

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.55

ВЛИЯНИЕ ВОЗВРАЩЕНИЯ CYS11 НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ S11C CYS-FREE NT.BSPD6I

© 2023 г. Р. И. Артюх^{1,*}, Б. Ф. Фатхуллин², В. Н. Антипова¹, Т. А. Перевязова¹,
Г. С. Качалова¹, А. К. Юнусова¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

²Институт белка РАН, Пушкино, Россия

*E-mail: rimtaartuykh@gmail.com

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 20.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

Пространственная структура рекомбинантной никующей эндонуклеазы S11C Cys-free Nt.BspD6I определена с разрешением 1.85 Å. Никаза S11C Cys-free Nt.BspD6I получена в результате возвращения Cys11 в Cys-free Nt.BspD6I методом сайт-направленного мутагенеза. Анализ кристаллической структуры никазы S11C Cys-free Nt.BspD6I показал, что возвращение Cys11 индуцирует заметные конформационные изменения в узнающем домене никазы, которые сопровождаются изменениями в ее функции: уменьшением сродства к ДНК, потерей образования олигомерных форм и высокой активностью эндонуклеазы рестрикции S11C Cys-free R.BspD6I.

DOI: 10.31857/S0023476123600702, EDN: YEJZJU

ВВЕДЕНИЕ

Цистеиновые аминокислотные остатки (а. о.) редко встречаются (1.9%) в молекулах белка, за исключением случаев, когда они определяют основную функцию белков, например металлопротеин-подобные белки [1]. Присутствие цистеинов в активном центре белков определяется высокой реакционной активностью их тиольных групп. Согласно данным “Mechanism and Catalytic Site Atlas” (M-CSA) количество ферментов с а. о. цистеина, задействованных в каталитической функции, составляет 189 из 648 ферментов [2, 3].

Цистеины участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. Окисление цистеина ведет к образованию связи между двумя атомами серы от двух разных а. о. цистеинов. Дисульфидные мостики поддерживают стабильную структуру молекулы белка [4].

В связи с этим возникает интерес определить роль остатков цистеина в структуре и функции никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I (никазы).

Никаза Nt.BspD6I принадлежит к классу уникальных ферментов, которые связываются со специфической последовательностью в ДНК и гидролизуют только одну цепь. Никаза узнает асимметричный короткий сайт 5'-GAGTC-3' в двухцепочечной ДНК (дцДНК) и вносит ник в верхнюю цепь дцДНК на расстоянии четырех нуклеотидов от узнающего сайта в сторону 3'-конца.

Гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции R.BspD6I состоит из двух разных субъединиц (никаза и малая субъединица BspD6I) и расщепляет обе цепи дцДНК. Структуры никазы (PDB ID: 2EWF) и малой субъединицы BspD6I (PDB ID: 2P14) определены с высоким разрешением в [5].

Молекула никазы имеет доменную структуру: N-концевой узнающий домен, состоящий из двух субдоменов D1 и D2, линкерный домен и C-концевой расщепляющий домен (рис. 1). Механизм функционирования никазы Nt.BspD6I до настоящего времени не известен. Для изучения механизма функционирования ферментов используют метод сайт-направленного мутагенеза индивидуальных а. о. в структуре белка.

Пространственное расположение цистеиновых остатков в молекуле никазы позволяет определить их влияние как на связывание, так и на гидролиз ДНК, так как два цистеиновых остатка (11 и 160) локализованы в D1- и D2-субдоменах узнающего домена соответственно, и два других цистеиновых остатка (508 и 578) расположены в расщепляющем домене.

В [6] определена кристаллическая структура никазы Cys-free Nt.BspD6I, в которой четыре цистеиновых остатка (11, 160, 508 и 578) заменены на серин. Анализ структуры и функциональной активности Cys-free-никазы показал, что замещение цистеинов на серин не влияет на никующую функцию, тогда как имеет значительное воздей-

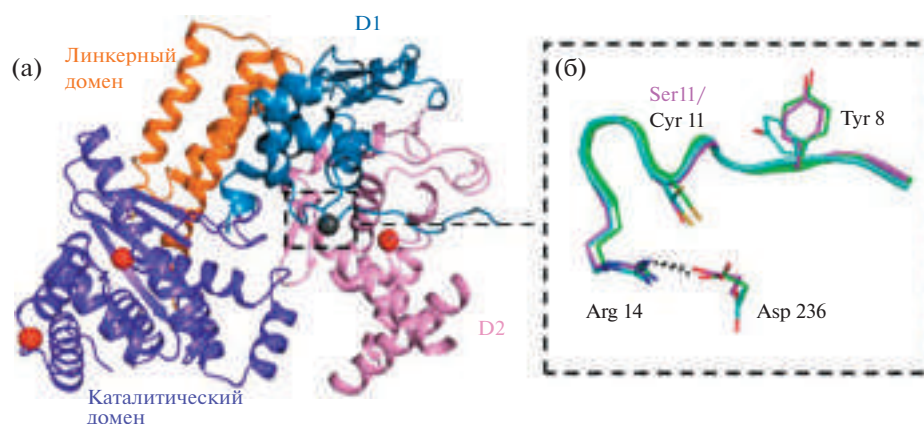


Рис. 1. Структура А-цепи S11C-никазы и влияние мутации: а – организация доменов S11C-никазы. Положения мутированных аминокислот показаны красными сферами, Cys11 – серой сферой; б – наложение трех структур никазы: wt-никаза (зеленый), Cys-free-никаза (пурпурный) и А-цепь S11C-никазы (голубой) в области остатка Cys11. Водородные связи показаны черными точками. Показаны две альтернативные конформации Cys11 (голубой) для S11C-никазы.

ствие на рестрикционную активность мутантной рестриктазы R.BspD6I. Поэтому важно определить, один или более из четырех остатков цистеина являются важными для активности рестриктазы R.BspD6I. С этой целью получена S11C-никаза Cys-free Nt.BspD6I (**S11C-никаза**) методом сайт-направленного мутагенеза, в которой один остаток цистеина (Cys11) “возвращен” (обратно мутирован), а три цистеиновых остатка (160, 508 и 578) заменены на серин. Цель данной работы – изучить структуру и функцию S11C-никазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Никаза Nt.BspD6I и малая субъединица (ss) BspD6I получены ранее [7, 8].

Получение и выделение S11C-никазы. S11C-никазу получали методом сайт-направленного мутагенеза на плазмиде pET28b/Cys-free Nt.BspD6I [6] с использованием праймеров:

S11C-f: 5'-TGTTCACCTAGAAGTCCAGA-3' и S11C-r: 5'-AGAAACATACCAATTAACSTTTT-3' (Синтол, Россия). Замена серина на цистеин в гене никазы была подтверждена секвенированием.

Белок S11C-никазы получали, как описано в [9]. Биомассу выращивали на среде LB с антибиотиками (40 мкг/мл канамицина и 10 мкг/мл хлорамфеникола) в течение 3 ч при 37° С до оптической плотности $D_{590} = 0.68$ О.Е. и охлаждали до комнатной температуры. Целевой белок индуцировали 1 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом. Клетки инкубировали в течение ночи при интенсивной аэрации при температуре 20°С. Затем клетки осаждали на центрифуге CR 22GIII (Hitachi, Япония) при 18000 g в течение 30 мин при 4°С и ресуспендировали в буфере А (20 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.5, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 1 мМ этилендиаминтетрауксусная кис-

лота), содержащем 1 мМ фенилметилсульфонил-фторида, при 4°С. Клетки разрушали ультразвуком до снижения оптической плотности в 10 раз на дезинтеграторе УЗД-1 У4.2 (СССР) и центрифугировали при 18 000 g 30 мин (4°С). Полученный лизат очищали в две стадии с помощью хроматографии с использованием системы BioLogic LP (Bio-Rad). Первичную очистку проводили на Ni-NTA-агарозе (QIAGEN, Германия), уравновешенной буфером А с добавлением 10 мМ имидазола. Разделение проводили в ступенчатом градиенте имидазола (30, 50 и 100 мМ) в буфере А со скоростью 0.5 мл/мин. Фракции анализировали на наличие целевого белка методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле по Лэммли [10]. Целевой продукт обнаружен во фракциях, элюированных 100 мМ имидазола. Для очистки от примесей фракции, содержащие максимальное количество мутантной никазы, объединяли, диализовали против буфера В (10 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.5, 100 мМ KCl, 10% глицерина) и наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P11 (Whatman, Великобритания), уравновешенную буфером В, со скоростью 0.3 мл/мин. Разделение проводили в ступенчатом градиенте KCl (200, 500 и 800 мМ) в буфере В со скоростью 0.5 мл/мин. Целевой белок обнаруживали во фракциях, элюированных 500 мМ KCl. Для последующей кристаллизации отбирали фракции с наибольшей концентрацией белка.

Определение активности S11C-никазы. Активность S11C-никазы определяли гидролизом 1 мкг ДНК фага T7 (“СибЭнзим”, Россия) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 150 мМ KCl и 1 мМ β -меркаптоэтанол, в течение 1 ч при 55°С. Продукты расщепления ДНК разделяли электрофорезом в 0.8%-ном агарозном геле с использованием трис-ацетатного

буфера. ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-трансиллюминаторе.

Связывание S11C-никазы с ДНК дуплексом. Комплементарные 26-мерные олигонуклеотиды А и В (5'-CTGATGAAGAGTCCTTAGTTACACT G-3' и 5'-CAGTGTAACAAAGGACTCTTCATCA G-3') смешивали в эквимольных количествах в буфере (20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 50 мМ NaCl и 1 мМ β-меркаптоэтанол), нагревали на водяной бане до 90°C и медленно охлаждали до комнатной температуры.

Комплекс дуплекса АВ (1 мкМ) с никазой получали в буфере для связывания (10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ CaCl₂, 1 мМ дитиотреитол) при варьировании концентрации белка в течение 15 мин при 55°C. Эксперименты проводили не менее трех раз. Продукты комплексообразования разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле при постоянном токе 20 мА в трис-ацетатном буфере, рН 8.0 [11]. Положение АВ-дуплекса и комплекса в геле определяли бромистым этидием.

Кристаллизация S11C-никазы. Очищенный белок S11C-никазы (36.5 мг/мл) в буфере (20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 200 мМ KCl и 10% глицерина) кристаллизовали при 293 К методом диффузии паров в варианте сидячей капли. Кристаллизационную каплю, которая состояла из 2 мкл белка и 1 мкл резервуарного раствора, уравнивали 100 мкл резервуарного раствора, содержащего 0.04 М КН₂РO₄, 16 мас. % ПЭГ 8000 и 20% глицерина, рН 5.5. Через 24 ч образовались игольчатые кристаллы. На четвертые сутки размеры кристаллов достигали 950–750 × 100 × 50 мкм.

Сбор и обработка данных рентгеноструктурного анализа (РСА) монокристалла S11C-никазы. Данные РСА монокристалла S11C-никазы получены на станции ID23-1 в Европейском центре синхротронного излучения (ESRF; Гренобль, Франция) при 100 К с использованием CCD-детектора ADSC QUANTUM 315г с монохроматическим излучением с длиной волны 0.97623 Å. Полный угол поворота кристалла составлял 100° с шагом осцилляции 0.1°. Кристалл в нейлоновой петле замораживали без добавления криораствора. Полный набор данных получен при разрешении 1.85 Å. Индексацию и интегрирование экспериментальных данных проводили с помощью программ XDS [12, 13] и iMosflm [14]. Масштабирование интенсивности и расчет структурных факторов проводили с помощью программы Scala [15]. Уточнение структуры выполнено в REFMAC [16]. Данные и статистика уточнения приведены в табл. 1.

Атомные координаты модели и структурные факторы S11C-никазы депонированы в PDB ID: 5LIQ.

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционного набора и кристаллографического уточнения

Статистика набора	
Пр. гр.	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å	76.20, 92.48, 113.81
α, β, γ, град	90.00, 105.67, 90.00
Разрешение, Å	109.6–1.85 (1.92–1.85)*
<i>R</i> _{merge}	0.03 (0.66)
Среднее <i>I</i> /σ(<i>I</i>)	18.7 (2.0)*
Полнота набора, %	99.6 (99.6)*
Избыточность	3.8 (3.6)*
Число отражений на независимую часть элементарной ячейки	129040 (12820)
Уточнение структуры	
Разрешение, Å	19.58–1.85
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.21/0.25 (0.33/0.34)
В-фактор Вильсона, Å ²	39.2
Число атомов	
Неводородные атомы	10 168
Белковые атомы	9671
Атомы лигандов	83
Атомы растворителя	295
Карта Рамачандрана	
предпочтительные, %	97.49
разрешенные, %	2.34
запрещенные, %	0.17
R.M.S.D.	
Связи, Å	0.07
Углы, град	0.08
В-фактор, Å ²	
Средний	48.4
Белка	48.29
Лигандов	60.42
Растворителя	47.95
Выбросы по ротамерам (%)	1.57

* Данные в скобках соответствуют зоне высокого разрешения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структурное исследование. Собран набор данных с монокристалла и определена структура S11C-никазы с высоким разрешением (1.85 Å) (рис. 2). Кристаллы S11C-никазы относятся к пр. гр. *P*2₁ и содержат две молекулы никазы (цепи А и В) в асимметричной ячейке. Кристаллы никазы дикого типа (wt) [5] и Cys-free-никазы [6] относятся к одной и той же пространственной группе.

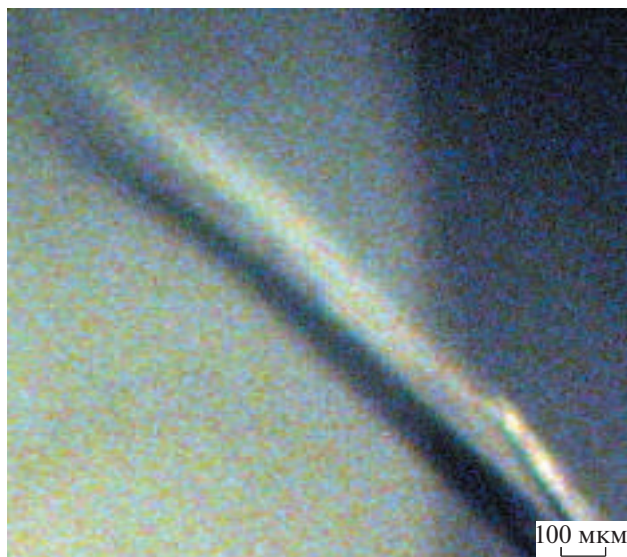


Рис. 2. Фото кристалла S11C Cys-free Nt.BspD6I.

Наложение структуры А-цепи S11C-никазы дает следующие значения среднеквадратичного отклонения координат (**RMSD**) C_{α} -атомов: с В-цепью — 0.573 Å, с Cys-free-никазой — 0.773 Å, с wt-никазой — 0.429 Å. Эти значения указывают на незначительные различия в положении атомов C_{α} в сравниваемых структурах никаза.

Сравнение структур никаза S11C, wt и Cys-free выявило а. о., конформация боковых групп которых изменилась в результате возврата Cys11 в Cys-free-никазу. Например, положения Cys11 в wt-никазе и Ser11 в Cys-free-никазе совпадают, а тиольная группа возвращенного Cys11 занимает два альтернативных положения: А и В. Положение А совпадает с положением Cys11 в wt-никазе и Ser11 в Cys-free-никазе.

В положении В SH-группа Cys11 повернута на 120° вокруг связи $C_{\alpha}-C_{\beta}$ в сторону Tyr8, гидроксильная группа которого сближается с SH-группой Cys11 на 4.6 Å в результате поворота фенольного кольца Tyr8 на 85° относительно его положения в wt- и Cys-free-никазах (рис. 3). Как видно из рис. 3, Cys11 в wt-никазе и Ser11 в Cys-free-никазе расположены на расстоянии 10 Å от фенольного кольца Tyr8. Возвращение Cys11 также вызывает изменение положения карбоксильной группы Asp236 по отношению к ее положению в никазах wt и Cys-free. Карбоксильная группа повернута вокруг связи $C_{\alpha}-C_{\beta}$ на угол 67.4°, а атом C_{γ} смещен на 1.8 Å, что приводит к потере водородной связи (2.8 Å) с Arg14.

Изменения в электростатических взаимодействиях наблюдаются также в области Lys106, связанного водородной связью в Cys-free-никазе с OE2/Glu442 (3.09 Å) и с OE2/Glu364 (3.29 Å), тогда

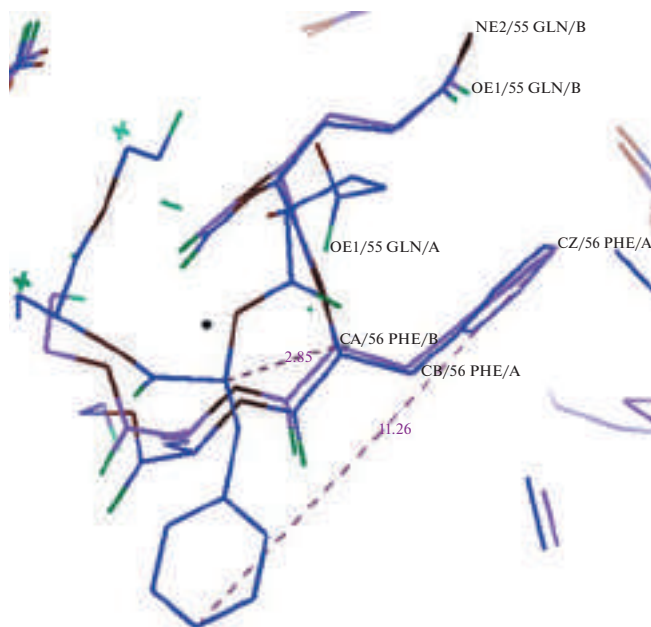


Рис. 3. Наложение фрагмента петли L1 в молекулах Cys-free (желтый) и А- и В-цепей (зеленый и голубой) S11C-никаза.

как в S11C- и wt-никазе этих взаимодействий не происходит. Таким образом, Lys106 субдомена D1 образует связь как с линкерным доменом, так и с С-доменом в Cys-free-никазе, что, вероятно, важно для поддержания конформации молекулы никаза, необходимой для ее функционирования.

Возврат Cys11 вызывает значительные изменения положения некоторых боковых групп гидрофобных остатков в субдоме D1 узнающего домена. Наложение структур Cys-free- и S11C-никаза (рис. 3) демонстрирует заметные конформационные изменения, которым подвергается боковая цепь Phe56.

Как видно из рис. 3, C_{α} -атом полипептидной цепи в этом районе смещен на 2.85 Å, а фенольное кольцо Phe56 развернуто вокруг связи $C_{\alpha}-C_{\beta}$, что приводит к смещению C_{γ} -атома фенольного кольца в двух никазах на 11.26 Å друг относительно друга. На рис. 3 также хорошо видно изменение положения боковой группы Gln55. Аминокислотные остатки, боковые группы которых изменяют свою конформацию в результате возвращения Cys11, занимают такое же положение в wt-никазе, также содержащей Cys11.

Таким образом, сравнительный структурный анализ никаза S11C, Cys-free и wt показал, что возвращение Cys11 сопровождается конформационными изменениями в N-концевом узнающем домене (рис. 1, 3).

Функциональное исследование. В связи с изложенным выше интерес заключался в том, чтобы определить возможное влияние возврата Cys11 на

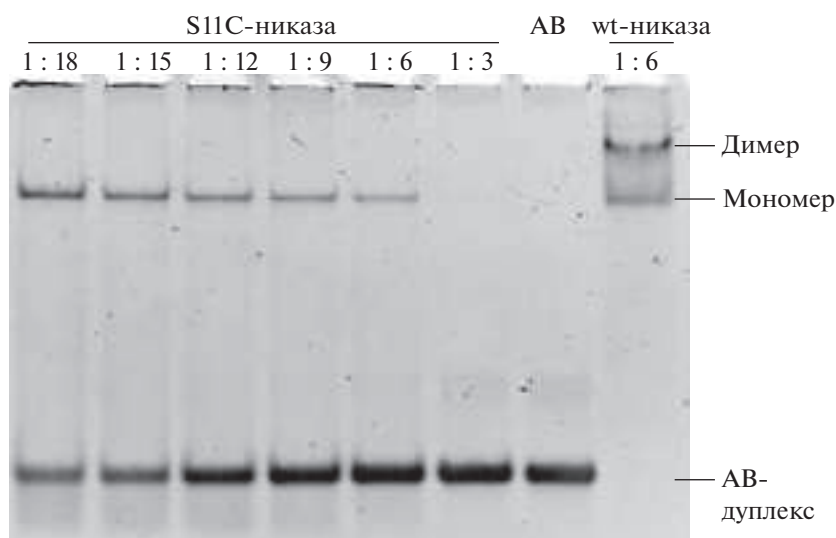


Рис. 4. Образование комплексов ДНК-дуплекса с никазами wt и S11C. Отношение концентрации дуплекса АВ (1 мкМ) к концентрации никаз wt и S11C обозначено цифрами сверху (мкМ).

связывание S11C-никазы с ДНК. Для этого сравнили связывание ДНК-дуплекса с wt-никазой в концентрации, соответствующей полному связыванию 1 мкМ дуплекса [6], и S11C-никазы в концентрации от 3 до 18 мкМ (рис. 4).

Используемый АВ-дуплекс состоит из 26 последовательностей нуклеотидов (п. н.) и содержит сайт узнавания 5'-GAGTC. В [6] показано, что полное связывание АВ-дуплекса Cys-free-никазой происходит при концентрации 9 мкМ. Эта концентрация никазы указывает на то, что полная замена всех цистеиновых остатков на серин в никазе немного снижает ее способность связывать дуплекс по сравнению с wt-никазой, полное связывание которой происходит при 6 мкМ. Как видно из рис. 4, возврат Cys11 не приводит к полному связыванию дуплекса даже при концентрации 18 мкМ. Следовательно, возврат Cys11 значительно снижает родство S11C-никазы к ДНК.

В [17] было показано, что цистеиновые а. о. 11 и 160 узнающего домена или один из них образуют ковалентную связь с ДНК-дуплексом, имеющим в сайте узнавания реактивную группу, специфически взаимодействующую с тиоловой группой цистеинов. Эти данные указывают на близкое расположение а. о. цистеина 11 или 160 к ДНК при образовании комплекса с никазой. Данные, полученные при анализе структуры S11C-никазы (рис. 1) и в эксперименте по связыванию этого белка с ДНК (рис. 4), позволяют предположить, что именно Cys11 находится вблизи сайта узнавания и поэтому конформационное изменение в области Cys11 оказывает такое сильное влияние на связывание S11C-никазы с ДНК.

Отметим, что Cys160 локализован в глубине субдомена D2, а Cys11 расположен на поверхно-

сти щели, в которую, согласно модели комплекса никаза–ДНК, встраивается ДНК [5]; поэтому весьма вероятно, что Cys11 взаимодействует с ДНК. На взаимодействие S11C-никазы с ДНК могут влиять и другие а. о., расположенные в щели (Tyr8, Asp236, Cys11, петля L1 с Phe56), боковые группы которых, как показано выше, претерпевают конформационные изменения в результате возвращения Cys11.

Особо отметим, что с увеличением концентрации S11C-никазы (рис. 4) увеличивается концентрация мономерного комплекса никазы с дуплексом, а олигомерные формы белка не образуются даже при концентрации 18 мкМ. Никаза дикого типа в концентрации 6 мкМ образует большое количество димерных комплексов с дуплексом, а в случае Cys-free-никазы количество димерных комплексов с дуплексом превышает количество мономерных даже при концентрации 3 мкМ [6]. Способность белка образовывать олигомерные формы при увеличении его концентрации является свойством многих белков [18, 19]. Возможно, конформационные изменения, обнаруженные в узнающем домене S11C-никазы, происходят в областях, участвующих в межмолекулярных взаимодействиях [20].

Представляло интерес определить, влияет ли возвращение Cys11 на способность никазы гидролизовать фосфодиэфирную связь в ДНК. Как правило, активность никазы определяется ее способностью расщеплять ДНК фага T7. Активность wt- и S11C-никаз определяли по полноте специфического гидролиза 1 мкг нативной ДНК фага T7 в течение 1 ч в оптимальных для фермента условиях. Узнаваемая никазой последовательность 5-GAGTC встречается в этой ДНК 115 раз,

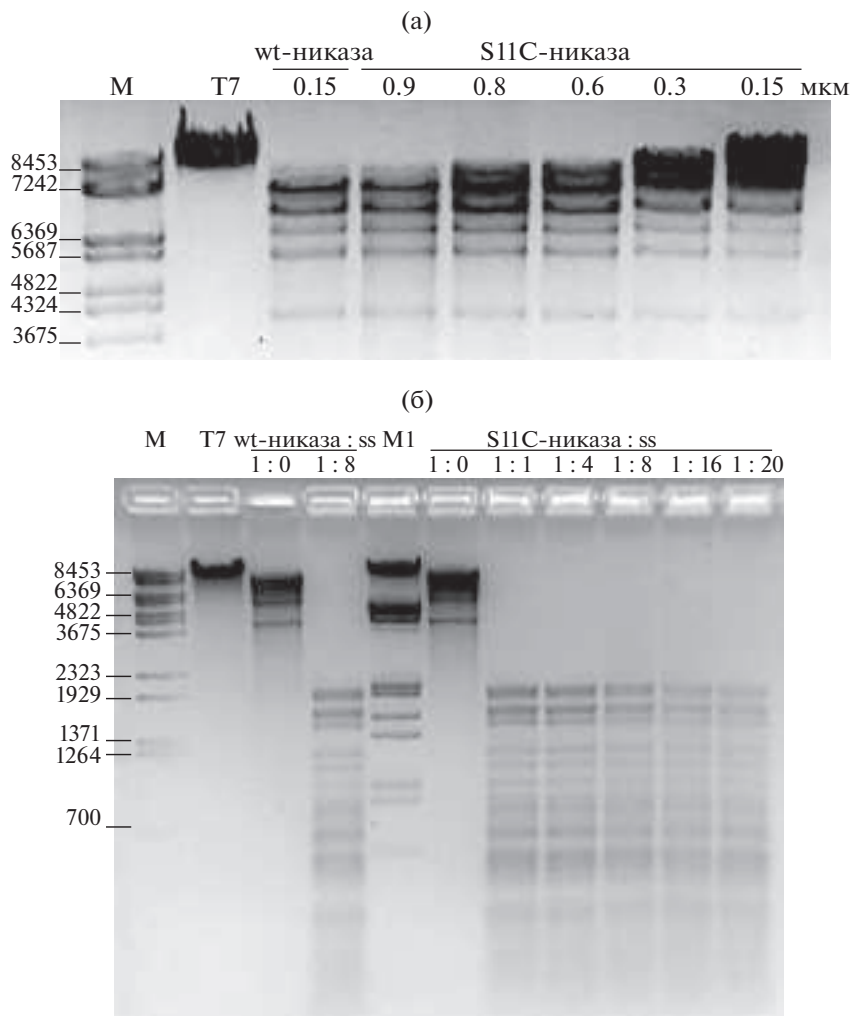


Рис. 5. Продукты гидролиза ДНК фага T7 никазами wt и S11C Nt.BspD6I (а) и эндонуклеазы рестрикции wt и S11C R.BspD6I (б); М — маркер ДНК (Lambda/Eco911) (Fermentas, Thermo Fisher), M1 — маркер ДНК (Lambda: EcoRI + HindIII; Thermo Fisher Scientific), T7 — необработанная ДНК фага T7. Размеры маркеров в п. н. указаны слева. Концентрация никаза wt и S11C (мкМ) и отношение концентрации никаза к концентрации малой субъединицы (ss) обозначены сверху.

но никаза гидролизует ДНК на фрагменты только в том случае, если два инвертированных сайта расположены на расстоянии ~ 7 –17 п. н. друг от друга. В ДНК фага T7 таких последовательностей четыре. Таким образом, никование ДНК фага T7 приводит к образованию пяти фрагментов. На рис. 5а представлены продукты гидролиза ДНК wt- и S11C-никазами. На рис. 5а показан полный гидролиз ДНК фага T7 wt- и S11C-никазами в концентрации 0.15 и 0.9 мкМ соответственно. Эти данные указывают на то, что возвращение Cys11 значительно снижает никующую активность S11C-никазы по сравнению с wt- и Cys-free-никазами, обладающими одинаковой активностью [6]. Наиболее вероятной причиной низкой активности S11C-никазы является низкое сродство к ДНК (рис. 4).

Никаза вместе с малой субъединицей образуют гетеродимерную эндонуклеазу рестрикции R.BspD6I, которая гидролизует обе цепи ДНК. Ранее было показано, что активность R.BspD6I, состоящей из большой субъединицы Cys-free-никазы и малой субъединицы BspD6I, в 2 раза ниже активности wt R.BspD6I [6].

В связи с этими данными представляло интерес выяснить, влияет ли возвращение Cys11 на рестрикционную активность R.BspD6I. Поскольку 100%-ное никование ДНК wt- и S11C-никазами происходит при концентрациях 0.15 и 0.9 мкМ соответственно (рис. 5а), эти концентрации использованы при гидролизе ДНК рестриктазой S11C R.BspD6I. На рис. 5б показаны продукты рестрикции ДНК фага T7 рестриктазой R.BspD6I,

состоящей из большой субъединицы S11C-никазы и малой субъединицы BspD6I.

О полной рестрикции ДНК судили по образованию набора фрагментов длиной менее 2000 п.н. Как видно из рис. 5б, полный гидролиз ДНК рестриктазой S11C R.BspD6I наблюдается уже при соотношении концентраций большой и малой субъединиц 1 : 1, в то время как wt R.BspD6I осуществляет полную рестрикцию ДНК только при соотношении 1 : 8. Рестриктаза R.BspD6I с S11C-никазой в мономерной форме проявляет в несколько раз выше активность относительно рестриктазы wt R.BspD6I и рестриктазы с Cys-free-никазой. Причиной различий в активности рестриктаз является то, что в условиях полной рестрикции ДНК большие субъединицы двух последних рестриктаз находятся в олигомерной форме [6]. Ранее мы предположили, что на активность рестриктазы влияет олигомеризация большой субъединицы. Это исследование подтверждает предположение и указывает на то, что лимитирующей стадией рестрикции является десорбция большой субъединицы от ДНК после ее гидролиза. По-видимому, олигомерные формы никазы диссоциируют медленнее, чем мономерные, вероятно, из-за большего числа контактов с ДНК. Следовательно, в случае олигомерных форм большой субъединицы требуется большее количество молекул малых субъединиц, чтобы облегчить диссоциацию никазы от ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, возвращение Cys11 в Cys-free-никазу привело к тому, что белок утратил способность образовывать олигомерные формы, его сродство к ДНК было снижено, а активность эндонуклеазы рестрикции R.BspD6I, образованной большой субъединицей S11C-никазы и малой субъединицей BspD6I, повысилась. Все структурные изменения происходят вдоль щели, образованной N-концом узнающего домена, петель L1 субдомена D1 и α 5-спиралью субдомена D2. Полагаем, что аминокислоты, расположенные в этой щели, непосредственно взаимодействуют с ДНК и ответственны за функциональную активность никазы.

Авторы выражают благодарность А.Н. Попову и Европейскому центру синхротронного излучения (ESRF) (Гренобль, Франция).

Работа выполнена при финансовой поддержке ИТЭБ РАН (госзадание № 075-01025-23-01).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang W.-C., Mao H., Ma D.-D., Yang W.-X. // Front. Mar. Sci. 2014. V. 1. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00034>
2. Holliday G.L., Mitchell J.B., Thornton J.M. // J. Mol. Biol. 2009. V. 390. P. 560. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.015>
3. Ribeiro A.J.M., Tyzack J.D., Borkakoti N. et al. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 314. <https://doi.org/10.1074/jbcREV119.006289>
4. Leichert L.I., Jakob U. // Antioxid. Redox Signal. 2006. V. 8 (5–6). P. 763. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.763>
5. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Yunusova A.K. et al. // J. Mol. Biol. 2008. V. 384 (2). P. 489. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.033>
6. Artyukh R.I., Fatkhullin B.F., Kachalova G.S. et al. // Biochim. Biophys. Acta — Proteins Proteom. 2022. V. 1870 (3). P. 140756. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2022.140756>
7. Zheleznyaya L.A., Perevyazova T.A., Alzhanova D.V., Matvienko N.I. // Biochemistry. 2001. V. 66. P. 989.
8. Yunusova A.K., Rogulin E.A., Artyukh R.I. et al. // Biochemistry. 2006. V. 71. P. 815.
9. Rogulin E.A., Perevyazova T.A., Zheleznyaya L.A., Matvienko N.I. // Biochemistry. 2004. V. 69 (10). P. 1123. <https://doi.org/10.1023/b:biry.0000046886.19428.d5>
10. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227 (5259). P. 680. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
11. Hellman L.M., Fried M.G. // Nat. Protoc. 2007. V. 2 (8). P. 1849. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>
12. Kabsch W. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. Pt. 2. P. 125. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
13. Kabsch W. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. Pt. 2. P. 133. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047374>
14. Battye T.G., Kontogiannis L., Johnson O. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. Pt. 4. P. 271. <https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
15. Evans P. // Acta Cryst. D. 2006. V. 62. Pt. 1. P. 72. <https://doi.org/10.1107/S0907444905036693>
16. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // Acta Cryst. D. 1997. V. 53. Pt. 3. P. 240. <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>
17. Abrosimova L.A., Samsonova A.R., Perevyazova T.A. // Mol. Biol. (Rus). 2020. V. 54. (4). P. 667. <https://doi.org/10.31857/S0026898420040023>
18. Goodsell D.S., Olson A.J. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2020. V. 29. P. 105. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.105>
19. Santos J., Pujols J., Pallarès I. et al. // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2020. V. 18. P. 1403. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.05.026>
20. Sekerina S.A., Grishin A.V., Riazanova A.I. et al. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. V. 38 (4). P. 431. <https://doi.org/10.1134/s1068162012040127>