

# Біоінформаційний аналіз впливу мутацій тирозил-тРНК синтетази людини, асоційованих з нейропатією Шарко-Марі-Тус типу С, на локальні властивості її просторової структури

К. О. Одинець, О. І. Корнелюк

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

odynets@imbg.org.ua, kornelyuk@imbg.org.ua

---

*Нещодавно встановлено причинний зв'язок між трьома незалежними мутаціями в гені цитоплазматичної тирозил-тРНК синтетази (TyrRS) людини і домінантною нейропатією Шарко-Марі-Тус типу С (DI-CMTC). У даній роботі для двох точкових мутацій Gly41Arg і Glu196Lys та делеції 153–156delVKQV проведено біоінформаційне дослідження впливу заміни амінокислотних залишків на локальні структурні властивості димеру каталітичного модуля TyrRS людини (2 39 кДа, або так звана «міні-TyrRS»), зокрема, на їхнє найближче оточення та електростатичний потенціал молекулярної поверхні білка.*

*Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, нейропатія Шарко-Марі-Тус типу С, просторова структура, комп'ютерний мутагенез.*

---

**Вступ.** Завдяки застосуванню новітніх методів дослідження в молекулярній генетиці спадкових хвороб людини в останні роки неочікувано виявлено зв'язки між деякими нейродегенеративними захворюваннями і мутаціями в генах «домашнього господарства» клітини, які кодуєть цитоплазматичні аміноацил-тРНК синтетази (aaRS). Ця родина ферментів каталізує високоспецифічне приєднання L-амінокислот до відповідних тРНК. aaRS є ключовими компонентами клітинної системи біосинтезу білків, оскільки саме вони реалізують правила відповідності генетичного коду між амінокислотами і антикодонами тРНК. Крім цієї так званої «канонічної» функції, aaRS також притаманні різноманітні інші функції (див. огляди [1, 2]).

Недавно показано, що близько 10 незалежних мутацій у гені гліцил-тРНК синтетази (GlyRS) асоційовані з сенсомоторною аксональною нейропатією Шарко-Марі-Тус (Charcot-Marie-Tooth, CMT) типу 2D [3, 4]. Іншою синтетазою, для якої ідентифіковано зв'язок з нейродегенерацією, є цитоплазматична тирозил-тРНК синтетаза (TyrRS). Три незалежні мутації в її гені призводять до розвитку нейропатії CMT типу С [5, 6]. Оскільки TyrRS ссавців тривалий час є предметом нашого дослідження [7, 8], дана стаття присвячена аналізу цих мутацій. Серед aaRS з іншою специфічністю визначено зв'язок синтетази, специфічної для аланіну, із загибеллю клітин Пуркінє та атаксією [9, 10], а специфічної для триптофану – з хворобою Альцгеймера [11, 12]. Вищенаведене засвідчує, що деякі ферменти аміноацилювання

тРНК, крім виконання своєї канонічної функції, відіграють також істотну роль у функціонуванні структури периферичних нейронів.

*Нейропатія СМТ.* Хвороба Шарко-Мари-Тус є однією з найпоширеніших груп спадкових периферичних нейропатій з частотою зустрічальності 1:2500, або 2–4 хворих на 10000 людей. Нейропатії СМТ – це клінічно і генетично гетерогенна група спадкових моногенних нейрому'язових захворювань периферичної нервової системи, які характеризуються прогресуючим послабленням і атрофією спочатку перонеальних м'язів, а надалі – дистальних м'язів рук. СМТ підрозділяється на різні типи на основі електрофізіологічних і нейропатологічних критеріїв, обумовлених демієлінізацією або дегенерацією аксонів, або ж їхньою комбінацією (див. огляди [13–16]). Обидві основні форми СМТ (дем'єлінізуюча і аксонна) можуть успадковуватися за аутомно-домінантним, аутомно-рецесивним і Х-зчепленим типами наслідування; зустрічаються і мутації *de novo*.

Найчастішою домінантною мутацією при СМТ (68–90 % СМТ1) є дуплікація 1,4 тис. п. н. у локусі 17p11.2-12 хромосоми 17, яка виникає внаслідок нерівного кросинговера гомологічних хромосом у мейозі і призводить до розвитку СМТ дем'єлінового типу 1А (СМТ1А) [17]. Показано, що клінічні ознаки захворювання у переважної більшості пацієнтів обумовлені надекспресією гена *PMP22* периферичного білка мієліну і виникають за наявності трьох або чотирьох копій цього гена. Ще приблизно 10–20 % випадків захворювання пов'язано з Х-зчепленими мутаціями в гені конексину-32 (*Cx32*, *GJb1*) у локусі Xq13.1 [18]. Рецесивні мутації, відповідальні за розвиток захворювання, виявлено також у протеїні-0 мієліну (P0, MPZ, локус 1q22) [19], періаксині (локус 19q13) [20], міотубулярин-спорідненому протеїні-2 (локус 11q22) [21]. Тому при дослідженні первинних генетичних дефектів дем'єлінізуючої форми нейропатії СМТ у першу чергу аналізують саме ці гени.

У гені гліцил-тРНК синтетази (ген *GARS*) виявлено вже більше 10 різних мутантних алелів, які викликають домінантну аксонну форму СМТ типу 2D. Функціональний аналіз мутантних форм GlyRS визначив відсутність істотних змін у рівнях

експресії білка, а також те, що в більшості випадків мутантні форми GlyRS мають змінену локалізацію в нейронах. Для чотирьох з п'яти досліджених мутацій встановлено відсутність функції GlyRS щонайменше за допомогою одного методу, підтверджуючи тим, що дефіцит в аміноацилюванні тРНК відіграє істотну роль у патогенезі цієї хвороби [3]. Також детектовано ендогенні гранули, асоційовані з GlyRS, у культивованих нейронах і аксонах периферичних нервів нормальної тканини людини.

Картування мутацій на нещодавно визначену кристалграфічну структуру GlyRS людини показує їхнє розташування у вигляді смуги, яка оточує обидва боки інтерфейсу димеризації [6]. Фенотип СМТ не корелює з аміноацилюючою активністю, однак більшість мутацій перешкоджають формуванню димеру, підсилюючи або послаблюючи димеризацію. Сім СМТ-обумовлюючих варіантів і білок дикого типу експресовано в трансфікованих клітинах нейробластоми, які розвиваються у примітивні нейрони. GlyRS дикого типу розподіляється в новоутворених нейронах і асоціюється з їхнім нормальним ростом. І, навпаки, всі мутантні форми GlyRS були дефектними за особливостями розподілу.

Таким чином, локалізація GlyRS при всіх СМТ-обумовлюючих мутаціях є порушеною, що може бути пов'язано зі змінами поверхні її інтерфейсу димеризації.

*Нейропатія DI-CMTC і TyrRS.* Проміжна аутомно-домінантна форма нейропатії СМТ типу С (DI-CMTC, MIM 608323) є генетичним і фенотиповим варіантом СМТ, який характеризується проміжними швидкостями нервової провідності та гістологічними ознаками як дегенерації, так і дем'єлінізації аксонів. DI-CMTC є периферичною нейропатією, якій притаманні риси обох форм СМТ (дем'єлінізуючої і аксонної), а також проміжні швидкості нервової провідності (NCV) у діапазоні від 25 до 45 м/с. Ідентифіковано локус 1p34-p35 хромосоми 1, пов'язаний з DI-CMTC, який відповідає гену *YARS* (GeneID: 8565), що кодує цитоплазматичну TyrRS людини [5, 6].

Як типовий ген «домашнього господарства» клітини *YARS* експресується у кожній тканині, включаючи головний і спинний мозки [5]. TyrRS

локалізована в кінчиках аксонів у культурах диференціюючих первинних моторних нейронів і нейробластом. Такий специфічний розподіл суттєво зменшується в клітинах, які експресують зазначені мутантні форми TyrRS [5]. Біохімічними експериментами і генетичною комплементациєю в дріжджах встановлено часткову втрату аміноацилюючої активності цих мутантних білків, а також зниження швидкості росту дріжджів під впливом мутацій в ортологічному дріжджовому гені *TYS1*.

Раніше кДНК гена *YARS* клонували з кількох різних кДНК-бібліотек людини [22]. Ця кДНК кодує субодиницю TyrRS, яка складається з 528 амінокислотних залишків (а. з.) (GenPept код NP\_003671.1). TyrRS (EC 6.1.1.1) є димером  $\gamma$ -типу з молекулярною масою 259 кДа і каталізує активацію L-тирозину і його специфічне приєднання до тРНК<sup>Tyr</sup>. Аналіз амінокислотної послідовності білка виявив, що NH<sub>2</sub>-кінцевий модуль (а. з. Met1–Pro342) містить каталітичний та антикодон-зв'язувальний домен (рис. 1, *a–в*). Димер N-модуля (259 кДа), який зберігає основні каталітичні властивості повної TyrRS, відомий також під назвою «міні-TyrRS» [23]. COOH-кінцева частина TyrRS або її C-модуль є представником родини Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide II (EMAP II)-подібних доменів і присутній в TyrRS лише вищих еукаріотів [22]. TyrRS людини експресовано також *in vitro* та досліджено її біохімічні властивості [24].

Хоча нативна TyrRS людини є неактивною молекулою стосовно передачі міжклітинного сигналу, вона може бути розщепленою на два різних фрагменти з цитокін-подібними активностями [23]. TyrRS секретується за апоптотичних умов у культурі клітин, де вона розщеплюється на N- і C-кінцеві фрагменти, які відповідають N- і C-модулям. N-модуль є інтерлейкін-8 (IL8)-подібним цитокіном, у той час як вивільнений C-кінцевий фрагмент – EMAP II-подібним цитокіном. Показано, що цитокінові активності розщепленої TyrRS людини обумовлені високодиференційованими мотивами, специфічними для ферменту ссавців [25, 26]. Знайдено проангіогенну і антиангіогенну активності обох фрагментів TyrRS, які стимулюють імунні клітини і тим самим зв'язують трансляцію з важли-

вим клітинним сигнальним шляхом, що обговорюється в оглядах [2, 27, 28].

Дефекти в *YARS* є причиною домінантної проміжної форми СМТ типу С (DI-CMT C). На цей час визначено дві гетерозиготні місенс-мутації і одну *de novo* делецію в TyrRS у різних родинах з DI-CMTC [5]. Так, у родині з Північної Америки ідентифіковано гетерозиготну транзицію 121G → A в екзоні 2 гена *YARS*, яка спричиняє місенс-мутацію Gly41Arg (мутація СМТ-160). У родині з Болгарії знайдено гетерозиготну транзицію 586G → A в екзоні 5 цього гена, яка призводить до мутації Glu196Lys (мутація СМТ-176). Крім того, ідентифіковано делецію 458–46912 розміром 12 п. н. у рамці трансляції екзона 4 у хворій пацієнтки з Бельгії, яка спричиняє делецію 153–156delVKQV (делеція PN-765). Аналіз цієї мутації і генотипування безсимптомних батьків виявив, що ця мутація виникла *de novo*.

Просторову структуру N-модуля TyrRS людини (ділянка Met1–Pro342) визначено методом рентгеноструктурного аналізу у 2003 р. (Protein Data Bank (PDB), коди 1N3L і 1Q11) із роздільною здатністю 0,12 і 0,16 нм [29, 30]. Також на сьогодні визначено просторову структуру каталітичних модулів двох TyrRS, які є структурними гомологами N-модуля ссавців, у комплексах з відповідними тРНК<sup>Tyr</sup>. Це TyrRS архебактерії *Methanocaldococcus jannaschii* з немодифікованим транскриптом її тРНК<sup>Tyr</sup> (PDB код 1J1U, а. з. Met1–Leu306) [31] і дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* з нативною тРНК<sup>Tyr</sup> (PDB код 2DLC, а. з. Asp8–Pro356) [32]. Усі ці структурні дані надають можливість провести біоінформаційне дослідження впливу заміни зазначених амінокислотних залишків на структурні властивості TyrRS людини в нормі і в її трьох мутантних формах.

**Матеріали і методи.** Використовували інформацію з бази даних спадкових хвороб людини Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim]. Координатні файли просторових структур білків взято з банку даних PDB [33], а додаткову інформацію – з бази даних PDBsum [34]. Візуалізацію просторової структури білків і аналіз локального оточення залишків проводили у програмі Swiss-PdbViewer (DeepView) 3.7

[35]. Веб-сервер ModLoop [36] застосовували для побудови відсутньої каталітичної «KMSKS»-петлі розміром 7 а. з. Для моделювання мутантних форм мономера N-модуля TyrRS методом «комп'ютерного мутагенезу» незалежно використано веб-сервер Swiss-Model 3.5 [37] у режимі «First Approach Mode» і програму для моделювання за гомологією Modeller 9.2 [38]. Оцінку якості кожної з 10 отриманих моделей для кожної з трьох мутацій здійснювали за величиною цільової функції «Modeller Objective Function» та з веб-сервером Biotech Validation Suite [biotech.ebi.ac.uk: /8400/] і обирали найкращі моделі за його об'єднаним рейтингом. Структури димерів N-модуля утворювали шляхом суперпозиції обох мономерів з димером Biological Unit від веб-сервера Protein Quaternary Structure (PQS).

Для аналізу можливої конформації заміненних бічних радикалів використано програму Swiss-PdbViewer 3.7 з її бібліотекою ротамерів та інструмент «Mutate», щоб обрати ротамери з найменшим рейтингом. Оптимальну конформацію для нового бічного ланцюга вибирали як «найкращий» ротамер за критерієм найменших конфліктів Ван-дер-Ваальсових радіусів його атомів з атомами сусідніх залишків.

Просторову структуру N-модуля аналізували з використанням його координат з файлу 1N3L у вигляді симетричного димеру, в якому побудовано «відсутню» міждоменну каталітичну «KMSKS»-петлю розміром 7 а. з. (222–228-KMSSEE) за допомогою веб-сервера ModLoop. Мутантні форми білка незалежно моделювали, застосовуючи програми Swiss-PdbViewer 3.7, Modeller 9.2 і веб-сервер Swiss-Model 3.5 (після заміни відповідних залишків, побудови петель і додавання відсутніх атомів структури моделей оптимізували за алгоритмом ProModII у силовому полі GROMOS96).

Відповідні ділянки амінокислотних послідовностей гомологічних TyrRS з еукаріотів і архебактерій досліджували, використовуючи готові множинні вирівнювання з домену «Tyrosinyl-tRNA synthetase (TyrRS) catalytic core domain» (TyrRS\_core, коди cd00805 і CDD:28813), який відповідає ділянці 38–320 TyrRS людини. Ступінь експонованості амінокислотних залишків аналізу-

вали з веб-сервером GetArea 1.1 [39], а ступінь еволюційної консервативності – з веб-сервером ConSurf 3.0 [40].

**Результати і обговорення.** Для двох точкових мутацій Gly41Arg, Glu196Lys і делеції 153–156VKQV TyrRS людини, які асоційовані з нейропатією СМТ типу С, здійснено біоінформаційне дослідження локальних властивостей просторової структури TyrRS у нормі та в мутантних формах. Для димеру N-модуля в нормі і трьох його мутантних форм послідовно проаналізовано розташування цих залишків відносно елементів вторинної структури білка, їхню еволюційну консервативність в амінокислотних послідовностях гомологічних TyrRS, властивості найближчого оточення, здатність утворювати водневі зв'язки з сусідніми залишками, ступінь експонованості на поверхні макромолекули та ступінь рухливості оточуючих ділянок поліпептидного остова за В-факторами С атомів амінокислотних залишків у кристаліграфічній структурі. Також передбачали зміни ізоелектричної точки та аналізували вплив на розподіл електричного потенціалу на поверхні макромолекули і можливу дію на зв'язування трьох субстратів TyrRS, включаючи tPHK<sup>Tyr</sup>.

*Загальна характеристика сайтів, пов'язаних з мутаціями, в нормі.* Усі досліджувані сайти знаходяться в N-модулі TyrRS до рухливої «KMSKS»-петлі, в межах каталітичного домену з топологією згортки Россмана. Розташування цих залишків відносно амінокислотної послідовності субодиниці TyrRS та елементів її вторинної структури за норми представлено на рис. 1, а–в, а відносно поліпептидного остова димеру N-модуля в нормі – на рис. 1, г. Усі три сайти локалізовані з одного боку димеру N-модуля, де розташований каталітичний центр TyrRS, і мають значну частку поверхні, експонованої до розчинника, як це показано при вигляді «згори» на димер «міні-TyrRS» (рис. 1, д). Множинне вирівнювання 44 послідовностей TyrRS вищих еукаріотів від людини до нематод демонструє еволюційну інваріантність усіх шести залишків для сайтів мутацій (даних не наведено). Розрахунок теоретичних значень ізоелектричної точки pI N-модуля TyrRS демонструє передбачувані і досить істотні її зміни: 6,49 в нормі; 6,74 для Gly41Arg; 6,29 для

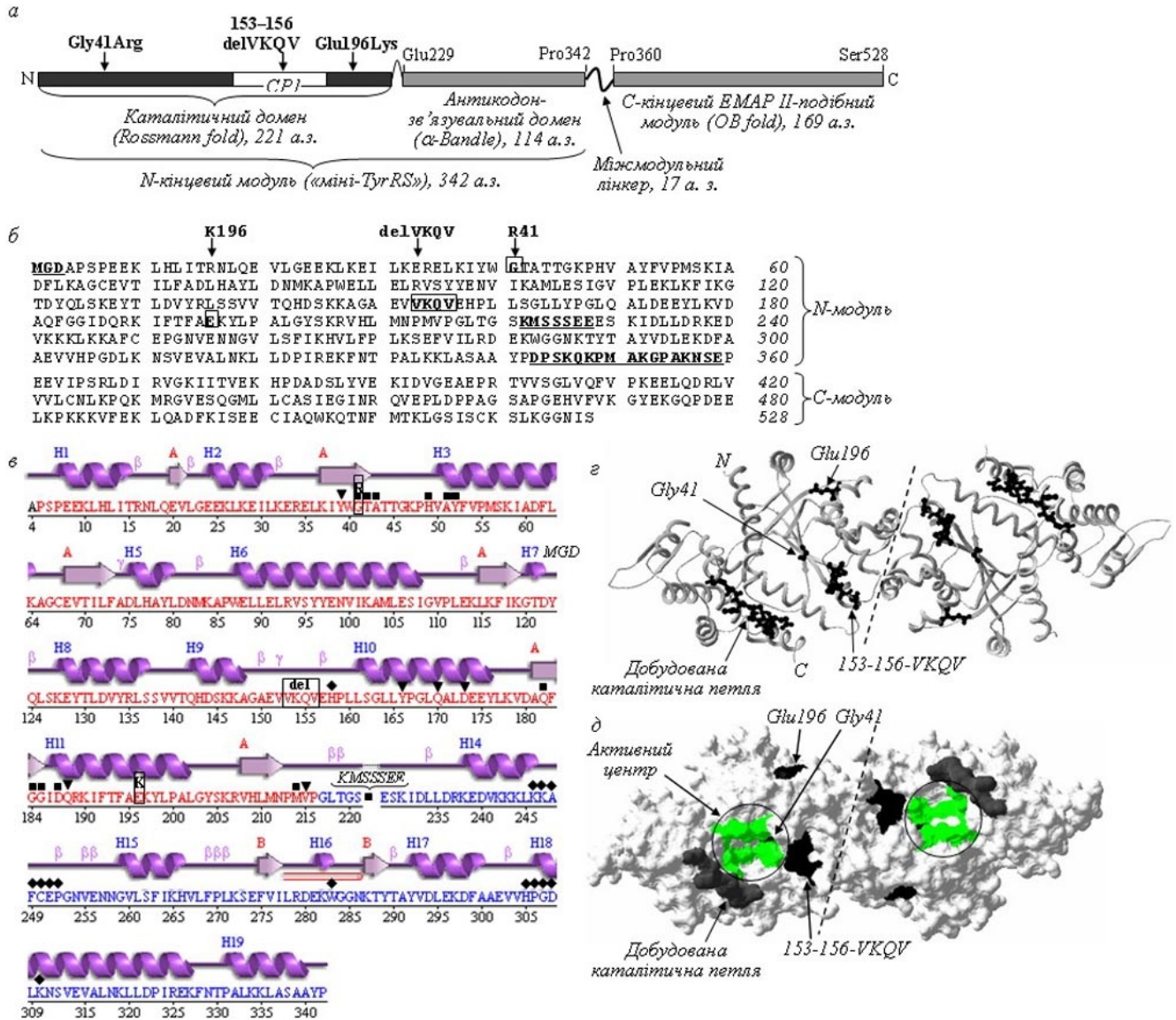


Рис. 1. Розташування двох точкових гетерозиготних мутацій Gly41Arg і Glu196Lys та делеції 153-156delVKQV цитоплазматичної TygRS людини, асоційованих з нейропатією Шарко-Мари-Тос типу С: *а* – схема доменної організації субодиниці TygRS (N-модуль («міні-TyrRS») має аміноацилюючу та інтерлейкін-8-подібну активності, а С-модуль гомологічний до цитокіну EMAP II; каталітичний і антикодонз'язувальний домен (Met1–Ser221 і Glu229–Pro342) розділені каталітичною «KMSKS»-петлею); *б* – амінокислотна послідовність субодиниці TygRS у нормі (GenPept код NP\_003671; залишки, пов'язані з DI-CMTC, виділено жирним шрифтом, а ділянки послідовності, для яких не встановлено атомних координат у кристалографічних структурах N- і С-модулів (PDB коди 1N3L, 1Q11 і 1NTG), позначено курсивом); *в* – вторинна структура N-модуля за даними рентгеноструктурного аналізу (PDB код 1N3L; відповідні залишки виокремлено рамками; амінокислотні залишки, які формують водневі зв'язки з L-тирозином і аденоїном AMP, позначено трикутниками; інші залишки активного центру – прямокутниками, а 14 а. з., які взаємодіють з tРНК<sup>Tyr</sup>, – ромбами); *г* – розташування залишків у нормі відносно просторової структури димеру її N-модуля (PDB код 1N3L; поліпептидний остов білка представлено у вигляді стрічкової моделі; бічні ланцюги для залишків у нормі забарвлено чорним кольором); *д* – молекулярна поверхня димеру N-модуля в нормі, на якій позначено одночасно всі DI-CMTC залишки (чорний колір), побудовано каталітичну петлю (сірий колір) та 16 ключових залишків активного центру обведено овалом

Вид організму	Код	Gly41Arg	153-156delVKQV	Glu196Lys
<i>Homo sapiens</i>	4507947	LKI-YWG <b>T</b> ATTGK	KAGAEV <b>V</b> KQ <b>V</b> EHPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<b>Інші еукаріоти</b>				
<i>Canis familiaris</i>	73949939	LKV-YWG <b>T</b> ATTGK	KAGAEV <b>V</b> KQ <b>V</b> EHPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Gallus gallus</i>	57530465	VKI-YWG <b>T</b> ATTGK	KAGAEV <b>V</b> KQ <b>V</b> EHPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Danio rerio</i>	41151996	LKV-YWG <b>T</b> ATTGK	KAGAEV <b>V</b> KQ <b>V</b> EHPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Anopheles gambiae</i>	118781822	LKI-YWG <b>T</b> ATTGK	KAGAEV <b>V</b> KQ <b>V</b> EHPLMS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Apis mellifera</i>	110762892	LKL-YWG <b>T</b> ATTGK	KAGAEV <b>V</b> KQ <b>V</b> VNPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Caenorhabditis elegans</i>	71992775	PHV-YWG <b>T</b> ATTGK	KAGAEV <b>V</b> KQ <b>V</b> ESPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Yarrowia lipolytica</i>	50548779	LKI-YWG <b>T</b> APTGK	RAGADV <b>V</b> KQ <b>V</b> DNPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Ashbya gossypii</i>	45184676	LRL-YWG <b>T</b> APTGK	RAGADV <b>V</b> KQ <b>V</b> SNPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Kluyveromyces lactis</i>	50311493	LKL-YWG <b>T</b> APTGK	RAGADV <b>V</b> KQ <b>V</b> ANPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Debaryomyces hansenii</i>	50427467	LKI-YWG <b>T</b> APTGK	RAGADV <b>V</b> KQ <b>V</b> ANPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Candida albicans</i>	68470880	VKI-YWG <b>T</b> APTGK	RAGADV <b>V</b> KQ <b>V</b> ANPLLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Neurospora crassa</i>	85090711	PRI-YWG <b>T</b> ATTGR	KAGAEV <b>V</b> KQ <b>S</b> DNAPLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Aspergillus nidulans</i>	40746079	PRI-YWG <b>T</b> ATTGR	KAGAE <b>I</b> VKQ <b>S</b> ANAPLS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Plasmodium falciparum</i>	23612935	LIC-YD <b>G</b> FEPSGR	CLK <b>I</b> MGR <b>S</b> EGEENYCS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Cryptosporidium parvum</i>	32398875	HPIC <b>Y</b> D <b>G</b> FEPSGR	CCQ <b>I</b> MGR <b>Q</b> ENDEQPCA	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Plasmodium berghei</i>	56498114	KLIC <b>Y</b> D <b>G</b> FEPSGR	CL <b>T</b> IMGR <b>T</b> EGEDNYCS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<b>Архебактерії</b>				
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	11498382	PRA-YV <b>G</b> YEPSGE	RSMDEV <b>S</b> RRKEDPMVS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Methanopyrus kandleri</i>	20093954	EPVAYV <b>G</b> FEPSGK	RSMD <b>M</b> I <b>A</b> RSEENPPVS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Methanosarcina barkeri</i>	73669252	PRA-YV <b>G</b> YEPSGK	RSMDEV <b>G</b> RAMDDPTVS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Methanosarcina mazei</i>	21228065	PRA-YV <b>G</b> YEPSGK	RSMDEV <b>G</b> RAMDDPTVS	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Methanothermobact.ther.</i>	15679755	PVV-Y <b>T</b> G <b>Y</b> EPSGR	RSMA <b>Q</b> I <b>T</b> RESRDHKVA	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Methanocaldococcus jan.</i>	15668565	KSA-Y <b>I</b> G <b>F</b> EPSGK	RSME <b>L</b> I <b>A</b> REDENPKVA	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL
<i>Pyrococcus abyssi</i>	14521173	LQH-Y <b>I</b> G <b>F</b> EISGY	RS <b>I</b> T <b>I</b> MGR <b>Q</b> MGESIDF	KIFTFA <b>E</b> KYLPAL

Рис. 2. Множинне вирівнювання 24 з 74 амінокислотних послідовностей TyrRS еукаріотів і архебактерій (консервативний домен COG0162.2, за даними бази даних CDD) для оточення трьох зазначених мутацій. Жирним шрифтом виділено найконсервативніші позиції

delVKQV і 7,10 для Glu196Lys. Детальний розгляд структурних особливостей трьох мутацій наведено нижче.

**Мутація Gly41Arg.** Відносно елементів вторинної структури Gly41 локалізований на кінці -тяжу A1 і належить до еволюційно найконсервативніших залишків TyrRS (рис. 1, в, рис. 2). Слід зазначити значну структурну відмінність амінокислотного залишку в нормі і в мутантному білку – аргінін має набагато більший об'єм, ніж гліцин, до того ж його гуанідинова група позитивно заряджена. Тому досить несподіваним виявилось те, що мутація Gly41Arg взагалі сумісна із стабільною структурою TyrRS. У радіусі 0,5 нм від залишку Gly41 знаходяться сім залишків (39-YW, 42-TA, L72 і 182-QF), з якими він не утворює водневих зв'язків, проте Leu72 утворює водневі зв'язки з остовом сусідніх залишків у -шарі (рис. 3, а). В радіусі 0,7 нм від Gly41 знаходяться 15 переважно гідрофобних залишків, з яких п'ять є ароматичними. Залишок Gly41 розташований у невеликій заглибині, яка сформована, у першу чергу, залишками W40, T42, A43 і Q188 і має досить значну поверхню, доступну

для розчинника (рис. 4, б, таблиця). Значення В-фактора для С атома Gly41 у кристалографічних структурах 1N3L і 1Q11 становить відповідно 1,73 і 1,29 нм, що вказує на його незначну рухливість у складі корового -шару білка (рис. 4, в).

При заміні залишку Gly41 на аргінін програмою Swiss-PdbViewer запропоновано 18 ротамерів з рейтингом від 26 до -3, з яких лише чотири не мають істотних конфліктів з оточенням (рейтинг 0– -3). Для ротамеру Arg41 № 18 з найнижчим рейтингом -3 виявлено можливість утворення двох водневих зв'язків між його бічною групою і бічними групами Tyr166 і Gln170 (рис. 3, б). При цьому основні обмеження на можливу конформацію довгого і гнучкого бічного ланцюга Arg41 накладають сусідні а. з. Y39, L72, H77, Y166, Q170, D173 і Q188. Суперпозиція дев'яти моделей, отриманих за допомогою Modeller 9.2, продемонструвала можливість суттєвої конформаційної рухливості бічного ланцюга Arg41 у межах зазначеної кишені.

Варто також зазначити, що близькість одного з чотирьох залишків триптофану (а саме – Trp40), які є природними флуорофорами в структурі TyrRS

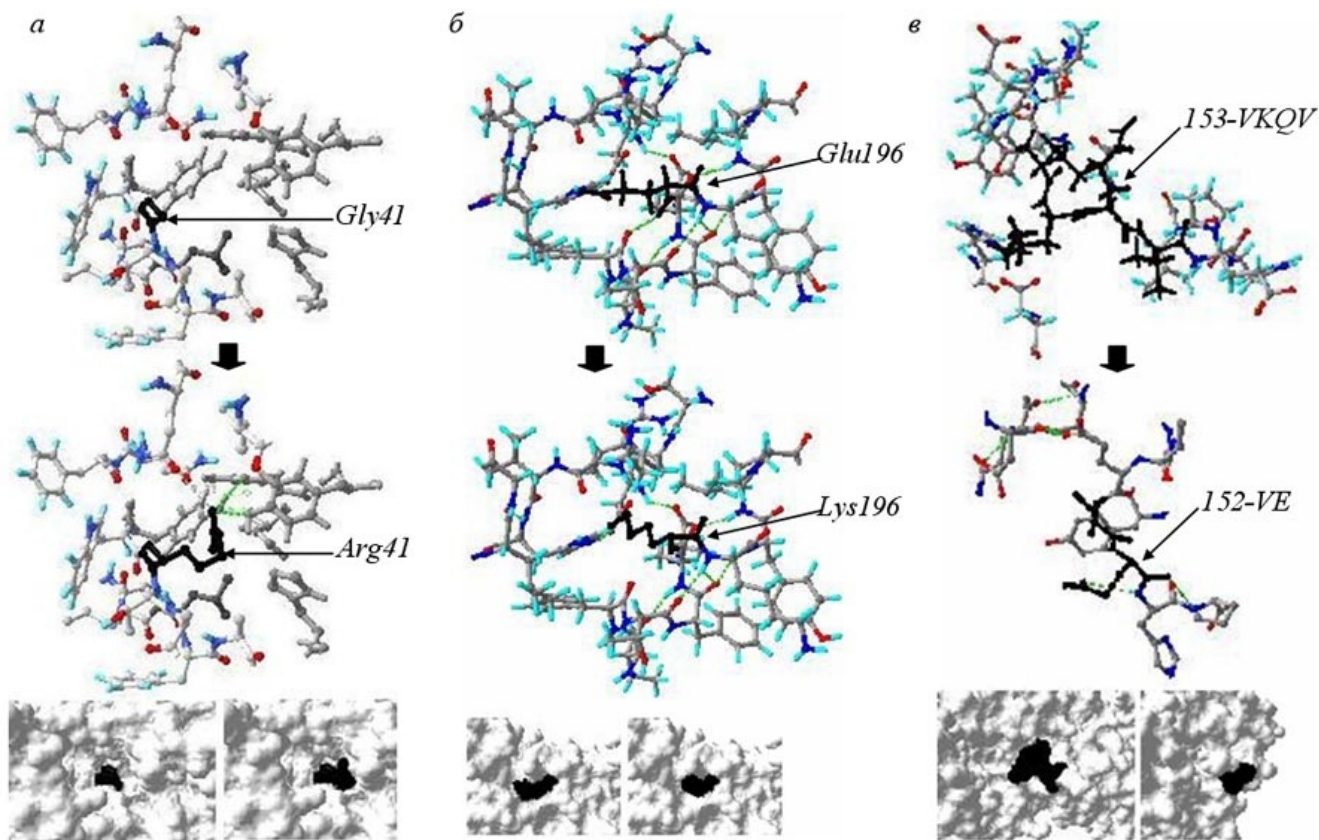


Рис. 3. Локальне оточення амінокислотних залишків, пов'язаних з мутаціями, в нормі та після комп'ютерного мутагенезу (ці залишки виділено чорним кольором), наведено також зображення відповідних ділянок молекулярної поверхні в однаковій орієнтації: *a* – Gly41 і 12 залишків у радіусі 0,6 нм (залишок Leu72 утворює два водневих зв'язки; для мутантної форми Gly41Arg оптимальною є компактна конформація бічного ланцюга, при якій можливе утворення двох водневих зв'язків); *б* – Glu196 і 13 залишків у радіусі 5,0 Å (бічний ланцюг Glu196 не утворює водневих зв'язків; для мутантної форми Glu196Lys відсутні суттєві зміни в положенні бічного ланцюга та його локального оточення); *в* – залишки 153–156-VKQV і 11 залишків у радіусі 0,5 нм (поверхнева петля Gly149–Leu161 формує незначну кількість контактів з іншими ділянками білка; при делеції 153–156 відбувається скорочення довжини цієї петлі з 13 до 9 а. з.)

людини, *a priori* може впливати на зміну її флуоресцентних властивостей за наявності мутації Gly41Arg.

**Мутація Glu196Lys.** Відносно елементів вторинної структури залишок Glu196 локалізований в кінці  $\alpha$ -спіралі H12 і також є досить еволюційно консервативним – крім нього, в даній позиції найчастіше зустрічається залишок аргініну (рис. 1, *в*, рис. 2 і рис. 4, *а*). Glu196 є частково експонованим на поверхні TyrRS, і біля нього в радіусі 0,5 нм знаходяться 13 а. з. (L22, 192-FTFA, 197-KYLP і 206-KRVH), чотири з яких мають позитивний заряд. Залишок Glu196 розташований майже паралельно молекулярній поверхні TyrRS і утворює два водневих

зв'язки з атомами поліпептидного остову залишків Phe192 і Thr193 (рис. 3, *б*). Значення В-фактора для С атома залишку Glu196 становлять 1,99 і 1,41 нм для структур 1N3L і 1Q11 відповідно (рис. 4, *в*), що вказує на його невисоку рухливість.

При заміні залишку Glu196 на близький за розміром лізин програмою Swiss-PdbViewer запропоновано 16 різних ротамерів з рейтингами від 15 до  $-2$ , з яких нами обрано ротамер № 2 з найнижчим рейтингом  $-2$ . Ще чотири інших ротамери мали той самий рейтинг і близьку конформацію бічного ланцюга. Мутація Glu196Lys призводить до заміни негативного заряду на позитивний, однак при цьому не спостерігається суттєвих змін у конформації

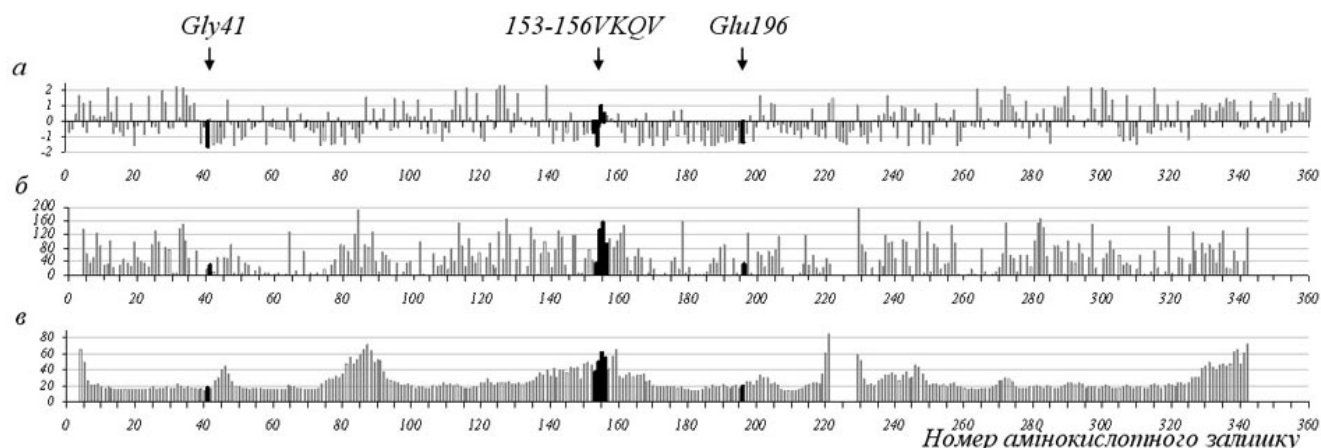


Рис. 4. Параметри амінокислотних залишків для N-модуля TygRS людини (Met1–Pro342, залишки, для яких описано мутації, виділено чорним фоном; структуру трьох найрухливіших залишків з N-кінця макромолекули і семи залишків каталітичної «KMSKS»-петлі не визначено в кристалографічній структурі, PDB код 1N3L): *a* – ступінь еволюційної консервативності залишків як значення нормалізованого рейтингу від веб-сервера ConSurf 3.0; *б* – ступінь експонованості як площа залишку, доступна для розчинника (Solvent Accessible Surface Area, SASA), за даними веб-сервера GetArea 1.1; *в* – ступінь рухливості а. з. як значення В-фактора для С атомів у кристалографічній структурі (PDB код 1N3L)

Характеристика еволюційної консервативності, експонованості та рухливості для амінокислотних залишків, пов'язанх з мутаціями DI-CMTC

Амінокислотний залишок	Нормалізований рейтинг консервативності (ConSurf 3.0)	Дані множинного вирівнювання*	Варіація залишку**	Поверхня, доступна для розчинника, нм <sup>2</sup> (GetArea 1.1)	В-фактор С-атома	
					1N3L	1Q11
Gly41	-1,554	50/50	G	0,31	17,28	12,91
Val153	-0,684	50/50	A, G, K, Q, S, T, V	0,36	37,75	25,18
Lys154	-1,469	50/50	K, Q, R	1,30	49,09	28,19
Gln155	1,025	50/50	A, E, F, K, N, Q, R, S, T, Y	1,56	60,51	31,45
Val156	0,514	50/50	A, D, E, G, K, M, N, Q, R, S, T, V	0,91	55,18	35,93
Glu196	-1,338	50/50	E, I, R	0,34	19,85	14,08

Примітка. \*Кількість вирівняних без зсуву (non-gapped) амінокислотних послідовностей TygRS, які мають цей залишок, із загальної кількості 50 найменш гомологічних послідовностей для кожної позиції; \*\*амінокислотні залишки, які зустрічаються у даній позиції множинного вирівнювання послідовностей.

оточуючих залишків. Водневі зв'язки між остовом залишку 196 зберігаються (з Phe192 і Thr193), а новий бічний ланцюг Lys196 втрачає водневий зв'язок з остовом залишку Arg207.

*Мутація 153–156delVKQV.* Ці амінокислотні залишки розташовані в ділянці так званого з'єднувального поліпептиду 1 (Connecting Polypeptide 1,

CP1) домену, який поєднує дві половини згортки Россмана. Ділянка петлі Val153–His158 між-спіралями Н9 і Н10 є однією з двох частково не-впорядкованих ділянок у каталітичному домені «міні-TygRS», розташованих на її поверхні [29]. Цей сегмент – частина специфічного елемента для впізнавання акцепторного стебла тРНК<sup>Tyr</sup> і,



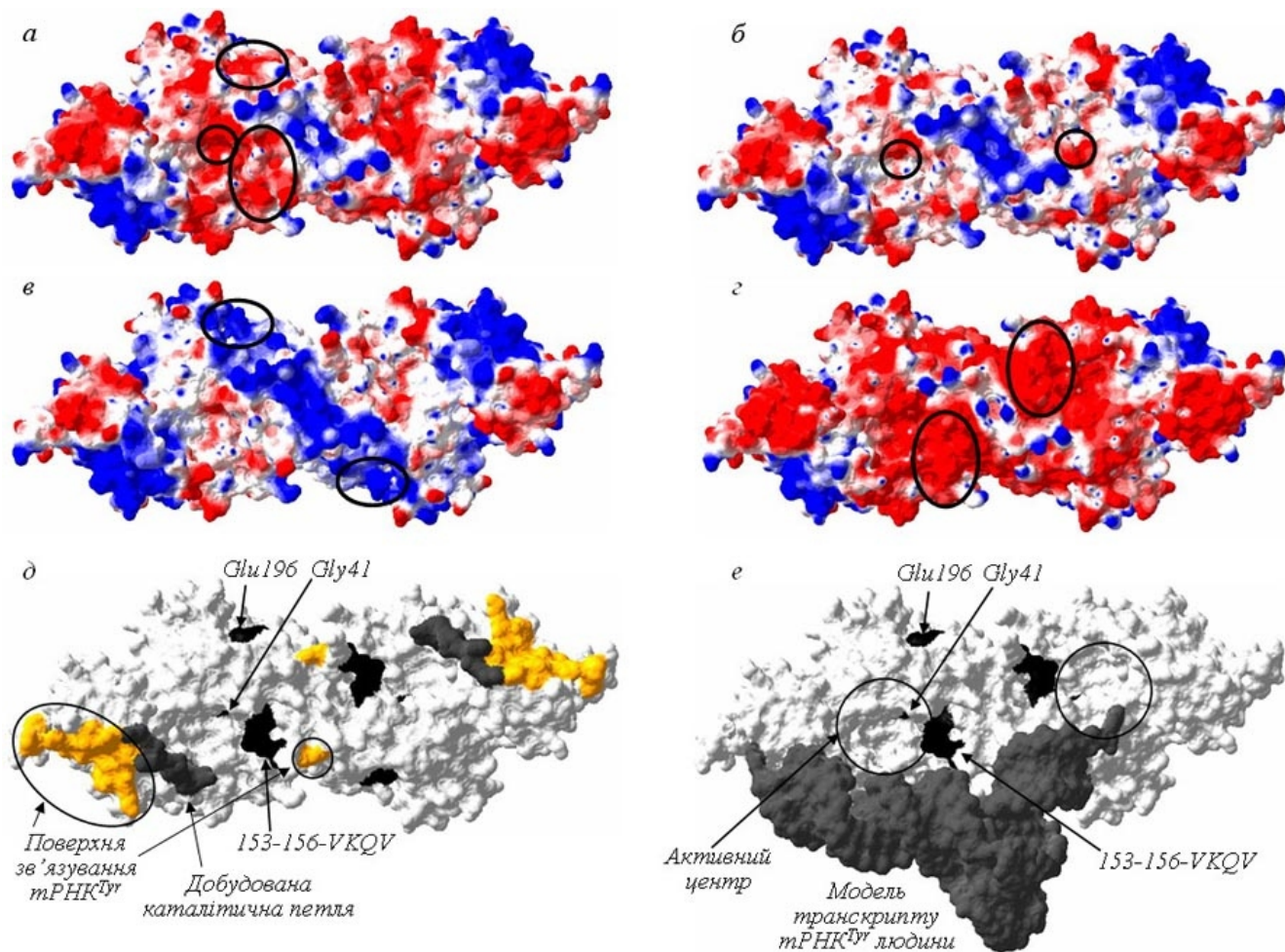


Рис. 5. Розташування трьох амінокислотних залишків цитоплазматичної TyRS людини, які відповідають мутаціям Gly41Arg, Glu196Lys і 153–156delVKQV, відносно просторової структури димеру її N-модуля або «міні-TyRS» (PDB код 1N3L) у нормі і в мутантних формах білка (міждоменну каталітичну «KMSKS»-петлю добудовано за допомогою веб-сервера ModLoop; зображення створено з використанням програми Swiss-PdbViewer 3.7 і наведено в одній проекції – вигляд «згори»): *a* – молекулярна поверхня димеру N-модуля в нормі, забарвлена за електростатичним потенціалом (електростатичний потенціал розраховано за методом «Coulomb» з урахуванням парціальних зарядів атомів); *b* – те саме з точковою мутацією Gly41Arg в обох субодиницях; *c* – те саме з мутацією Glu196Lys в обох субодиницях; *d* – те саме з делецією 153–156delVKQV в обох субодиницях; *e* – розташування сайтів DI-СМТС мутацій відносно а. з., які формують поверхню зв'язування тРНК<sup>Tyr</sup>, окрім її 3'-ССА-кінця (виділено сірим кольором і двома овалами); *e* – модель комплексу димеру N-модуля з немодифікованим транскриптом тРНК<sup>Tyr</sup> людини без її 3'-ССА-кінця (стехіометрія 2:1)

ймовірно, набуває впорядкованої конформації при зв'язуванні тРНК<sup>Tyr</sup> [29, 41]. Мутація 153–156delVKQV практично збігається з цією ділянкою і при делеції зазначених залишків відбувається скорочення довжини петлі з 13 до 9 а. з. (рис. 1, *в*). Варто згадати певну консервативність даної ділянки в амінокислотних послідовностях гомологічних

TyRS еукаріотів, але не архебактерій (рис. 2), однак структура петлі, вірогідно, неістотно впливає на внутрішню структуру білкового кору.

У радіусі 0,5 нм від цих чотирьох залишків петлі знаходяться дев'ять сусідніх у ланцюзі амінокислотних залишків (149-GAEV, 157-ENP, G163 і Y166), з якими вони утворюють лише один водне-

вий зв'язок (рис. 3, в). Значення В-фактора для С атомів ділянки 153–156VKQV лежать у межах 3,78–6,05 нм для структури 1N3L, що відповідає значному пікові рухливості поліпептидного остову і є очікуваним для залишків поверхневої петлі (рис. 4, в, таблиця).

*Можливий вплив мутацій на взаємодію TyrRS з субстратами.* Виходячи з кристалграфічних структур TyrRS архебактерії і дріжджів, можна з високою надійністю передбачити еволюційно консервативні залишки, які формують водневі зв'язки з L-тирозином і основою аденіну AMP. Для TyrRS людини це відповідно п'ять а. з. – Y39, Y166, Q170, D173, Q188 та залишок Val215. До каталітичного центра також належать залишки 41-GTA, H49, 51-AY, Q182, 184-GG, D187, M214 і 222-KMSSS (рис. 1, в). Справедливо очікувати, що структурні зміни, пов'язані з мутаціями DI-CMTC, можуть опосередковано (дистально) впливати на зв'язування низькомолекулярних субстратів. У першу чергу це стосується мутації Gly41Arg, яка є сусідньою до більшості залишків що зв'язують L-тирозин.

Зіставлення молекулярних поверхонь димерів N-модуля, забарвлених за електростатичним потенціалом, у нормі і окремо для трьох мутацій вказує на те, що розподіл електростатичного потенціалу на поверхні молекули набуває значних змін і є дуже чутливим до окремих мутацій (рис. 5, а–г).

*Можливий вплив мутацій на взаємодію TyrRS з tPНК<sup>Tyr</sup>.* Щоб дослідити можливу участь залишків, причетних до мутацій, у зв'язуванні макромолекули tPНК<sup>Tyr</sup>, здійснено моделювання комплексу димеру N-модуля TyrRS людини з немодифікованим транскриптом її tPНК<sup>Tyr</sup>, не включаючи її рухливого 3'-ССА-кінця (стехіометрія 2:1), на основі гомологічних комплексів з архебактерії *M. jannaschii* і дріжджів *S. cerevisiae* (PDB коди 1J1U і 2DLC). Проведене передбачення контактів цієї моделі між TyrRS людини у нормі з молекулою tPНК<sup>Tyr</sup> виявило 14 а. з.: H158, 246-KKAFCEP, W283, 305-NPGD і K310, які утворюють контактну поверхню. У результаті встановлено близьке розташування залишку Glu196 до молекули tPНК у моделі комплексу TyrRS–tPНК<sup>Tyr</sup> та ймовірний вплив делеції залишків 153–156-VKQV на розташування сусідньо-

го His158, який безпосередньо взаємодіє з акцепторним стеблом tPНК<sup>Tyr</sup> (рис. 5, д, е).

Варто зазначити, що всі три мутації, і в першу чергу Gly41Arg, є потенційними чинниками некоректного фолдингу мутантних форм TyrRS. Це спричинює зменшення їхньої розчинності і підвищення здатності до утворення макромолекулярних агрегатів.

Інша можливість полягає в тому, що зміни молекулярної поверхні цих мутантних форм TyrRS впливатимуть на характеристики білково-білкових взаємодій TyrRS з її партнерами в нормі або на виникнення нових нетипових взаємодій з іншими клітинними компонентами.

На сьогодні для гена *YARS* людини знайдено також інші несинонімічні точкові мутації (nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms), які змінюють амінокислотну послідовність TyrRS. Зокрема, це п'ять мутацій: Arg34Gln, Met56Ile, Lys114Thr, Glu128Asp і Gln170His в екзонах 2, 2, 3, 4 і 4 відповідно. Ці мутації потенційно можуть також змінювати властивості TyrRS і мати зв'язок із поки ще не виявленими спадковими патологіями.

У наступних дослідженнях планується провести моделювання молекулярної динаміки димеру «міні-TyrRS» людини в нормі та трьох отриманих мутантних форм у водно-іонному оточенні за допомогою пакету програм GROMACS 3.3.2 для порівняльного аналізу та вивчення можливої зміни динамічних властивостей мутантних форм TyrRS.

*K. A. Odynets, A. I. Kornelyuk*

Bioinformatical analysis of influence of human tyrosyl-tRNA synthetase mutations associated with neuropathy Charcot-Marie-Tooth, type C, on its local spatial structure properties

Summary

*A causal relationship between three independent mutant forms of the human cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase (TyrRS) and dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy, type C, (DI-CMTC) has been recently reported. In this article we carried out the bioinformatical investigation of the effect of amino acid residues change in the cases of two point mutations Gly41Arg, Glu196Lys and deletion 153–156delVKQV on structural properties of catalytic module dimer of TyrRS (2x39 kDa or, so called, mini-TyrRS), especially on its local environment and electrostatic potential of molecular surface of the protein.*

*Key words:* tyrosyl-tRNA synthetase, neuropathy Charcot-Marie-Tooth type C, spatial structure, computer mutagenesis.

К. А. Одынец, А. И. Корнелюк

Биоинформационный анализ влияния мутаций тирозил-ТРНК синтетазы человека, ассоциированных с нейропатией Шарко-Мари-Тус типа С, на локальные особенности ее пространственной структуры

Резюме

Недавно установлена причинная связь между тремя определенными мутантными формами цитоплазматической тирозил-ТРНК синтетазы (TyrRS) человека и доминантной нейропатией Шарко-Мари-Тус типа С (DI-CMTC). В данной работе для двух точечных мутаций Gly41Arg, Glu196Lys и делеции 153–156VKQV проведено биоинформационное исследование влияния замены аминокислотных остатков на структурные особенности димера каталитического модуля TyrRS («мини-TyrRS», 2 39 кДа), в частности, на ее ближайшее окружение и электростатический потенциал молекулярной поверхности.

*Ключевые слова:* тирозил-ТРНК синтетаза, нейропатия Шарко-Мари-Тус типа С, пространственная структура, компьютерный мутагенез.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Park S. G., Ewalt K. L., Kim S. Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers // Trends Biochem. Sci.–2005.–**30**.–P. 569–574.
2. Ivakhno S. S., Kornelyuk A. I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis // Exp. Oncol.–2004.–**26**.–P. 250–255.
3. Antonellis A., Lee-Lin S. Q., Wasterlain A., Leo P., Quezado M., Goldfarb L. G., Myung K., Burgess S., Fischbeck K. H., Green E. D. Functional analyses of glycyl-tRNA synthetase mutations suggest a key role for tRNA-charging enzymes in peripheral axons // J. Neurosci.–2006.–**26**.–P. 10397–10406.
4. Nangle L. A., Zhang W., Xie W., Yang X. L., Schimmel P. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant tRNA synthetases linked to altered dimer interface and neurite distribution defect // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–2007.–**104**.–P. 11239–11244.
5. Jordanova A., Irobi J., Thomas F. P., Van Dijk P., Meerschaert K., Dewil M., Dierick I., Jacobs A., De Vriendt E., Guergueltcheva V., Rao C. V., Tournev I., Gondim F. A., D'Hooghe M., Van Gerwen V., Callaerts P., Van Den Bosch L., Timmermans J. P., Robberecht W., Gettemans J., Thevelein J. M., De Jonghe P., Kremensky I., Timmerman V. Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy // Nat. Genet.–2006.–**38**.–P. 197–202.
6. Jordanova A., Thomas F. P., Guergueltcheva V., Tournev I., Gondim F. A. A., Ishpekova B., De Vriendt E., Jacobs A., Litvinenko I., Ivanova N., Buzhov B., De Jonghe P., Kremensky I., Timmerman V. Dominant intermediate

Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35 // Amer. J. Hum. Genet.–2003.–**73**.–P. 1423–1430.

7. Корнелюк А. И. Структурно-функциональное исследование тирозил-ТРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка.–1998.–**14**.–С. 349–359.
8. Kornelyuk A. I., Tas M. P. R., Dubrovsky A., Murray J. C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP 2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Биополимеры и клетка.–1999.–**15**.–P. 168–172.
9. Lee J. W., Beebe K., Nangle L. A., Jang J., Longo-Guess C. M., Cook S. A., Davisson M. T., Sundberg J. P., Schimmel P., Ackerman S. L. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration // Nature.–2006.–**443**.–P. 50–55.
10. Roy H., Ibba M. Molecular biology: sticky end in protein synthesis // Nature.–2006.–**443**.–P. 41–42.
11. Paley E. L., Denisova G., Sokolova O., Posternak N., Wang X., Brownell A. L. Tryptamine induces tryptophanyl-tRNA synthetase-mediated neurodegeneration with neurofibrillary tangles in human cell and mouse models // Neuromol. Med.–2007.–**9**.–P. 55–82.
12. Paley E. L., Smelyanski L., Malinovsky V., Subbarayan P. R., Berdichevsky Y., Posternak N., Gershoni J. M., Sokolova O., Denisova G. Mapping and molecular characterization of novel monoclonal antibodies to conformational epitopes on NH(2) and COOH termini of mammalian tryptophanyl-tRNA synthetase reveal link of the epitopes to aggregation and Alzheimer's disease // Mol. Immunol.–2007.–**44**.–P. 541–557.
13. Berger P., Niemann A., Suter U. Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease) // Glia.–2006.–**54**.–P. 243–257.
14. Meyer zu Horste G., Prukop T., Nave K. A., Sereda M. W. Myelin disorders: Causes and perspectives of Charcot-Marie-Tooth neuropathy // J. Mol. Neurosci.–2006.–**28**.–P. 77–88.
15. Vallat J. M., Tazir M., Magdelaine C., Sturtz F., Grid D. Autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth diseases // J. Neuropathol. Exp. Neurol.–2005.–**64**.–P. 363–370.
16. Shy M. E. Charcot-Marie-Tooth disease: an update // Curr. Opin. Neurol.–2004.–**17**.–P. 579–585.
17. Roa B. B., Greenberg F., Gunaratne P., Sauer C. M., Lubinsky M. S., Kozma C., Meck J. M., Magenis R. E., Shaffer L. G., Lupski J. R. Duplication of the PMP22 gene in 17p partial trisomy patients with Charcot-Marie-Tooth type-1 neuropathy // Hum. Genet.–1996.–**97**.–P. 642–649.
18. Bruzzzone R., White T. W., Scherer S. S., Fischbeck K. H., Paul D. L. Null mutations of connexin 32 in patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease // Neuron.–1994.–**13**.–P. 1253–1260.
19. Ionasescu V. V. Charcot-Marie-Tooth neuropathies: from clinical description to molecular genetics // Muscle Nerve.–1995.–**18**.–P. 267–275.
20. Guilbot A., Williams A., Ravise N., Verny C., Brice A., Sherman D. L., Brophy P. J., LeGuern E., Delague V., Bareil C., Megarbane A., Claustres M. A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease // Hum. Mol. Genet.–2001.–**10**.–P. 415–421.
21. Bolino A., Muglia M., Conforti F. L., LeGuern E., Salih M. A., Georgiou D. M., Christodoulou K., Hausmanowa-

- Petrusewicz I., Mandich P., Schenone A., Gambardella A., Bono F., Quattrone A., Devoto M., Monaco A. P.* Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2 // *Nat. Genet.*—2000.—**25**.—P. 17–19.
22. *Kleeman T. A., Wei D., Simpson K. L., First E. A.* Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine // *J. Biol. Chem.*—1997.—**272**.—P. 14420–14425.
23. *Wakasugi K., Slike B. M., Hood J., Ewalt K. L., Cheresh D. A., Schimmel P.* Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**.—P. 20124–20126.
24. *Jia J., Li B., Jin Y., Wang D.* Expression, purification, and characterization of human tyrosyl-tRNA synthetase // *Protein Exp. Purif.*—2003.—**27**.—P. 104–108.
25. *Wakasugi K., Schimmel P.* Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase // *J. Biol. Chem.*—1999.—**274**.—P. 23155–23159.
26. *Wakasugi K., Schimmel P.* Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // *Science*.—1999.—**284**.—P. 147–151.
27. *Ewalt K. L., Schimmel P.* Activation of angiogenic signaling pathways by two human tRNA synthetases // *Biochemistry*.—2002.—**41**.—P. 13344–13349.
28. *Tzima E., Schimmel P.* Inhibition of tumour angiogenesis by a natural fragment of a tRNA synthetase // *Trends Biochem. Sci.*—2006.—**31**.—P. 7–10.
29. *Yang X. L., Skene R. J., McRee D. E., Schimmel P.* Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2002.—**99**.—P. 15369–15374.
30. *Yang X. L., Otero F. J., Skene R. J., McRee D. E., Schimmel P., Ribas de Pouplana L.* Crystal structures that suggest late development of genetic code components for differentiating aromatic side chains // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—2003.—**100**.—P. 15376–15380.
31. *Kobayashi T., Nureki O., Ishitani R., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S., Sakamoto K., Yokoyama S.* Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion // *Nat. Struct. Biol.*—2003.—**10**.—P. 425–432.
32. *Tsunoda M., Kusakabe Y., Tanaka N., Ohno S., Nakamura M., Senda T., Moriguchi T., Asai N., Sekine M., Yokogawa T., Nishikawa K., Nakamura K. T.* Structural basis for recognition of cognate tRNA by tyrosyl-tRNA synthetase from three kingdoms // *Nucl. Acids Res.*—2007.—**35**.—P. 4289–4300.
33. *Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E.* The Protein Data Bank // *Nucl. Acids Res.*—2000.—**28**, N 1.—P. 235–242.
34. *Laskowski R. A., Chistyakov V. V., Thornton J. M.* PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids // *Nucl. Acids Res.*—2005.—**33**, Database issue.—P. D266–D268.
35. *Guex N., Peitsch M. C.* SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis*.—1997.—**18**.—P. 2714–2723.
36. *Fiser A., Sali A.* ModLoop: automated modeling of loops in protein structures // *Bioinformatics*.—2003.—**18**.—P. 2500–2501.
37. *Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M. C.* Swiss-Model: an automated protein homology-modeling server // *Nucl. Acids Res.*—2003.—**31**.—P. 3381–3385.
38. *Marti-Renom M. A., Stuart A., Fiser A., Sanchez R., Melo F., Sali A.* Comparative protein structure modeling of genes and genomes // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*—2000.—**29**.—P. 291–325.
39. *Fraczkiewicz R., Braun W.* Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules // *J. Comp. Chem.*—1998.—**19**.—P. 319–333.
40. *Landau M., Mayrose I., Rosenberg Y., Glaser F., Martz E., Pupko T., Ben-Tal N.* ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information // *Nucl. Acids Res.*—2005.—**33**, Web Server issue.—P. W299–W302.
41. *Wakasugi K., Quinn C. L., Tao N., Schimmel P.* Genetic code in evolution: switching species-specific aminoacylation with a peptide transplant // *EMBO J.*—1998.—**17**.—P. 297–305.

УДК 577.152.6

Надійшла до редакції 01.12.06