

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ  
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

УЛУЧШЕНИЕ ДИФРАКЦИОННЫХ СВОЙСТВ КРИСТАЛЛОВ  
ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ© 2023 г. Л. А. Варфоломеева<sup>1,\*</sup>, К. М. Поляков<sup>2</sup>, А. С. Комолов<sup>3</sup>, Т. В. Ракитина<sup>3,4</sup>,  
Н. И. Дергоусова<sup>1</sup>, П. В. Дороватовский<sup>3</sup>, К. М. Бойко<sup>1</sup>, Т. В. Тихонова<sup>1</sup>, В. О. Попов<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия<sup>4</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

\*E-mail: larisaavarfolomeeva@gmail.com

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 02.06.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

При решении структуры тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) возникли трудности, связанные с тем, что кристаллы фермента либо были двойниками, либо имели сильную анизотропию. Дифракционное качество кристаллов может быть улучшено за счет использования в качестве объекта изучения мутантных форм или изучения структуры родственного фермента из другого организма. На основе анализа олигомерной структуры TcDH предложены перспективные для улучшения дифракционных свойств мутантные формы фермента. Получены кристаллы и решены структуры мутантных форм TcDH с заменами T169A и K281A. Структура мутантной формы с заменой T169A аналогична ранее решенным структурам. В структуре мутантной формы с заменой K281A обнаружено изменение в строении тетрамера, которое привело к невозможности двойникования.

DOI: 10.31857/S0023476123600799, EDN: ABAVXD

## ВВЕДЕНИЕ

Фермент нового класса, тиоцианатдегидрогеназа (TcDH), был впервые выделен из галоалкалофильной хемолитоавторофной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* Arh1 [1]. Пространственная структура TcDH установлена методом рентгеноструктурного анализа (РСА) [2]. Основной структуры молекулы TcDH является скрученный  $\beta$ -лист из семи антипараллельных цепей, формирующий  $\beta$ -пропеллер. Субъединицы фермента формируют симметричный димер. В ранее решенных структурах два симметричных димера TcDH образуют тетрамер. Субъединицы фермента в тетрамере располагаются в одной плоскости. Контакты субъединиц в димере значительно сильнее контактов между субъединицами из разных димеров в тетрамере. Активный центр TcDH располагается в центральной полости  $\beta$ -пропеллера. Доступ молекул растворителя в активный центр фермента возможен с одной стороны центральной полости. Вторая сторона центральной полости закрыта C-концевым фрагментом полипептидной цепи. Активный центр фермента содержит три иона меди, координированных шестью остатками гистидина и остатками лизина и аспартата.

Топологически молекула TcDH сходна со структурой N-концевого домена N<sub>2</sub>O-редуктазы [3].

Независимые части элементарных ячеек восемь пространственных структур TcDH, депонированных в банк белковых структур, содержат идентичные тетрамеры. Пять структур TcDH (6G50, 6I3Q, 6UWE, 6G50, 8BPN), полученные в разных условиях кристаллизации, принадлежат к кристаллической модификации, в которой возможно двойникование псевдомероздрического типа. Кристаллы фермента этой кристаллической модификации принадлежат к пр. гр.  $P2_1$ . Причем параметры элементарной ячейки  $a$  и  $c$  приблизительно равны, а угол моноклинности  $\beta$  близок к  $120^\circ$ . Димеры в структурах тетрамеров располагаются в одной плоскости, параллельной плоскости, включающей ребро  $b$  и диагональ  $(a + c)$  элементарной ячейки. Тетрамеры TcDH образуют слои в этих структурах.

В остальных структурах TcDH (5OEX, 5F75, 6SJI) строение тетрамеров аналогично, но они не образуют слои. Кристаллы этих модификаций также принадлежат к пр. гр.  $P2_1$ , но имеют параметры элементарной ячейки, не допускающие псевдомероздрического двойникования. Однако дифракционные данные кристаллов этих кристал-

лических модификаций обладают большой анизотропией и более низким разрешением по сравнению с кристаллами-двойниками.

Псевдомероздрическое двойникование часто наблюдается для кристаллов белков. Было подсчитано, что на момент публикации статьи более 30% структур, депонированных в банк белковых структур, могли оказаться псевдомероздрически двойниками [4]. В этой работе был предложен алгоритм, позволяющий определять потенциальный оператор двойникования для заданной элементарной ячейки и пространственной группы и оценивать долю каждого кристаллического домена. Этот алгоритм был включен в программу уточнения REFMAC5 [5]. Уточнение степени двойникования при кристаллографическом уточнении заметно улучшает качество карты электронной плотности и статистические показатели [6].

Двойникование приводит к ухудшению дифракционных свойств кристаллов за счет уширения дифракционных пиков, затруднения индексирования рефлексов и кристаллографического уточнения модели. Идеальное двойникование приводит к снижению разрешения в 1.26 раза [6]. Двойникование кристалла обнаруживается при анализе статистики распределения интенсивностей рефлексов дифракционных данных, и существует два специальных теста [7, 8]. Для небольшой степени двойникования можно рассчитать вклады в интенсивность рефлекса от каждого кристаллического домена, используя программу DETWIN [8]. Раздвойниковывание данных значительно повышает качество карты электронной плотности, несмотря на возрастание ошибок при определении интенсивностей рефлексов [9].

Генно-инженерный подход неоднократно применялся для улучшения качества кристаллов исследуемых белков [10]. Так, замена остатков лизина, расположенных на поверхности белка RhoGDI из *Homo sapiens*, на аланин улучшила качество кристаллов белка [11]. Модификация длины N- и C-концов МАРКАР-киназы 2 из *Homo sapiens* позволила получить мутантные формы фермента, которые образовывали кристаллы лучшего качества [12]. Удаление подвижной петли, закрепляющей липоксигеназу мягкого коралла *Plexaura homomalla* на цитоплазматической мембране, привело к улучшению качества кристаллов и увеличению разрешения дифракционных данных [13]. Оставление гистидинового тага в препарате аквапоринов из *Homo sapiens* и *Spinacia oleracea* способствовало уменьшению степени двойникования или его исчезновению вовсе, однако разрешение дифракционных данных ухудшалось [14].

Цель настоящей работы – улучшение дифракционных качеств кристаллов TcDH за счет исследования структур мутантных форм фермента с заменами аминокислотных остатков в области

слабых контактов между димерами в тетрамере. Ожидалось, что использование этих мутантных форм изменит четвертичную структуру белка и исключит возможность двойникования кристаллов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Выделение и очистка генно-инженерных препаратов TcDH.* Создание генно-инженерных конструкций TcDH с заменами T169A, K281A и двойной заменой (K264A и K267A), экспрессию рекомбинантных белков в клетках *E. coli*, выделение и очистку проводили согласно методике [2].

Перед определением активности и кристаллизацией препараты фермента насыщали ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в молярном соотношении 1 : 3. Удельную активность рекомбинантных форм TcDH определяли спектрофотометрически в реакции с цитохромом  $\text{C}_{550}$  из сердца лошади [2].

*Кристаллизация.* Для кристаллизации использовали растворы рекомбинантных форм TcDH с концентрацией 10 мг/мл в 25 мМ боратном буфере, pH 9.5, содержащем 150 мМ NaCl.

Первичный поиск условий кристаллизации рекомбинантных форм TcDH осуществляли методом диффузии паров (вариант “сидячая капля”) с использованием роботизированной системы для кристаллизации макромолекул Rigaku (Япония) и набора коммерческих растворов для кристаллизации Index HT, Crystal Screen HT (Hampton research, США). Оптимизацию найденных условий кристаллизации осуществляли методом диффузии паров (вариант “висячая капля”) в 24-луночных планшетах (VDX, США) при температуре 15°C. Смешивали 1 мкл раствора белка и 1 мкл раствора резервуара, в лунку планшета вносили 500 мкл раствора резервуара.

Кристаллы TcDH с заменой T169A получены при использовании противораствора следующего состава: 0.2 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 М Bis-Tris, pH 5.5, 25% PEG 3350. Кристаллы TcDH с заменой K281A получены при использовании противораствора следующего состава: 0.5 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 М цитрата натрия, pH 5.6, 0.7 М  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ . Кристаллы TcDH с двойной заменой (K264A, K267A) получены при использовании противораствора следующего состава: 1 мМ  $\text{ZnCl}_2$ , 0.1 М MES, pH 6.0, 12% PEG 6000.

*Сбор дифракционных данных.* Наборы дифракционных данных для кристаллов рекомбинантных форм TcDH с заменой T169A и двойной заменой (K264A, K267A) собирали на станции “Белок” синхротрона Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (Москва, Россия) [15], для кристалла TcDH с заменой K281A – на станции BL41XU (SPring-8, Япония). Для кристаллов TcDH с заменой T169A

**Таблица 1.** Статистика сбора данных и уточнения структур рекомбинантных форм TсDH

	T169A	K281A
Станция	РСА-Белок, КИСИ	BL41XU, SPring-8, Япония
Пр. гр.	$P2_1$	$P2_1$
$a, b, c, \text{Å}$	90.81, 162.24, 90.76	98.15, 142.42, 294.40
$\beta$ , град	119.74	90.07
Длина волны, $\text{Å}$	0.79312	1.00000
Разрешение, $\text{Å}$	81.12–1.80 (1.85–1.80)	49.12–2.07 (2.10–2.07)
Число независимых рефлексов	208077 (14719)	485243 (20586)
Повторяемость	6.75 (6.32)	2.92 (2.96)
$I/\sigma(I)$	6.57 (1.70)	6.91 (1.52)
Полнота данных, %	98.8 (94.4)	98.8 (99.8)
$R_{\text{meas}}$ , %	27.3 (129.0)	15.3 (99.3)
$CC_{1/2}$ , %	98.7 (72.0)	99.1 (40.8)
Степень двойникования	0.56/0.44	1.00
$R_{\text{crist}}$ , %	18.6	17.9
$R_{\text{free}}$ , %	25.4	23.4
Среднеквадратичные отклонения		
Длины связей, $\text{Å}$	0.018	0.018
Валентные углы, град	3.000	2.816
Число неводородных атомов		
Белок	14547	57915
Растворитель	743	2419
Ионы меди	8	32
Общий средний B-фактор		
Средний B-фактор по белку	18.9	27.9
Средний B-фактор по растворителю	19.8	27.3
Код PDB	8P3L	8P3M

Примечание. В скобках приведены значения для данных высокого разрешения.

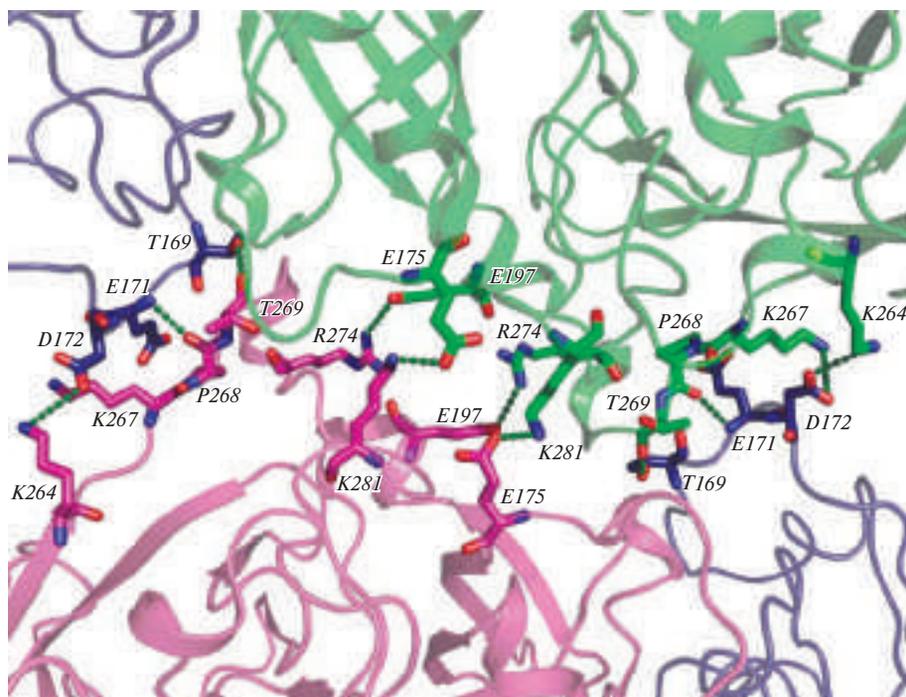
использовали раствор на основе кристаллизационного раствора с добавлением 25% PEG 400 в качестве криопротектанта. Для кристаллов TсDH с заменой K281A использовали раствор на основе кристаллизационного раствора с добавлением 20% этиленгликоля в качестве криопротектанта. Для кристаллов TсDH с двойной заменой (K264A, K267A) использовали раствор на основе кристаллизационного раствора с добавлением 20% глицерина в качестве криопротектанта. Сбор дифракционных данных проводили при температуре 100 К.

Обработку интенсивностей рефлексов проводили с помощью программы XDS [16]. Усреднение проводили в программе XSCALE [16]. Статистика сбора данных представлена в табл. 1.

Кристаллы рекомбинантной формы TсDH с двойной заменой (K264A, K267A) были не пригодны для РСА с высоким разрешением. Они да-

вали дифракционную картину только с разрешением  $\sim 3 \text{Å}$ .

*Решение и уточнение структуры.* Структуры рекомбинантных форм TсDH с заменами T169A и K281A были решены методом молекулярного замещения с помощью программы MOLREP [17], в качестве модели использовали тетрамер нативной TсDH. Модель уточняли в программе REFMAC5 [5]. Для кристаллографических расчетов использовали комплекс программ CCP4 [18]. Для структуры TсDH с заменой T169A на заключительных стадиях уточнения учитывали возможность двойникования. Модель после каждых 10 циклов уточнения корректировали в ручном режиме в графической программе COOT [19]. Статистика уточнения структур представлена в табл. 1. Расчет энергии диссоциации димеров и тетрамеров TсDH и анализ аминокислотных остатков, вовлеченных в формирование контактов между димерами TсDH



**Рис. 1.** Область контактов димеров в тетрамере TcDH дикого типа (PDB ID 6I3Q). Аминокислотные остатки, формирующие контакты между димерами в тетрамере, представлены в виде цилиндров. Для внутренних субъединиц элементы вторичной структуры показаны в виде ленточной модели, для внешних субъединиц элементы вторичной структуры не показаны. Водородные связи и электростатические взаимодействия показаны пунктирными линиями.

в тетрамере, проводили с помощью программы PISA [20].

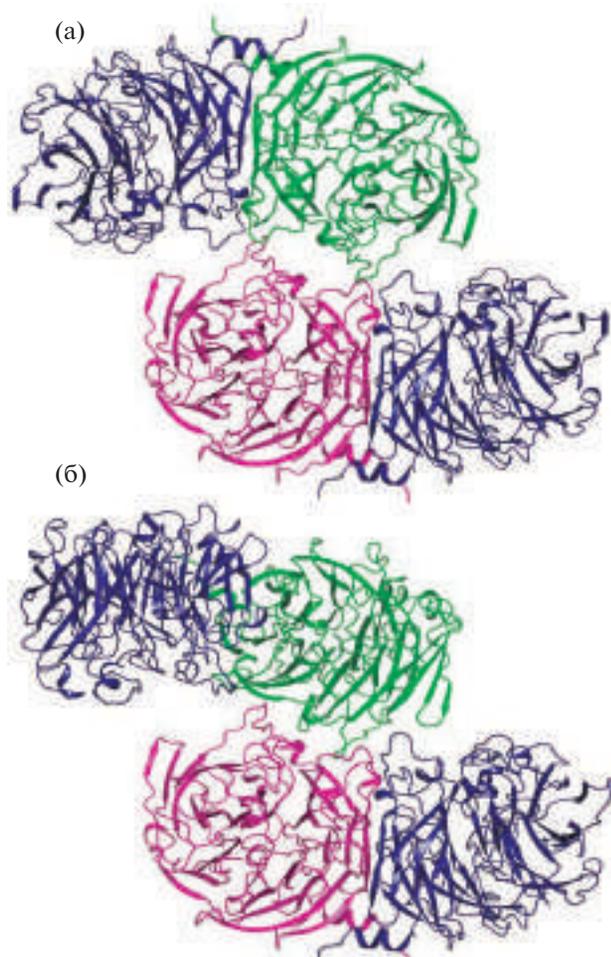
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тетрамер TcDH состоит из двух димеров (PDB ID 6I3Q). Субъединицы в димерах фермента прочно связаны. По оценке программы PISA [20] энергия сольватации димера составляет  $\Delta G^i \approx -37.0$  ккал/моль, а площадь контакта субъединиц димера –  $2590 \text{ \AA}^2$ . Субъединицы в димерах связаны за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий. Область контакта включает в себя  $\sim 30$  водородных связей. Димеры в тетрамере TcDH располагаются в одной плоскости. Контакты между субъединицами двух взаимодействующих димеров в тетрамере являются менее прочными. Энергия сольватации поверхности взаимодействия димеров составляет  $\Delta G^i \approx -2.0$  ккал/моль, а суммарная площадь контакта равна  $\sim 900 \text{ \AA}^2$ . Тетрамер TcDH стабилизируется небольшим числом водородных связей ( $\sim 8$ ) и электростатических взаимодействий между димерами. В тетрамере TcDH можно выделить внутренние и внешние субъединицы. Площадь взаимодействия внутренних субъединиц в тетрамере составляет  $\sim 400 \text{ \AA}^2$ , а площадь взаимодействия внешней и внутренней субъединиц равна  $\sim 244 \text{ \AA}^2$ . Внутренние и внешние субъединицы димера совмещаются по всем

$\text{C}\alpha$ -атомам с r.m.s.d.  $0.3 \text{ \AA}$ . Взаимодействие аминокислотных остатков в области контактов двух димеров в тетрамере показано на рис. 1. Для внутренних субъединиц в тетрамере наблюдаются взаимодействия между боковыми группами остатков R274–E197 и K281–E175. А для внутренней и внешней субъединиц обнаруживаются взаимодействия между боковыми группами остатков E171–K264 и D172–K267 и водородные связи между атомами основной цепи остатков P268–E171 и между карбонильной группой и боковой группой остатков T269–T169 (рис. 1).

Разрушение контактов между димерами TcDH может привести к изменению структуры тетрамера и упаковки молекул в кристалле и улучшить качество кристаллов фермента из-за исчезновения возможности двойникования. В качестве мишеней для точечного мутагенеза были выбраны остатки K281, T169, K264, K267, замена которых могла привести к нарушению взаимодействий между димерами в тетрамере TcDH. Замены остатков K281, T169, K264, K267 на аланин у мутантных форм фермента не должны сильно нарушить правильную укладку и, с другой стороны, могут изменить олигомерную структуру, тем самым исключив возможность образования двойников.

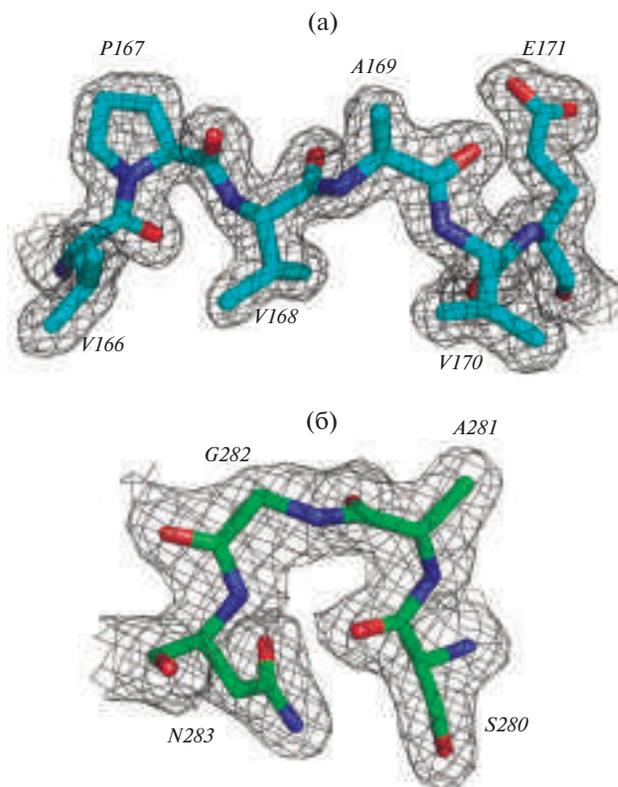
Кристаллы мутантной формы TcDH с заменой T169A (как и кристаллы большинства решенных



**Рис. 2.** Структура тетрамеров мутантной формы ТсДН с заменой Т169А (а) и К281А (б). Структуры мутантных форм совмещены по всем С $\alpha$ -атомам внутренней субъединицы нижнего димера.

ранее структур) принадлежат к пр. гр.  $P2_1$  с приблизительно равными параметрами  $a$  и  $c$  и углом моноклинности  $\beta \sim 120^\circ$ . Структура ТсДН с заменой Т169А уточнена как двойник, состоящий из двух доменов со степенью двойникования 0.56/0.44 (табл. 1). Значение  $R_{\text{cryst}}$  составляет 18.6%, а  $R_{\text{free}} - 25.4\%$  (табл. 1). Независимая часть элементарной ячейки содержит один тетрамер фермента (рис. 2а). Остаток А169 хорошо различим на карте электронной плотности (рис. 3а).

Строение тетрамера мутантной формы аналогично строению тетрамера фермента дикого типа. Структуры внутренней и внешней субъединицы ТсДН с заменой Т169А совмещаются с соответствующими субъединицами ТсДН дикого типа (PDB ID 6I3Q) по всем С $\alpha$ -атомам с г.м.с.д. 0.2 Å. Отсутствие водородной связи между боковой группой А169 и кислородом пептидной связи Т269 не привело к нарушению взаимодействия между внутренней и внешней субъединицами му-



**Рис. 3.** Карта ( $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ ) электронной плотности на уровне  $1\sigma$  для участка полипептидной цепи с точечной мутацией Т169А (а) из структуры мутантной формы с заменой Т169А и с точечной мутацией К281А (б) из структуры мутантной формы с заменой К281А.

тантной формы ТсДН. Данная водородная связь, вероятно, не вносила решающего вклада в стабилизацию тетрамера ТсДН.

Дифракционные данные ТсДН с заменой К281А были обработаны в пр. гр.  $P2_12_12_1$  и  $P2_1$ . Причем в обеих пространственных группах двойникование невозможно.

В пр. гр.  $P2_12_12_1$  параметры элементарной ячейки равны  $a = 98.15$ ,  $b = 142.42$  и  $c = 294.40$  Å. В этой группе закон погасания был нарушен для рефлексов с индексами  $h00$  и  $00l$ . Программа MOLREP смогла определить положение трех димеров мутантной формы фермента из предполагаемых четырех в независимой части элементарной ячейки. Анализ карты электронной плотности в графической программе COOT позволил достроить четвертую димерную молекулу ТсДН в модель вручную. Модель удалось уточнить до значения  $R_{\text{cryst}} = 19.0\%$ .

Понижение группы симметрии до  $P2_1$  ( $a = 98.15$ ,  $b = 142.42$ ,  $c = 294.40$  Å,  $\beta = 90.07^\circ$ ) позволило устранить противоречие с систематическими погасаниями и способствовало тому, что программа MOLREP определила положение всех

восьми димеров в независимой части элементарной ячейки. В пр. гр.  $P2_1$  модель удалось уточнить до значения  $R_{\text{cryst}} = 17.9\%$  (табл. 1). Димеры мутантной формы с заменой K281A формировали тетрамерную структуру, похожую по строению на тетрамер фермента дикого типа (рис. 2б). Остаток A281 хорошо различим на карте электронной плотности (рис. 3б).

Замена K281A не привела к нарушению укладки субъединиц. Не изменилось для этой мутантной формы и строение димеров. А в строении тетрамера TcDH с заменой K281A наблюдаются существенные изменения по отношению к строению тетрамеров ранее решенных структур. Тетрамеры мутантных форм TcDH с заменами T169A и K281A представлены на рис. 2. На рисунке выбрана ориентация, для которой все субъединицы в тетрамере TcDH с заменой T169A (как и у всех решенных ранее структур) располагаются в плоскости рисунка (рис. 2а), а тетрамер TcDH с заменой K281A (рис. 2б) развернут так, чтобы совместились внутренние субъединицы одного из димеров (нижний на рисунке). Димеры в тетрамере мутантной формы TcDH с заменой K281A не располагаются в одной плоскости (рис. 2б). Димеры в этой структуре развернуты друг относительно друга примерно на  $30^\circ$ . Такое строение тетрамера делает невозможным упаковку молекул в слоистую структуру, склонную к образованию двойников. В структуре TcDH с заменой K281A только внутренние субъединицы участвуют в образовании контактов в тетрамере. Площадь контактов равна  $\sim 370 \text{ \AA}^2$ . Нарушение взаимодействий между парой остатков E175 и 281 оказалось критичным для стабилизации структуры тетрамера TcDH.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе поиска кристаллов TcDH с улучшенными дифракционными свойствами решены структуры мутантных форм фермента с точечными заменами T169A и K281A. Кристаллы TcDH с заменой T169A были двойниками. Замена K281A позволила за счет изменения структуры тетрамера фермента найти новую кристаллическую модификацию фермента, где двойникование невозможно. Однако кристаллы TcDH с заменой K281A давали дифракционную картину только с разрешением около  $2 \text{ \AA}$  из-за большого размера элементарной ячейки.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-74-30004.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Lysenko A.M. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 657. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-657>
2. Tikhonova T.V., Sorokin D.Y., Hagen W.R. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. P. 5280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922133117>
3. Paraskevopoulos K., Antonyuk S.V., Sawers R.G. et al. // J. Mol. Biol. 2006. V. 362. P. 55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.064>
4. Lebedev A.A., Vagin A.A., Murshudov G.N. // Acta Cryst. D. 2006. V. 62. P. 83. <https://doi.org/10.1107/S0907444905036759>
5. Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 355. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
6. Campeotto I., Lebedev A., Schreurs A.M.M. et al. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 14876. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32962-6>
7. Yeates T.O. // Methods Enzymol. 1997. V. 276. P. 344. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)76068-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)76068-3)
8. Padilla J.E., Yeates T.O. // Acta Cryst. D. 2003. V. 59. P. 1124. <https://doi.org/10.1107/S0907444903007947>
9. Yang F., Dauter Z., Wlodawer A. // Acta Cryst. D. 2000. V. 56. P. 959. <https://doi.org/10.1107/S0907444900007162>
10. Derewenda Z. S. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 604. <https://doi.org/10.1107/S090744491000644X>
11. Longenecker K.L., Garrard S.M., Sheffield P.J., Derewenda Z.S. // Acta Cryst. D. 2001. V. 57. P. 679. <https://doi.org/10.1107/S0907444901003122>
12. Malawski G.A., Hillig R.C., Monteclaro F. et al. // Protein Sci. 2006. V. 15. P. 2718. <https://doi.org/10.1110/ps.062491906>
13. Neau D.B., Gilbert N.C., Bartlett S.G. et al. // Acta Cryst. F. 2007. V. 63. P. 972. <https://doi.org/10.1107/S1744309107050993>
14. Backmark A., Nyblom M., Törnroth-Horsefield S. et al. // Acta Cryst. D. 2008. V. 64. P. 1183. <https://doi.org/10.1107/S090744490802948X>
15. Svetogorov R.D., Dorovatovskii P.V., Lazarenko V.A. // Cryst. Res. Technol. 2020. V. 55. P. 1900184. <https://doi.org/1002/crat.201900184>
16. Kabsch W. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 125. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
17. Vagin A., Teplyakov A. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 22. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042589>
18. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 235. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
19. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 486. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
20. Krissinel E., Henrick K. // J. Mol. Biol. 2007. V. 372. P. 774. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>