Полнота набора, %	99.80 (99.78)	99.92 (99.86)	99.71 (99.01)
$I/\sigma(I)$	10.15 (2.09)	8.45 (2.11)	7.98 (2.14)
R _{merge} -F, %	4.9 (31)	6.1 (29)	5.7 (24)

Примечание. В скобках приведены значения для последнего слоя.

Таблица 4. Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов, полученных для комплексов PSP и PSP_S532A на синхротронном источнике SPring-8, Япония

Белок	PSP	PSP	PSP	PSP	PSP_S532A
Пептид	ZAAK	ZALR	ZADR	ZAAR	ZAKIR
Пр. гр.	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
$a, b, c, \text{Å}; \alpha = \beta = \gamma, \text{град}$	72.45, 100.50, 108.72; 90	72.89, 100.44, 108.55; 90	72.95, 100.53, 108.88; 90	73.09, 100.62, 108.63; 90	70.71, 100.45, 108.96; 90
$T, \text{К}$	100	100	100	100	100
$\lambda, \text{Å}$	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Разрешение, Å	30.0–1.8 (1.9–1.8)	30.0–1.75 (1.84–1.75)	30.84–1.72 (1.81–1.72)	30.0–1.65 (1.74–1.65)	73.85–2.00 (2.11–2.00)
Число независимых рефлексов	73343 (10481)	80464 (11668)	78927 (12166)	95311 (13658)	54664 (7867)
Повторяемость	6.43 (6.41)	4.96 (4.87)	4.29 (4.67)	5.84 (6.06)	7.15 (7.43)
Полнота набора, %	98.99 (98.21)	99.5 (99.93)	92.53 (98.83)	98.57 (97.79)	99.97 (100.00)
$I/\sigma(I)$	10.62 (3.22)	7.47 (2.53)	3.34 (2.1)	9.26 (2.29)	4.01 (1.46)
R _{merge} -F, %	4.8 (24)	6.6 (29)	17.3 (32)	5.0 (33)	10.3 (51)

Примечание. В скобках приведены значения для последнего слоя.

молекулярной динамике [9, 10], а также доступные пространственные структуры близкородственных ферментов из лейшмании *L. major* и трипаносомы *T. brucei* [6, 7]. Исходя из структурных данных, полученных для протозойных ферментов, ОрВ существуют в двух конформациях: открытой (неактивной), в которой каталитический и β -пропеллерный домен, а также аминокислотные остатки активного центра разобщены между собой, и закрытой (активной), в которой два домена сближены, а активный центр собран (рис. 1а, 1б). В то же время анализ пространственных структур, полученных для других представителей семейства POP (дипептидилпептидаз, DPP),

показывает, что конформационные перестройки активного центра и активация ферментов могут происходить без изменения положения доменов друг относительно друга [20]. В 2019 г. получена пространственная структура PSP (PDB ID 6TF5), которая стала первой структурой бактериальной ОрВ [12]. Анализ структуры показал, что активный центр фермента находится в каталитически неактивной конформации. При этом взаимное расположение доменов друг относительно друга не позволило однозначно определить, находится ли фермент в открытой или закрытой конформации (рис. 1в).

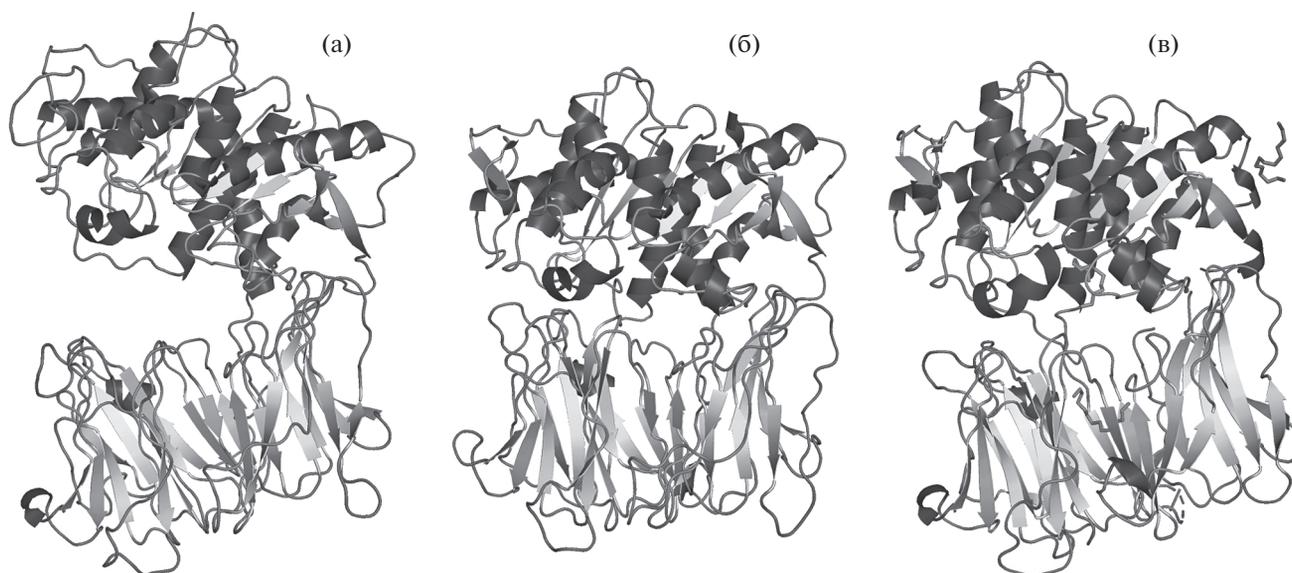


Рис. 1. Модели открытой (а) и закрытой (б) конформаций PSP, полученные с помощью моделирования по гомологии на основе пространственных структур PDB ID 4BP8 и 4BP9, полученных для OpB *Trypanosoma brucei* в открытой и закрытой конформациях соответственно. Модель пространственной структуры PSP (PDB ID 6TF5), полученной методом PCA в 2019 г. (в).

Чтобы определить, как происходит активация PSP, требовалось получить пространственные структуры фермента, находящегося на других стадиях каталитической активации; для этого решили провести кристаллографические исследования мутантных форм PSP, а также комплексов фермента с лигандами различной природы (табл. 1).

Для исследований был отобран мутант PSP_E125A, обладающий повышенной эффективностью катализа [9], а также каталитически неактивный мутант PSP_S532A, содержащий аланиновую замену каталитического серина S532. Данная мутантная форма использована для получения комплексов с пептидным субстратом ZAKIR (табл. 1). Ожидается, что связывание субстрата в субстратсвязывающем центре фермента вызовет переход активного центра в каталитически активную конформацию, при этом нарушение катали-

тической триады не позволит начаться гидролизу и зафиксирует данное состояние.

Следующим типом комплекса, выбранным для кристаллизации, был комплекс PSP с низкомолекулярным ингибитором N-альфа-тоцил-L-лизин-хлорометил кетоном (TLCK) (рис. 2), являющимся необратимым ингибитором сериновых протеаз и пептидаз, который способен образовывать ковалентную связь одновременно с серином и гистидином каталитического центра, имитируя переходное состояние субстрата в процессе катализа [21].

Финальные комплексы, полученные в настоящей работе, представляли собой комплексы PSP с аналогами продуктов катализа – пептидами вида z-XXXR/K, где X – любая аминокислота, а z – бензилоксикарбонил (табл. 1). Олигопептидазы В имеют трипсиноподобную субстратную специфичность и гидролизуют пептидную связь после положительно заряженного остатка. С-концевые R/K аминокислотные остатки пептидов, находящихся в кристаллизационной смеси в 100-кратном молярном избытке по сравнению с ферментом, с высокой вероятностью будут взаимодействовать с аминокислотными остатками, ответственными за удаление продуктов реакции из активного центра, а пространственные структуры таких комплексов могут стать иллюстрациями завершающей стадии катализа.

Для всех описанных комплексов подобраны условия кристаллизации (табл. 2) и получены кристаллы (рис. 3). Сравнительный анализ усло-

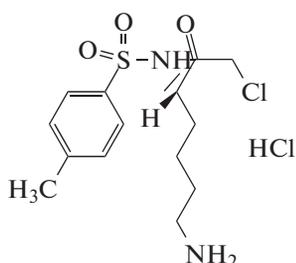


Рис. 2. Химическая формула N-альфа-тоцил-L-лизин-хлорометил кетона (TLCK).

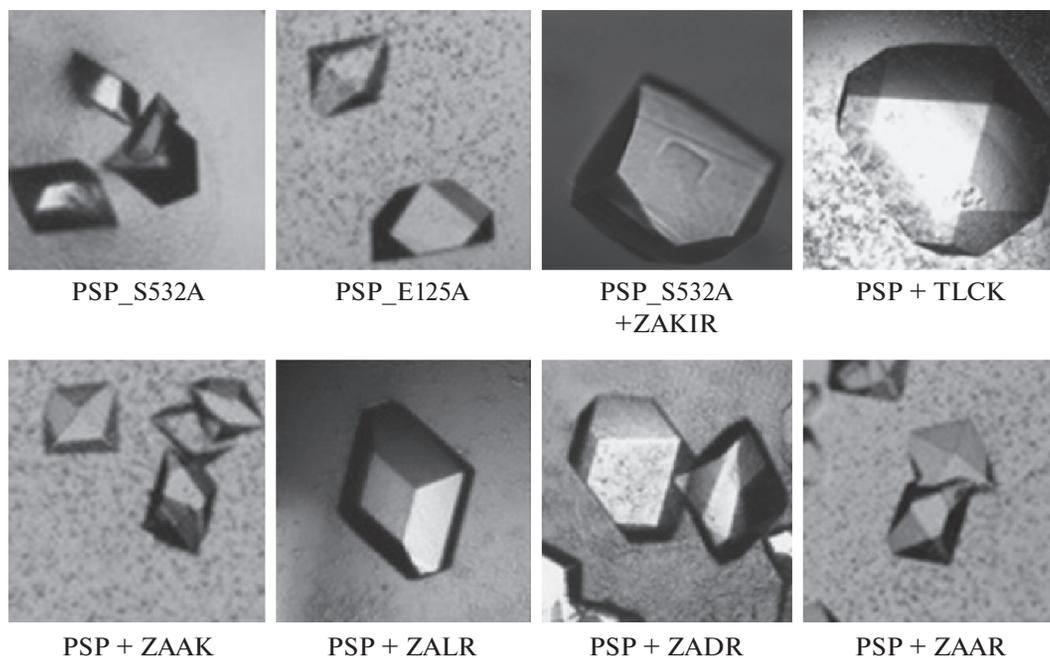


Рис. 3. Фотографии полученных в работе кристаллов.

вий кристаллизации показал, что все комплексы PSP с аналогами продуктов катализа кристаллизовались в сходных условиях: 0.2 М малоната натрия, pH 7.0, а в качестве осадителя – 20–30% полиэтиленгликоля (ПЭГ) 3350. Кристаллы PSP_S532A росли в том же ПЭГ при pH 5.5 в присутствии 0.2 М сульфата лития, PSP_E125A – при pH 6.5 и с ПЭГ 5000, а комплекс PSP-TLCK – при pH 8.5 и с ПЭГ 4000.

Рентгеноструктурный анализ полученных кристаллов проводили на синхротронных источниках НИЦ “Курчатовский институт” и SPring-8 (Япония), кристаллографические данные и параметры съемки представлены в табл. 3 и 4 соответственно. Наборы, пригодные для решения пространственных структур, собраны с разрешением 2.72–1.88 Å (синхротрон НИЦ “Курчатовский институт”) и 2.0–1.8 Å (SPring-8).

Таким образом, найдены условия кристаллизации, наработаны кристаллы и проведен сбор и последующий анализ рентгеноструктурных данных для двух мутантных белков и шести комплексов с лигандами. Собранные дифракционные наборы позволят получить недостающую информацию для описания каталитического цикла бактериальных ОрВ. Уже на стадии предварительного анализа, исходя из того, что все кристаллы принадлежат пр. гр. $P2_12_1$, совпадающей с пространственной группой ранее полученной структуры PSP [12], можно предположить, что переход PSP между каталитически активным и неактивным состояниями, скорее всего, не сопровождается сильным расхождением доменов, которое наблюда-

лось в случае ОрВ из *T. Brucei*. Кристаллы, полученные для протозойного фермента в открытой и закрытой конформациях, принадлежали к разным пространственным группам – $P3_221$ и $P12_1$ соответственно [7].

Работы в части кристаллизации белков проведены при поддержке РЦ МКБ НИЦ “Курчатовский институт”, в части определения каталитической активности белков и эффективности ингибиторов – при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения работ по Государственному заданию ИБХ РАН (АААА-А19-119042690072-1); в части РСА на источнике SPring-8 – при поддержке Федерального космического агентства (проект КЭ (ЦР) “Кристаллизатор”); решение и уточнение структур проводили при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fulop V., Bocskei Z., Polgar L. // Cell. 1998. V. 94. P. 161.
2. Kaushik S., Sowdhamini R. // BMC Genomics. 2014. V. 15. P. 985.
3. Coetzer T.H., Goldring, J.P., Huson L.E. // Biochimie. 2008. V. 90. P. 336.
4. Motta F., Azevedo C., Neves B. et al. // Biochimie. 2019. V. 167. P. 207.
5. Mattiuzzo M., De Gobba C., Runti G. et al. // J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 24. № 2. P. 160.

6. *McLuskey K., Paterson N.G., Bland N.D. et al.* // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 50. P. 39249.
7. *Canning P., Rea D., Morty R.E., Fülöp V.* // PLOS ONE. 2013. V. 8. № 11. e79349.
8. *Михайлова А.Г., Некрасов А.Н., Зинченко А.А. и др.* // Биохимия. 2015. Т. 80. № 11. С. 1606.
9. *Mikhailova A.G., Rakitina T.V., Timofeev V.I. et al.* // Biochimie. 2017. V. 139. P. 125.
10. *Petrenko D.E., Mikhailova A.G., Timofeev V.I. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2019. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1692694>
11. *Агапова Ю.К., Талызина А.А., Зейфман Ю.С. и др.* // Кристаллография. 2019. Т. 64. № 5. С. 747.
12. *Петренко Д.Е., Николаева А.Ю., Лазаренко В.А. и др.* // Кристаллография. 2020. Т. 65. № 2. С. 266.
13. *Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Хайруллин Р.Ф. и др.* // Биохимия. 2006. Т. 71. № 5. С. 697.
14. *Хайруллин Р.Ф., Михайлова А.Г., Себякина Т.Ю. и др.* // Биохимия. 2009. Т. 74. № 10. С. 1427.
15. *Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Демидюк И.В. и др.* // Биохимия. 2011. Т. 76. № 4. С. 591.
16. *Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Коломийцева Г.Я. и др.* // Биохимия. 2012. Т. 77. № 3. С. 384.
17. *Mikhailova A.G., Khairullin R.F., Demidyuk I.V. et al.* // Protein Exp. Purif. 2014. V. 93. P. 63.
18. *Ovchinnikova M.V., Mikhailova A.G., Karlinsky D.M. et al.* // Acta Naturae. 2018. V. 10. № 2. P. 65.
19. *Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D. et al.* // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. № 4. P. 235.
20. *Aertgeerts K., Ye S., Tennant M.G. et al.* // Protein Sci. 2004. V. 13. P. 412.
21. *Lu D., Fütterer K., Korolev S. et al.* // J. Mol. Biol. 1999. V. 292. № 2. P. 361.