

## СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

### СТРУКТУРА МУТАНТНОЙ ФОРМЫ БЕЛКА-РЕГУЛЯТОРА ТРАНСЛЯЦИИ Hfq С УДЛИНЕННОЙ ПЕТЛЕЙ L4

© 2021 г. А. А. Алипов<sup>1</sup>, Н. В. Леконцева<sup>1</sup>, А. О. Михайлина<sup>1</sup>, М. С. Фандо<sup>1</sup>,  
С. В. Тищенко<sup>1</sup>, А. Д. Никулин<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт белка РАН, Пущино, Россия

\*E-mail: nikulin@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 17.09.2020 г.

После доработки 03.10.2020 г.

Принята к публикации 06.10.2020 г.

Бактериальный белок Hfq принадлежит к обширному семейству Lsm белков, имеющих консервативную третичную структуру и формирующих стабильную четвертичную структуру в виде колец из нескольких мономеров. Бактериальные белки формируют гексамеры, а их архейные и эукариотические гомологи – гептамеры. Причина формирования высоко гомологичными Lsm белками с одинаковой третичной структурой мультимеров с различающимся числом мономеров не установлена и является предметом активной дискуссии. Экспериментально проверено влияние варибельной по длине петли L4 на четвертичную структуру белка Hfq. Полученный белок сохраняет гексамерную четвертичную структуру, а удлиненная петля отходит от поверхности центральной части белка в разные стороны. Таким образом, не удалось изменить четвертичную структуру белка, что подтверждает ее высокую стабильность. При этом РНК-связывающие свойства мутантной формы белка практически не изменились.

DOI: 10.31857/S0023476121050027

#### ВВЕДЕНИЕ

РНК-связывающий белок Hfq является регулятором трансляции большого числа бактериальных генов [1–3]. Он способствует специфическому взаимодействию малых регуляторных РНК с мРНК, что приводит к активации или репрессии трансляции. Белок Hfq принадлежит к обширному семейству Lsm белков, представители которого имеются в бактериях, археях и эукариотах. Их объединяет консервативная пятичленивая  $\beta$ -структура с N-концевой  $\alpha$ -спиралью общей протяженностью ~70 аминокислотных остатков (а.о.). На C-конце у Lsm белков наблюдается неупорядоченная и не консервативная последовательность от 3 до 30 а.о. [4]. Характерная особенность Lsm белков – формирование ими кольцевой четвертичной структуры из шести (бактериальные Hfq) или семи (эукариотические Sm/Lsm и архейные SmAP) мономеров [4]. Имеются единичные примеры формирования белками этого семейства пентамеров [5] и октамеров [6], но это исключение из общего правила. Начиная со времени объединения Lsm белков в один класс, перед исследователями стоял вопрос о причине формирования столь близкими по пространственной структуре белками четвертичной структуры с разным числом мономеров. Выдвигались гипотезы о влия-

нии на четвертичную структуру C-концевой части белка [7–10] и петли L4 между тяжами  $\beta 3$  и  $\beta 4$  [11, 12]. Первая гипотеза не получила подтверждения, поскольку все известные бактериальные белки Hfq формируют только гексамеры, несмотря на различную длину C-концов – от 3 до 25 а.о., а архейные и эукариотические белки формируют гептамеры, несмотря на значительное различие C-концевых последовательностей. Более того, экспериментально показано, что делеция C-концевой части белка Hfq не сказывается на его четвертичной структуре [13, 14]. Вторая гипотеза имеет больше оснований: все гексамерные белки имеют короткую последовательность петли L4 (включая Hfq-подобный архейный белок из *Methanococcus jannaschii*), а все гептамерные – удлиненную последовательность этой петли. Исключением является белок AF-SM2 (SmAP2 белок из археи *Archeoglobus fulgidus*), который может менять четвертичную структуру в зависимости от pH раствора или присутствия РНК [12]. Эта гипотеза неоднократно обсуждалась в литературе, но экспериментальной проверки влияния длины петли на четвертичную структуру Lsm белков не проводилось. В представленной работе получена генно-инженерная конструкция, несущая ген белка Hfq из *P. aeruginosa* со вставкой последовательности, кодирующей протяженную петлю L4

```

                *           20           *           40           *
AF-SM1 :      MPPRPLDVLNRSLSKSPVIVRLKGGREFRGTLDGYDIHMNLVLLDA
PaeHfqL4: MSKGHSLQDPYLNTLRKERVPVSIYLVNGIKLQGQIESFDQFVILLKNTA
PaeHfq : MSKGHSLQDPYLNTLRKERVPVSIYLVNGIKLQGQIESFDQFVILLKNT-

                60           *           80           *
AF-SM1 :      EEIQNGEVVRKVGSVVIRGDTVVFVSPAPGGE
PaeHfqL4: EEIQNGEVVRKVVSQMVYKHAISTVVPSRPVRLPSGDQPAEPGNA
PaeHfq : -----VSQMVYKHAISTVVPSRPVRLPSGDQPAEPGNA

```

**Рис. 1.** Сравнение последовательностей белков AF-SM1 из *Archaeoglobus fulgidus*, Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* дикого типа (PaeHfq) и с удлиненной петлей L4 (PaeHfqL4). Выделена последовательность удлиненной петли L4.

архейного SmAP белка. Белок был выделен, охарактеризованы его РНК-связывающие свойства, определена пространственная структура с помощью рентгеноструктурного анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Клонирование и получение штамма-продуцента.* Генетическую конструкцию, кодирующую ген белка PaeHfqL4 со вставкой, получили методом сайт-направленного мутагенеза, следуя протоколу QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, США). Нуклеотидная последовательность вставки соответствовала последовательности гена SmAP белка AF-SM1 из *Archaeoglobus fulgidus* (UNIPROT O29386), кодирующего длинную петлю L4 (рис. 1). Используемые праймеры (Синтол, Россия) содержали необходимую вставку:

F-PaeHfqL4:

5'-ТТCAGAACGGCGAAGTGGTGCCTAAAG  
TGCTCAGCCAGATGGTTTACA-3'

R-PaeHfqL4:

5'-CACTTCGCCGTTCTGAATTTCTTCCGC-  
GGTGTCTTTCAGCAGGATGA-3'.

Для амплификации ДНК использовали *KOD Hot Start* ДНК-полимеразу. ДНК-матрицей в ПЦР служила плаزمида рЕТ-22b(+)PaeHfq [15], несущая ген белка Hfq из *P. aeruginosa* дикого типа.

*Выделение и очистку белков* дикого типа PaeHfq и его мутантной формы PaeHfqL4 проводили по схеме, разработанной в [15]. Дополнительной стадией очистки стала гель-фильтрация. Сконцентрированный до 1 мл препарат белка наносили на колонку со смолой Superdex G75 (объем колонки 120 мл), уравновешенную буфером 200 мМ NaCl, 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0.

*Получение фрагментов РНК.* Для анализа РНК-белковых взаимодействий использовали фрагменты двух разных РНК. Фрагмент малой некодирующей РНК DsrA длиной 42 нуклеотида (**DsrA42**; 5'-GGGUGUAAACGAAUUUUUAUUC-GUUUGAAAUUCGUUACACCC-3') и фрагмент 5'-НТО *rpoS* мРНК длиной 40 нуклеотидов (**rpoS40**; 5'-GGCAUUUUGAAAUUCGUUACAAG-

GGGAAAUCCGUAAACCC-3') нарабатывали транскрипцией *in vitro* с рестрицированных по сайту EcoRI плазмид рUC18, содержащих гены фрагментов РНК под контролем промотора РНК-полимеразы фага Т7. Получение и очистка DsrA42 РНК описаны в [16]. Фрагмент гена мРНК rpoS40 клонировали в вектор рUC18 с использованием перекрывающихся праймеров (Синтол, Россия), причем прямой олигонуклеотид содержал последовательность Т7 промотора:

F-rpoS40:

5'-СТАCTGCAAAGCTТААТACGACTCACTA  
TAGGGCAUUUUGAAAUUCGUUACAAGG-3'

R-rpoS40:

5'-АТCTAGCCC GG GTT TACGGATT TCCCC  
TTGTAACGAAT T TC-3'.

Очистку наработанного транскрипцией *in vitro* фрагмента мРНК rpoS40 проводили по методике для очистки DsrA42 [16].

*Кинетический анализ взаимодействия белков PaeHfq и PaeHfqL4 с фрагментами РНК* проводили методом поверхностного плазмонного резонанса [17] на системе ProteOn XPR36 (Bio-Rad, США). Присоединение к фрагментам РНК биотинилированного олигонуклеотида проводили как описано в [16].

Биотинилированный фрагмент РНК наносили на сенсорный NLC-чип (Bio-Rad, США) с иммобилизованным авидином до достижения единиц ответа 500–1000. Поверхность чипа отмывали от несвязавшейся РНК 0.1%-ным раствором додецилсульфата натрия. Затем пропускали препарат белка с различной концентрацией (0.15–1.15 нМ) со скоростью 30 мкл/мин. Серии разведений из пяти концентраций анализатора (PaeHfq или PaeHfqL4) готовили с использованием буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl, рН<sub>25°C</sub> 7.5, 175 мМ NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20. Время ассоциации составляло 360 с, диссоциации – 2500 с. Все эксперименты по связыванию проводили при температуре 25°C. Серию из трех–пяти сенсogramм обсчитывали в программе BIAEvaluation с использованием модели Ленгмюра (1:1).

Кристаллизацию белка *RaeHfqL4* проводили методом диффузии паров в висящей капле при 23°C. Препарат белка (1–2 мкл) с концентрацией 12 мг/мл в 200 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, смешивали с равным объемом противораствора. Кристаллы белка получены в условиях № 3 набора JBScreen Nuc-Pro 1 (Jena Bioscience, Германия): 5% ПЭГ400, 50 мМ PIPES 7.0, 30 мМ MgCl<sub>2</sub>. Кристаллы появлялись в течение 3–5 дней и достигали размера 0.4 × 0.4 × 0.02 мм. Перед замораживанием кристаллы вымачивали в криорастворе с увеличенным содержанием ПЭГ 400.

Получение наборов кристаллографических данных. Дифракционный набор данных получен на детекторе DECTRIS PILATUS3S 6M линии ID23-1 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция) с кристалла, охлажденного до температуры 100 К, на длине волны 0.97242 Å. Для сбора данных использовали метод качания–вращения с углом осцилляции 0.2°, суммарный угол вращения составил 200°. Первичные дифрактограммы были обработаны в программе XDS [18] и интегрированы в программе AIMLESS комплекса CCP4 [19]. Детали результата обработки и статистические характеристики набора данных представлены в табл. 1.

Определение и уточнение структуры белка *RaeHfqL4*. Структуру белка определяли методом молекулярного замещения с использованием программы MorDA [20]. Исходная модель для решения была выбрана программой автоматически, на основе заданной аминокислотной последовательности белка *RaeHfqL4*. Найденное решение оценивали на соответствие экспериментальным данным по картам электронной плотности (ЭП) 2mFo-DFc и mFo-DFc. Уточнение структуры белка осуществляли в программе PHENIX [21]. На первом этапе проводили уточнение ориентации мономеров белка в гексамере, рассматривая каждый мономер в качестве независимого “твёрдого тела” с приписанным общим B-фактором для всех атомов, входящих в одну из шести субъединиц (rigid body refinement). На втором этапе уточнения использовали протокол “симуляции отжига” – молекулярной динамики с ограничениями по имеющимся экспериментальным дифракционным данным (simulated annealing). На этом этапе уточняли индивидуальные значения B-фактора для каждого атома.

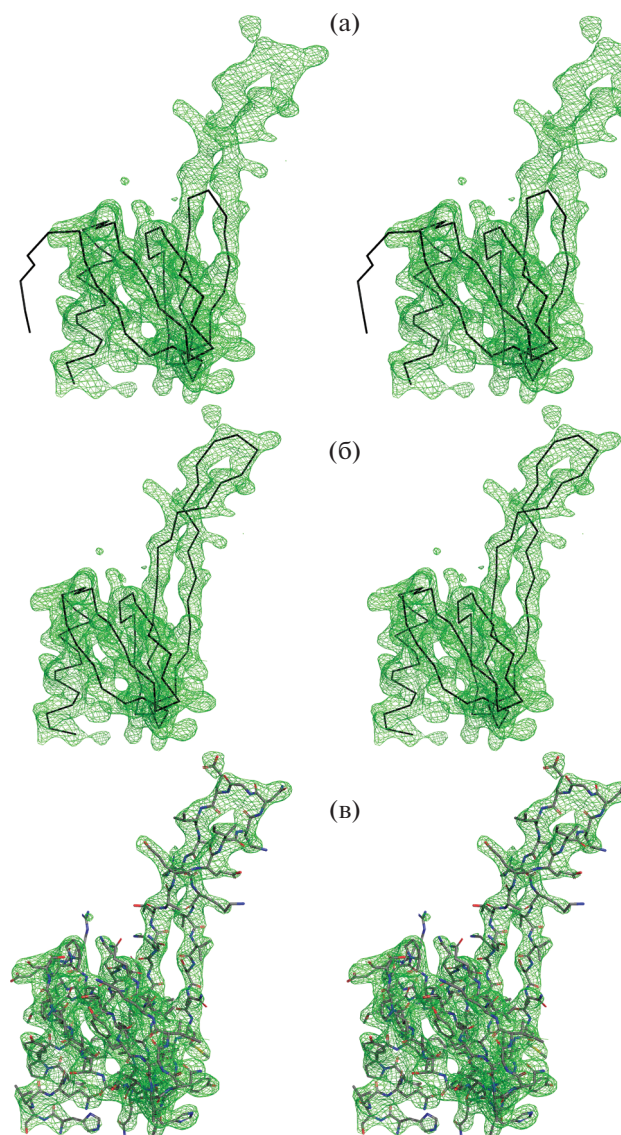
После этих этапов в результирующей карте ЭП идентифицировали участок, который соответствовал добавленной к структуре белка Hfq петли L4 длиной 13 а.о., и в соответствующий участок ЭП вписывали недостающие а.о. с помощью программы SOOT [22]. После завершения итеративного дополнения аминокислотных последовательностей мономеров белка до полных проводили несколько раундов уточнения структуры. На первых этапах использовали протокол “симуля-

**Таблица 1.** Статистические характеристики экспериментальных данных и уточнения структуры белка *RaeHfqL4* (PDB ID 6XYJ)

Длина волны, на которой получили дифракционные данные, Å	0.9724
Область разрешения, Å	50–2.79 (2.89–2.79)
Пр. гр. ячейки кристалла	C <sub>2</sub> <sub>1</sub>
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å; α, β, γ, град	76.8, 112.6, 78.0; 90.0, 119.4, 90.0
Общее число отражений (рефлексов)	52850 (4964)
Из них уникальных	14417 (1396)
Избыточность	3.7 (3.6)
Полнота, %	98.7 (93.0)
Среднее значение <i>I</i> /σ( <i>I</i> )	12.2 (0.8)
V-фактор Вильсона	76.2
<i>R</i> -merge	0.079 (1.60)
<i>R</i> -meas	0.093 (1.88)
<i>R</i> -pim	0.047 (0.965)
CC <sub>1/2</sub>	1.0 (0.56)
CC*	1.0 (0.85)
Число отражений, использованных при уточнении	14320 (1320)
Число отражений, использованных для расчета <i>R</i> -free	710 (68)
<i>R</i> <sub>work</sub>	0.218 (0.435)
<i>R</i> <sub>free</sub>	0.279 (0.410)
CC <sub>work</sub>	0.954 (0.604)
CC <sub>free</sub>	0.929 (0.651)
Число неводородных атомов в модели	3862
СКО для длин связей, Å	0.013
СКО для валентных углов, град	1.79
Средний B-фактор для атомов	105.8
Число аминокислотных остатков на карте Рамачандрана	
В предпочтительных областях, %	93
В допустимых областях, %	7
В запрещенных областях, %	0

Примечание. Значения в скобках приведены для области высокого разрешения 2.89–2.79 Å.

ции отжига” с уточнением индивидуальных значений B-фактора для каждого атома. На последних этапах уточнения, когда проводили тонкую подгонку значений длин связей, валентных и торсионных углов для подготовки финальной модели, использовали протокол без “симуляции отжига”, но с оптимизацией весовых параметров соотношения геометрии/свободной энергии модели.



**Рис. 2.** Этапы дополнения исходной структуры белка PaеHfq до полной структуры мутантной формы белка с удлиненной петлей L4 на примере одного из мономеров белка (стереопары). Карта электронной плотности 2Fo-DF показана в виде сетки со срезкой 1 $\sigma$ , разрешение 2.8 Å; а – наложение  $\alpha$ -цепи исходной структуры PaеHfq на карту ЭП; б – наложение  $\alpha$ -цепи модифицированной модели с добавленными а.о. удлиненной петли L4; в – наложение достроенной модели PaеHfqL4 на карту ЭП.

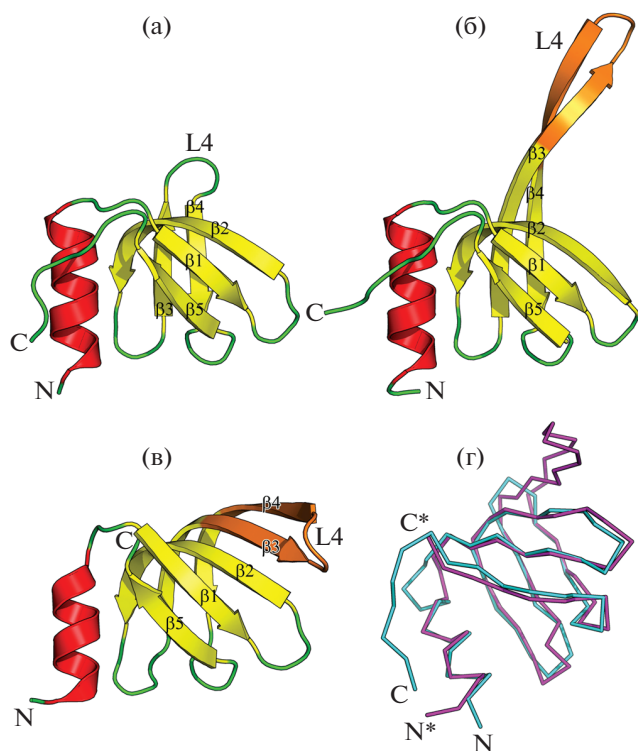
Перед депонированием структуры белка в банк данных проводили тщательную проверку геометрии белка с помощью сервиса MolProbity, встроенного в программный комплекс PHENIX. Найденные ошибки исправляли с помощью программы молекулярной графики COOT и подвергали повторному уточнению. Результирующая структура была уточнена в программе REFMAC комплекса CCP4 и депонирована в банк данных с присвоением PDBID 6XYJ. Статистические ха-

рактеристики уточнения структуры приведены в табл. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Структура белка Hfq из P. aeruginosa с удлиненной петлей L4.* Для определения структуры белка Hfq из *P. aeruginosa* с удлиненной петлей L4 (PaеHfqL4) использовали метод молекулярного замещения. Поскольку ожидалось, что число мономеров в исследуемом белке будет отличаться от их количества в исходной структуре, для решения задачи молекулярного замещения использовали программу MorDA. Она позволяет при поиске решения задачи молекулярного замещения в автоматическом режиме тестировать ряд возможных вариантов исходных моделей, автоматически отбираемых из банка данных на основе гомологии первичных структур. Такой режим работы программы в данном случае позволяет значительно ускорить нахождение решения при неопределенности числа мономеров в асимметричной части ячейки кристалла. В результате работы программы наилучшей исходной моделью был выбран мономер белка Hfq из *P. aeruginosa*, причем асимметричная часть кристаллической ячейки содержала гексамер белка, а не гептамер, как ожидалось. Карта ЭП, рассчитанная по ориентированной модели гексамера белка, показала наличие для каждого из мономеров белка неопisanного участка плотности в области между тяжами  $\beta$ 3 и  $\beta$ 4 (рис. 2). Этот участок был дополнен а.о., соответствующими последовательности вставки в петлю L4. Модель уточнена до хороших значений стереохимических параметров (с учетом разрешения кристаллографических данных 2.8 Å).

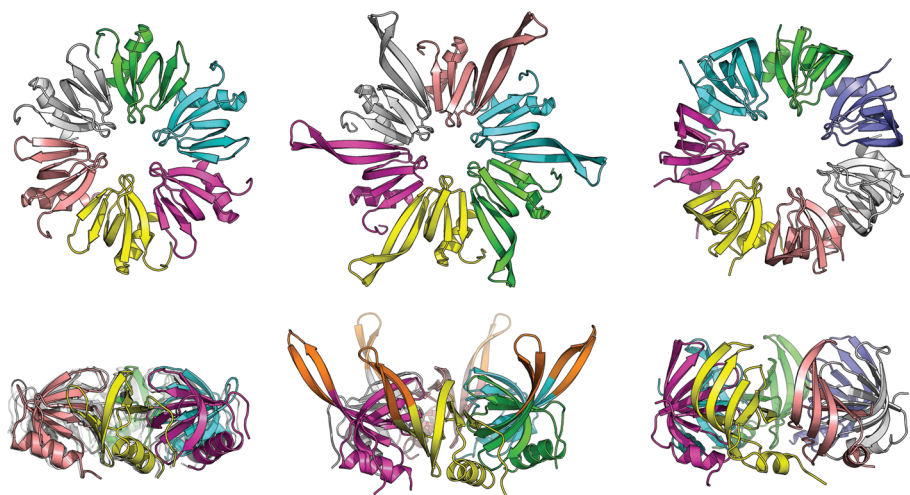
Полученная структура мутантной формы белка PaеHfq с удлиненной петлей L4 показала, что мономер белка сохраняет трехмерную структуру из N-концевой  $\alpha$ -спирали и пяти  $\beta$ -тяжей. Вставка в петлю L4 из 13 а.о. в белке PaеHfqL4 приобрела конформацию  $\beta$ -шпильки (рис. 3). Однако в отличие от архейных гомологов, где петля L4 формирует плотно прилегающую к поверхности гептамера  $\beta$ -шпильку, в рассматриваемом случае удлиненная петля L4 отходит от основной части белка в разные стороны, а белок остается гексамером (рис. 4). В результате ожидаемого изменения четвертичной структуры белка не произошло. Возможными причинами этого могут быть компактность и высокая стабильность гексамера Hfq, не позволяющая сближать петли к его центру, а различия в последовательностях бактериального и архейных белков не способствуют формированию гидрофобных контактов и/или водородных связей между а.о. шпильки L4 и коровой частью белка, что способствовало бы “притягиванию” шпильки к ее поверхности. Таким образом, пока нельзя полностью отвергать гипотезу о су-



**Рис. 3.** Структура мономеров исходного белка PaеHfq (а), мутантной формы белка PaеHfqL4 (б), мономера SmAP белка из *Archaeoglobus fulgidus* (AF-SM1) (в). Обозначены N- и C-концы мономеров, элементы  $\beta$ -слоя, положение петли L4. Цветом выделены удлиненные относительно PaеHfq петли L4 в мономерах PaеHfqL4 и AF-SM1, имеющие конформацию  $\beta$ -шпикл. Ориентация мономеров одинаковая относительно центральной части белка. Наложение главных цепей мономеров белков Hfq (светло-серый) и AF-SM1 (черный) (г). Обозначены N- и C-концы мономеров.

ществленном влиянии длины петли L4 на четвертичную структуру Lsm белков. Окончательный ответ можно получить только при создании мутантной формы Hfq с прилегающей к поверхности мономера длинной петли L4.

*Влияние удлинения петли L4 на РНК-связывающие свойства белка PaеHfq.* Известно, что белок Hfq действует как РНК-шаперон, облегчая взаимодействие между малыми регуляторными РНК (мРНК) и их мРНК-мишенями [2]. Так, после взаимодействия Hfq с лидерной последовательностью *rpoS* мРНК происходит связывание мРНК с DsrA мРНК [23, 24]. Формирование тройного комплекса мРНК–Hfq–мРНК приводит к образованию дуплекса *rpoS*–DsrA и последующей инициации трансляции мРНК. Участки связывания мРНК и мРНК на белке различаются: мРНК имеют, как правило, уридин-богатые участки и взаимодействуют с так называемым уридин-связывающим участком на белке, расположенным вблизи петли L4, а мРНК связывается с противоположной стороны гексамера [2]. Третий РНК-связывающий участок белка Hfq расположен на боковой поверхности гексамера белка и является “местом встречи” мРНК и мРНК [25–28]. Для анализа влияния увеличенной петли L4 на взаимодействие белков со специфическими фрагментами мРНК DrsA и мРНК *rpoS* были определены константы диссоциации РНК-белковых комплексов (табл. 2). Показано, что удлинение петли L4 практически не изменило сродство белка к фрагменту лидерной последовательности мРНК *rpoS*. Поскольку участок связывания мРНК удален от петли L4, это вполне ожидаемый результат. Сродство мутантной формы белка к



**Рис. 4.** Сравнение четвертичной структуры белка PaеHfq дикого типа (слева), его мутантной формы PaеHfqL4 (в центре) и архейного гомолога AF-SM1 (справа). Вверху – вид со стороны дистальной (противоположной стороне с  $\alpha$ -спиралями) поверхности белков; внизу – вид сбоку. Участки петель L4 выделены цветом.

**Таблица 2.** Константы диссоциации ( $K_D$ ) РНК-белковых комплексов

	$K_D$ , нМ	
	РacHfq	РacHfqL4
DsrA42	$0.1 \pm 0.01$	$0.04 \pm 0.004$
RpoS40	$0.03 \pm 0.002$	$0.02 \pm 0.007$

DsrA мРНК несколько увеличилось, что можно объяснить наличием дополнительных положительно заряженных а.о.в удлинённой петле. Тем не менее удлинённая петля L4 в целом не оказала значительного влияния на РНК-связывающие свойства белка Hfq, поскольку находится в отдалении от его РНК-связывающих участков.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-04-00222.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева Ю.М., Гарбер М.Б. // Молекулярная биология. 2002. Т. 36. № 6. С. 1.
2. Updegrave T.B., Zhang A., Storz G. // Curr. Opin. Microbiol. 2016. V. 30. P. 133. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.02.003>
3. Sauer E. // RNA Biol. 2013. V. 10. № 4. P. 610. <https://doi.org/10.4161/rna.24617>
4. Мурина В.Н., Никулин А.Д. // Успехи биологической химии. 2011. Т. 51. С. 133.
5. Das D., Kozbial P., Axelrod H.L. et al. // Proteins. 2010. V. 75. № 2. P. 296. <https://doi.org/10.1002/prot.22360>
6. Naidoo N., Harrop S.J., Sobti M. et al. // J. Mol. Biol. 2008. V. 377. № 5. P. 1357. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.007>
7. Thore S., Mayer C., Sauter C. et al. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 2. P. 1239. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207685200>
8. Fortas E., Piccirilli F., Malabirade A. et al. // Biosci. Rep. 2015. V. 35. № 2. P. 1. <https://doi.org/10.1042/BSR20140128>
9. Arluison V., Folichon M., Marco S. et al. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. № 7. P. 1258. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04026.x>
10. Beich-Frandsen M., Vecerek B., Konarev P.V. et al. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. № 11. P. 4900. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1346>
11. Sauter C., Basquin J., Suck D. // Nucl. Acids Res. 2003. V. 31. № 14. P. 4091. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg480>
12. Törö I., Basquin J., Teo-Dreher H., Suck D. // J. Mol. Biol. 2002. V. 320. № 1. P. 129. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00406-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00406-0)
13. Beich-Frandsen M., Vecerek B., Sjoblom B. et al. // Acta Cryst. F. 2011. V. 67. № 5. P. 536. <https://doi.org/10.1107/S174430911100786X>
14. Olsen A.S., Møller-Jensen J., Brennan R.G., Valentin-Hansen P. // J. Mol. Biol. 2010. V. 404. № 2. P. 173. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.038>
15. Nikulin A., Stolboushkina E., Perederina A. et al. // Acta Cryst. D. 2005. V. 61. № 2. P. 141. <https://doi.org/10.1107/S0907444904030008>
16. Nikulin A., Mikhailina A., Lekontseva N. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2017. V. 35. № 8. P. 1615. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1189849>
17. Katsamba P.S., Park S., Laird-Offringa I.A. // Methods. 2002. V. 26. № 2. P. 95. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00012-9](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00012-9)
18. Kabsch W. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. № 2. P. 125. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
19. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. № 4. P. 235. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
20. Vagin A., Lebedev A. // Acta Cryst. A. 2015. V. 71. № a1. P. s19. <https://doi.org/10.1107/S2053273315099672>
21. Afonine P.V., Grosse-Kunstleve R.W., Echols N. et al. // Acta Cryst. D. 2012. V. 68. № 4. P. 352. <https://doi.org/10.1107/S0907444912001308>
22. Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. № 12. P. 2126. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
23. Sledjeski D.D., Whitman C., Zhang A. // J. Bacteriol. 2005. V. 183. № 6. P. 1997. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.1997-2005.2001>
24. Vecerek B., Beich-Frandsen M., Resch A., Bläsi U. // Nucl. Acids Res. 2010. V. 38. № 4. P. 1284. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1125>
25. Chen J., Morita T., Gottesman S. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. № 6. P. 201. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00201>
26. Sauer E., Schmidt S., Weichenrieder O. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2012. V. 109. № 24. P. 9396. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202521109>
27. Robinson K.E., Orans J., Kovach A.R. et al. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 42. № 4. P. 2736. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1171>
28. Panja S., Schu D.J., Woodson S. A. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. № 15. P. 7536. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt521>