

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.32

ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ПРИОНА SUP35 ИЗ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae* МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2023 г. А. Д. Бурцева¹, А. В. Моисеенко², Т. Н. Баймухаметов³, А. А. Дергалев¹,
К. М. Бойко^{1,*}, В. В. Кушников¹

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 06.06.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

Прионы являются инфекционным вариантом амилоидов, участвующих в патогенезе ряда нейродегенеративных заболеваний человека, в том числе болезней Альцгеймера и Паркинсона. Прионы дрожжей, в частности белок Sup35, представляют собой эффективную модель для изучения базовых свойств амилоидов. Штаммовые варианты прионной формы Sup35 лежат в основе конформационного разнообразия образованных им амилоидных структур, обладающих различающимися биологическими свойствами. Пространственная организация приона Sup35 до сих пор не установлена. Методом просвечивающей электронной микроскопии проведено исследование структуры штаммового варианта W прионного белка Sup35, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Проведены оценка параметров фибриллы и реконструкция ее структуры с низким разрешением.

DOI: 10.31857/S0023476123600817, EDN: NAMYDW

ВВЕДЕНИЕ

Прионы способны катализировать конформационное превращение нормального клеточного белка в амилоидные структуры и являются инфекционным подклассом амилоидов, представляющих собой фибриллярные агрегаты некоторых растворимых в норме белков, центральная часть которых – амилоидный “кор” – обладает регулярной кросс- β -структурой [1]. Образование амилоидов наблюдается при ряде нейродегенеративных заболеваний человека и животных, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, диабет II типа и др. [2], широко распространенных у людей старшего возраста и на данный момент являющихся неизлечимыми.

Все известные прионные заболевания млекопитающих вызываются эндогенным белком PrP [3], имеющим схожие с прионными белками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* механизмы существования наследуемых вариантов с различными биологическими свойствами, агрегации в амилоидные структуры и устойчивости к протеазам [4]. Таким образом, прионы дрожжей, в частности наиболее изученный дрожжевой белок Sup35, являются удобными моделями для изучения общих

структурно-функциональных свойств прионов и амилоидов благодаря относительной простоте культивирования дрожжей и получения белка, а также разработанным системам детекции прионных фенотипов, позволяющих отслеживать биологические эффекты от присутствия в клетках тех или иных прионных конформаций.

Фундаментальным свойством амилоидов, включая Sup35, является существование “штаммовых” вариантов, существенно различающихся биологическими свойствами. По эффективности связывания мономерного белка в амилоидную фибриллу штаммовые варианты приона Sup35 разделяются на две категории: сильные (S) и слабые (W) [5]. Сильные варианты полимеризуют Sup35 более эффективно, эффективнее фрагментируются клеточными шаперонами и имеют меньший размер амилоидных полимеров в клетках дрожжей [6]. Из имеющихся косвенных данных о пространственной организации “сильных” и “слабых” вариантов приона Sup35 следует, что в основе различий в фенотипических проявлениях этих вариантов лежат разные пространственные укладки белка Sup35 в составе соответствующих амилоидных фибрилл.

На данный момент полноатомная структура ни одного штаммового варианта Sup35 не установлена, а имеющиеся косвенные данные о пространственной организации амилоидных фибрилл белка Sup35 “сильного” и “слабого” типа противоречивы [7–10]. Также было показано, что данные, полученные на моделях *in vitro* (т.е. амилоидные фибриллы Sup35, возникшие *de novo* в препарате выделенного рекомбинантного белка) и *ex vivo* (амилоиды, выделенные из клеток дрожжей с прионом), значительно различаются [10, 11]. Это может быть объяснено тем, что, хотя *in vitro* Sup35 самодостаточен для амилоидного превращения, в клетках дрожжей поддержание и наследование приона происходит в тесном взаимодействии с многочисленными клеточными факторами – прежде всего шаперонами, такими как Hsp104, Ssa1 и Sis1, которые участвуют в его фрагментации [12]. Такое взаимодействие приводит к селекции из всех амилоидных укладок, которые могут возникать в бесклеточной среде, только тех, которые могут стабильно поддерживаться в клетках аналогично тому, как это было описано для прионных и прионоподобных амилоидов млекопитающих [13].

В настоящей работе описаны структурные исследования методом электронной микроскопии (ЭМ) пространственной организации амилоидных фибрилл “слабого” (W) штаммового варианта прионного белка Sup35, выделенного *ex vivo* из дрожжей *S. cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение амилоидных фибрилл прионного белка Sup35 из клеток дрожжей. Клетки данного штамма были трансформированы плазмидой pYES2-Sup35NM-eGFP, кодирующей белковую конструкцию, в которой нативно-неупорядоченный регион белка Sup35 (Sup35NM, аминокислотные остатки (а.о.) 1–239 белка Sup35) слит с зеленым флуоресцентным белком, необходимым для упрощения процедуры выделения целевого белка, и помещен под контроль сильного индуцибельного промотора GAL1. Кроме того, эта плазида содержала ген функционального С-домена белка Sup35 (а.о. 254–685) под контролем промотора гена SUP35 для уменьшения токсического эффекта, который обычно наблюдается при сверхпродукции белка Sup35NM-eGFP в дрожжах с прионом. Трансформанты выращены в 400 мл синтетической среды с 2% глюкозы до состояния стационарной культуры (OD₆₀₀ > 10), после этого к ним было добавлено 600 мл синтетической среды с 2.4% галактозы (которая индуцирует продукцию белка Sup35NM-eGFP под контролем промотора GAL1). Спустя 18 ч клетки осаждали 30 мин при 2200 g, клеточные осадки собрали, за-

морозили в жидком азоте и хранили при температуре –70°C.

Выделение и очистку амилоидных фибрилл провели по ранее отработанному протоколу [10] с некоторыми модификациями. Так, в новом протоколе отказались от соницирования амилоидных макроагрегатов Sup35NM-eGFP (цитоплазматические образования, состоящие из множества скрепленных друг с другом фибрилл этого белка), выделенных из клеточного лизата путем низкоскоростного центрифугирования, так как эта процедура приводила к измельчению амилоидных фибрилл до фрагментов, размер которых был несовместим с их дальнейшим изучением методом ЭМ. В качестве альтернативы для солюбилизации амилоидных макроагрегатов и их разделения на отдельные амилоидные фибриллы обрабатывали фракцию макроагрегатов 4%-ным раствором додецилсульфат натрия (SDS) в течение 30 мин при температуре ~10°C. После этого амилоидные фибриллы отделяли ультрацентрифугированием (268 000 g, 4 ч) в градиенте сахарозы (20–65%), приготовленном на основе трис-солевого буфера (TBS) с 0.1%-ным лаурилсаркозинатом натрия. Фракцию, содержащую наибольшую концентрацию амилоидных фибрилл (~400 мкл), отбирали как фракцию с наиболее интенсивным флуоресцентным сигналом зеленого флуоресцентного белка (GFP). На заключительной стадии очистки полученный препарат фибрилл очищали от сахарозы и избытка детергента путем диализа против 1 л буфера TBS при температуре 4°C в течение ~16 ч (диализный мешок Spectra/Por (Spectrum Medical Industries, США) с пределом отсечения молекулярной массы = 12000 Да). Препарат очищенных фибрилл разделили на аликвоты по 50 мкл, заморозили в жидком азоте и хранили при температуре –70°C.

Негативное окрашивание. Для негативного окрашивания образца использовали сетки для электронной микроскопии Lacey C only 300 mesh (Ted Pella, США), которые были гидрофилизированы с помощью системы очистки тлеющим разрядом PELCO easiGlow (TedPella, США) в течение 30 с при 25 мА. 3 мкл суспензии белка наносили на углеродную подложку сетки и адсорбировали в течение 60 с. Далее сетку поочередно промакивали в двух каплях 1%-ного уранилацетата в течение 10 с. Излишки жидкости убирали фильтровальной бумагой.

Для сбора изображений использовали просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) Jeol JEM-2100 (Центр коллективного пользования Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия) с ускоряющим напряжением 200 кВ (JEOL Ltd., Япония), оснащенный камерой Direct Electron DE-20. Получены 354 снимка

образца при номинальном увеличении в 62000 раз с результирующим размером пикселя 2.5 Å. Доза облучения составила 80 э/Å², сферическая абберация – 1.4 мм. Сбор изображений проводили с помощью программы SerialEM [14]. Основные параметры ЭМ-съемки приведены в табл. 1.

Обработка данных негативного окрашивания. Обработку изображений, полученных после негативного окрашивания, проводили с помощью программного пакета CryoSPARC v3.2 [15]. Была сделана коррекция функции передачи контраста (CTF) 354 изображений со стандартными параметрами. Поиск филаментов без заданного шаблона проведен с помощью Filament tracer в режиме Template-free tracing со следующими параметрами: минимальный диаметр филаментов – 80 Å, максимальный диаметр филаментов – 120 Å, расстояние между сегментами – 0.2 диаметра, минимальная длина филаментов – 3 диаметра. Визуальная оценка 286 000 выбранных частиц была осуществлена с помощью Inspect particle picks. Отбор частиц провели согласно гистограмме NCC Score/Power Score с учетом следующих параметров отсечки: NCC Score > 0.300, 22358 < Local Power < 35065, Curvature < 0.0011 1/Å, Sinuosity < 1.06. 19000 отобранных таким образом проекций частиц, экстрагированных в боксе размером 300 × 300 Å, классифицировали в режиме выравнивания двумерных классов по вертикали со стандартными параметрами. Из 20 полученных двумерных классов выбрали четыре класса с характерными очертаниями фибриллярных структур, содержащих 9000 проекций частиц, на основе которых сделана трехмерная спиральная реконструкция структуры с помощью Helical Refinement с параметрами по умолчанию.

Витрификация. Подготовку образцов для крио-ЭМ-эксперимента провели с помощью оборудования Ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии “Нанозонд” (НИЦ “Курчатовский институт”, Россия). Сетки Quantifoil R 2/2300 mesh гидрофилизировали с помощью системы очистки тлеющим разрядом PELCO easiGlow (TedPella, США) в течение 20 с при 15 мА. 3 мкл препарата варианта W белка Sup35 были нанесены на сетки при температуре 4°C и 100%-ной влажности. Сетки промакивали в течение 3 с, а затем быстро погружали в жидкий этан с помощью автоматизированной установки для витрификации Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США). Экспериментальные данные получены на просвечивающем криоэлектронном микроскопе Titan Krios 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенном детектором прямого детектирования электронов Falcon 2. Основные параметры крио-ЭМ-эксперимента приведены в табл. 2.

Таблица 1. Основные параметры ЭМ-эксперимента штаммового варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Ускоряющее напряжение, кВ	200
Номинальное увеличение	×62000
Пиксель, Å	2.5
Доза облучения, э ⁻ /Å ²	80
Сферическая абберация, мм	1.4
Количество изображений	354

Таблица 2. Основные параметры крио-ЭМ-эксперимента штаммового варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Ускоряющее напряжение, кВ	300
Номинальное увеличение	×59 000
Пиксель, Å	1.15
Суммарная доза облучения на стек, э ⁻ /Å ²	77
Изображений в стек	30
Доза облучения на стек, э ⁻ /Å ²	2.57
Время экспозиции, с	3
Диапазон дефокусировки, мкм	[-2.2, -1.0]
Шаг дефокусировки, мкм	0.1
Сферическая абберация, мм	0.01
Суммарно стеков изображений	1400

Обработка данных криоэлектронной микроскопии. Обработку полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения CryoSPARC (v3.3.2) [15]. Для 1400 стеков изображений были проведены коррекция дрейфа и CTF со стандартными параметрами. Далее провели поиск филаментов при помощи Filament tracer в режиме Template-free tracing со следующими параметрами: минимальный диаметр филаментов – 80 Å, максимальный диаметр филаментов – 150 Å, расстояние между сегментами – 0.2 диаметра, минимальная длина филаментов – 2 диаметра, фильтр нижних частот – 10 Å. Визуальная оценка 1 318 000 выбранных частиц осуществлена с помощью работы Inspect particle picks. Отбор частиц провели согласно гистограмме NCC Score/Power Score с учетом следующих параметров отсечки: оценка NCC > 0.151649 < локальная мощность < 295541, кривизна < 0.0078 1/Å, синусоидальность < 1.264057. 1027 000 отобранных таким образом проекций частиц, экстрагированных в боксе размером 294.4 × 294.4 Å, классифицировали в режиме выравнивания двумерных классов по вертикали со стандартными параметрами. Из 20 полученных двумерных классов выбраны два класса, содержащие 71 000 проекций частиц и имеющие характерные очертания фибриллярных структур.

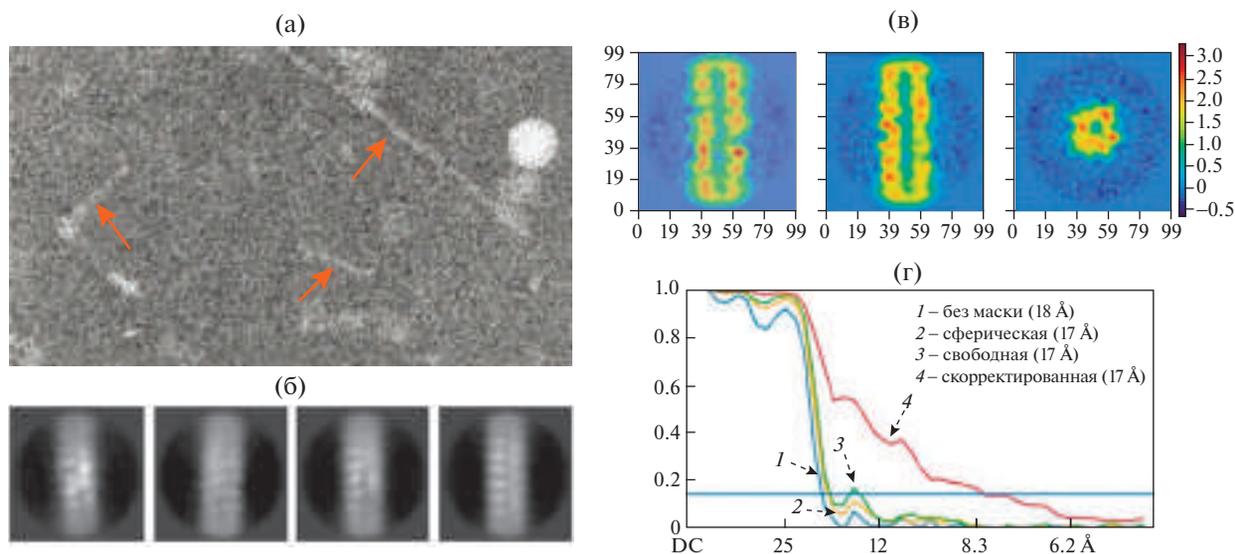


Рис. 1. Данные негативного окрашивания варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: а – ЭМ-изображение амилоидных фибрилл Sup35NM-eGFP; б – двумерные классы сегментов амилоидных фибрилл Sup35NM-eGFP в квадратном боксе размером 300 Å, выбранные для реконструкции; в – проекции крио-ЭМ-карты структуры после спиральной реконструкции в различных плоскостях; г – оценка разрешения по графику GSFSC.

Далее выбранные частицы подвергли повторной двумерной классификации. Из десяти полученных двумерных классов выбрали пять классов с 70000 частиц, на основе которых была сделана трехмерная спиральная реконструкция с помощью Helical Refinement со стандартными параметрами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для структурных исследований выбран прионный вариант W2 белка Sup35 – один из типичных представителей “слабого” класса вариантов приона, охарактеризованный ранее методом протеазного картирования амилоидного “кора” [10]. Проведено негативное окрашивание варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *S. cerevisiae*, с целью оценки пригодности образца для крио-ЭМ-экспериментов и получения трехмерной модели структуры с низким разрешением. Получили 354 изображения амилоидных фибрилл Sup35NM-eGFP, на которых присутствуют как длинные, так и короткие фибриллы, преимущественно прямые и имеющие одинаковый диаметр ~ 100 Å (рис. 1а, табл. 1). Оценка диаметра совпала с данными, полученными ранее и независимо в экспериментах по атомно-силовой микроскопии (данные не приведены), а также с результатами предыдущих исследований амилоидов Sup35 [16]. Полученные изображения свидетельствовали о том, что препарат белка гомогенен, частицы распределены достаточно равномерно, поверхностная концентра-

ция и размер частиц удовлетворяют требованиям для проведения крио-ЭМ-эксперимента.

Для спиральной реконструкции фибрилл провели обработку исходных данных негативного окрашивания, основные этапы которой представлены на рис. 2. После коррекции дрейфа и СТФ для полученных изображений был выполнен поиск филаментов с диаметром в диапазоне от 80 до 120 Å. Обнаружено 286000 частиц, из которых по данным визуального анализа отобрали 19000, лежащих в допустимых областях значений параметров NCC Score и Power Score. На основе выбранных проекций частиц провели 2D-классификацию в режиме выравнивания для спиральной структуры, при котором выравнивание всех средних значений класса происходило по вертикали, что позволяет оценить вращение в плоскости. В результате получили 20 двумерных классов проекций фибрилл в боксах размером 300×300 Å, из которых выбрали четыре класса с суммарным количеством частиц 9000, обладающих наиболее выраженными очертаниями спиральной структуры (рис. 1б). На основе этих классов была проведена 3D-реконструкция крио-ЭМ-карты со стандартными параметрами. Несмотря на низкое разрешение, полученная трехмерная карта крио-ЭМ демонстрирует характерные признаки спиральной структуры – обладает осевой симметрией и периодичностью (рис. 1в). В соответствии с золотым стандартом $FSC = 0.143$ [17, 18] реконструкция крио-ЭМ-карты фибриллы без использования маски имеет разрешение ~ 18 Å (рис. 1г), что



Рис. 2. Основные этапы обработки данных негативного окрашивания варианта W2 белка Sup35NM-eGFP.

соответствует максимальному разрешению для метода негативного контраста.

Известно, что дрожжевой прион Sup35 формирует амилоидные фибриллы с параллельными β -листами в так называемой “in-register”-укладке, в которой каждый остаток в одной молекуле выравнивается с тем же остатком в соседней молекуле, образуя линию идентичных остатков вдоль длинной оси филамента (рис. 3а) [8]. Для крио-ЭМ-реконструкции структур со спиральной симметрией, в частности амилоидных фибрилл, критически важно определить параметры симметрии, которые позволят провести корректное вы-

равнивание частиц. Такими параметрами являются связанные между собой винтовой шаг (pitch, p), винтовой подъем (rise, Δz) и поворот спирали (twist, $\Delta\phi$) (рис. 3б). Поиск параметров симметрии спиральных структур требует задания первого приближения винтового подъема или винтового шага и количества субъединиц на полный оборот спирали. В фибриллах с кросс- β -структурой расстояние между β -листами, называемое винтовым подъемом (Δz), в большинстве случаев соответствует 4.75 \AA [19], в то время как остальные параметры, такие как винтовой шаг и поворот спирали, существенно различаются. Использование указанного значения винтового подъема для поиска остальных параметров симметрии фибриллы Sup35 не дало положительных результатов, что, по-видимому, является следствием низкого разрешения ЭМ-данных негативного окрашивания.

Далее провели крио-ЭМ-эксперимент, включивший в себя стадию витрификации и сбора данных на криогенном ПЭМ (табл. 2). Было получено 1400 стеков изображений амилоидных фибрилл с характерным диаметром 100 \AA . Анализ полученных изображений (рис. 4а) свидетельствует о наличии вокруг фибрилл плотной “шубы”, образованной молекулами GFP, ковалентно пришитыми к Sup35NM для упрощения выделения белка. Была проведена обработка данных крио-ЭМ для спиральной реконструкции крио-ЭМ-карты амилоидных фибрилл, основные этапы которой показаны на рис. 5. Стеки изображений подвергли коррекции дрейфа и CTF со стандартными параметрами. Поиск филаментов с диаметром в диапазоне от 80 до 150 \AA выявил 1318000 проекций сегментов фибрилл, из кото-

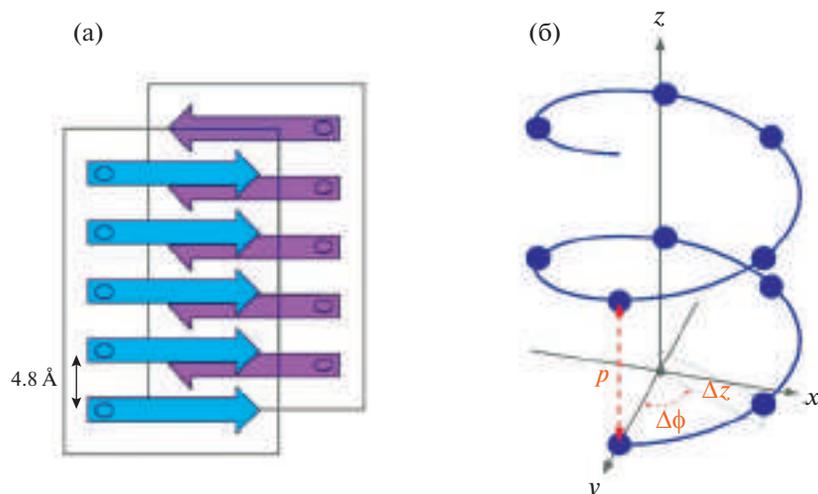


Рис. 3. Спиральная симметрия амилоидных фибрилл Sup35: а – in-register-укладка параллельных β -листов фибрилл Sup35; б – основные параметры спиральности – винтовой шаг (pitch, p), винтовой подъем (rise, Δz) и поворот спирали (twist, $\Delta\phi$).

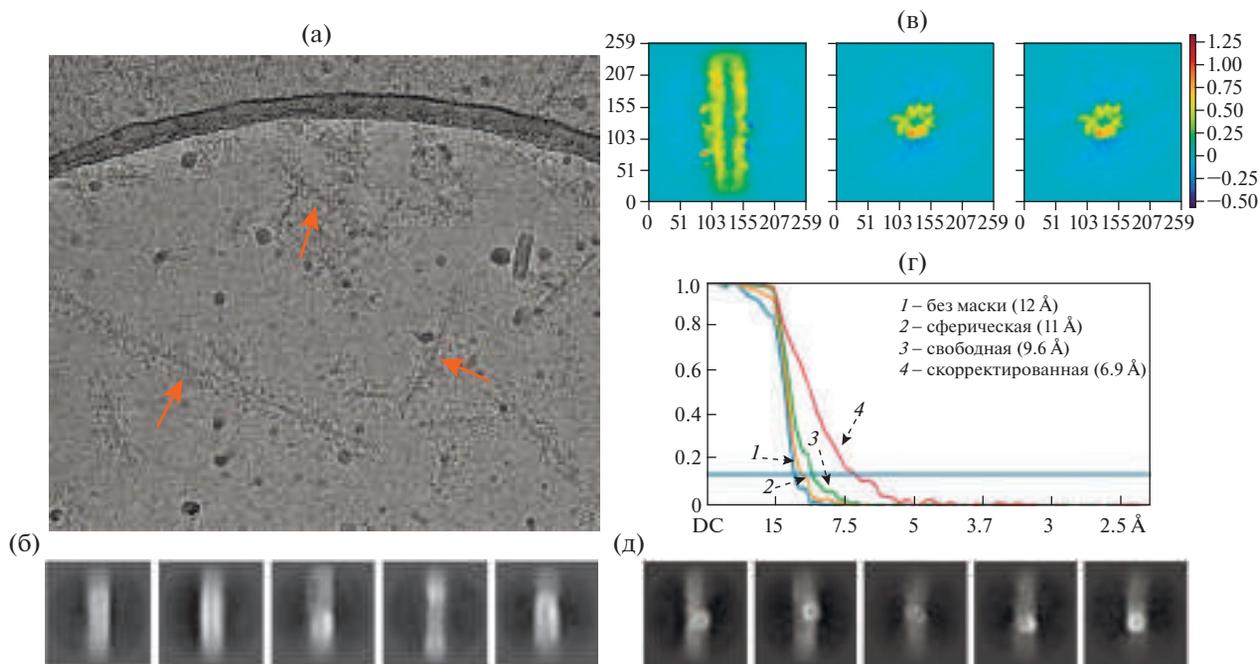


Рис. 4. Крио-ЭМ-данные амилоидных фибрилл варианта W2 белка Sup35NM-eGFP, выделенного *ex vivo* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: а – крио-ЭМ-изображение фибрилл, окруженных “шубой” из GFP; б – двумерные классы проекций сегментов фибрилл Sup35NM-eGFP, использованные для реконструкции, размер бокса – 294,4 Å; в – проекции крио-ЭМ-карты фибрилл в разных плоскостях, полученные после спиральной реконструкции; г – оценка разрешения крио-ЭМ-карты на графике GSFSC; д – двумерные классы проекций сегментов фибрилл, демонстрирующие наличие GFP.

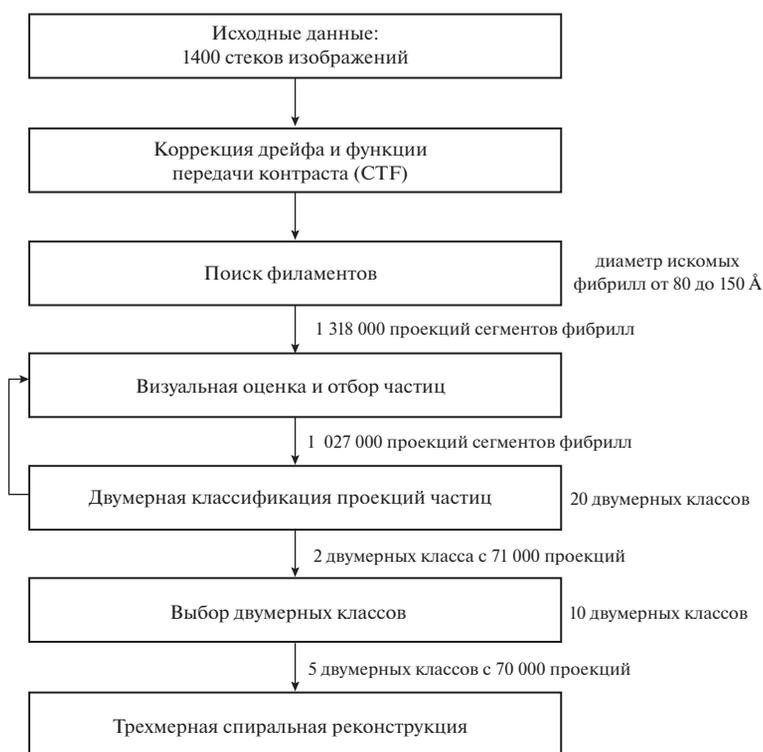


Рис. 5. Основные этапы обработки данных крио-ЭМ для варианта W2 белка Sup35NM-eGFP.

рых визуально инспектировали и отобрали 1027000 проекций для дальнейшей обработки. После нескольких повторов двумерной классификации, выбора и поиска частиц было получено 10 классов с характерными очертаниями фибриллярных структур. На основе пяти классов, содержащих 69 000 частиц (рис. 4б), провели спиральную реконструкцию крио-ЭМ-карты фибрилл без указания параметров спиральности (рис. 4в). Полученная карта структуры фибриллы согласно GSFSC имеет разрешение 12 Å (рис. 4г). Визуальный анализ двумерных классов показывает, что наличие молекул GFP мешает спиральной реконструкции фибрилл с высоким разрешением, препятствуя корректному выравниванию частиц (рис. 4д). В связи с этим не удалось определить, в частности, параметры спиральности полученной модели по известному значению винтового подъема.

Таким образом, методом электронной микроскопии были получены трехмерные крио-ЭМ-карты амилоидных фибрилл дрожжевого приона Sup35, демонстрирующие характерную архитектуру спиральных структур с диаметром 100 Å. Анализ данных показал, что для исследуемой генетической конструкции Sup35NM-eGFP наличие молекул GFP вокруг фибрилл не позволяет исследовать объект с высоким разрешением, что определяет необходимость ее оптимизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00062).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tycko R., Wickner R.B.* // *Acc. Chem. Res.* 2013. V. 46. P. 1487.
<https://doi.org/10.1021/ar300282r>
2. *Sabate R.* // *Prion.* 2014. V. 8. P. 233.
<https://doi.org/10.4161/19336896.2014.968464>
3. *Prusiner S.B.* // *Science.* 1982. V. 216. P. 136.
<https://doi.org/10.1126/science.6801762>
4. *Paushkin S.V. et al.* // *Science.* 1997. V. 277. P. 381.
<https://doi.org/10.1126/science.277.5324.381>
5. *Uptain S.M.* // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 6236.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.22.6236>
6. *Kushnirov V.V. et al.* // *Prion.* 2007. V. 1. P. 179.
<https://doi.org/10.4161/pri.1.3.4840>
7. *Krishnan R., Lindquist S.L.* // *Nature.* 2005. V. 435. P. 765.
<https://doi.org/10.1038/nature03679>
8. *Gorkovskiy A. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1417974111>
9. *Toyama B.H. et al.* // *Nature.* 2007. V. 449. P. 233.
<https://doi.org/10.1038/nature06108>
10. *Dergalev A. et al.* // *IJMS.* 2019. V. 20. P. 2633.
<https://doi.org/10.3390/ijms20112633>
11. *Ohhashi Y. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. P. 2389.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1715483115>
12. *Chernoff Y.O. et al.* // *Science.* 1995. V. 268. P. 880.
<https://doi.org/10.1126/science.7754373>
13. *Scialò C. et al.* // *Viruses.* 2019. V. 11. P. 261.
<https://doi.org/10.3390/v11030261>
14. *Mastronarde D.N.* // *Microsc Microanal.* 2003. V. 9. P. 1182.
<https://doi.org/10.1017/S1431927603445911>
15. *Punjani A. et al.* // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 290.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>
16. *Makin O.S., Serpell L.C.* // *FEBS J.* 2005. V. 272. P. 5950.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x>
17. *Van Heel M., Schatz M.* // *J. Struct. Biol.* 2005. V. 151. P. 250.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.05.009>
18. *Rosenthal P.B., Henderson R.* // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 333. P. 721.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.07.013>
19. *Eanes E.D., Glenner G.G.* // *J. Histochem. Cytochem.* 1968. V. 16. P. 673.
<https://doi.org/10.1177/16.11.673>