

УДК 577.151.34

# Второй активный центр в эндолитической трансгликозилазе gp144 бактериофага phiKZ

О. В. Чертков<sup>1</sup>, Г. А. Армеев<sup>2</sup>, И. В. Упоров<sup>3</sup>, С. А. Легоцкий<sup>3</sup>, Н. Н. Сыкилинда<sup>1</sup>,  
А. К. Шайтан<sup>2</sup>, Н. Л. Клячко<sup>3</sup>, К. А. Мирошников<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 11

\*E-mail: kmi@ibch.ru

Поступила в редакцию 01.04.2016

Принята к печати 10.06.2016

**РЕФЕРАТ** Литические трансгликозилазы – распространенный тип пептидогликанлизирующих ферментов, расщепляющих гетерополимеры клеточных стенок бактерий в процессе клеточного метаболизма или инфекции бактериофагом. Молекулярный механизм действия трансгликозилаз предполагает участие в активном центре фермента лишь одного аминокислотного остатка Glu или Asp. Эндолизин gp144 бактериофага phiKZ *Pseudomonas aeruginosa* принадлежит к группе грамтрицательных трансгликозилаз с модульным строением и С-концевым расположением каталитического домена. Предсказанную роль каталитического аминокислотного остатка в его структуре выполняет Glu115. Однако замена этого остатка не полностью удаляет активность мутантного белка. Направленный мутагенез выявил участие в каталитическом механизме Tyr197, а также второй активный центр с аминокислотными остатками Glu178 и Tyr147. Наличие дублирующего активного центра подтверждено методами компьютерного моделирования, молекулярной динамики конформационных изменений и изменения заряда поверхности и структуры при внесении точечных мутаций.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** активный центр фермента, бактериофаг phiKZ, молекулярная динамика, направленный мутагенез, трансгликозилаза, эндолизин.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** NAM – N-ацетилмурамовая кислота; NAG – N-ацетилглюкозамин.

## ВВЕДЕНИЕ

Бактериофаг phiKZ (vB\_PaeM\_KZ, GenBank NC\_004629) принадлежит к семейству Myoviridae и служит «фагом-основателем» таксономического рода гигантских фагов, инфицирующих грамтрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и некоторые близкородственные бактерии [1]. phiKZ-подобные фаги служат объектом для различных геномных [2], эволюционных [3] и структурных [4–6] исследований.

Лизис бактерии-хозяина на поздних стадиях инфекции фагом phiKZ осуществляется пептидогликанлизирующим ферментом (эндолизином) gp144. Этот белок имеет модульное строение и состоит из двух доменов – N-концевого, отвечающего за первичное связывание с субстратом, и каталитического С-концевого [7]. Пептидогликансвязывающая функ-

ция N-концевой части полипептида (остатки 9–69) экспериментально доказана с помощью белковой химеры с присоединенным зеленым флуоресцентным белком [8, 9]. С-Концевой домен gp144 (остатки 70–260) имеет выраженную гомологию с литическими трансгликозилазами класса 1. Каталитический механизм был подтвержден масс-спектрометрическим анализом продуктов расщепления пептидогликана [10]. Литические трансгликозилазы – ферменты, расщепляющие β-1,4-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой (NAM) и N-ацетилглюкозамином (NAG) с образованием циклического ангидрида N-ацетилмурамовой кислоты (связь между O6 и C1) [11]. Пространственная структура phiKZ gp144 апофермента (ЗВКV) и фермента со связанной молекулой хитотетразы (ЗВКН) получена с помощью рентгеновской кристаллографии

с разрешением 2.6 Å [12]. С-Концевой домен белка в основном состоит из α-спиралей и структурно гомологичен каталитическому домену литических трансгликозилаз класса 1. Согласно общепринятой модели [11] за каталитическое действие в активном центре отвечает единственный аминокислотный остаток – у phiKZ gp144 это Glu115 [12]. Однако мутагенез этого остатка не приводил к полной инактивации фермента, оставляя около 30% активности у мутантного белка [8]. Таким образом, данная работа проведена с целью выявления роли других аминокислотных остатков в катализе phiKZ gp144 и уточнения структурной организации активного центра.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Направленный мутагенез

Основные манипуляции молекулярного клонирования в *Escherichia coli* выполняли в соответствии с [13]. В качестве матрицы для точечного мутагенеза использовали плазмиду pKZ144, содержащую ген 144 бактериофага phiKZ в векторе pQE30 (Qiagen) [7]. Для направленного мутагенеза использовали набор QuickChange Kit (Stratagene). В полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры:

E115A Fw 5'-CATTTGCTTCTATTGCAATCAGCATT-CGATTAC-3',

E115A Re 5'-GTAATCGAATGCTAGTGC AATAGAA-GCAAATG-3',

H200L Fw 5'-GATCTTTAGCTCTCTTCTTTGGGCC-TGG-3',

H200L Re 5'-CCAGGCCCAAAGAAGAGAGCTAAA-TAAAGATC-3',

Y197F Fw 5'-ACTGATACTGATCTTTTTTTAGCTC-ACTTCTTT-3',

Y197F Re 5'-AAAGAAGTGAGCTAAAAAAGATC-AGTATCAGT-3'.

E178A Fw 5'-GCGGAAGTGAATTAAGCAAACATGA-ACATTCTG-3',

E178A Re 5'-CAGAATGTTTCATGTTTGCTTAATCA-GTTCCGC-3'.

После проведения ПЦР плазмиду с геном фермента дикого типа разрушали при помощи DpnI-эндонуклеазы, специфичной к метилированной ДНК. Полученный материал использовали для электропорации клеток *E. coli* NovaBlue (Novagen). Клетки высевали на чашки Петри со средой Lb agar, содержащую антибиотик ампициллин в концентрации 100 мкг/мл и культивировали при 37°C в течение 16 ч. Плазмиды pKZ144-E115A, pKZ144-H200L, pKZ144-Y197F, pKZ144-E115A/H200L, pKZ144-E115A/Y197F, pKZ144-H200L/Y197F, pKZ144-E178A, pKZ144-E115A/E178A выделяли из индивидуальных клонов с помощью набора QiaQuick Spin

(Qiagen), присутствие заданной мутации проверяли секвенированием.

### Выделение и очистка белков

Клетки *E. coli* штамма AD494(DE3) (Novagen), трансформированные соответствующими плазмидами, растили в среде 2xYT при 37°C до  $A_{600} \sim 0.6$  отн. ед., после чего индуцировали экспрессию добавлением изопропилтио-β-D-галактозида до конечной концентрации 0.5 мМ. Клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°C и умеренной аэрации. Далее клетки *E. coli* из 0.15 л среды осаждали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 15 мин, осадок ресуспендировали в 10 мл буфера А (20 мМ Трис-НСl рН 8.0, 100 мМ NaCl, 1 мМ о-фенилметансульфонилфторид (PMSF)). Клетки разрушали ультразвуком (Techpan MD20), нерастворимые фрагменты отделяли центрифугированием при 15000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой (Qiagen). Элюцию аффинно связанного белка проводили 200 мМ имидазолом в буфере А. Очищенный препарат белка диализовали против 20 мМ буфера Трис-НСl рН 8.0, 50 мМ NaCl и хранили при -70°C. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение при 280 нм на спектрофотометре GENESYS 10 (ThermoElektron). Коэффициент экстинкции рассчитывали с помощью программы VectorNTI, основываясь на концентрации ароматических остатков в молекуле белка. Изменения вторичной структуры мутантных белков оценивали спектроскопией кругового дихроизма на спектрополяриметре JASCO J-500 в кювете 0.05 см (Hellma) в Na-фосфатном буфере рН 6.2 при комнатной температуре.

### Определение активности

Ферментативную активность белковых препаратов определяли с использованием в качестве субстрата суспензии клеточных стенок *P. aeruginosa* PAO1, полученной обработкой клеток хлороформом для удаления внешней клеточной мембраны. Для приготовления суспензии клеточных стенок клетки PAO1 растили при 37°C в среде 2xTY до  $A_{500} \sim 0.6$  отн. ед. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере 50 мМ Трис-НСl рН 7.8, насыщенном хлороформом, и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре с перемешиванием. Остатки клеточных стенок осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали в 10 мМ Na-фосфатном буфере рН 6.2, 120 мМ NaCl, довели до поглощения при 500 нм до 0.6–1 отн. ед. Образец фер-

мента объемом 30 мкл добавляли к 270 мкл суспензии клеточных стенок на плашке и измеряли уменьшение оптической плотности на спектрофотометрическом ридере Viktor (Perkin Elmer) при комнатной температуре в течение 1.5 ч с интервалом 1 мин. За 1 ед. пептидогликанлитической активности принимали активность, вызывающую линейное снижение поглощения на 0.001 отн. ед. в 1 мин. Результаты измерений обрабатывали при помощи программы Activity Calculator [14]. Эксперименты проводили в трехкратной повторности, результаты усредняли и сравнивали с соответствующими отрицательными контролями и положительным контролем, содержащим лизоцим куриного яйца.

### Моделирование и молекулярная динамика

Молекулу субстрата строили и релаксировали в программе Avogadro [15]. Докинг проводили к отрелаксированной, а затем замороженной нативной структуре с помощью веб-сервиса SwissDock [16] и выбирали вариант, наиболее похожий по ориентации и положению на структуру 3VKV [12]. Распределение зарядов в нативной белковой молекуле рассчитывали с помощью программ PDB2PQR [17, 18] и APBS [19].

Конформационную подвижность белка изучали методом молекулярной динамики. Исходя из кристаллической структуры 3VKH [12], создали гидратированные модели на основе силового поля AMBER [20, 21]. Моделирование проводили в пакете GROMACS [22–25] со следующими параметрами: время симуляции 100 нс, шаг 2 фс, радиус обрезания ван-дер-ваальсовых взаимодействий 1 нм, метод учета электростатических взаимодействий PME, температура 300 К с отдельным термостатированием белка и раствора, использовали периодические граничные условия с кубической ячейкой.

Анализ данных проводили путем сравнения среднеквадратичного отклонения структур точечных мутантов от структуры фермента дикого типа. За референсную структуру принимали конформацию трансгликозилазы, полученную путем молекулярной динамики при 300 К. Сравнение проводили по атомам белкового остова только тех аминокислот, которые находятся вблизи субстрата (аминокислоты: 110–116, 125–150, 168–185, 195–210, 220–230) и могут влиять на его связывание с ферментом. В связи с тем, что при комнатной температуре подвижность молекулы слишком велика, чтобы на доступных временах вычисления сделать статистически достоверные выводы о конформационных отличиях, применяли метод отжига структур к низким температурам. Систему плавно замораживали в течение 1 нс от 300 К до температуры жидкого азота (77 К).

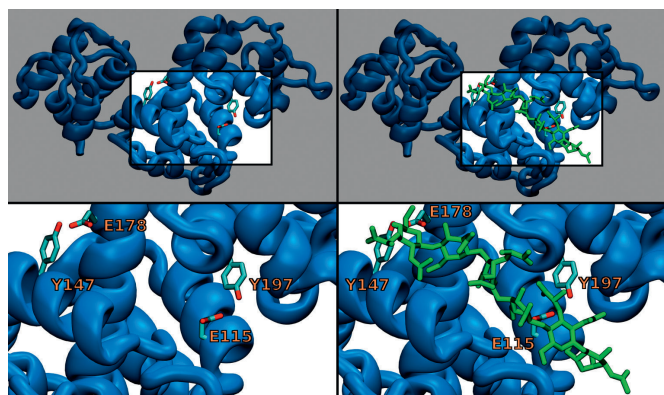
### РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ рентгеноструктурных данных phiKZ gp144 3VKV [12] показал, что пространственное расположение Glu115 в активном центре относительно молекулы субстрата не оптимально, и вероятно наличие «неканонического» аминокислотного остатка, также участвующего в катализе. В качестве таких остатков мы предположили His200, обладающий пониженной электронной плотностью, и высококонсервативный остаток Tyr197, координирующий участок субстрата в положении –1.

Пространственная структура 3VKV phiKZ gp144 показывает высокую степень сходства каталитического домена со структурой аналогичного домена трансгликозилазы Slt70 из *E. coli* [26]. Положение и ориентация каталитического остатка Glu115 в gp144 сходны с положением Glu478 в Slt70. Ранее был предложен механизм катализа трансгликозилазы Slt70, отличающийся от классического механизма наличием дополнительного остатка Tyr597, который находится в каталитическом центре фермента и участвует в катализе. Функция Tyr597 заключается в активации каталитического остатка Glu478 через образование водородной связи с ним, что увеличивает отрицательный заряд на Glu478 и облегчает протонирование O-гликозидной связи [27]. В полипептиде phiKZ gp144 имеется остаток Tyr197, расположение и ориентация которого сходны с Tyr597 в Slt70. Высокая степень пространственной гомологии позволяет предположить, что катализ phiKZ gp144 происходит аналогично механизму Slt70.

Основная гипотеза, объясняющая частичное сохранение активности фермента при замене основного каталитического остатка, предполагает существование двух каталитических участков – главного Glu115/Tyr197 и дублирующего Glu178/Tyr147. Расположение аминокислот предполагаемого второго активного центра относительно цепи пептидогликанового субстрата сходно с расположением аминокислот основного активного центра. Совмещение положения боковых цепей остатков «основного» и «дублирующего» активного центров с помощью вычисления минимального среднеквадратичного отклонения показывает практически одинаковую позицию (рис. 1).

Для экспериментального подтверждения роли остатков, принимающих участие в работе активного центра phiKZ gp144, получен ряд одиночных и двойных мутантов по этим аминокислотам. Введение точечных мутаций не влияло существенно на растворимость или вторичную структуру (по результатам связывания с аффинной колонкой и спектроскопии кругового дихроизма). Мутантные белки очищали с помощью Ni-хелатной хроматографии [7] без су-

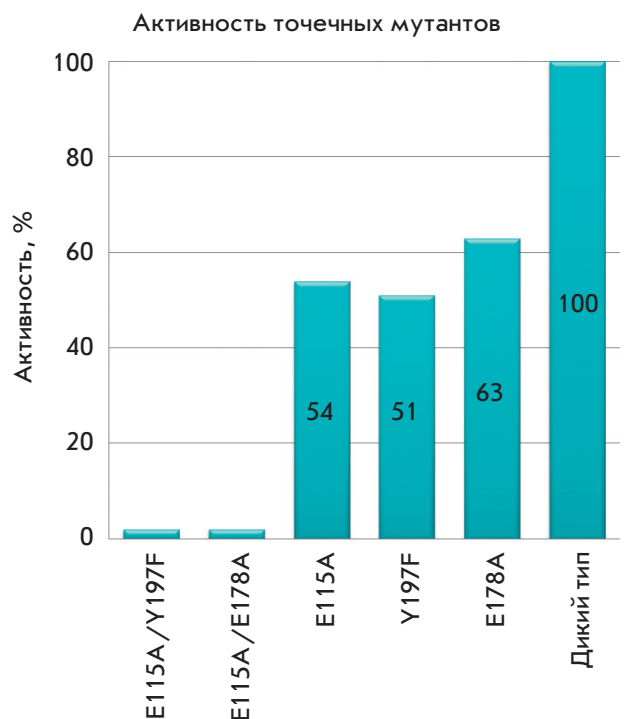


**Рис. 1.** Боковые цепи аминокислотных остатков, формирующие активные центры  $\phi$ iKZ gp144 и возможное расположение молекулы NAM-NAG. На верхних рисунках изображен общий вид фермента без субстрата (сверху слева) и с субстратом (сверху справа). На нижних рисунках крупным планом изображены сайты связывания фермента без субстрата (снизу слева) и с субстратом (снизу справа)

ществленных изменений. Полученные препараты содержали 3–6 мг мутантного белка с чистотой > 90%.

Одиночные мутанты E115A, E178A и Y197F по каждому из остатков в отдельности имели остаточную активность 54, 63 и 51% соответственно по сравнению с исходным белком  $\phi$ iKZ gp144 (рис. 2, табл. 1). Все мутанты проявляли максимальную активность при том же составе буфера, что и фермент дикого типа (рН 6.2 и  $I = 120$  мМ NaCl), далее все реакции проводили в этих условиях. Мутация His приводила к снижению активности на 20–30%, что подтверждает предположение об участии остатков гистидина в координации субстрата.

В контексте высказанной гипотезы не совсем логична потеря активности мутантом E115A/Y197F, в котором мутированы оба остатка основного активного центра, а дополнительный не изменен. Для объяснения этого явления необходимо было рассмотреть как детали пространственного взаимодействия белка с субстратом, так и возможные изменения в конформации белка, вызванные мутациями. Поскольку хитотетраоза, которую использовали как эмульгатор суб-



**Рис. 2.** Диаграмма активностей одиночных и двойных точечных мутантов  $\phi$ iKZ gp144 в сравнении с ферментом дикого типа, принятой за 100%

страта в экспериментах по кристаллизации  $\phi$ iKZ gp144 [12], достаточно сильно отличается по своей конформации от естественного субстрата (NAM-NAG), проводили молекулярный докинг по вычислению возможных конфигураций связывания субстрата с молекулой белка. Наиболее вероятное расположение субстрата в бороздке активного центра показано на рис. 1.

Для дополнительной оценки изменения конформаций белка при различных заменах проведен молекулярно-динамический анализ конфигурации бороздки путем изучения ее внешнего вида (рис. 3А) и расстояний между  $S\alpha$ -атомами аминокислотных остатков 126 и 229 (рис. 3Б, табл. 2). Скорее всего, при некоторых мутациях нарушается сеть взаимодействий между боковыми цепями остатков, формирующих активный центр, вследствие чего область бороздки

**Таблица 1.** Таблица активностей одиночных и двойных точечных мутантов  $\phi$ iKZ gp144, а также фермента дикого типа

Фермент	Дикий тип	E178A	Y197F	E115A	E115A/ Y197F	E115A /E178A
Активность, У/мг	210000	132000	107000	113000	0	0

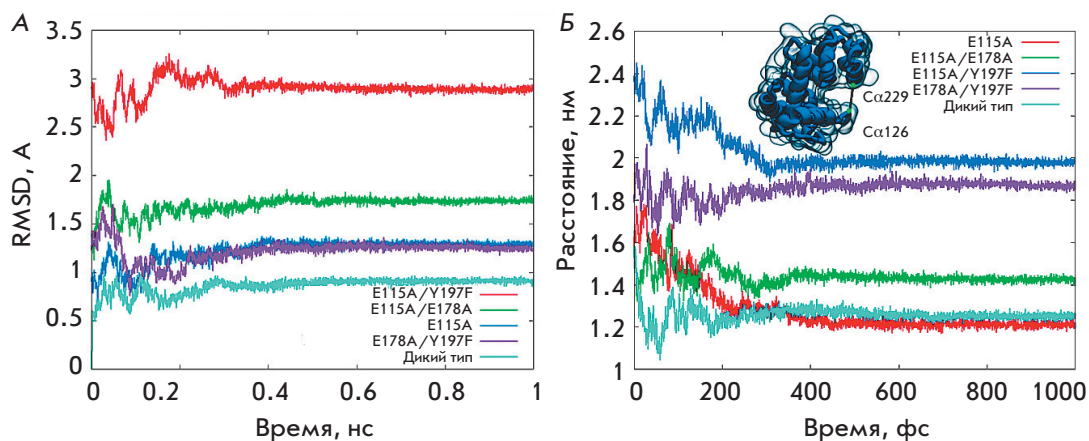


Рис. 3. А – средне-квадратичное отклонение белкового остова трансгликозилазы во время заморозки до 77 К. Отклонение вычисляли только для участка, контактирующего с субстратом. Б – изменение расстояния между  $C\alpha$ -атомами аминокислот 126 и 229 во время заморозки до 77 К

Таблица 2. Сводная таблица среднеквадратичных отклонений белковой структуры в процессе отжига к температуре жидкого азота

Фермент	Среднее, Å	Станд. ошибка, Å	Мин, Å	Макс, Å
Нативный	0.858	0.081	0.005	0.974
E115A	1.225	0.118	0.692	1.370
E115A /Y197F	2.895	0.104	2.366	3.249
E178A /Y197F	1.219	0.110	0.762	1.693
E115A /E178A	1.693	0.084	1.130	1.944

активного центра  $\phi$ iKZ gp144 довольно сильно изменяет свою конформацию. Например, при мутациях аминокислотных остатков основного активного центра изменяется форма бороздки, в которую укладывается субстрат, что может вызывать снижение аффинности белка к субстрату и, как следствие, реакционной способности. Видно, что двойная мутация по основному активному центру приводит к наиболее сильному «открытию» бороздки (рис. 4).

Вычислено распределение зарядов на доступной растворителю поверхности каждого мутанта. Вычисление поверхностного заряда глобулы белка  $\phi$ iKZ gp144 показывает, что бороздка связывания субстрата имеет преимущественно положительный заряд. Замены аминокислотных остатков в активных центрах также в ряде случаев приводят к сильному изменению распределения зарядов (рис. 5). Мутант E115A/Y197F не обладает активностью, несмотря на то, что один из реакционных центров остался не измененным. Двойная мутация близкорасположенных аминокислот привела к сильному изменению конформации поверхности, связывающей субстрат (рис. 4), а также к смене заряда в этой области бороздки (рис. 5). Такое изменение свойств поверх-

ности, вероятно, не позволяет этому мутанту  $\phi$ iKZ gp144 связывать субстрат, и фермент полностью теряет активность.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Литические трансгликозилазы – класс пептидогликанлизирующих ферментов, которые играют активную роль в жизненных циклах бактерий [28] и бактериофагов [29]. Трансгликозилазы действуют на тот же участок пептидогликана, что и лизоцимы ([КФ 3.2.1.17]; пептидогликан-N-ацетилмурамоилгидролазы, мурамидазы) –  $\beta$ -1,4-гликозидную связь между остатками NAM и NAG. Основным отличием трансгликозилаз от мурамидаз является отсутствие нуклеофильного каталитического остатка. Также различия проявляются в связывании олигосахарида в сайтах связывания +1 и +2. Классический механизм действия трансгликозилаз предполагает наличие одного кислотного каталитического остатка, расположенного в активном центре фермента между субсайтами +1 и –1. На первой стадии реакции каталитический аминокислотный остаток протонирует гликозидный кислород с образованием оксокарбониевого катиона и дальнейшим

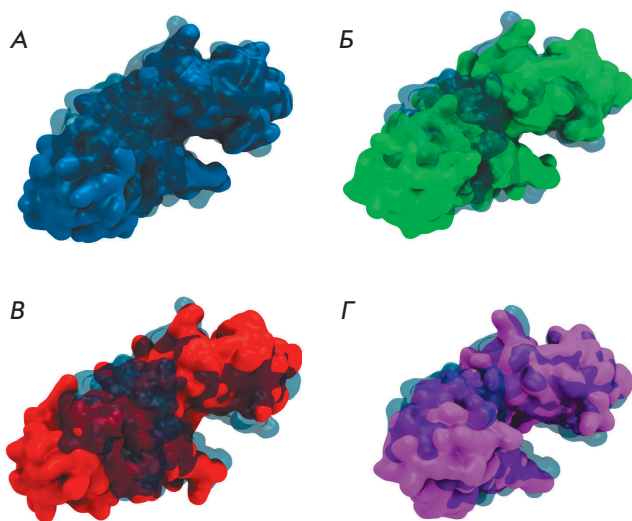


Рис. 4. Моделирование поверхности мутантных форм  $\phi$ iKZ gp144 в сравнении с нативной формой А – E115A, Б – E115A/E178A, В – E115A/Y197F, Г – E178A/Y197F. Полупрозрачная поверхность принадлежит структуре фермента дикого типа. На изображении удален домен, не принимающий участия в связывании с субстратом. Бороздка показана в профиль

разрывом O-гликозидной связи между NAM и NAG. На второй стадии реакции происходит внутримолекулярная нуклеофильная атака C6-гидроксильной группой C1 углерода оксокарбониевого катиона с образованием 1,6-оксазалонового цикла NAM. При этом каталитический остаток Glu активирует C6-гидроксил, оттягивая на себя протон гидроксила [11].

Мы предполагаем, что в полипептидной цепи трансглюкозилазы  $\phi$ iKZ gp144 находятся два активных центра: основной, E115/Y197, и дублирующий, E178/Y147. Участок молекулы пептидогликана может связаться с бороздкой на глобуле фермента двумя способами (рис. 6). Предположительно, направление укладки субстрата имеет значение для протекания реакции и определяет, какой из активных центров проведет реакцию деградации субстрата. Таким образом, при инактивации одного из участков активного центра соответствующее направление укладки субстрата не будет сопровождаться ферментативным расщеплением.

Ключевым остатком, осуществляющим атаку на  $\beta$ -1,4-гликозидную связь, является Glu. При его замене происходит полная инактивация одного из активных центров, что приводит к снижению

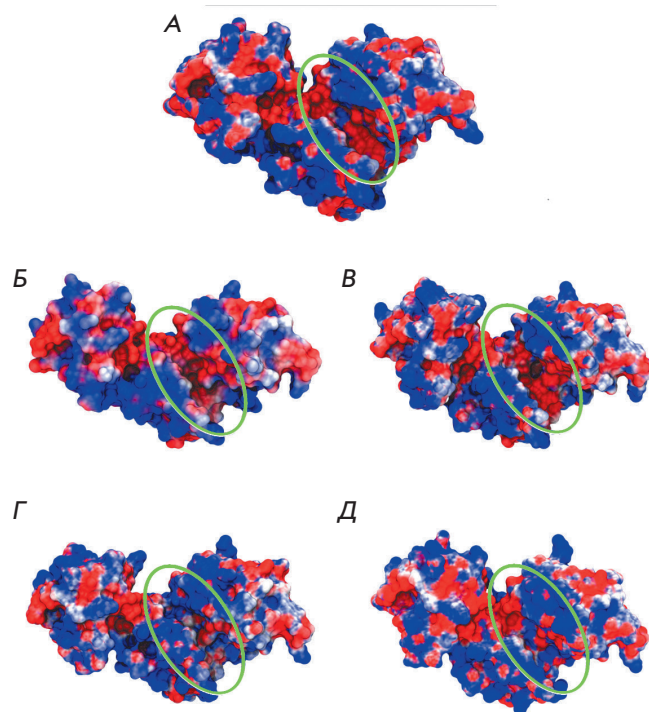
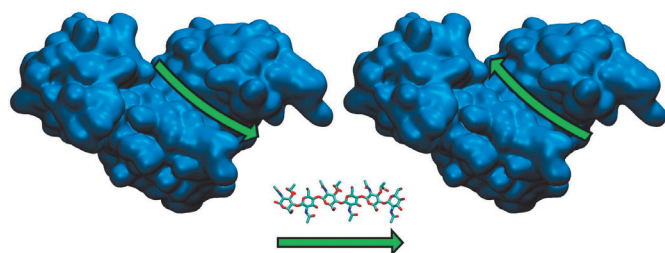


Рис. 5. Распределение зарядов на поверхности мутантных изоформ  $\phi$ iKZ gp144. Выделен участок, связывающий субстрат. А – нативная структура, Б – E115A, В – E178A/Y197F, Г – E115A/E178A, Д – E115A/Y197F

активности фермента в 2 раза. Одиночные мутации по остатку Tyr также снижают активность фермента. В пространственной модели активного центра Glu и Tyr обращены друг к другу и образуют водородную связь. Большую часть времени симуляции методом молекулярной динамики они скоординированы таким же образом. Можно предположить, что Tyr фиксирует Glu в положении, наиболее выгодном с точки зрения протекания реакции. Замена Tyr на Phe приводит к смещению боковой цепи Glu в сторону от выгодного положения и изменению активности мутантного сайта. В эксперименте с двойным мутантом E178A/Y197F не обнаружено инактивации сайта. Несмотря на выключение одного из активных центров, вызванное заменой Glu, второй остается активным без остатка Tyr. Двойной мутант E115A/E178A активности не проявляет, поскольку произведены замены атакующих остатков Glu в обоих реакционных центрах.

Мутант E115A/Y197F не обладает активностью, несмотря на то, что один из реакционных центров остался в нативном состоянии. Двойная мутация близкорасположенных аминокислот привела к сильному изменению конформации связывающей суб-



**Рис. 6.** Схема возможных направлений укладки субстрата в бороздку  $\phi$ iKZ gp144. Субстрат (N-ацетилмурамоил-N-ацетилглюкозамин) показан над стрелкой

страт поверхности (рис. 4), а также к смене заряда в этой области бороздки (рис. 5). Такое изменение свойств поверхности, вероятно, не позволяет  $\phi$ iKZ gp144 связывать субстрат, и фермент полностью теряет активность.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные подтверждают гипотезу о двух активных центрах у  $\phi$ iKZ gp144 и проясняют механизм действия этого фермента. Дополнительный активный центр появился, вероятно, в ходе эволюци-

онного развития, на что указывает высокая гомология структур активных центров.

В настоящее время появляется все больше штаммов патогенных и условно патогенных бактерий, устойчивых к синтетическим антибиотикам. Альтернативой антибиотикам могут быть «энзимотики» – токсичные для бактерий ферменты, в том числе пептидогликангидролазы [29]. Один из наиболее эффективных подходов к конструированию энзимотиков, активных в отношении грамотрицательных патогенов, – комбинирование ферментов с поликатионными пептидами [30] или создание химерных белков с такими пептидами (артилизины) [31, 32]. Поликатионные пептиды способствуют проникновению фермента через внешнюю мембрану бактерии. В этом контексте каталитический домен  $\phi$ iKZ gp144 в силу своей высокой активности и специфичности представляет подходящий объект для создания инженерных ферментативных противомикробных препаратов. Детальное понимание механизмов действия пептидогликанлизирующих ферментов позволит создавать на их основе более эффективные средства борьбы с патогенными бактериями.

*Работа поддержана РФФ (грант № 16-16-00073).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krylov V.N., Dela Cruz D.M., Hertveldt K., Ackermann H.W. // Arch. Virol. 2007. V. 152. № 10. P. 1955–1959.
- Cornelissen A., Hardies S.C., Shaburova O.V., Krylov V.N., Mattheus W., Kropinski A.M., Lavigne R. // J. Virol. 2012. V. 86. № 3. P. 1844–1852.
- Крылов В.Н., Мирошников К.А., Крылов С.В., Вейко В.П., Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Буркальцева М.В. // Генетика. 2010. Т. 46. № 2. С. 159–167.
- Fokine A., Battisti A.J., Bowman V.D., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Chipman P.R., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. // Structure. 2007. V. 15. № 9. P. 1099–1104.
- Aksyuk A.A., Kurochkina L.P., Fokine A., Forouhar F., Mesyanzhinov V.V., Tong L., Rossmann M.G. // Structure. 2011. V. 19. № 12. P. 1885–1894.
- Thomas J.A., Weintraub S.T., Wu W., Winkler D.C., Cheng N., Steven A.C., Black L.W. // Mol. Microbiol. 2012. V. 84. № 2. P. 324–339.
- Мирошников К.А., Файзуллина Н.М., Сыкилинда Н.Н., Месянжинов В.В. // Биохимия. 2006. Т. 71. № 3. С. 379–385.
- Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C.W., Hertveldt K., Lavigne R. // Mol. Microbiol. 2007. V. 65. № 5. P. 1334–1344.
- Briers Y., Schmelcher M., Loessner M.J., Hendrix J., Engelborghs Y., Volckaert G., Lavigne R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 383. № 2. P. 187–191.
- Paradis-Bleau C., Cloutier I., Lemieux L., Sanschagrin F., Laroche J., Auger M., Garnier A., Levesque R.C. // FEMS Microbiol. Lett. 2007. V. 266. № 2. P. 201–209.
- Höltje J.V. // EXS. 1996. V. 75. P. 425–429.
- Fokine A., Miroshnikov K.A., Shneider M.M., Mesyanzhinov V. V., Rossmann M.G. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 11. P. 7242–7250.
- Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2231 p.
- Briers Y., Lavigne R., Volckaert G., Hertveldt K. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2007. V. 70. № 3. P. 531–533.
- Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G.R. // J. Cheminform. 2012. V. 4. № 8. P. 1–17.
- Grosdidier A., Zoete V., Michelin O. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. Suppl. 2. P. 270–277.
- Dolinsky T.J., Nielsen J.E., McCammon J.A., Baker N.A. // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. № WEB SERVER ISS. P. 665–667. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215472>
- Dolinsky T.J., Czodrowski P., Li H., Nielsen J.E., Jensen J.H., Klebe G., Baker N.A. // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. Suppl. 2. P. 522–525.
- Baker N.A., Sept D., Joseph S., Holst M.J., McCammon J.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 18. P. 10037–10041.
- Sorin E.J., Pande V.S. // Biophys. J. 2005. V. 88. № 4. P. 2472–2493.
- DePaul A.J., Thompson E.J., Patel S.S., Haldeman K., Sorin E.J. // Nucl. Acids Res. 2010. V. 38. № 14. P. 4856–4867.
- Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. // Comput. Phys. Commun. 1995. V. 91. № 1–3. P. 43–56.
- Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. // J. Mol. Model. 2001. V. 7. № 8. P. 306–317.
- Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. № 16. P. 1701–1718.

25. Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E. // *J. Chem. Theory Comput.* 2008. V. 4. № 3. P. 435–447.
26. van Asselt E.J., Dijkstra A.J., Kalk K.H., Takacs B., Keck W., Dijkstra B.W. // *Structure.* 1999. V. 7. № 10. P. 1167–1180.
27. Thunnissen A.M.W.H., Isaacs N.W., Dijkstra B.W. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1995. V. 22. № 3. P. 245–258.
28. Scheurwater E., Reid C.W., Clarke A.J. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008. V. 40. № 4. P. 586–591.
29. Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.J. // *Future Microbiol.* 2012. V. 7. № 10. P. 1147–1171.
30. Legotsky S.A., Vlasova K.Y., Priyma A.D., Shneider M.M., Pugachev V.G., Totmenina O.D., Kabanov A.V., Miroshnikov K.A., Klyachko N.L. // *Biochimie.* 2014. V. 107. Pt B. P. 293–299.
31. Yang H., Yu J., Wei H. // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 542–548.
32. Briers Y., Lavigne R. // *Future Microbiol.* 2015. V. 10. № 3. P. 377–390.