

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ТРАНСАМИНАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ АРХЕИ *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661

© 2021 г. К. М. Бойко^{1,*}, А. Ю. Николаева², А. К. Бакунова¹, Т. Н. Стеханова¹, Т. В. Ракитина²,
В. О. Попов^{1,2}, Е. Ю. Безсуднова¹

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

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

*E-mail: boiko_konstantin@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 14.07.2020 г.

После доработки 14.08.2020 г.

Принята к публикации 14.08.2020 г.

Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые трансминазы (PLP) катализируют стереоспецифический перенос аминокислоты с аминокислоты или амина на кетон или кетокислоту. Трансминазы участвуют в метаболизме аминокислот у всех организмов; на основе этого суперсемейства ферментов активно разрабатываются биокатализаторы стереоселективного аминирования органических соединений для тонкого органического синтеза. Представлены краткая биохимическая характеристика и кристаллическая структура термостабильной трансминазы I типа укладки PLP-связывающего домена из термофильной археи *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661, полученная с разрешением 1.8 Å. Описаны строение функционального димера фермента и организация его активного центра, проведено сравнение с ближайшими гомологами.

DOI: 10.31857/S0023476121050039

ВВЕДЕНИЕ

Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые трансминазы (PLP) (ТА, аминотрансферазы, ЕС 2.6.1.X) катализируют обратимый стереоселективный перенос аминокислоты с амин/аминокислота на кетосубстрат (кетон/кетокислота/альдегид) с образованием хирального амина/аминокислоты и нового кетосоединения [1]. В клетках всех организмов ТА являются ключевыми ферментами метаболизма аминокислот. В биотехнологии ТА применяются для стереоселективного аминирования органических соединений, на основе природных ТА разрабатываются биокатализаторы для синтеза оптически активных аминов и неприродных аминокислот [2–6].

Принятая на сегодня классификация ТА составлена по множественному выравниванию последовательностей в базе данных семейств белковых доменов PFAM и объединяет, ориентируясь на субстратную специфичность, ТА в классы и подклассы (семейства) по паре реагирующих субстратов: донору аминокислоты/акцептору аминокислоты (механизм трансминирования приведен ниже). Имеются шесть основных классов ТА [1]. Кроме того, все ТА разделяются по типу укладки

PLP-связывающего домена на ферменты I или IV типа укладки [7, 8].

Любой фермент характеризуется оптимальным природным субстратом (или набором субстратов). Для всех ТА такими субстратами являются α-аминокислоты и их кетоаналоги, однако некоторые ферменты в определенных условиях активны с отличными от природных субстратов соединениями, т.е. проявляют разнородную (промишквитетную) активность (*promiscuous activity*). Такая активность представляет интерес для целей биотехнологии, так как позволяет использовать ферменты в синтезе неприродных соединений [9].

Трансминазы III класса относятся к I типу PLP-укладки и являются примером ферментов с разнородной активностью, т.е. проявляют активность не только с α-, β-, γ- и ε-аминокислотами и их кетоаналогами, но и с (S)-ароматическими и алифатическими аминами, а также с альдегидами и кетонами [10, 11]. Трансминазы III класса, катализирующие аминирование (S)-8-амино-7-оксоноаноата (КАРА) с образованием 7,8-диаминопеларгоновой кислоты (ДАРА), составляют подсемейство ДАРА ТА и в клетках участвуют в синтезе биотина [12]. Большинство ДАРА ТА узкоспецифичны, используют S-аденозил-L-мети-

онин (SAM) в качестве аминодонора. Среди ТА III класса – это одни из самых “медленных” ферментов [13, 14]. В [15] была охарактеризована DAPA TA из *Psychrobacter cryohalolentis*, проявляющая активность не только к природным SAM, DAPA и KAPA, но и к (S)-(-)-1-фенилэтиламину (S-PEA) и ряду альдегидов и кетонов. Для проявления такой разнородной субстратной специфичности в активном центре фермента присутствует ряд аминокислотных замен, а также повышенная мобильность отдельных остатков по сравнению с аминокислотными остатками в активном центре канонической DAPA TA из *Escherichia coli*.

Исследованная в настоящей работе термостабильная DAPA TA из археи *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 (BioA, EC 2.6.1.62) гомологична описанной ранее DAPA TA из *P. cryohalolentis*. Охарактеризована неприродная активность BioA в реакции с S-PEA и его энантиомером R-PEA с кетосубстратом изобутаналем, получена пространственная структура фермента с разрешением 1.8 Å и проведены ее детальный анализ и сравнение со структурами гомологичных ТА. Полученные данные дополняют многообразие структур ТА I типа укладки, а также могут быть полезны при разработке новых термостабильных биокатализаторов, проявляющих максимальную активность и стабильность при температурах 50°C и выше, а также стабильных в присутствии органических растворителей, улучшающих растворимость органических субстратов в биотехнологических процессах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирования, экспрессия и очистка BioA. Ген BioA был получен полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием геномной ДНК *M. jannaschii* DSM 2661 [16] в качестве матрицы. Продукт ПЦР лигировали в плазмиду pET-21b (Novagen, Germany) и модифицировали согласно методике, описанной в [17], для получения целевого белка, на N-конце слитого с His-тагом и сайтом узнавания TEV протеазы. Трансформированные клетки *E. coli* BL21Star (Stratagene, USA) выращивали в среде LB/ампицилин при 37°C до $A_{600} = 0.8$, экспрессию индуцировали 1 mM изопропил-β-тиогалактопиранозидом. После инкубирования при 25°C клетки собирали центрифугированием, далее ресуспендировали в 50 mM Трис-HCl-буфере, pH 7.5, содержащем 200 mM NaCl, 20 mM имидазола, 10% глицерина, 2 mM β-меркаптоэтанола, 0.1% Тритона X-100 и 1 mM фенилметилсульфонилфторида, и разрушали ультразвуком. Грубый экстракт центрифугировали при 10000 g в течение 25 мин. Супернатант наносили на колонку HisTrap HP (GE Healthcare, USA), уравновешенную 50 mM Трис-HCl-буфером, pH 7.5, содержащим 500 mM NaCl, 20 mM имидазола и 0.1% Тритона X-100. BioA с 6-His-тагом

элюировали линейным градиентом имидазола (20–500 mM) в том же буфере без Тритона X-100. Фракцию с целевым ферментом инкубировали с десятикратным молярным избытком PLP при 4°C в течение 12 ч, переносили в буфер 50 mM Трис-HCl, pH 7.9, содержащий 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM β-меркаптоэтанола и TEV протеазу (1 мг на 10 мг белка). Раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, диализировали против 50 mM Трис-HCl-буфера, pH 7.5, содержащего 500 mM NaCl, 20 mM имидазола, и наносили на колонку HisTrap HP. Проскок собирали, концентрировали и наносили на колонку Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенную 50 mM Трис-HCl-буфером, pH 7.5, содержащим 50 mM NaCl и 15 мкМ PLP. Очищенный BioA в холоформе хранили при –20°C с добавлением 50% глицерина. Чистоту белка подтверждали при помощи ДДС-ПААГ электрофореза. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда.

Определение активности BioA и стационарных параметров реакции. Удельную активность BioA в реакции с R-PEA и S-PEA с изобутаналем в качестве аминокцептора рассчитывали из начального линейного участка зависимости накопления продукта от времени. За единицу ферментативной активности U принимали количество BioA, катализирующее образование 1 мкМ ацетофенона в минуту. За образованием ацетофенона следили по увеличению оптической плотности при 245 нм ($\Delta\epsilon = 12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) на спектрофотометре Evolution 300 UV-Vis (Thermo Scientific, USA). Стандартную реакцию проводили при 65°C в 100 mM бикарбонатном буфере, pH 10, с добавлением 90 мкМ PLP при концентрации каждого субстрата 10 mM.

Для получения кинетических параметров варьировали концентрацию одного субстрата при постоянной концентрации второго (концентрация для изобутанала составляла 12 mM, для R-PEA – 10 mM). Измерения проводили при 35°C в 75 mM натрий-фосфатном буфере, pH 8, с добавлением 90 мкМ PLP. Кинетические параметры получали, обрабатывая экспериментальные данные согласно уравнению Михаэлиса–Ментен, используя Origin 7.5 (Origin Lab, USA).

Кристаллизацию BioA проводили методом диффузии в парах, как описано в [18]. Финальные условия кристаллизации включали 0.2 M MgCl₂; 0.1 M Tris, pH 8.5; 19% PEG 3350, кристаллизация велась при температуре +20°C. Кристаллы палочкообразной формы размером ~100 × 100 × 50 мкм росли в течение семи дней.

Сбор и обработка дифракционных данных. Решение и уточнение структуры. Перед сбором дифракционных данных кристаллы вылавливали петлей и переносили в криораствор, содержащий

кроме компонентов, входящих в противораствор, 25% глицерина. После чего кристалл в петле замораживали в парах азота. Дифракционные наборы собирали при температуре 100 К на станции ID29 синхротронного источника ESRF (Франция). Дифракционная картина фиксировалась детектором Pilatus6M. Для расчета стратегии сбора данных использовали программу Best [19], предложившую следующие параметры: длина волны 0.969 Å, угол вращения 287°, угол качания 0.1°, расстояние кристалл–детектор 302 мм. Набор дифракционных данных обработан с использованием программы iMosflm [20]. Статистика набора данных приведена в табл. 1.

Решение структуры проведено методом молекулярного замещения при помощи программы MOLREP [21]. В качестве стартовой модели использовали структуру холо-формы синтазы диаминопералгоновой кислоты из *Bacillus subtilis* (код PDB 3DOD). Кристаллографическое уточнение структуры проведено с использованием программ Refmac5 [22] и Coot [23] до достижения R -факторами следующих значений: $R_{\text{work}} = 17.7\%$, $R_{\text{free}} = 22.2\%$ (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активность BioA и кинетические параметры полной реакции. Удельная активность выделенных препаратов BioA с R-PEA и S-PEA соответственно составила 42 ± 2 и 21 ± 1 мУ/мг при 65°C в 100 мМ бикарбонатном буфере, pH 10. Кинетические параметры катализируемой BioA реакции между R-PEA и изобутаналем приведены в табл. 3. Можно сделать вывод, что BioA стабилен и активен в щелочных условиях при 65°C, однако проявляет низкую стереоспецифичность к неканоническим субстратам.

Анализ структуры BioA. Кристаллы BioA принадлежат пр. гр. $P1$. В независимой части элементарной ячейки кристалла находятся две субъединицы белка, образующие функциональный димер [1, 8]. В обеих субъединицах в электронной плотности отсутствуют восемь аминокислот с N-конца, а также участок 190–209, что, по-видимому, связано с их относительной подвижностью. Парное сравнение субъединиц между собой дает RMSD по C α -атомам, не превышающее 0.14 Å², свидетельствующее об отсутствии между ними значимых различий.

Общая архитектура субъединицы BioA типична для TA I типа укладки и состоит из двух доменов – малого N-концевого (остатки 1–58 и 359–466) и большого C-концевого (остатки 59–358) (рис. 1а) [7]. N-концевой домен BioA содержит пять α -спиралей и два β -слоя по три тяжа каждый, а C-концевой – 9 α -спиралей, окружающих β -слой, состоящий из семи тяжей.

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки кристалла трансаминазы BioA

Пр. гр.	$P1$
$a, b, c, \text{Å}$	61.23, 61.38, 63.07;
$\alpha, \beta, \gamma, \text{град}$	106.11, 93.48, 96.47
$T, \text{К}$	100
$\lambda, \text{Å}$	0.969
Разрешение, Å	60.56–1.80 (1.84–1.80)*
Число независимых рефлексов	71599 (4097)
Повторяемость	2.7 (2.6)
Полнота набора, %	88.5 (86.1)
$I/\sigma(I)$	6.4 (2.4)
$R_{\text{meas}}, \%$	12.6 (53.3)
$CC_{1/2}, \%$	98.9 (75.5)

* В скобках приведены значения для последнего слоя.

Таблица 2. Данные уточнения структуры трансаминазы BioA

$R_{\text{fact}}, \%$	17.7
$R_{\text{free}}, \%$	22.2
Общий средний B -фактор	22.0
Средний B -фактор по белку	21.8
Средний B -фактор по лигандам	23.3
Средний B -фактор по растворителю	27.2
Число неводородных атомов	
Белок	6958
Лиганды	3
Растворитель	446
Всего	7407
Среднеквадратичные отклонения	
Длины связей, Å	0.013
Валентные углы, град	1.842
График Рамачандрана	
Наиболее благоприятные, %	94.5
Допустимые, %	4.4
Код PDB	6ZHK

Таблица 3. Кинетические параметры катализируемой BioA реакции между R-PEA и изобутаналем при 65°C

Субстрат	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$	$k_{\text{cat}}/K_m, \text{с}^{-1} \text{мМ}^{-1}$
R-PEA	0.033 ± 0.001	0.9 ± 0.1	0.037 ± 0.005
Изобутаналь	0.0162 ± 0.0005	0.19 ± 0.03	0.08 ± 0.02

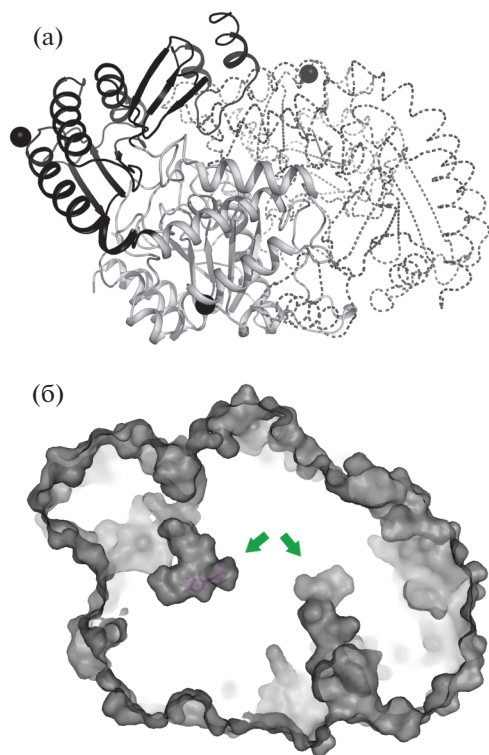


Рис. 1. Структура BioA. Димер BioA (а). N-концевой домен одной из субъединиц димера показан в виде черной ленточной модели, С-концевой – в виде серой ленточной модели. Вторая субъединица димера показана в виде прерывистой ленточной модели. Ионы магния показаны сферами. Субстратный канал BioA (б). Серым показана поверхность димера BioA (центральный срез) и каналы, ведущие от поверхности молекулы в активный центр фермента. Молекула РМР взята из структуры 6I01 и показана палочковой моделью для одной субъединицы. Активный центр каждой субъединицы обозначен стрелкой.

Анализ контактов между субъединицами из независимой части показал, что BioA аналогично многим другим ТА [1, 8, 15] является димером в кристалле. Скрытая при формировании димера поверхность (buried surface area) составляет 5678 Å² (28.5% поверхности субъединицы). Димер стабилизирован девятью солевыми мостиками и 50 водородными связями. Оценка гидрофобных взаимодействий, сделанная по выигрышу

свободной энергии при формировании димерного межмолекулярного контакта, дает величину –96.3 ккал/моль (табл. 4).

Димер BioA является минимальной каталитической единицей фермента, что связано с устройством активного центра ТА, включающего в себя остатки обеих субъединиц, а именно – двух доменов одной субъединицы и С-концевого домена соседней. Активный центр BioA находится глубоко в центре каждой из субъединиц димера и соединен с поверхностью протяженным каналом длиной ~15 Å (рис. 1б). Полость активного центра сформирована остатками W63, D121, G122, A123, E124, V126, Y155, H156, G157, E234, D268, V270, A271, G336, H337 и T338, а также каталитическим лизином K301. Для данного класса ферментов известно, что помимо каталитических остатков в активном центре находится молекула кофактора – РЛР, ковалентно связанная в структуре холоформы с каталитическим остатком лизина и отсоединяющаяся от него в процессе катализа с образованием свободной РМР-формы, способной покинуть активный центр. Анализ активного центра BioA показал, что в обеих субъединицах фермента отсутствует разностная электронная плотность для кофактора, поэтому каталитический остаток лизина K301 находится в свободной форме. Возможно, в случае BioA отсутствие кофактора вызвано условиями кристаллизации.

Сравнение субъединицы BioA с гомологичными структурами показало, что наибольшее сходство фермент имеет со структурами синтазы диаминопералгоновой кислоты из *Bacillus subtilis* (RMSD – 1.08 Å², код PDB – 3DRD), термостабильной ω-трансаминазы из *Thermomicrobium roseum* (RMSD – 1.50 Å², код PDB – 6I01) и ТА из *Pseudomonas fluorescens* (RMSD – 1.57 Å², код PDB – 6S54) (рис. 2а). Несмотря на сходство структур субъединиц, указанные ферменты имеют различное олигомерное состояние в кристалле – димер (3DRD и 6I01) и тетрамер (6S54), что, впрочем, типично для ТА [1]. Тем не менее все указанные олигомерные состояния включают в себя аналогичный BioA димер (рис. 2б), что позволяет провести их взаимное сравнение. Анализ контактов упомянутых димеров (табл. 4) показывает, что ди-

Таблица 4. Сравнение димерных межмолекулярных контактов BioA и гомологичных ферментов

	BioA	3DRD [24]	6I01 [25]	6S54* [26]
Поверхность, скрытая при формировании димера, Å ² (процент от поверхности субъединицы)	5678 (28.5%)	4289 (22.1%)	5698 (28.3%)	5440 (27.6%)
Водородные связи	50	35	38	64
Солевые мостики	9	4	17	8
Гидрофобные взаимодействия (ΔG ^{int} , ккал/моль)	–96.3	–63.6	–81.1	–88.6

* Димерный контакт, аналогичный BioA.

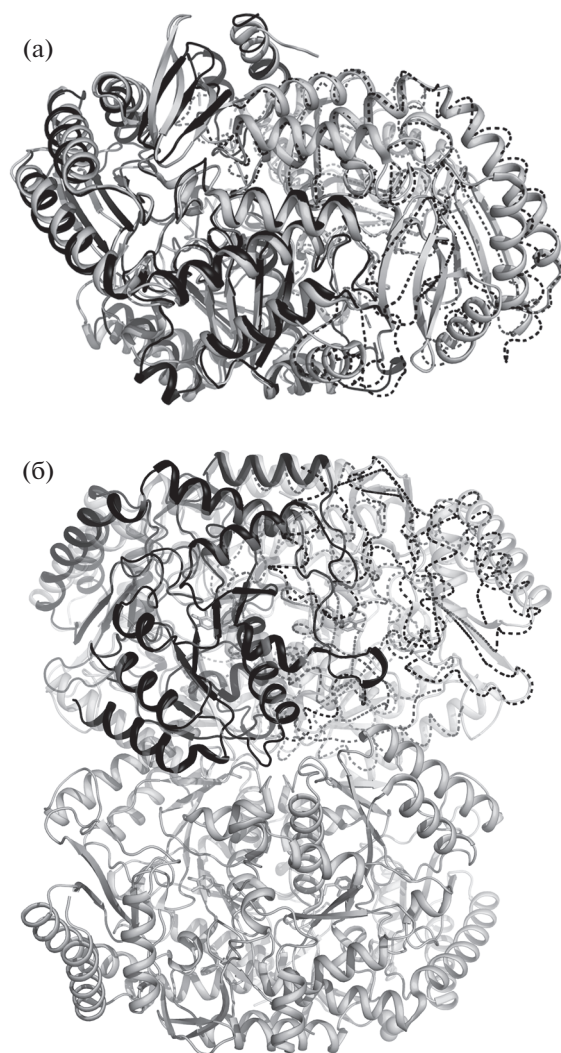


Рис. 2. Сравнение структур BioA и ближайших гомологов. Наложение димеров BioA (субъединицы показаны в виде сплошной и прерывистой ленточных моделей соответственно) и 3DRD (светло-серый) (а). Наложение димера BioA (окраска аналогична панели А) и тетрамера 6S54 (светло-серый) (б). Димер 6S54, аналогичный димеру BioA, показан полупрозрачно для ясности.

мерное межмолекулярное взаимодействие данного класса ферментов весьма прочно даже в случае белков из мезофильных организмов (например, 6S54). При этом в случае тетрамера 6S54 межмолекулярный контакт, аналогичный димеру BioA, значительно превосходит по прочности остальные, что подчеркивает ключевую роль димеризации для функционирования фермента.

Сравнение активных центров BioA и гомологичных ферментов позволило установить, что связанный кофактор присутствует не во всех сравниваемых структурах. Так, помимо BioA он отсутствует в структурах 3DRD и в одной из субъединиц 6S54, при этом во второй субъединице об-

наружена PMP-форма кофактора. В структуре 6S54 ковалентно связанный PLP находится во всех четырех субъединицах из независимой части. Анализ окружения области связывания кофактора показал, что в случае BioA остатки, формирующие окружение PLP, в основном консервативны, при этом в структуре 3DRD отсутствует петля 143–173 (нумерация по 3DRD), закрывающая активный центр от растворителя. В отсутствие кофактора в BioA вакантное положение его фосфатной группы занято боковой группой остатка H337, имеющей двойное положение, чего не наблюдается в структуре гомологов, где крупная боковая группа гомологичного ароматического остатка отвернута от кофактора. Неконсервативный S240 в BioA (аланин у гомологов) создает полярную область на входе в полость активного центра. Еще одним отличием BioA является наличие вблизи активного центра пары неконсервативных полярных остатков – D158 и Y25, боковые группы которых образуют водородную связь между собой, а также с каталитическим Y155. В положении, аналогичном Y25, у гомологов находится гидрофобный остаток. Таким образом, в случае BioA пара D158–Y25 может дополнительно стабилизировать структуру активного центра, являясь следствием адаптации к повышенной температуре.

Таким образом, исследована структура термостабильной ТА из археи *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661, проведено ее сравнение со структурами гомологичных ферментов и выявлены различия в активном центре, которые могут отражать субстратную специфичность BioA.

Работы по экспрессии и выделению белка выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00164), кристаллизация и рентгеноструктурный эксперимент выполнены при поддержке Российского Федерального космического агентства (проект КЭ (ЦР) “Кристаллизатор”), работы по кристаллографическому уточнению и анализу полученной структуры выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bezsudnova E.Y., Boyko K.M., Popov V.O.* // Biochemistry (Mosc.) 2017. V. 82. P. 1572. <https://doi.org/10.1134/S0006297917130028>
2. *Fuchs M., Farnberger J.E., Kroutil W.* // Eur. J. Org. Chem. 2015. V. 2015. P. 6965. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500852>
3. *Guo F., Berglund P.* // Green Chem. 2017. V. 19. P. 333. <https://doi.org/10.1039/C6GC02328B>
4. *Slabu I., Galman J.L., Turner N.J. et al.* // Acs. Catalysis. 2017. V. 7. P. 8263. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02686>

5. *Steffen-Munzberg F., Vickers C., Kohls H. et al.* // *Bio-technol. Adv.* 2015. V. 33. P. 566.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.012>
6. *Wu S., Snajdrova R., Moore J.C. et al.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2020. V. 60. № 1. P. 88.
<https://doi.org/10.1002/anie.202006648>
7. *Grishin N.V., Phillips M.A., Goldsmith E.J.* // *Protein Sci.* 1995. V. 4. P. 1291.
<https://doi.org/10.1002/pro.5560040705>
8. *Bezsudnova E.Y., Popov V.O., Boyko K.M.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. P. 2343.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10369-6>
9. *Hult K., Berglund P.* // *Trends Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 231.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.03.002>
10. *Kaulmann U., Smithies K., Smith M.E.B. et al.* // *Enzyme Microbial Technology.* 2007. V. 41. P. 628.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.011>
11. *Steffen-Munzberg F., Matzel P., Sowa M.A. et al.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. P. 4511.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7275-9>
12. *Stoner G.L., Eisenberg M.A.* // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. P. 4037.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41381-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41381-1)
13. *Cobessi D., Dumas R., Pautre V. et al.* // *Plant Cell.* 2012. V. 24. P. 1608.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.097675>
14. *Mann S., Ploux O.* // *Febs J.* 2006. V. 273. P. 4778.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05479.x>
15. *Bezsudnova E.Y., Stekhanova T.N., Popinako A.V. et al.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. P. 9621.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9310-0>
16. *Bult C.J., White O., Olsen G.J. et al.* // *Science.* 1996. V. 273. P. 1058.
<https://doi.org/10.1126/science.273.5278.1058>
17. *Boyko K., Gorbacheva M., Rakitina T. et al.* // *Acta Cryst. F.* 2015. V. 71. P. 24.
<https://doi.org/10.1107/S2053230X14025333>
18. *Boyko K.M., Lipkin A.V., Popov V.O. et al.* // *Crystallography Reports.* 2013. V. 58. P. 442.
<https://doi.org/10.1134/S106377451105004X>
19. *Bourenkov G.P., Popov A.N.* // *Acta Cryst. D.* 2006. V. 62. P. 58.
<https://doi.org/10.1107/S0907444905033998>
20. *Battye T.G., Kontogiannis L., Johnson O. et al.* // *Acta Cryst. D.* 2011. V. 67. P. 271.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
21. *Vagin A.A., Isupov M.N.* // *Acta Cryst. D.* 2001. V. 57. P. 1451.
<https://doi.org/10.1107/s0907444901012409>
22. *Vagin A.A., Steiner R.A., Lebedev A.A. et al.* // *Acta Cryst. D.* 2004. V. 60. P. 2184.
<https://doi.org/10.1107/S0907444904023510>
23. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G. et al.* // *Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. P. 486.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
24. *Dey S., Lane J.M., Lee R.E. et al.* // *Biochemistry.* 2010. V. 49. P. 6746.
<https://doi.org/10.1021/bi902097j>
25. *Kwon S., Lee J.H., Kim C.M. et al.* // *Sci Rep.* 2019. V. 9. P. 6958.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43490-2>
26. *Roura Padrosa D., Alaux R., Smith P. et al.* // *Front Bio-eng Biotechnol.* 2019. V. 7. P. 282.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00282>