

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

САВИЦЬКИЙ Олександр Вячеславович

УДК 577.217.32

**КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ
H. sapiens ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ ТА ЇЇ МУТАНТНИХ ФОРМ**

03.00.03 – молекулярна біологія

ДИСЕРТАЦІЯ
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

Корнелюк Олександр Іванович

доктор біологічних наук, професор,

член-кореспондент НАН України

Київ – 2017

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1. Аміноацил-тРНК синтетази та їх функції.....	11
1.1.1. Класифікація аміноацил-тРНК синтетаз.....	12
1.1.2. Мульти-аміноацил-тРНК синтетазні комплекси.....	15
1.1.3. Неканонічні функції аміноацил-тРНК синтетаз.....	16
1.1.4. Зв'язок аміноацил-тРНК синтетаз із захворюваннями людини.....	19
1.1.5. Нейропатія СМТ та її зв'язок із аміноацил-тРНК синтетазами.....	22
1.1.6. Проміжна нейропатія DI-СМТС та її зв'язок із тирозил-тРНК синтетазою людини.....	25
1.2. Структурно-функціональні властивості тирозил-тРНК синтетази.....	26
1.3. Комп'ютерна структурна біологія.....	28
1.3.1. Молекулярне моделювання і молекулярна динаміка <i>in silico</i>	29
1.3.2. Молекулярна динаміка аміноацил-тРНК синтетаз.....	30
1.3.3. Комп'ютерні ґрид-технології в молекулярній біології.....	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	37
2.1. Методи моделювання просторової структури повнорозмірної <i>HsTyrRS</i> , її мутантних форм та комплексів із субстратами.....	37
2.1.1. Моделювання структури димера <i>HsTyrRS</i> у вільному стані.....	37
2.1.2. Моделювання закритої конформації KMSSS-петлі.....	38
2.1.3. Моделювання структури комплексу <i>HsTyrRS</i> з L-тирозином.....	38
2.1.4. Моделювання комплексу <i>HsTyrRS</i> з L-тирозином та АТФ.....	39
2.1.5. Моделювання комплексу <i>HsTyrRS</i> ^{Tyr} із АМР та пірофосфатом.....	40
2.1.6. Моделювання мутантних форм <i>HsTyrRS</i> (G41R, E196K, 153-156 delVKQV).....	40
2.1.7. Моделювання структури тРНК ^{Tyr} людини в комплексі з <i>HsTyrRS</i>	41
2.1.8. Моделювання структури <i>HsTyrRS</i> *тРНК ^{Tyr} в комплексі з eEF1A2.....	42
2.2. Метод ієрархічних обертань NIEROT.....	43
2.3. Методика розрахунків молекулярної динаміки.....	44
2.4. Аналіз і візуалізація результатів.....	45
2.5. Обчислювальні ресурси.....	45
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	48
3.1. Побудова повноатомної моделі просторової структури <i>HsTyrRS</i>	48
3.1.1. Моделювання просторової структури <i>HsTyrRS</i> у вільному стані.....	48

3.2. Оптимізація та адаптація методик із розрахунків молекулярної динаміки та аналізу отриманих траєкторій в грид-середовищі	54
3.2.1. Створення віртуальної лабораторії MolDynGrid та її грид-сервіси.	54
3.2.2. Інтеграція віртуальної лабораторії MolDynGrid в Європейську грид-інфраструктуру.	57
3.3. Дослідження молекулярної динаміки <i>HsTyrRS</i> у вільному стані.....	61
3.3.1. Дослідження <i>HsTyrRS</i> методом ієрархічних обертань.....	61
3.3.2. Моделювання молекулярної динаміки <i>HsTyrRS</i>	64
3.3.3. Аналіз стану цитокінового ELR-мотиву в <i>HsTyrRS</i>	70
3.4. Комп'ютерне моделювання просторових структур мутантних форм <i>HsTyrRS</i> пов'язаних з нейропатією DI-CMTC	74
3.4.1. Комп'ютерний мутагенез <i>HsTyrRS</i> (G41R, E196K, del153-156VKQV)...	75
3.5. Комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантних форм <i>HsTyrRS</i>	78
3.5.1. Молекулярна динаміка мутантної форми G41R.	78
3.5.2. Молекулярна динаміка мутантної форми del153-156VKQV.	85
3.6. Дослідження впливу мутацій DI-CMTC на взаємодії між <i>HsTyrRS</i> та її субстратами	90
3.6.1. Моделювання просторової структури <i>HsTyrRS</i> в комплексі з низькомолекулярними субстратами.	91
3.6.1.1. Моделювання каталітичної петлі із закритою конформацією.....	91
3.6.1.2. Моделювання структурних комплексів <i>HsTyrRS</i> з L-тирозином, АТФ, тирозил-аденілатом.	93
3.6.2. Молекулярна динаміка мутантної форми G41R в комплексі з L-тирозином.	94
3.6.3. Моделювання структурного комплексу <i>HsTyrRS</i> з відповідною тРНК ^{Тур}	99
3.6.3.1. Побудова просторової структури тРНК ^{Тур} людини.	99
3.6.3.2. Моделювання комплексу <i>HsTyrRS</i> з тРНК ^{Тур}	100
3.6.4. Молекулярна динаміка структурного комплексу <i>HsTyrRS</i> з тРНК ^{Тур} ...	102
3.6.5. Побудова просторової структури <i>HsTyrRS</i> в комплексі з тРНК ^{Тур} і фактором елонгації eEF1A2.	105
3.6.5.1. Нова роль невпорядкованої ділянки CP1 вставки у TyrRS ссавців. ...	108
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	110
ВИСНОВКИ	115
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	117

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

aaRS – аміноацил-тРНК синтетаза (АРСаза)

а.з. – амінокислотний залишок

TyrRS – тирозил-тРНК синтетаза

тРНК – транспортна РНК

MSC – мульти-аміноацил-тРНК синтетазний комплекс (англ. Multi-aminoacyl-tRNA Synthetase Complex)

C_α-атом – С-альфа атом

RMSD – середньоквадратичні відхилення (англ. Root Mean Square Deviation)

RMSF – середньоквадратичні флуктуації (англ. Root Mean Square Fluctuation)

МД – молекулярна динаміка

АТФ – аденозинтрифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

PPi – пірофосфат

АА – амінокислота

Å – ангстрем

кДж – кілоджоуль

кДа – кілодальтон

ккал – кілокалорія

МГц – мегагерц

МБ – мегабайт

ГБ – гігабайт

нм – нанометр

нс – наносекунда

PDB – Protein Data Bank

PME – Particle Mesh Ewald

DSSP – Dictionary of Secondary Structure of Protein

OMIM™ – база даних менделівської спадковості у людини (англ.: Mendelian Inheritance in Man)

ВСТУП

Актуальність теми. Тирозил-тРНК синтетаза належить до родини ферментів аміноацил-тРНК синтетаз, які виникли на найдревніших стадіях еволюції і відіграють ключову роль на дорибосомному етапі біосинтезу протеїнів. Окрім основної функції – аміноацилювання тРНК, синтетази можуть бути залучені також до неканонічних процесів, таких як регуляція експресії генів, трансляція, апоптоз, сплайсинг, прояв цитокінових властивостей тощо. Залучення синтетаз до перебігу різноманітних клітинних процесів дозволяє розглядати їх як перспективні мішені для розробки лікарських препаратів. Вивчення міжмолекулярних взаємодій, структурних мотивів та їх функцій, необхідних для цих взаємодій, забезпечить фундаментальне розуміння того, яким чином синтетази тісно пов'язані із сигнальними шляхами клітини. Наявність цитокінових властивостей у фрагментів тирозил-тРНК синтетази викликає велику зацікавленість у їх використанні як перспективних терапевтичних препаратів у медицині. Порушення основних або неканонічних функцій синтетаз можуть призводити до аутоімунних захворювань, злоякісних новоутворень та нейропатій. Однією з найпоширеніших хвороб, пов'язаною з мутаціями генів деяких синтетаз, є нейропатія Шарко-Марі-Туса.

Захворювання Шарко-Марі-Туса (Charcot-Marie-Tooth, CMT) – поширений спадковий неврологічний розлад у людини, який зустрічається із частотою 1 на 2500 випадків, і розповсюджений серед усіх рас та етнічних груп [1, 2]. CMT належить до групи гетерогенних захворювань, які вражають периферичну нервову систему, що призводять до її дегенерації. Демієлінізація аксонів призводить у більшості випадків до їх вторинної дегенерації, що в подальшому ініціює виникнення м'язової атрофії, втрати здатності їх функціонувати [3]. Відповідно до генетичних і клінічних досліджень розділяють чотири типи захворювань (CMT 1, 2, 3, 4) та X-форму, тісно пов'язану із цими типами. Молекулярні механізми цього гетерогенного захворювання є досі невідомими. Деякі мутантні форми тирозил-тРНК синтетази (TyrRS) призводять до

виникнення проміжного типу захворювання – DI-SMTC, яке характеризується порушеннями мієлінової оболонки за автосомно-домінантним типом успадкування [4, 5]. Для розуміння молекулярних механізмів впливу мутацій на функції TyrRS необхідна вичерпна інформація про просторову структуру ферменту, молекулярну динаміку та конформаційні зміни, які індукуються мутаціями.

Тривимірна структура повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази людини досі невідома, є інформація лише про координати атомів окремих N- і C-кінцевих модулів, отриманих методом рентгеноструктурного аналізу. Однак цей метод не дозволяє вивчати конформаційну динаміку ферментів та визначати координати високорухливих ділянок. Сучасні методи комп'ютерної структурної біології із використанням високопродуктивних обчислень дозволяють проводити моделювання молекулярної динаміки протеїнів в наносекундних часових інтервалах, що дає важливу інформацію про конформаційні зміни ферментів.

Отже, вивчення просторової структури і динаміки повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази людини та її мутантних форм, пов'язаних з нейродегенеративною хворобою, є важливим кроком для розуміння молекулярних механізмів функціонування ферменту та впливу мутацій на його функції.

Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України відповідно з планами науково-дослідної роботи відділу у рамках бюджетних тем: “Динамічні аспекти функціонування еукаріотної тирозил-тРНК синтетази та вивчення впливу мутацій на процес аміноацилювання тРНК та виникнення нейродегенеративних захворювань (2008–2012 рр., державний реєстраційний номер 0107V004938), “Дослідження локальних конформаційних змін та формування метастабільних структурних елементів в тирозил-тРНК синтетазах прокаріотів та еукаріотів” (2013–2017 рр., державний реєстраційний номер 0112U003747), “Розвинення

віртуальної лабораторії MolDynGrid як частини Української академічної Грід-інфраструктури” (2009 р., державний реєстраційний номер 01090004889), “Розробка та впровадження комп’ютерних сервісів для аналізу молекулярної динаміки білків в віртуальній лабораторії MolDynGrid та її інтеграція в європейську грід-інфраструктуру” (2010–2013 рр., державний реєстраційний номер 0110U005745), “Розробка та адаптація програмного забезпечення кластеру СКІТ-4 для вирішення задач комп’ютерної структурної біології” (2013–2015 рр., державний реєстраційний номер 0113U005318) та “Розробка та впровадження Cloud-технологій в роботу грід-сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid” (2014–2016 рр., державний реєстраційний номер 0114U004667).

Мета і задачі досліджень. Мета роботи – провести комп’ютерне моделювання структури та молекулярної динаміки тирозил-тРНК синтетази *H. sapiens* та її мутантних форм, а також дослідити конформаційні зміни структури у фермент-субстратних комплексах.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

1. Побудувати повноатомну модель просторової структури димера повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази людини (*HsTyrRS*) та провести її оптимізацію.
2. Оптимізувати та адаптувати методики розрахунків молекулярної динаміки *HsTyrRS* та аналізу отриманих траєкторій з використанням обчислень у грід-середовищі.
3. Провести дослідження молекулярної динаміки повнорозмірної *HsTyrRS*, проаналізувати взаємодію між її N- і C-кінцевими модулями та перевірити гіпотезу екранування цитокінового ELR-мотиву.
4. Побудувати просторові структури мутантних форм *HsTyrRS*, пов'язаних з нейропатією Шарко-Мари-Туса (DI-CMTC), та охарактеризувати молекулярну динаміку і конформаційні зміни фермента, пов'язані з мутаціями.

5. Провести комп'ютерне моделювання комплексів *HsTyrRS* з субстратами: L-тирозином, АТР, проміжним продуктом тирозил-аденілатом та відповідною тРНК^{Tyr}.
6. Вивчити вплив мутацій СМТ на взаємодії між *HsTyrRS* та макромолекулами-партнерами: тРНК^{Tyr} та фактором елонгації.

Об'єкт дослідження: молекулярні основи конформаційної рухливості протеїнів та їх мутантних форм.

Предмет дослідження: структурна динаміка *HsTyrRS*, механізми міжмодульних взаємодій, локальні конформаційні зміни фермента.

Методи дослідження: метод комп'ютерного моделювання та оптимізації просторової структури протеїнів, метод комп'ютерного мутагенезу, метод моделювання молекулярної динаміки, метод молекулярного докінгу, методи комп'ютерного моделювання в глід-середовищі.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримані у дисертації дані розширюють існуючі уявлення щодо функціонування тирозил-тРНК синтетази людини у розчині, а саме міжмодульних взаємодій, динаміки активного центру, механізмів взаємодії з субстратами (в тому числі впізнавання гомологічної тРНК^{Tyr}), впливу мутацій при нейродегенеративних захворюваннях на структуру та динаміку фермента.

Вперше побудовано структурну модель повнорозмірної *HsTyrRS* та проведено комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки в часовому інтервалі 100 нс. Описано інтерфейси міжмодульних взаємодій та підтверджено гіпотезу екранування цитокінового ELR-мотиву С-кінцевим модулем синтетази. Показано динамічне формування антипаралельних β -стрендів у неструктурованій петлі CP1-вставки для мутантних форм тирозил-тРНК синтетази. Запропоновано модель впливу мутацій СМТ на взаємодії між *HsTyrRS* та її молекулами-партнерами. Створено базу просторових структур TyrRS в комплексах з субстратами, в т.ч. із відповідною тРНК^{Tyr}.

Особистий внесок здобувача. Особисто здобувачем здійснено інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою роботи. У всіх опублікованих наукових роботах за темою дисертаційної роботи особистий внесок здобувача полягає у: моделюванні повнорозмірної *HsTyrRS* та її мутантних форм; підготовці і проведенні розрахунків молекулярної динаміки *HsTyrRS* та її мутантних форм; визначенні оптимальних умов розрахунків; підготовці топологій силових полів для субстратів; побудові структурних комплексів димеру *HsTyrRS* з тРНК^{Tyr} та еукаріотичним фактором елонгації eEF1A2; проведенні розрахунків молекулярної динаміки *HsTyrRS* в комплексах з субстратами; аналізі та інтерпретації отриманих результатів і співставленні їх з літературними даними; обговоренні результатів; написанні наукових робіт та представленні результатів на наукових конференціях. Автор висловлює глибоку подяку д.б.н., проф., член-кор. НАН України О.І. Корнелюку за керівництво роботою; д.ф.-м.н. С.О. Єсилевському; д.б.н., проф., член-кор. НАН України Д.М. Говоруну; д.б.н., проф., член-кор. НАН України М.А. Тукало; д.б.н., проф. Б.С. Негруцькому за участь в обговоренні результатів та їх інтерпретації, усім колегам, які були долучені до отримання результатів роботи та адміністраторам грид-інфраструктур (UNG, EGI), особливо к.т.н. А.О. Сальнікову та к.т.н. Є.А. Слюсару за підтримку високотехнологічних грид-розрахунків.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові результати було представлено на IEEE 5th International Workshop on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications (IDAACS'2009) (Rende, Cosenza, Italy, 2009), FEBS Combined Practical and Lecture Course “Physical Chemistry of Biointerfaces (San Sebastian, Spain, 2010), Конгреси Українського біофізичного товариства (Луцьк-Світязь, Україна, 2011, 2015), 4-й міжнародній конференції “Molecular Biology: Advances and Perspectives” (Київ, Україна, 2011), 6th IEEE International Conference IDAACS 2011 (Prague, Czech Republic, 2011), FEBS Workshop “Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders” (Vico Equense, Naples, Italy, 2011), “NordUGrid 2012”

Conference (Uppsala, Sweden, 2012), eSSENCE International Workshop on “Macromolecular Structure and Dynamics” (Uppsala, Sweden, 2013), International Conference “NORDUGRID-2013: Distributed systems and Big Data – towards new horizons” (Šiauliai, Lithuania, 2013), 6th Theoretical Biophysics Symposium (Gothenburg, Sweden, 2013), 9th European Biophysics Congress (Lisbon, Portugal, 2013), Joint FEBS/EMBO Lecture Course and IUBMB Advanced School “Protein interactions, assemblies and human disease” (Spetses island, Greece, 2013); Opening of the Academic Year 2013/2014 at Biocentrum Ochota” (Warsaw, Poland, 2013), FEBS Young Scientists' Forum 2014 and FEBS EMBO 2014 Conference (Paris, France, 2014), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), “EGI Community Forum 2015” (Bari, Italy, 2015), International Workshop on “High Performance Molecular Dynamics@CINECA” (Bologna, Italy, 2015), FEBS/IUBMB Advanced Lecture Course "Molecular basis of human diseases: 50 years anniversary of Spetses summer schools" (Spetses island, Greece, 2016), щорічних звітних конференціях молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць, що включають 9 статей [6-14], з яких 6 у фахових виданнях (5 з яких належать до наукометричної бази даних “Scopus”: *Journal of Molecular Recognition*, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, *Biophysical Chemistry*, *Ukr.Biochem.J.*, *Biopolym. Cell*), 7 публікацій за матеріалами і тезами у збірниках закордонних і вітчизняних з’їздів та конференцій [15-21].

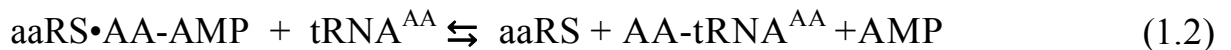
Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 220 найменувань. Дисертацію викладено на 146 сторінках стандартного машинопису, вона містить 42 рисунки та 7 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Аміноацил-тРНК синтетази та їх функції

Аміноацил-тРНК синтетази (aaRS, КФ 6.1.1) – ключова родина ферментів, яка відповідає за трансляцію генетичної інформації на дорибосомному етапі біосинтезу протеїнів. Основною функцією aaRS є каталіз ковалентного приєднання амінокислоти до гомологічної тРНК із механізмом у два етапи. На першому етапі реакції амінокислота активується АТФ із утворенням аміноацил-аденілату (рівняння 1.1). На другому етапі аміноацил-аденілат переноситься на 3'-кінець відповідної тРНК (рівняння 1.2).



де aaRS – аміноацил-тРНК синтетаза, AA – амінокислота, АТФ – аденозин-5'-трифосфат, PPi – пірофосфат, aaRS•AA-AMP – комплекс фермента з аміноацил-аденілатом, AMP – аденозин-5'-монофосфат, AA-tRNA^{AA} – аміноацил-тРНК

Ці два етапи є спільними для приєднання всіх 20 амінокислот. АРСази вищих еукаріот відрізняються більш складною структурою в порівнянні з прокаріотичними АРСазами. Характерною особливістю aaRS вищих еукаріот є формування стабільних високомолекулярних комплексів – кодосом. Дослідження цих ферментів привело до кращого розуміння їх функції, а також показало додаткові ролі, які мають відношення не тільки до біосинтезу протеїнів.

АРСази характеризується високою точністю (надспецифічністю). Точне розпізнавання амінокислот АРСазами є критично важливим для клітини, а приєднання помилкових амінокислот до тРНК призводило б до мутацій в

протеомі [22]. Такі помилки можуть призводити до загибелі клітини або до нейродегенеративних захворювань у ссавців. Деякі з АРСаз мають механізми редагування приєднаної амінокислоти, щоб забезпечити ще більший рівень точності синтезу протеїну [23] (таблиця 1.1).

Аміноацил-тРНК синтетази у процесі еволюції набули додаткові функції внаслідок приєднання різних доменів до їх каталітичних модулів. Неканонічні функції відіграють ключову роль в багатоклітинних організмах, а їх порушення призводить до захворювань, в тому числі і раку. АРСази еукаріот можуть також брати участь у сплайсингу РНК, асоціації з мРНК, регуляції біосинтезу амінокислот, у патогенезі при автоімунних і нейродегенеративних захворюваннях, та в інших процесах [24-26].

1.1.1. Класифікація аміноацил-тРНК синтетаз. Аміноацил-тРНК синтетази поділено на два класи в залежності від структурної будови каталітичних доменів, консервативних мотивів та їх властивостей (таблиця 1.1). Рентгеноструктурний аналіз та аналіз амінокислотних послідовностей дозволили розділити найчисельнішу родину із 24 АРСаз на два класи із трьома підкласами в кожному. До першого класу належать 11 АРСаз (MetRS, LeuRS, IleRS, ValRS, CysRS, GlnRS, GluRS, TyrRS, TrpRS, ArgRS, LysRS-I) і 13 АРСаз (SerRS, ProRS, ThrRS, GlyRS(α 2), HisRS, AspRS, AsnRS, LysRS-II, PheRS, GlyRS($\alpha\beta$)2, AlaRS, SepRS, PylRS) до другого класу відповідно [27]. Лізил-тРНК синтетаза (LysRS) може відноситись до обох класів. Всі представники підкласів Ia і Ib є мономерами (α), а підклас Ic об'єднує гомодимери (α 2). Більшість ферментів класу II – гомодимери, а деякі представники підкласу IIc мають більш складну четвертинну структуру (α 2 β 2, α 4). Для кожного із класів характерна структурна подібність каталітичних доменів та амінокислотні послідовності декількох мотивів в активних центрах. Молекулярна вага синтетаз варіює від 40 до 400 кДа [28-31].

Таблиця 1.1.

Класифікація і властивості цитоплазматичних аміноацил-тРНК синтетаз

[32, 33]

Клас	aaRS	Редагуюча активність, (амінокислота)	Редагуючий домен	Структура	Участь в MSC
Ia	IleRS	+ (Val, Cys)	+	<i>a</i>	+
Ia	ValRS	+ (Thr, Abu)	+	<i>a</i>	-
Ia	LeuRS	+ (Nva, Ile, γ HL, δ HL, γ HI, δ HI Met)	+	MSC	+
Ia	MetRS	+ (Hcy)	-	MSC	+
Ia	CysRS	-	-	<i>a</i>	-
Ia	ArgRS	-	-	MSC	+
Ib	GluRS	-	-	MSC	+
Ib	GlnRS	-	-	MSC	+
Ic	TyrRS	-	-	<i>a</i> ₂	-
Ic	TrpRS	-	-	<i>a</i> ₂	-
IIa	ProRS	+ (Ala, Cys, 4hP)	+	MSC	+
IIa	ThrRS	+ (Ser)	+	<i>a</i> ₂	-
IIa	GlyRS	-	-	<i>a</i> ₂	-
IIa	SerRS	+ (Thr, Cys, SerHX)	-	<i>a</i> ₂	-
IIa	HisRS	-	-	<i>a</i> ₂	-
IIb	LysRS	+ (Orn, Hcy, Hse)	-	MSC	+
IIb	AspRS	-	-	MSC	+
IIb	AsnRS	-	-	<i>a</i> ₂	-
IIc	AlaRS	+ (Ser, Gly)	+	<i>a</i>	-
IIc	PheRS	+ (Tyr, Ile)	+	<i>a</i> ₂ <i>b</i> ₂	-

Характеристики

	Клас I	Клас II
Топологія активного центру:	Паралельний β -шар (згортка Россмана)	Антипаралельний β -шар
Мотиви:	HIGH, KMSKS	1, 2, 3
Група рибози, що аміноацилюється:	2'-ОН-група	3'-ОН-група (виключення PheRS)

Більшість APCаз класу I є мономерами, однак тирозил- і триптофаніл-тРНК синтетази функціонують як димери, зв'язуючись із тРНК обома субодинамиціями. Каталітичний домен входить до складу N-кінцевої частини ферменту. Він представлений паралельним β -листом, який складається з п'яти (шести) β -стрендів, з'єднаних між собою α -спіралями. Цю структурну

особливість (згортку Россмана) в каталітичному домені для APCаз класу I вперше відкрито для тирозил-тРНК синтетази [34, 35]. До її складу входять вставка CP1 (Connective Peptide 1) [26, 36] та два висококонсервативні мотиви: “KMSKS” (Lys-Met-Ser-Lys-Ser) [35, 37] і “HIGH” (His-Ile-Gly-His) [38], які локалізовані в активному центрі фермента і відіграють ключову роль у каталітичній реакції. У структурах ферментів LeuRS, IleRS, ValRS вставка CP1 формує окремий редагуючий сайт, який відщеплює помилково приєднану амінокислоту від відповідної тРНК [39, 40]. Структури С-кінцевих доменів більшості APCаз I класу відрізняються між собою і можуть зв'язуватись з антикодоном тРНК [36, 41].

Основною функцією KMSKS-мотиву є координація АТФ у процесі аміноацилювання та додаткова стабілізація 3'-кінця (A76) відповідної тРНК на другому етапі реакції [42-44]. Послідовність KMSKS-мотиву локалізована між β -структурою S6 та α -спіраллю H11 [35]. На першому етапі реакції KMSKS-мотив каталітичної петлі може приймати різні конформації: “відкритий” і “закритий” стан для стабілізації АТФ [45-47]. HIGH-мотив також бере участь в активації амінокислоти, у якій гістидини зв'язуються з фосфатами АТФ, стабілізуючи їх в активному центрі [26]. Цей мотив локалізований між β -структурою S2 та α -спіраллю H3 [35]. У послідовності HIGH залишок гліцину є висококонсервативним. Головний ланцюг цього залишку формує конформацію, яка дозволяє стекінгові взаємодії з кільцем аденіну АТФ і заміна його на інший залишок може порушувати такі взаємодії.

APCази класу II майже всі мають олігомерну структуру (димерну або тетрамерну), на відміну від ферментів класу I, у яких переважно мономерна. Структура каталітичного домену APCаз класу II складається з семи антипаралельних β -стрендів, оточених α -спіралями. Каталітичний домен APCаз II класу містить три консервативні послідовності в активному центрі, які відповідають за здійснення каталітичної функції ферменту [28, 48]. Мотив 1 (g ϕ xh ϕ xhr $\phi\phi$, де ϕ є гідрофобний амінокислотний залишок; x – будь-який залишок) локалізований в інтерфейсі димеризації та може брати участь у

кореляційних механізмах між активними центрами двох субодиниць [49]. Мотив 2 [fRxe-h/rxxxFxxx(d/e)] і мотив 3 [gϕgϕgϕ(d/e)Rϕϕϕϕϕ] є частинами активного центру APCаз, де проходить реакція аміноацилювання тРНК [28, 48, 50]. На відміну від перших двох мотивів APCаз класу II, третій каталітичний мотив можна порівняти з мотивами HIGH та KMSKS APCаз класу I (має схожу функцію, відповідаючи за зв'язування АТФ) [28]. Структурна відмінність синтетаз проявляється в конформаціях трифосфатного ланцюга зв'язаної молекули АТФ: витягнутої або зігнутої в активному центрі ферментів класу I або класу II [29].

Друга відмінність між класами полягає у способах зв'язування акцепторного кінця до гомологічної тРНК: для класу I (крім TyrRS і TrpRS) характерна взаємодія з акцепторним стеблом з боку його малої борозенки і шпилькоподібної структури 3'-кінцевого тетрануклеотида тРНК, а для II-ого класу (також для TyrRS і TrpRS) – зв'язування акцепторного стебла з боку його великої борозенки і витягнутої конформації 3'-кінця. Належність до певного класу корелює з функціональними відмінностями синтетаз: всі ферменти класу I використовують 3'-кінцеву 2'-ОН-групу тРНК як акцептора амінокислоти, а ферменти класу II (за винятком PheRS) – 3'-ОН-групу [51].

1.1.2. Мульти-аміноацил-тРНК синтетазні комплекси. Характерною особливістю аміноацил-тРНК синтетаз бактерій, архей та еукаріот є їх здатність до формування стабільних макромолекулярних комплексів *in vivo* [52]. Розглядають три основних комплекси.

Першим і найбільшим є мульти-аміноацил-тРНК синтетазний комплекс (MSC, Multi-aminoacyl-tRNA Synthetase Complex), молекулярна маса якого складає приблизно 1-1,5 МДа. Він був описаний більш ніж 20 років тому, але його структурна і функціональна організація досі є предметом дослідження. Даний комплекс присутній у вищих еукаріот починаючи від *Drosophila* і закінчуючи ссавцями. До його складу входять дев'ять аміноацил-тРНК синтетаз (ArgRS, AspRS, GlnRS, GluRS, IleRS, LeuRS, LysRS, MetRS, ProRS) та три допоміжних протеїна, які необхідні для утримання та регуляції активності

комплексу (AIMP1/p43, AIMP2/p38 та AIMP3/p18) [53]. Компоненти комплексу, взаємодіючи між собою, утворюють два структурні субкомплекси. Існує гіпотеза, що MSC може виконувати роль молекулярного центру для координації процесів біосинтезу білка та певних сигнальних шляхів у клітині [54]. Наявність такого комплексу є характерною ознакою всіх багатоклітинних організмів.

Другим комплексом є VEGA (Valyl-tRNA synthetase/Elongation factor 1A/Guanine exchange factors Assembly). Комплекс VEGA складається із валіл-тРНК синтетази та чотирьох субодиниць фактора елонгації трансляції 1 (eEF1A та трьох субодиниць фактора обміну гуанінового нуклеотиду, а саме eEF1B α , eEF1B β , і eEF1B γ) [55]. Встановлено, що NH₂-термінальний домен валіл-тРНК синтетази є необхідним для утворення комплексу з субодиницею eEF1B β [56]. Також відомо, що прокаріоти, нижчі еукаріоти та рослини не мають даного комплексу. Існує припущення, що обидва комплекси (MSC і VEGA) виконують функцію прискорення трансляції [57, 58].

Третім комплексом є GAIT до якого входять чотири протеїни: глутаміл-проліл-тРНК синтетаза (EPRS), NSI-associated protein I (NSAPI), рибосомний протеїн L13a, гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназа (GAPDH). Роль GAIT комплексу пов'язують із взаємодією зі специфічними послідовностями мРНК для регуляції трансляції [59].

1.1.3. Неканонічні функції аміноацил-тРНК синтетаз. Аміноацил-тРНК синтетази окрім основної функції – ковалентного приєднання амінокислоти до відповідної тРНК (аміноацилювання) – виконують також найрізноманітніші неканонічні функції. Вони можуть бути регуляторами транскрипції генів, трансляції, апоптозу, брати участь у сплайсингу, проявляти властивості цитокінів, проводити різноманітні реакції. Неканонічні функції можуть виконуватися завдяки додатковим доменам, які входять до складу синтетаз, або ж здійснюватися в каталітичному центрі ферментів [24-26, 60].

До додаткових функцій синтетаз також належать контроль над аміноацилюванням тРНК. Так, завдяки взаємодії деяких синтетаз з факторами елонгації (EF), посилюється каталітична ефективність реакції аміноацилювання і прискорюється процес «передачі» аміноацил-тРНК на рибосому. Спостерігається також формування неканонічного структурного комплексу $eEF1A \cdot GDP \cdot tRNA^{Tyr} \cdot TyrRS$. Цікаво, що експресований окремо С-кінцевий домен TyrRS також здатний взаємодіяти одночасно з тРНК та $eEF1A \cdot GDP$. Формування подібного комплексу є ще одним доказом на користь існування механізму передачі тРНК від рибосом до ARS шляхом каналювання за участі $eEF1A \cdot GDP$ комплексу [61].

Встановлено, що для забезпечення точності трансляції генетичного коду, необхідного для існування життєздатної клітини, частота синтезу помилкових продуктів аміноацилювання тРНК *in vivo* не повинна перебільшувати однієї помилки на 10^4 - 10^5 реакцій [33]. Підвищення рівня помилок може призводити до загибелі клітини або до виникнення нейродегенеративних захворювань у ссавців [23, 62, 63]. Щоб підтримувати низький рівень помилок, деякі синтетази мають «коригувальну» функцію («editing» або «proofreading») – каталізують гідроліз власних помилкових продуктів [26]. Для синтетаз класу I характерна консервативна природа редагуючого домену, що утворює вставку CP1 в каталітичному домені. Всі синтетази класу II розрізняються структурною топологією редагуючих доменів та їх локалізацією в амінокислотній послідовності.

Для активації сигнальних шляхів деякі синтетази секретуються з клітини. Зв'язуючись із протеїнами-рецепторами різних органів і тканин, ендотелію і крові, вони беруть участь у регуляції процесів клітинного розвитку і метаболізму. AspRS, HisRS, SerRS стимулюють імунні клітини через взаємодію з рецепторами хемокінів [64]. Три аміноацил-тРНК синтетази: тирозил-, триптофаніл- і лізіл-тРНК синтетази, проявляють цитокинову активність поза клітиною. У випадку тирозил-тРНК синтетази, фермент секретується з клітини

під час апоптозу, а потім розщеплюється позаклітинною еластазою на два поліпептиди, які мають різні цитокінові активності [65].

Каталітичний N-кінцевий модуль TyrRS містить ELR (Glu91-Leu92-Arg93) мотив, який проявляє проангіогенні властивості (стимулює розвиток кровоносних судин). Це дає змогу виступати в якості протизапального цитокіну, як інтерлейкін 8 (англ. Interleukin-8, IL-8). C-кінцевий модуль гомологічний за послідовністю на 51% до ЕМАР II (англ. Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide-II) і має подібну до нього функцію [66-68]. ЕМАР II фактично є C-кінцевим доменом AIMP1 і діє як протизапальний, антиангіогенний цитокін, стимулює хемотаксис лейкоцитів і моноцитів, накопичення мієлопероксидази і фактора некрозу пухлин (TNF- α). Цитокінова активність відсутня в повнорозмірній TyrRS ссавців та активується лише після його вивільнення при обмеженому протеолітичному розщепленні TyrRS *in vitro* та *in vivo* [65, 68, 69].

Фрагменти триптофаніл-тРНК синтетази, продуковані в результаті альтернативного сплайсингу (міні-TrpRS), проявляють антиангіогенні властивості – інгібують утворення кровоносних судин [69, 70]. В свою чергу, лізил-тРНК синтетази також стимулюють міграцію макрофагів і мононуклеарних клітин периферичної крові та продукування ними фактора TNF- α [57]. На додаток, лізил-тРНК синтетази також відіграють важливу роль в упаковці віріона ВІЛ-1. Його N-кінцевий домен зв'язується з C-кінцевим доменом основного протеїна віріона ВІЛ-1 – Gag [71].

Стимулюючий вплив на клітини імунної системи, базуючись на взаємодії з хемокіновими рецепторами клітин, здійснюють й інші синтетази: HisRS, AsnRS і SerRS. Глутамін-тРНК зв'язується ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) і пригнічує апоптоз. Процес інгібування посилюється у випадку присутності глутаміна в реакції [72].

Відкриття неканонічних функцій у різних процесах клітинного метаболізму сприяло встановленню взаємозв'язку між синтетазами і рядом захворювань [24-26].

1.1.4. Зв'язок аміноацил-тРНК синтетаз із захворюваннями людини.

Оскільки в ході еволюції аміноацил-тРНК синтетази набули здатності проявляти неканонічні функції, вони можуть бути залучені у різноманітних клітинних процесах (рис. 1.1) [73]. Неканонічні функції синтетаз можуть бути реалізовані через ядерні, цитоплазматичні або позаклітинні форми ферментів та впливати на клітинний сигналінг, імунну відповідь, ангиогенез [74]. Через таку багатофункціональність, синтетази часто є причинами або учасниками патогенезу різних захворювань. Аміноацил-тРНК синтетази можуть бути залучені до автоімунних захворювань, зокрема "антисинтетазного синдрому", злоякісної трансформації та розладів нервової системи. У клітинах людини синтетази кодуються окремими генами, в залежності від їх цитоплазматичної або мітохондріальної локалізації. Причини порушень роботи і захворювань можуть бути, відповідно, різними. [24, 25, 75, 76]. Мутації в мітохондріальних тРНК і деяких мітохондріальних аміноацил-тРНК синтетазах мають відношення до ряду захворювань, включаючи діабет [77, 78].

Аміноацил-тРНК синтетази можуть виконувати дві ролі під час захворювання на рак. Першою з них є підвищення експресії цих ферментів у ракових пухлинах, що є очевидним при розгляді рівня синтезу протеїну при захворюванні на рак. Експресія глутаміл-проліл-тРНК та ізолейцил-тРНК синтетаз регулюється протоонкогеном *c-myc* [79], аномальною експресією EPRS та IRS при онкогенних умовах. Друга роль знайдена при неканонічних функціях тирозил- (який має домени як з про- так і з антиангіогенними властивостями) і триптофаніл-тРНК синтетаз де вони виступають поза клітиною в якості цитокінів, що впливають на активацію і репресію ангиогенезу. Особливості цих двох ферментів можуть бути використані для терапії раку.

Всі три протеїна AIMP, які входять до мультисинтетазного комплексу, виконують певні функціональні ролі при захворюванні на рак. Окрім того, AIMP1 задіяний в регуляції автоімунних процесів [80], AIMP2 регулює експресію *c-myc*, AIMP3 активує p53 у відповідь на пошкодження ДНК і онкогенний стрес. Мутації в AIMP3 були виявлені у пацієнтів, які страждають

від хронічного мієлолейкозу. Ці мутації заважають взаємодії AIMP3 з ATM (англ. Ataxia Telangiectasia Mutated), запобігаючи активації p53 [81].

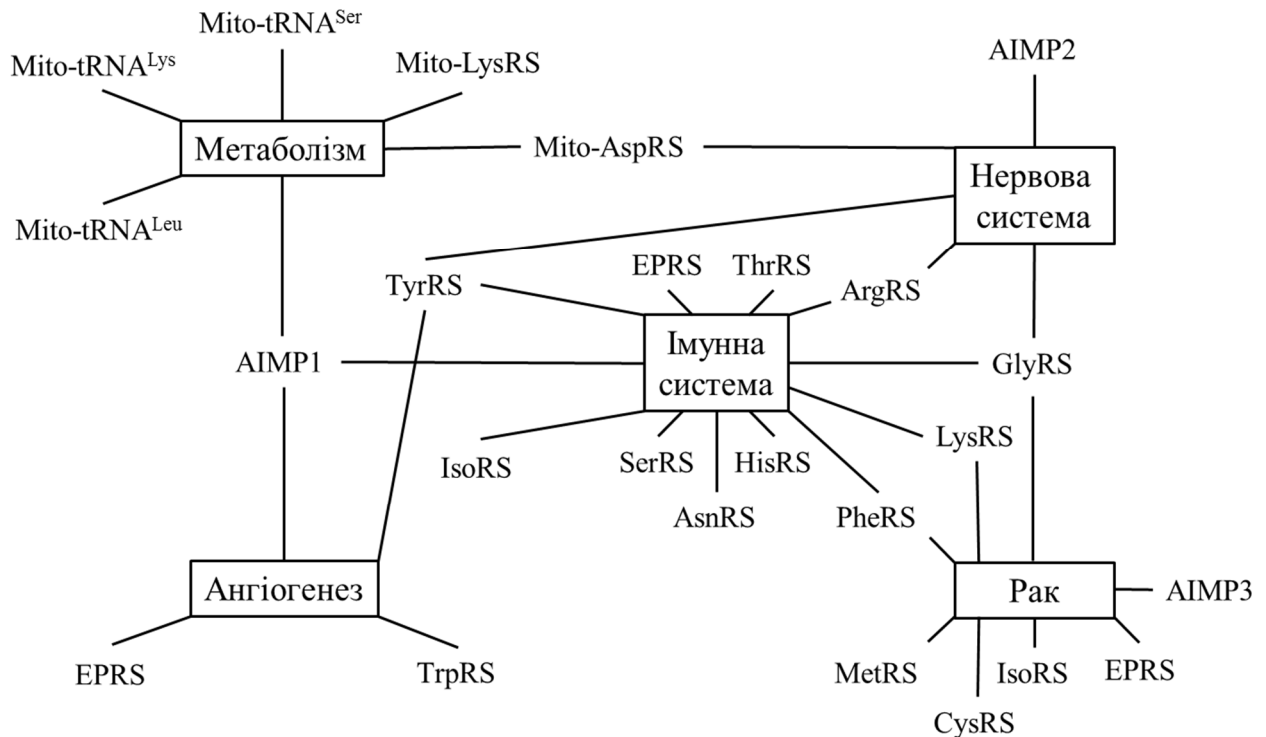


Рис. 1.1. Зв'язок аміноацил-тРНК синтетаз із захворюваннями людини [24]

Аміноацил-тРНК синтетази також пов'язані з розвитком деяких неврологічних розладів і безпосередньо пов'язані з етіологічним розвитком захворювання Шарко-Марі-Туса (таблиця 1.2). Порушення в лізил-тРНК синтетазі пов'язані з розвитком бічного аміотрофічного склерозу (ALS). Заміна в Cu/Zn супероксиддисмутази 1 (SOD1) була виявлена у пацієнтів із ALS. Мутації в SOD1 призводять до формування нових інтерфейсів у протеїн-протеїнових взаємодіях з лізил-тРНК синтетазою [82]. Ця взаємодія з SOD1 сприяє олігомеризації і в кінцевому рахунку агрегації. Сформовані агрегати індукують апоптоз рухових нейронів і нейродегенерацію.

Зв'язок аміноацил-тРНК синтетаз із автосомними захворюваннями [83]

Ген/ aaRS	Автосомно-рецесивний клінічний фенотип (OMIM*)	Автосомно-домінантний клінічний фенотип (OMIM)
Цитоплазматичні:		
AARS/ AlaRS	Рання інфантильна епілептична енцефалопатія, вроджений вертикальний таран, втрата рефлексів і дистонія (616339) [84]	Захворювання Шарко-Марі- Туса типу 2 [85]
DARS/ AspRS	Гіпомієлінізація із залучення мозку та спастичність ніг (615281) [86]	–
HARS/ HisRS	Синдром Ушера (Прогресивне погіршення зору – блідість диска зорового нерва, ністагм) (614504) [87]	Захворювання Шарко-Марі- Туса типу 2 (616625) [88]
LARS/ LeuRS	Печінкова недостатність, анемія, затримка розвитку, судоми, ФТТ, гіпоальбумінемія (615438) [89]	–
MARS/ MetRS	Інтерстиційні захворювання легенів і печінки (615486) [90] / Легеневий альвеолярний протеїном [91]	Захворювання Шарко-Марі- Туса типу 2 (616280) [92]
RARS/ ArgRS	Гіпомієлінізація, лейкоцистострофія (616140) [93]	–
VARs/ ValRS	Інтелектуальна інвалідність, мікроцефалія, атрофія кори головного мозку і судоми [94]	–
YARS/ TyrRS	Спастичність, ФТТ, арефлексія, цироз печінки та кіста легень [83]	Захворювання Шарко-Марі- Туса проміжного типу С (608323) [4]
Біфункціональні:		
GARS/ GlyRS	Міалгія, підвищення лактату, лейкоенцефалопатія та кардіоміопатія [95]	Захворювання Шарко-Марі- Туса типу 2 (601472) [96, 97] / Дистальна спадкова моторна нейропатія (600794) [98]
KARS/ LysRS	Захворювання Шарко-Марі-Туса проміжного типу (613641) [99] / Погіршення слуху (613916) [100] / Вроджені порушення зору, прогресивна мікроцефалія та когнітивні порушення [101]	–
QARS/ GlnRS	Прогресивна мікроцефалія, судоми, церебральна і мозочкова атрофія (615760) [102]	–

Відповідні автосомно-рецесивні мутації мітохондріальної аспартил-тРНК синтетази призводять до вкороченої та неправильної форми цього протеїну, що в свою чергу спричинює прогресуючу мозочкову атаксію. Вона викликає лейкоенцефалопатію в стовбурі головного і спинного мозку із підвищеним рівнем лактату (LBSL). Механізм зміни конформації мітохондріальної аспартам-тРНК синтетази, який призводить до даного розладу, є незрозумілим. При зниженні активності аміноацилювання тРНК порушення мітохондріального комплексу не спостерігається [103, 104].

AIMP2 (p38) поза мультисинтетазним комплексом взаємодіє з протеїнами p53 та Parkin, які беруть участь у патологічних процесах, таких як розвиток ракових пухлин, хвороба Паркінсона та ін. Хвороба Паркінсона виникає внаслідок втрати функціонування протеїну Parkin у результаті мутації. Під час захворювання в середині мозку мишей спостерігається надекспресія AIMP2, яка сприяє апоптозу й утворенню подібних до агрегатів включень [105].

Останнім часом встановлено, що дефекти в редагуванні аміноацил-тРНК синтетаз можуть також призводити до хвороб. Прикладом цього є *sti/sti* миші, яка містить у собі мутацію в області редагування аланіл-тРНК синтетази. Ця мутація призводить до заміни аміноацилювання тРНК^{Ala} серином і подальшим включенням серину в пептидну послідовність. Ця заміна серину на аланін у структурі протеїну призводить до порушення його локального та глобального згортання, стимулюючи шаперони у відповідь на денатурацію протеїну. У мишей, за наявності цієї рецесивної мутації, спостерігається помітне зниження клітин Пуркінє в мозочку, що призводить до розвитку важкої атаксії [23].

1.1.5. Нейропатія СМТ та її зв'язок із аміноацил-тРНК синтетазами. Ідентифіковано мутації в більш ніж 70 генах, які асоційовано з гетерогенним типом захворювань – нейропатією СМТ [32, 106]. Відомо шість синтетаз, мутації в яких можуть призвести до захворювань СМТ різних типів. Серед них одна синтетаза з автосомно-рецесивним фенотипом – лізил-тРНК синтетаза та п'ять синтетаз із автосомно-домінантним фенотипом – гліцил-, аланіл-, гістидил-, метіоніл- та тирозил-тРНК синтетази.

Гліцил-тРНК синтетаза (GlyRS) – є першою з синтетаз, мутації в якій асоціювали з нейропатією типу СМТ-2D і дистальною спадковою нейропатією моторного типу Va (HMN5A) [96]. На сьогодні відомо наступні мутації в гліцил-тРНК синтетазі, для яких встановлено зв'язок з СМТ: A57V, E71G, P98L, L129P, D146YN, C157R, S211F, L218Q, P234KY, M238R, G240R, P244L, E279D I280F, H418R, D500N, G526R, S581L, G598A і G652A [25, 32, 96]. Дослідження *in vivo* проводили на моделях мишей, за результатами яких спостерігалась схожість за фенотипом до захворювання типу СМТ-2D [97, 107]. У результаті цих досліджень виявлено порушення у трансляції деяких цитоплазматичних протеїнів [108].

Аланіл-тРНК синтетаза (AlaRS). У 2009 році, досліджуючи родину в Франції, до якої входило 17 пацієнтів з симптоматикою СМТ-2 (автосомно-домінантний тип успадкування), вдалося асоціювати з точковою мутацією R329H аланіл-тРНК синтетази. Та ж сама мутація була виявлена в другій родині з Франції, без генетичних зв'язків з першою. Аргінін R329 є висококонсервативним, що локалізований в Н10 спіралі аланіл-тРНК синтетази [85]. З 2014 року відомо кристалічні структури аланіл-тРНК синтетази людини та її мутантної форми R329H (PDB коди: 4XEM і 4XEO відповідно), для яких значна різниця у конформації каталітичних доменів фермента не спостерігається. Для кишкової палички *E. coli*, гомологічним аргініну є одним з двох залишків (R314), які є ключовими для зв'язування і аміноацилювання тРНК^{Ala} [109]. Автори показали 700 кратне зменшення швидкості реакції аміноацилювання у випадку заміни R314 на аланін, що підкреслює його важливу роль у реакції. Ймовірною причиною захворювання розглядають нездатність ферменту ефективно зв'язуватись з акцепторним плечем тРНК^{Ala}. Latour та співавтори запропонували гіпотезу, в якій мутантна форма знижує афінність зі спорідненими тРНК або призводить до помилкового зв'язування тРНК^{Lys}, що й спричинює виникнення захворювання [85].

Гістидил-тРНК синтетаза (HisRS). Чотири гетерозиготні мутації в HisRS локалізовані в каталітичному домені: T132I, P134H, D175G, і D364Y

[110]. Фенотиповий спектр є досить широким та охоплює аксональний тип, спадкову моторну нейропатію та проміжний тип СМТ.

Метіоніл-тРНК синтетаза (*MetRS*). У деяких членів сім'ї ідентифіковано мутації R618C і P800T, які станом на сьогодні не мають остаточного підтвердження патогенності та впливу на виникнення захворювання СМТ-2 [32].

Лізил-тРНК синтетаза (*LysRS*). Розглядають три мутантних форми лізил-тРНК синтетази, які можуть призводити до невропатії СМТ: (L133H, Y173SfsX7 і I302M). Експериментально показано, що дві з цих мутацій (L133H і Y173SfsX7) мають значний вплив на ферментивну активність. LysRS є четвертою синтетазою, мутації якої пов'язані з захворюванням СМТ зі специфічним впливом на функцію аксонів [99].

Тирозил-тРНК синтетаза (*TyrRS*). У 2006 році були вперше виявлені мутації в гені, що кодує тирозил-тРНК синтетазу, які сприяють виникненню захворювання СМТ [4]. Дослідження двох незалежних родин у Північній Америці та Болгарії, які були діагностовані з DI-СМТС, виявили дві окремі мутації в гені, який кодує тирозил-тРНК синтетазу. У родині з Північної Америки міссенс-мутації, викликані заміною гліцину 41 на аргінін (G41R), в той час як родина з Болгарії має міссенс-мутацію, яка замінює глутамінову кислоту 196 на лізин (E196K). Виявлена *de novo* мутація у пацієнта з Бельгії, у якій видалено дванадцять пар основ із відповідними залишками, що спричинюють делецію 153-156(VKQV) в тирозил-тРНК синтетазі. Аналіз послідовності вказує на те, що мутація G41R заміщує висококонсервативний гліцин, який може бути залучений в формуванні тирозил-аденілату.

В експериментах на моделі дріжджів показано негативний ефект мутацій на функціональність ферменту [4]. У 2009 році дослідження провели на тваринній моделі – *Drosophila melanogaster*. У мух за алогічною до E196K мутацією спостерігається погіршення моторики. У *Drosophila*, дана мутація має більш серйозний дефект, ніж гомологічні до G41R і делеції 153-156(VKQV) мутації. Це перша модель, яка була вивчена на тваринному організмі з метою

формування кращого уявлення про захворювання, але фенотип відрізняється від прояву у людини, тому є потреба у створенні більш якісних критеріїв підбору тваринної моделі [111].

1.1.6. Проміжна нейропатія DI-CMTC та її зв'язок із тирозил-тРНК синтетазою людини. Автосомно-домінантна проміжна форма нейропатії СМТ типу С (DI-CMTC, OMIM 608323) є генетичним і фенотипічним варіантом класичної СМТ, яка характеризується проміжними швидкостями нервової провідності та такими гістологічними ознаками як дегенерація та демієлінізація аксонів. Ідентифіковано локус 1p34-p35 хромосоми 1, пов'язаний з DI-CMTC, який відповідає гену YARS (GeneID: 8565), що кодує TyrRS [5, 112].

TyrRS локалізується у кінчиках аксонів у культурах диференціюючих первинних моторних нейронів і нейробластом. Цей специфічний розподіл істотно зменшується в клітинах, які експресують зазначені мутантні форми TyrRS [5]. Біохімічні експерименти і генетична комплементация в дріжджах показали часткову втрату аміноацилюючої активності цих мутантних форм протеїнів, а також те, що мутації в ортологічному гені *TYS1* дріжджів зменшують швидкість росту дріжджів. На сьогодні ідентифіковано дві гетерозиготні міссенс-мутації і одну делецію *de novo* в TyrRS у трьох незалежних родинах із DI-CMTC [5]. Так у родині з Північної Америки ідентифіковано гетерозиготну транзицію 121G→A в екзоні 2 гену YARS, яка спричиняє міссенс-мутацію G41R (мутація СМТ-160). У родині з Болгарії знайдено гетерозиготну транзицію 586G→A в екзоні 5 цього гену, яка призводить до мутації E196K (мутація СМТ-176). Крім того, у хворій пацієнтки з Бельгії ідентифіковано делецію 458-469del12 розміром 12 п.н. в рамці трансляції екзона 4, яка призводить до делеції 153-156delVKQV (делеція PN-765).

Відомо, що мутантні форми G41R і *de novo* делеція 153-156delVKQV TyrRS показують значне зниження в здатності зв'язування L-тироzinу більш ніж у 100 разів у порівнянні з нативною формою фермента [113]. Залишок аргініну

мутантної форми G41R локалізований в активному центрі *HsTyrRS* і може блокувати зв'язування з L-тирозином у схожий спосіб із мутацією G526R *HsGlyRS* для фрагменту рибози аденілату (AMP) [114]. Проте, мутантна форма E196K *TyrRS* суттєво не впливає на кінетику формування проміжного продукту тирозил-аденілату і фактично підвищує швидкість передачі тирозину до тРНК^{Тур}. Авторами висунуто припущення, що порушення каталітичних властивостей не є спільним для всіх мутантних форм, асоційованих із нейропатією DI-CMTC [113].

Існує припущення, що мутації призводять до порушення основної функції ферменту або його неканонічних функцій [4, 32, 113].

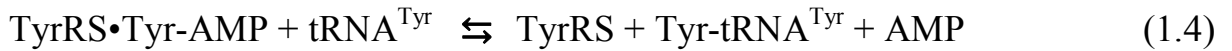
1.2. Структурно-функціональні властивості тирозил-тРНК синтетази

Тирозил-тРНК синтетаза людини, як представник класу Іс родини аміноацил-тРНК синтетаз, займає центральне місце у даній дисертаційній роботі за такими причинами: структурні координати окремих N- і C-кінцевих модулів відомі в комплексі з L-тирозином [36, 115, 116]; експериментальні данні кінетики та механізмів реакції обох етапів аміноацилювання також відомі [117, 118]; зв'язок з одним з найпоширеніших нейродегенеративних захворювань – СМТ, загальний механізм якого є досі невідомим [4, 32, 113]. Тому, подальший огляд літератури виконано саме для цієї системи.

Основна функція тирозил-тРНК синтетази полягає у каталізі приєднання тирозину до 3'-кінця тРНК^{Тур}. Реакція аміноацилювання еукаріотичної тРНК^{Тур} є калій- і магній-залежною та відбувається у два етапи.

На першому етапі (рівняння 1.3), переважно, спочатку відбувається приєднання L-тирозиону, а потім молекули АТР до активного центру ферменту [117]. В результаті хімічних перебудов формується ковалентний зв'язок між карбоксильною групою амінокислоти та α -фосфатом АТФ, з утворенням проміжного продукту реакції тирозил-аденілату. В результаті реакції пірофосфат вивільняється з активного центру ферменту. На другому етапі

(рівняння 1.4) відбувається перенесення активованого тирозину до гідроксильної групи 2'-ОН 3'-кінця тРНК^{Тур} (A76) вивільнюється АМФ і синтетаза.



де TyrRS – тирозил-тРНК синтетаза, Tyr – тирозин, АТФ:Мg²⁺ – аденозин-5'-трифосфат з іоном Mg²⁺, PPi – пірофосфат, TyrRS•Tyr-AMP – комплекс фермента з тирозил-аденілатом, AMP – аденозин-5'-монофосфат, Tyr-tRNA^{Тур} – аміноацил-тРНК.

Дві стадії реакції можуть працювати незалежно одна від одної, з утворенням проміжного продукту тирозил-аденілату, супроводжуючись зміною власної флуоресценції фермента [119-121]. Цей процес відбувається внаслідок того, що тирозил-тРНК синтетаза є біологічно активною лише у формі гомодимера і працює за принципом механізму “half-of-the-sites”. Суть цього механізму полягає у тому, що субстрати зв'язуються з високою спорідненістю з однією із субодиниць, формуючи один тирозил-аденілат на гомодимер у певний момент часу [119]. Це може бути пояснено теорією індукованої відповідності (англ. induced fit theory), яка говорить про конформаційні зміни в структурі всього протеїну або в іншій субодиниці, шляхом передачі сигналів через інтерфейс димеризації [122]. Тирозил-тРНК синтетаза ссавців є K⁺ залежним ферментом [113, 117, 118].

За даними NCBI до активного центру *HsTyrRS* належать 20 а.з. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_003671.1): Y39, G41, T42, A43, H49, A51, Y52, Y166, Q170, D173, Q182, G184, G185, Q188, M214, V215, K222, M223, S224, S225. Kleeman і співавтори показали, що у послідовності “²²²KMSSS²²⁶”, яка відповідає консервативному KMSKS-мотиву, відсутній другий лізин, необхідний для утворення водневих зв'язків із фосфатною групою АТФ [123]. Цей мотив, окрім зв'язування з АТФ, дозволяє стабілізувати перехідний стан

каталітичної реакції [51]. Austin і співавтори в додаткових дослідженнях виявили, що іон K^+ функціонально замінює відсутність другого лізину [117].

Взаємодія і перенесення тирозину на тРНК^{Тур} було спочатку описано для бактерійних систем: *E. coli* та *B. stearothermophilus* [120]. У 2002 році описані термодинамічні і кінетичні константи взаємодій та активація тирозину тирозил-тРНК синтетазою людини [118].

До елементів впізнавання тРНК^{Тур} належать: перша пара основ C1:G72 для еукаріот та архей (пара нуклеотидів G1:C72 для бактерійних систем), уридин 35 (U35) та аденін 36 (A35), які локалізовано в антикодоновій петлі тРНК^{Тур}. Одним із ключових нуклеотидів є також аденін 73 (A73), який локалізований в зоні акцепторного 3'-кінця тРНК^{Тур} [119, 124].

1.3. Комп'ютерна структурна біологія

Просторова організація та конформаційні властивості молекул протеїнів лежать в основі практично всіх біологічних процесів. У зв'язку з цим, вирішення багатьох біологічних задач пов'язано саме з необхідністю вивчення тривимірної структури біополімерів, а проблема їх просторової організації – є актуальною для біофізики, молекулярної біології, фармакології та медицини. Вивчення функції протеїнів та механізмів їх міжмолекулярних взаємодій в інтерактіві потребують знання не лише глобальної структури, але й конформацій їх локальних амінокислотних залишків. На сьогодні, серед множини фізико-хімічних методів досліджень просторової структури протеїнів, рентгеноструктурний аналіз є одним із найбільш інформативних методів з точки зору якості опису структури на атомному рівні.

З появою комп'ютерної техніки встановлено більш ніж сто тисяч трьохвимірних структур протеїнів та їх комплексів, які депоновано у базі даних Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/>). Однак координати молекул, отримані методом рентгеноструктурного аналізу, є статичними, а їх конформаційні властивості, за наявності фізіологічних умов розчинника,

можуть суттєво відрізнитись. Одним із перспективних методів при експериментальних дослідженнях структури молекули в нативному стані є спектроскопія ЯМР (ядерного магнітного резонансу) [125].

У випадках, коли експериментальні дані просторової організації досліджуваного протеїну або його структурного комплексу з субстратами відсутні, ефективною альтернативою є методи комп'ютерної структурної біології. Дані методи ще називають комп'ютерним експериментом або експериментом *in silico* [126, 127].

1.3.1. Молекулярне моделювання і молекулярна динаміка *in silico*.

Молекулярне моделювання – сукупність методів дослідження структури і властивостей молекул обчислювальними методами з наступною візуалізацією результатів. Для позначення всього, що пов'язано з комп'ютерними експериментами, в 90-і роки ХХ століття виник термін *in silico*. Молекулярна динаміка (МД) – один із методів молекулярного моделювання *in silico*, в основі якого лежить чисельне рішення рівнянь Ньютона [126].

За останні 30 років розвиток комп'ютерної техніки досяг великих розмахів. Як наслідок, було залучено багато галузей науки і техніки для вивчення динамічної поведінки молекулярних систем у сучасній комп'ютерній хімії та біології.

В молекулярній біології метод МД вперше застосовано і опубліковано в журналі “*Nature*” для структури бичачого панкреатичного інгібітора трипсину в 1977 році [128, 129]. Результати досліджень розрахунків із траєкторією МД в 3,2 пс стали справжнім проривом у структурній біології та мали ключовий вплив на розвиток методів молекулярного моделювання.

Метод моделювання МД створено, в значній мірі, при узгодженні з основними фізичними принципами, які можуть бути підтвержені експериментально. У 2013 році Нобелівська премія з хімії була присуджена Martin Karplus, Michael Levitt та Arieh Warshel, які є піонерами у методологіях моделювання МД та ММ/QM біомолекулярних систем [130, 131].

Молекулярні взаємодії протеїнів в емпіричних силових полях при розрахунках МД функціонують на основі параметрів силового поля [132], які спочатку були вивчені в нативному середовищі. Силове поле описує взаємодію між атомами, які поділяються на два типи: ковалентні (ковалентні зв'язки, кути, обертання) та нековалентні (ван-дер-ваальсові та електростатичні взаємодії). Для вивчення протеїнів, нуклеїнових кислот та їх міжмолекулярних структурних комплексів використовують переважно силові поля: CHARMM [133], AMBER [134] і GROMOS [135]. Вони можуть входити до складу програмних пакетів: AMBER [136], CHARMM [137], GROMACS [138], LAMMPS [139] і NAMD [140]. Графічні прискорювачі (англ. Graphics Processing Unit, GPU), які традиційно використовувались для візуалізації молекул, на сьогодні також залучені до високопродуктивних обчислень. Ефективність такого гібридного підходу при використанні обчислювальних ресурсів дозволяє збільшити швидкість розрахунків до 3-10 разів [141].

1.3.2. Молекулярна динаміка аміноацил-тРНК синтетаз. Аміноацил-тРНК синтетази інтенсивно вивчалися протягом багатьох десятиліть, у той же час, більш докладний механізм їх функціонування залишається актуальним. Незважаючи на наявність методів рентгеноструктурного аналізу з високою роздільною здатністю і спектроскопії ЯМР, координати більшості повнорозмірних структур aaRS та їх комплексів із субстратами на різних етапах реакції аміноацилювання відсутні. Методи молекулярного моделювання *in silico* дозволяють побудувати повнорозмірні структурні комплекси синтетаз з субстратами, використовуючи гомологічні структури в якості шаблонів. Метод молекулярної динаміки забезпечує краще розуміння цих ферментів, формулюючи молекулярні механізми впливу точкових мутацій та ін. Під час аналізу траєкторій молекулярної динаміки є можливість провести детальний аналіз гнучкості фермента, спостерігати за локальними конформаційними змінами, механізмами його згортання, описавши все в точних часових інтервалах, які можуть бути перевірені експериментально [126].

Одна з перших робіт, де використовувався метод молекулярної динаміки при вивченні синтетази, датована 1994 роком. Під керівництвом Karplus визначено різницю вільної енергії зв'язування між тирозином і *Bacillus stearothermophilus* TyrRS та у випадку її мутантної форми Y169F у часовому інтервалі 540 пс [142]. Виходячи з обчислювальних обмежень на ті роки, було обрано лише ділянку фермента, яка взаємодіє з субстратом. Результати теоретичних досліджень добре узгоджувались з експериментальними даними з урахуванням статистичної похибки. З часом програмно-технічна складова вдосконалювалась, що дозволило використовувати метод для більш складних систем із часовим інтервалом до 100 нс (таблиця 1.3) [126].

Точкові мутації можуть значно впливати на функцію протеїна, однак, механізм впливу таких мутацій не завжди вдається пояснити експериментальними методами. Особливо це відноситься до дистальних мутацій, кристалографічні структури яких суттєво не відрізняються від нативної конформації білка [114]. Метод МД є ефективним для вивчення механізму впливу мутацій на динаміку протеїну, пов'язану з його функцією [143]. Порівняння траєкторій для нативного протеїну та його мутанта може дозволити виокремити ефект цієї мутації на структуру і рухливість даного білка. Такого роду дослідження можуть бути особливо корисними для білкової інженерії та фармацевтичної промисловості.

Таким чином, структури аміноацил-тРНК синтетази широко досліджували методом рентгеноструктурного аналізу, який дає інформацію про статичну структуру, а метод молекулярної динаміки розширює розуміння динамічних аспектів функціонування ферменту. Тому в даній роботі проведено дослідження динаміки *Hs*TyrRS та її мутантних форм у вільному стані, а також в комплексах з субстратами методами *in silico*.

Таблиця 1.3.

Моделювання МД аміноацил-тРНК синтетаз [126]

aaRS	Ліганд (субстрат)	Структурна матриця	Час, нс	Посилання
І клас				
CysRS	+tRNA ^{Cys} :Cys-AMP (змодельований) +Cys-AMP (змодельований)	1LI5 і стр. моделі	10	Ghosh <i>et al.</i> , JBC, 2011 [144]
GlnRS	+tRNA ^{Gln} (змодельований)	4H3S і стр. моделі	70	Grant <i>et al.</i> , JMB, 2013[145]
GlnRS	+tRNA ^{Gln}	1GTR, 1EXD і стр. моделі	6,5	Yamasaki <i>et al.</i> , Biophys. J, 2007 [146]
GluRS	+tRNA ^{Glu} :Glutamol-AMP	1N78	20	Pyrkosz <i>et al.</i> , JMB, 2010 [147]
GluRS	+tRNA ^{Glu} :Glu-AMP	1N78	20	Sethi <i>et al.</i> , PNAS, 2009 [148]
LeuRS	–	CP домен від 3PZ0, 3PZ6	20	Liu <i>et al.</i> , Biochem. J, 2011 [149]
LeuRS	+tRNA ^{Leu} :Leu-AMP (змодельований)	1WZ2, 2V0C	20	Sethi <i>et al.</i> , PNAS, 2009 [148]
LeuRS	–	1H3N	55	Strom <i>et al.</i> , J. Mol. Model., 2014 [150]
LeuRS	+Val-tRNA ^{Leu} (змодельований)	2BYT, 10BC і стр. моделі	1	Hagiwara <i>et al.</i> , FEBS, 2009 [151]
MetRS	tRNA ^{Met} :Met-AMP	2CSX, 2CT8 і стр. моделі	10	Ghosh <i>et al.</i> , PNAS, 2007[152]
MetRS	–	1QQT	12	Budiman <i>et al.</i> , Proteins, 2007 [153]
TrpRS	+Trp-AMP, +tRNA ^{Trp} :Trp-AMP (змодельований)	2DR2, 1R6U і стр. моделі	5	Bhattacharyya <i>et al.</i> , Proteins, 2008 [154]
TrpRS	+ATP, + Trp, +ATP:Trp, +ATP:Mg, +ATP:Trp:Mg	1MAW, 1MB2, 1MAU, 1M83, 1I6L	5	Kapustina <i>et al.</i> , JMB, 2006 [155]
TyrRS	+Tyr, +ATP, +Tyr-AMP, + інгібітор	1JIL, 4TS1, 1H3E, 3TS1, 1I6K і стр. моделі	12	Li <i>et al.</i> , Eur. Biophys. J., 2008 [156]
TyrRS	Tyr	4TS1	0,54	Lau <i>et al.</i> , JMB, 1994 [142]
TyrRS	+Tyr, +Tyr:ATP, +Tyr-AMP	2JAN, 1X8X, 1H3E, 1VBM і стр. моделі	100	Mykuliak <i>et al.</i> , Eur. Biophys. J., 2014 [47]
TyrRS	–	Ансамбль N- і C-модулів від 1N3L та 1NTG	100	Savytskyi <i>et al.</i> , J. Mol. Recognit., 2013 [12]
TyrRS	мутантна форма G41R (змодельований)	1N3L, Стр. модель	100	Savytskyi <i>et al.</i> , Ukr Biochem J, 2015 [13]
TyrRS	+Tyr, +Tyr:ATP, +Tyr-AMP:PPi (змодельований)	Стр. модель	100	Kravchuk <i>et al.</i> , 2016, JBSD [14]

Продовж. табл. 1.3.

ValRS	+tRNA ^{Val} :Val-AMP, +tRNA ^{Val} :ThrAMP (змодельований)	1GAX і стр. моделі	10	Li <i>et al.</i> , J. Mol. Model., 2011[156]
ValRS	+ редагуючі субстрати (змодельований)	1WK9 (CP домен), 1GAX (ValRS + tRNA) і стр. моделі	2–5	Bharatham <i>et al.</i> , Biophys. Chem., 2009 [157]
II клас				
AspRS	+Asp:ATP (змодельований), + Asn:ATP (змодельований)	1IL2, 1C0A і стр. моделі	0,50	Thompson <i>et al.</i> , Chem. Bio. Chem., 2006 [158]
AspRS	+Asp:ATP (змодельований), +Asn:ATP (змодельований)	1IL2, 1C0A і стр. моделі	3	Thompson <i>et al.</i> , JBC, 2006 [159]
AspRS	+Asp, +Asn (змодельований)	1C0Z	0,30	Archontis <i>et al.</i> , JMB, 2001 [160]
AsnRS	+Asn-AMP, +Asp- AMP (змодельований)	<i>T. thermophilus</i> AsnRS	4	Polydorides <i>et al.</i> , Proteins, 2011 [161]
HisRS	+His-AMP, +His (змодельований), +HisOH (змодельований)	1KMM, 1KMN і стр. моделі	0,60	Arnez <i>et al.</i> , Proteins, 1998 [162]
LysRS (LysU)	+Lys:AMPPCP	1E22, змодельований димер	1	Hughes <i>et al.</i> , BMC Struct. Biol., 2003 [163]
LysRS (LysU)	+Lys:AMPPCP	1E22, змодельований димер	0,52	Hughes <i>et al.</i> , Proteins, 2006 [164]
ProRS	+Pro-AMP (змодельований)	2J3M	30	Strom <i>et al.</i> , J. Mol. Model., 2014 [150]
ProRS	–	2J3M і стр. моделі	12	Sanford <i>et al.</i> , Biochemistry, 2012 [165]
SerRS	+tRNA ^{Ser}	3W3S і змодельований димер	2	Dutta <i>et al.</i> , J. Phys. Chem. B, 2015 [166]
ThrRS	+tRNA ^{Thr} :Thr-AMP (змодельований)	1QF6	15	Bushnell <i>et al.</i> , J. Phys. Chem. B, 2012 [167]

1.3.3. Комп'ютерні ґрід-технології в молекулярній біології. Широке застосування новітніх технологій у всіх сферах життєдіяльності суспільства, особливо в медицині, потребує залучення потужних обчислювальних ресурсів, у тому числі й у сфері збереження та оброблення експериментальних даних [168, 169].

Масштабне використання високопродуктивних обчислень спочатку були задіяні у сфері фізико-технічних наук для таких організацій як NASA та CERN (Європейська організація з ядерних досліджень). Після спорудження в ЦЕРНі прискорювача частинок LHC (Large Hadron Collider – великий адронний колайдер), обсяг даних, отримуваних щорічно під час експериментів, становить приблизно 15–20 петабайт на рік, що відповідає об'єму 20 мільйонів звичайних компакт-дисків. Для опрацювання такого надвеликого масиву даних було запропоновано об'єднати комп'ютерні ресурси багатьох фізичних центрів і лабораторій у єдине джерело обчислювальних ресурсів. Така мережа отримала назву «ґрід» (grid), що в дослівному перекладі з англійської означає «сітка». Ґрід-інфраструктуру можна представити як один великий і потужний суперкомп'ютер, що може бути використаний в якості обчислень та зберігання даних. Швидкість обчислень й ефективність використання ресурсів віртуального комп'ютера зростає завдяки тому, що багато обчислювальних завдань можна виконувати паралельно на різних обчислювальних вузлах, використовуючи при цьому мільярди процесорів [170].

Ґрід-інфраструктура складається з трьох необхідних компонентів: 1) обчислювальні ресурси (ґрід-кластери); 2) проміжне програмне забезпечення (основні провайдери middleware: ARC NorduGrid, gLite, UNICORE, HTCondor), яке керує всією інфраструктурою; 3) швидкісні канали мережевого зв'язку між обчислювальними кластерами. Задачі застосування ґрід-технологій, в залежності від складності, можна розділити на дві групи: 1) моделювання з використанням обчислювальних потужностей; 2) збереження, аналіз та архівування даних.

Одним із наймасштабніших і найдорожчих науково-дослідних проєктів, у якому використовували потужні суперкомп'ютери для визначення складу і структури генів є «Геном людини» (Human Genome Project) [171].

Грід-технології були успішно використані для аналізу властивостей гена *ACE* (ангіотензин-конвертувальний фермент), що виробляє ангіотензин, негативна дія якого на стінки артерій призводить до гіпертонії. Відносно давно були знайдені блокатори ферменту *ACE*, проте їхня дія недостатньо ефективна. Аналіз геному дав змогу виділити ген *ACE-2*, який кодує більш поширений та ефективний варіант ферменту. Пізніше було отримано структуру протеїна та підібрано хімічні сполуки, які активно блокують білок *ACE-2*. Вартість нового препарату проти підвищеного артеріального тиску коштувала \$200 млн замість прогнозованих \$500 млн, із урахуванням вдвічі меншого часу на пошук [172].

Станом на сьогодні, створено такі наймасштабніші грід-інфраструктури:

- OSG, Open Science Grid (США) – <http://www.opensciencegrid.org>;
- TeraGrid (США) – <https://www.teragrid.org>;
- Italian Grid Infrastructure (Італія) – <http://www.italiangrid.it/>;
- NAREGI (Японія) – <http://www.naregi.org>;
- NorduGrid (Скандинавія) – <http://www.nordugrid.org>;
- EGI, European Grid Infrastructure (Європа) – <https://www.egi.eu>.

Європейська грід-інфраструктура (EGI) об'єднує понад 650 тис. процесорів, понад 500 тис. терабайт дискових масивів, понад 45 тис. науковців, 15 грід-інфраструктур, до яких входить і Україна. EGI, окрім проєктів із фізики, використовується також для вирішень біомедичних задач:

1. Пошук нових біомаркерів множинного (розсіяного) склерозу (МС). На базі Каролінського Інституту в Швеції використовується платформа віртуальної візуалізації (Virtual Imaging Platform, VIP), для аналізу даних за результатами довгострокових досліджень МС ефектів мозолистого тіла – область мозку, дуже чутливого до захворювання. VIP-система забезпечує доступ до обчислювальних ресурсів та елементу збереження грід-

- інфраструктури, які використовуються для швидкого моделювання об'ємних медичних зображень [173].
2. Вивчення геному сальмонел для кращого розуміння взаємодії патогену із клітинами людини. Для вирішення даної задачі використано програму READemption tool у грід, для швидкого аналізу мРНК отриманих з обох організмів одночасно [174].
 3. Проектування якісніших антибіотиків з використанням високопродуктивних обчислень допомагають розробити антибіотики з меншою кількістю побічних ефектів, і в той же час ефективнішим проти грибних захворювань, ніж амфотерицин, – AmB. Для вирішення даної задачі необхідно було задіяти не менше 24 процесорів для кожного завдання, із загальним часом п'ять мільйонів процесорних годин [175].

В Україні з 2005 року виконується програма інформатизації Національної академії наук, в рамках якої вперше створено Український національний грід (УНГ, <http://ung.in.ua/>). Разом із обробкою даних експериментів на LHC в CERN виконувалися ціла серія різних проектів (наприклад, моделювання просторової структури та поведінки біологічних макромолекул, що можуть бути мішенями для розробки лікарських препаратів) [172, 176]. Значна частина грід-обчислень в УНГ припадає на вирішення молекулярно-біологічних завдань. Шість із 14 віртуальних організацій УНГ застосовують грід для розв'язання обчислювальних задач у галузі біології та медицини [177].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Методи моделювання просторової структури повнорозмірної *HsTyrRS*, її мутантних форм та комплексів із субстратами

У банку даних PDB доступні структури окремих N- і C-кінцевих модулів тирозил-тРНК синтетази людини, які визначено методом рентгеноструктурного аналізу. Для отримання просторових структур повнорозмірної *HsTyrRS* та її мутантних форм із субстратами задіяно методи структурної біоінформатики.

2.1.1. Моделювання структури димера *HsTyrRS* у вільному стані. Послідовність *HsTyrRS* взято з банку даних GenPept під номером NP_003671.1 серверу NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Пошук гомологічних послідовностей проводили з використанням програм і баз даних серверу BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Множинне вирівнювання послідовностей проводили з використанням серверу Clustal W (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). Для одержання структури повнорозмірної *HsTyrRS* проведено комп'ютерне моделювання *in silico* з використанням пакету програм Modeller v9.7 [178]. В якості структурних матриць N- і C-кінцевих модулів використано кристалографічні структури *HsTyrRS*, які депоновано в базі даних Protein Data Bank (PDB): 1N3L:A (ділянка A4–P342) [36], 1NTG:A (ділянка P360–S528) [115]. Амінокислотні залишки N-кінця синтетази (M1–D3), каталітичної петлі (K222–E228) і міжмодульного лінкера (D343–E359), які мають підвищену рухливість та не мають визначених координат в обох структурних шаблонах, змодельовані в Modeller v9.7 як петлева структура. Моделювання лінкера довжиною 17 амінокислотних залишків (а.з.) виконано на базі матриці авто-каталітичної тирозинової C-Abl кінази людини (1OPL:A, T231–M256) [179]. Моделювання мономерів, складених за прикладом протоколу “Homology modeling with multiple

templates”, включало зміни значень параметрів (a.library_schedule, a.max_var_iterations, a.md_level) з пошуком найоптимальніших рішень для побудови кращої структурної моделі. Змодельовані структури відсортовано одночасно за такими критеріями: Modeller Objective Function (molpdf), Discrete Optimized Protein Energy (DOPE), Normalized DOPE score, MolProbity Score. Побудова димеру повнорозмірної *HsTyrRS* виконана із використанням програмного пакету Swiss-PDB Viewer 4.0 [180] методом суперпозиції на кристалографічну структуру біологічної одиниці 1N3L. Отримано структури з відкритою каталітичною петлею – *HsTyrRS_{Opened}*.

2.1.2. Моделювання закритої конформації KMSSS-петлі. Для моделювання компактної конформації каталітичної петлі *HsTyrRS* було розглянуто два альтернативні структурні шаблони – відповідні петлі еукаріотної TyrRS з *Plasmodium falciparum* (*PfTyrRS*, PDB код 3VGJ) [181] і триптофаніл-тРНК синтетази людини (*HsTrpRS*, PDB код 2QUI) [182]. В якості матриці обрано структуру *PfTyrRS*. Моделювання KMSSS-петлі проведено з використанням пакету Modeller 9.8. Оскільки в структурі 1N3L відсутні 7 а.з. каталітичної петлі (²²²KMSSSEE²²⁸), проведено перемоделювання 13 а.з. між залишками G217 і S230 в обох субодиницях *HsTyrRS* з урахуванням делецій для отримання компактної конформації всієї каталітичної петлі. Отримано структуру з закритою каталітичною петлею – *HsTyrRS_{Closed}*.

2.1.3. Моделювання структури комплексу *HsTyrRS* з L-тирозином. Структуру з субстратом *HsTyrRS^{Tyr}* отримано методом протеїн-протеїнової суперпозиції *HsTyrRS_{Opened}* з відкритою конформацією KMSSS-петлі з матрицею міні-*HsTyrRS* в комплексі з L-тирозином та іоном K⁺ (PDB код: 4QBT) [116] та збереженням відповідних координат *HsTyrRS*, іону K⁺ і L-тирозину. Молекулярну суперпозицію проведено з використанням програмного забезпечення Chimera 1.10 [183].

2.1.4. Моделювання комплексу *HsTyrRS* з L-тирозином та АТФ

Комплекс *HsTyrRS*^{Tyr} з компактною конформацією КМССС-петлі, який використано в якості рецептора для моделювання комплексу *HsTyrRS*^{АТФ+Тур}, отримано за аналогією до методу з відкритою конформацією петлі.

Для добудови АТФ:Мg²⁺ використано метод молекулярного докінгу в програмі AutoDock 4.2.6 (Morris et al., 2009). В якості рецептора застосовано комплекс *HsTyrRS*^{Tyr} з компактною конформацією КМССС-петлі, а конформацію АТФ:Мg²⁺ взято з *Geobacillus stearothermophilus* TrpRS (*GsTrpRS*, PDB код: 1MAU) [184]. Атоми водню додано в програмі Chimera 1.10. Молекулярний докінг для всіх низькомолекулярних субстратів проведено до субодиноці А, залишаючи субодиноцю Б у вільному від лігандів стані. Жорстку конформацію АТФ:Мg²⁺ доковано в активний центр *HsTyrRS* з 12 гнучкими залишками: Trp40, Thr42, His49, Tyr52, Val54, Asn212, Val215, Lys222, Met223, Ser224, Ser225 і Ser226. Дані залишки є складовими активного центру та орієнтовним оточенням АТФ [184].

Ділянку для докінгу ліганда розміщено в активному центрі *HsTyrRS* субодиноці А, у якій локалізовано HIGH- і КМСКС-мотиви. Розмір ділянки був обраний 40x40x40 точок з кроком 0,0375 нм. Ділянку відносно невеликих розмірів було обрано для забезпечення більшої точності результатів докінгу. Також ми задавали відповідний заряд для К⁺ і Мg²⁺ вручну, оскільки AutoDock за замовчанням встановлює заряд для іонів як нульовий. Генетичний алгоритм Ламарка [185] обрано для цих досліджень, оскільки результати інших авторів [186] зазначають цей алгоритм як один з найбільш ефективних і надійних для молекулярного докінгу лігандів у присутності іонів. Максимальна кількість оцінок енергії була задана на 300000 з чисельністю популяції 150. В результаті отримано комплекс *HsTyrRS*^{АТФ+Тур}.

2.1.5. Моделювання комплексу $HsTyrRS^{Tyr}$ із AMP та пірофосфатом.

Кристалграфічна структура $HsTyrRS$ з проміжним продуктом тирозил-аденілатом (Tyr-AMP) на сьогодні відсутня, відповідно і конформація цього ліганду в активному центрі залишається невідомою. Для побудови структурного комплексу $HsTyrRS$ з тирозил-аденілатом використано структуру Tyr-AMP з комплексу $PfTyrRS$ (PDB код: 3VGJ2011) [181]. Проведено гнучкий докінг ліганду в активний центр структури $HsTyrRS_{Opened}$ з відкритою каталітичною петлею та іоном K^+ . Розмір боксу відповідав значенням $63 \times 42 \times 40$ з тим самим кроком. Для іону K^+ назначено відповідний заряд. Відібрано комплекс з кращими значеннями енергії зв'язування. На отриману структуру $HsTyrRS^{Tyr-AMP}$ накладено координати $ATP:Mg^{2+}$ методом суперпозиції в PyMOL 1.5 Schrödinger, LLC. Залишаючи координати атомів пірофосфату з іоном Mg^{2+} , отримано структурний комплекс $HsTyrRS^{Tyr-AMP+PPi}$.

2.1.6. Моделювання мутантних форм $HsTyrRS$ (G41R, E196K, 153-156delVKQV). Для отримання мутантних форм застосовано метод комп'ютерного мутагенезу. Точкові мутації G41R, E196K та *de novo* делеція 153-156delVKQV проведені для повнорозмірної конформації димеру в програмному пакеті Modeller 9.7, з використанням відповідних алгоритмів (*mutate_model.py* і *model-loop.py*). Мутації локалізовано в кожній з субодиниць без зміни координат інших атомів структури. У дослідженнях мутантних форм використовували структуру міні- $HsTyrRS$, тому зайві залишки видалено у програмному пакеті Swiss-PdbViewer 4.0. Кращі структури відібрані за критеріями: Modeller Objective Function (molpdf), Discrete Optimized Protein Energy (DOPE).

2.1.7. Моделювання структури тРНК^{Tyr} людини в комплексі з HsTyrRS.

Моделювання тРНК^{Tyr} людини. Пошук шаблону проведено в ModeRNA Server, використовуючи функцію «Find Template». Нуклеотидні послідовності тРНК^{Tyr} людини, *Methanocaldococcus jannaschii* та *Saccharomyces cerevisiae* взято із бази нуклеотидних послідовностей European Nucleotide Archive (ENA, <http://www.ebi.ac.uk/ena/>), з ідентифікаційними номерами M55605.1, L77117.1:863656..863729:tRNA.1 та K02850.1 відповідно. Для моделювання застосовано програмний пакет MMB (MacroMoleculeBuilder) 2.8 [187, 188]. В якості матриць для моделювання використано координати просторової структури *Methanocaldococcus jannaschii* TyrRS в комплексі з тРНК^{Tyr} (MjTyrRS, PDB код: 1J1U) і структуру *Saccharomyces cerevisiae* TyrRS в комплексі з тРНК^{Tyr} (ScTyrRS, PDB код: 2DLC) [189, 190]. Для побудови просторової структури Hs-тРНК^{Tyr} з послідовністю від 1 до 72 нуклеотида (нт) використано матрицю тРНК^{Tyr} з 1J1U. Для добудови відсутнього ⁷⁴ССА⁷⁶-кінця використано фрагмент ⁷³АССА⁷⁶ з координатного файлу 2DLC із заміщенням аденіну 73 (A73). Для кращого молекулярного накладання та нівелювання конформаційних відмінностей, суперпозиція структур тРНК^{Tyr} проведена за атомами фосфору цукрофосфатного остову, атомами N1, N9 піримідинів та пуринів відповідно. Три іони Mg²⁺, які виконують функцію стабілізації структури тРНК^{Tyr} [191], перенесено з координатного файлу 2DLC шляхом суперпозиції в Chimera 1.10.

Побудова комплексу HsTyrRS*тРНК^{Tyr}. Для отримання структури протеїн-нуклеїнового комплексу HsTyrRS з тРНК^{Tyr} використано метод суперпозиції на матрицю координатного файлу 2DLC (субодиниця Б) з функцією MatchMaker в програмі Chimera 1.10. Для оптимізації та уникнення атомних перекриттів скоректовано ротамери для амінокислотних залишків His158 та His305. Заміну виконано с урахуванням експериментально отриманих ротамерів, застосовуючи бібліотеку Dunbrack [192] у програмі Chimera 1.10.

2.1.8. Моделювання структури $HsTyrRS*тРНК^{Tyr}$ в комплексі з eEF1A2. Послідовність фактора елонгації eEF1A2 людини взято з банку даних UNIPROT (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q05639>). В якості структурної матриці взято структуру фактору елонгації *Oryctolagus cuniculus* (кроля) (*Oc-eEF1A2* PDB код: 4C0S) [193], який на 100% ідентичний за послідовністю до eEF1A2 людини (*Hs-eEF1A2*) і бика (*Bt-eEF1A2*). Для більш гнучкого і якіснішого моделювання структурного комплексу міні- $HsTyrRS_{Opened}*тРНК^{Tyr}$ з eEF1A2, координати ізольованої структури 4C0S розділено на 3 домени, видаливши міжмодульні лінкери: домен 1 (Glu4-Thr234), домен 2 (Pro241-Asp328), домен 3 (Ala337-Ala445). В якості матриці для інтерфейсу між $тРНК^{Tyr}$ і С-кінцевим модулем (домен 3) eEF1A2 використано координати структурного комплексу eEF1A з $тРНК^{Val}$ (PDB код: 4CXG) [194]. Визначеного протеїно-нуклеїновий міжмолекулярний інтерфейс в структурі комплексу з 4CXG. Для побудови комплексу взято структуру міні- $HsTyrRS_{Opened}*тРНК^{Tyr}$ і методом суперпозиції накладено на $тРНК^{Val}$ комплексу 4CXG за атомами фосфору цукрофосфатного остову в зоні протеїно-нуклеїнового інтерфейсу. Домен 3 eEF1A2 накладено на гомологічний С-кінцевий модуль eEF1A структури 4CXG в програмі Chimera 1.10. Далі видалено координати матриці 4CXG і отримано проміжний комплекс міні- $HsTyrRS_{Opened}*тРНК^{Tyr}$ з доменом III eEF1A2. Для побудови комплексу з двома іншими доменами використано метод молекулярного докінгу в програмі ClusPro 2.0 [195]. Для наступного етапу взято структуру міні- $HsTyrRS$ до якої доковано N-кінцевий модуль (домен 1). Координатний файл міні- $HsTyrRS$ в комплексі з 1 і 3 доменами *Hs-eEF1A2* застосовано для молекулярного докінгу з доменом 2. Фінальний структурний комплекс міні- $HsTyrRS*тРНК^{Tyr}*eEF1A2$ отримано методом суперпозиції в програмі Chimera 1.10.

2.2. Метод ієрархічних обертань HIEROT

Для моделювання колективних дифузійних рухів динамічних доменів використано метод ієрархічних обертань – HIEROT (HIErarchical ROtations Technique) [196, 197]. Алгоритм адаптовано і використано для вивчення компактизації динамічних доменів у *HsTyrRS*. За допомогою методу HCCP (Hierarchical Clustering of the Correlation Patterns) протеїн розділяється на ієрархічно організовані кластери, визначені на різних рівнях кореляції рухів залишків навколо локального положення рівноваги. Кластери певного ієрархічного рівня є відносно незалежними один від одного за характером рухів, тому доцільно сказати, що вони рухаються як єдине ціле. Можна вважати, що внутрішні ступені вільності всередині кластерів заморожені, а самі кластери розглядати як тверді тіла. Кластери, що поєднані одним чи двома лінкерами (ділянками поліпептидного ланцюгу, які з'єднують різні домени) можуть механічно рухатися один відносно іншого. Тип руху визначається положенням лінкерів і може бути обертанням на осі з одним ступенем вільності чи рухом на шарнірі з двома ступенями вільності. В результаті, протеїн перетворюється у рухливу систему твердих тіл різного розміру, поєднаних шарнірами та осями. Докладніше про алгоритми ієрархічних обертань та ін. можна ознайомитись за посиланнями [9, 196-198]. Алгоритм реалізовано у бібліотеці молекулярного моделювання Pteros (<http://sourceforge.net/projects/pteros/>) [199].

Результати розрахунків ідентифікуються за допомогою кодів у вигляді “*i-n:c*”, де *i* – кодовий номер початкової структури (відповідно до даних Modeller), *n* – номер траєкторії згенерованої з цієї структури, *c* (1 або 2) – номер *C* модуля, який розглядається. Початкові структури нумеруються в тексті як *i*.

В методі HIEROT використовувалися параметри $M = 30$, $N_L = 50$, $T = 0,75$. Для кожної структури проводилося 20 незалежних випробувань по 500000 кроків кожне. Дані зберігалися кожні 1000 кроків [9].

2.3. Методика розрахунків молекулярної динаміки

Для розрахунку молекулярної динаміки застосовували програмний пакет GROMACS, що складається з набору розрахункових та аналітичних програм (застосунків) [200]. Загальна схема розрахунку полягала в наступному: координати структур досліджуваних протеїнів конвертували з *pdb*-формату у внутрішній формат GROMACS – *gro*, використовуючи програму *pdb2gmx*, при цьому, наявні атоми водню видалялися з PDB структури і потім додавалися знову у файл формату *gro*. Цю процедуру проводили для створення коректної топології. В усіх розрахунках використовували силові поля: GROMOS 53a6 (43a1) та CHARMM27 [201, 202]. За допомогою програми *editconf*, структуру розміщували в боксі, який має форму зрізаного октаедра з мінімальною відстанню від стінок боксу до атомів білка – 1 нм. Після цього бокс заповнювали SPC216 (Single Point Charge), моделлю води, за допомогою програми *genbox*. Програму *genion* використано для забезпечення концентрації іонів – 150 мМоль за рахунок додавання K^+ і Cl^- у систему. Мінімізацію енергії проводили методом крутого спуску (*steep*), після чого було використано метод спряженого градієнта (*cg*).

На наступному етапі розраховували молекулярну динаміку із гармонійною прив'язкою атомів протеїну до їхніх вихідних координат протягом 50 пс (результуючу систему вводили як вихідну). Інтегрування здійснювалося кроком у 2(4) фс за допомогою методу позмінного випередження, еквівалентного алгоритмові Верлета. Координати атомів записувалися у файл із періодичністю 1 пс. Довжину зв'язків підтримували постійно за допомогою алгоритму LINKS. Електростатичну взаємодію враховували за методом PME (Particle-Mesh Ewald sum). Параметр відсічення (*cutoff*) було виставлено в 1 нм для всіх типів взаємодій (1,2 нм у випадку CHARMM27). Температура системи (310 K) і тиск (1 атм) підтримували постійно, використовуючи алгоритми *v-rescale* і *parrinello-rahman*, відповідно.

2.4. Аналіз і візуалізація результатів

Конвертацію траєкторій виконували за допомогою програми *trjconv*. Середньоквадратичні відхилення $C\alpha$ атомів від їхніх вихідних позицій розраховували за допомогою програм *g_rms* та *g_rmsf*. Проведено аналіз залежності зміни вторинної структури від часу t , для побудування матриці, використано програму *do_dssp*. Інтерфейси між C- та N-модулями визначалися за допомогою спеціально нами написаних на мові Tcl скриптів CAS (Contact Analyzer Script) [10] для програми VMD [203]. Кластеризація інтерфейсів проводилася, нами написаним на мові Tcl, скриптом *cluster.tcl* [9]. Обчислення енергій проведено за допомогою програми *g_energy*. Енергія зв'язування розглядається як сума енергій ван-дер-ваальсових взаємодій (описано потенціалом Ленард-Джонса) та енергії електростатичних взаємодій (описано за законом Кулона). Аналіз Н-зв'язків проведено за допомогою програми *g_hbond*. Для визначення наявності Н-зв'язків, використано наступні критерії: $r \leq r_{\text{HB}} = 0,35$ нм; $\alpha \leq \alpha_{\text{HB}} = 30^\circ$. Розрахунок середньоквадратичних флуктуацій залежних від часу виконано програмою tRMSF бібліотеки Pteros [199].

Програми Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.1) [204] і PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5 Schrödinger, LLC використано для аналізу і візуалізації траєкторій та окремих фреймів молекулярної динаміки. Автоматизацію аналізу виконано із використанням написаного нами програмного засобу DAS 1.0 (Distributed Analyzer Script) [10].

2.5. Обчислювальні ресурси

Комп'ютерне моделювання просторових структур було проведено на обчислювальному кластері Інституту молекулярної біології і генетики (ІМБіГ) НАН України (<http://grid.imbg.org.ua/>). Кластер під'єднаний до оновленої оптоволоконної лінії з пропускною здатністю 10 Гбіт/с через мережу vLAN (UARNET). Обчислювальні вузли кластера ІМБіГ налічують 360 процесорних ядер Intel® Xeon® Processor (з технологією Hyper-Threading). До складу

обчислювального кластера входить елемент збереження uSystem ErgoLAN із дисковим масивом об'ємом у 80 Тбайт (технологія RAID 6) (рис. 2.1).

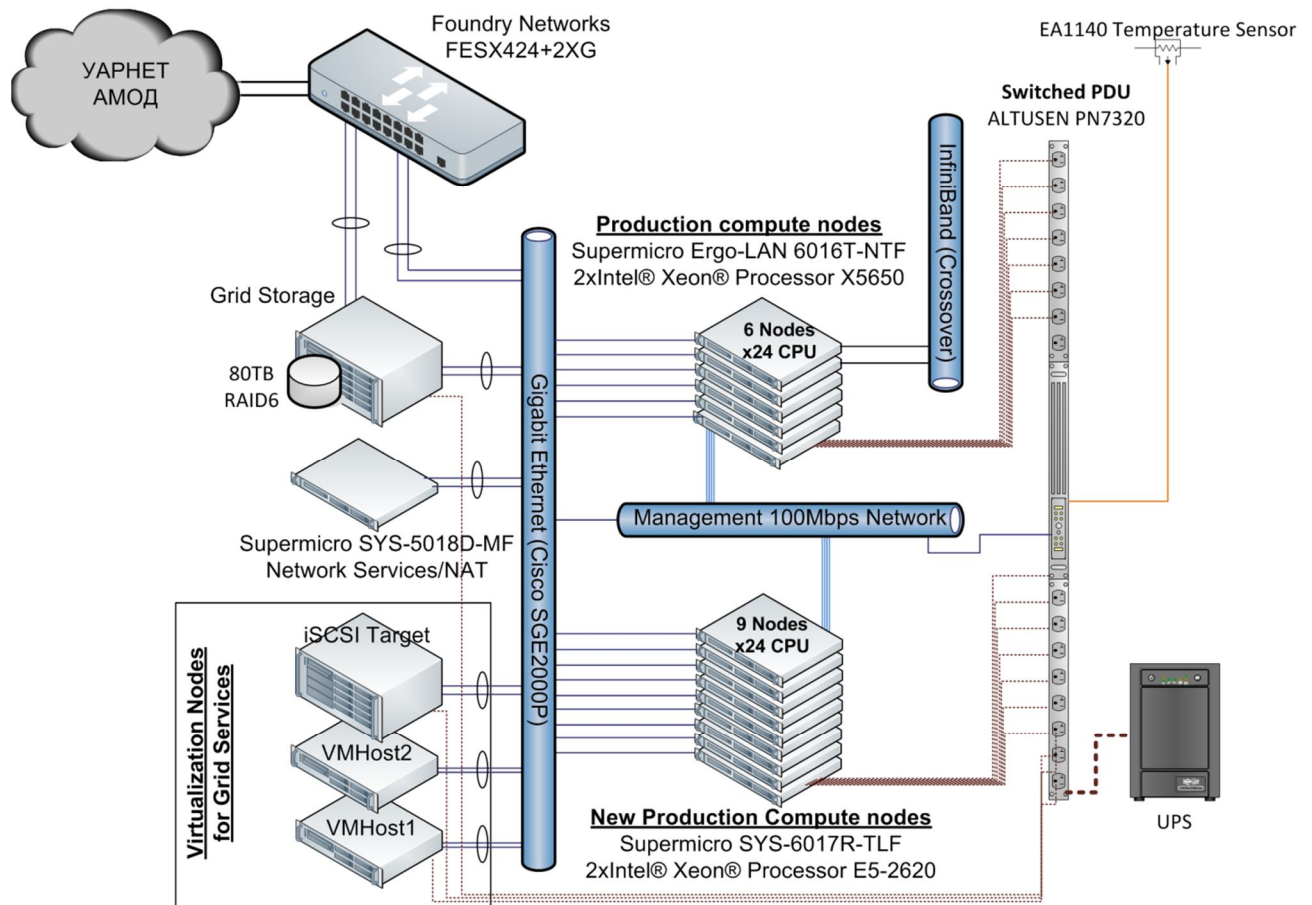


Рис. 2.1. Схема побудованої апаратної інфраструктури обчислювального кластера ІМБіГ НАН України станом на 2016 рік

Кластер функціонує під керуванням операційної системи Scientific Linux 6 x86_64 на якому встановлено прикладне програмне забезпечення: Amber 9 (11), GROMACS 5 (з 4.0 по 5.1), NAMD 2.10, Modeller 9v8, AutoDock 4, PTEROS, CPMD 3, ORCA 3.

Для розрахунків молекулярної динаміки в грід було використано проміжне програмне забезпечення та інструментальні засоби Nordugrid ARC, на базі якого побудовано Українську національну грід-інфраструктуру. Набір програмного забезпечення повністю відповідає сучасним стандартам EGI.

На базі оновленого кластера ІМБіГ авторським колективом створено віртуальну лабораторію MolDynGrid (<http://moldyngrid.org/>), гід-сервіси якої застосовували для автоматизації та ефективного масштабування комп'ютерних розрахунків молекулярної динаміки в гід-середовищі. Управління віртуальної організації (VO:moldyngrid) проводилась під керуванням веб-сервісу PHP VOMS-Admin v0.6.8 (<http://voms.grid.org.ua/voms/?vo=moldyngrid>) [6-8, 10].

В якості обчислювальних ресурсів MolDynGrid застосовано кластери Українського національного гід-у (UNG, <http://ung.in.ua/>) і Європейської гід-інфраструктури (EGI, <https://www.egi.eu/>).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

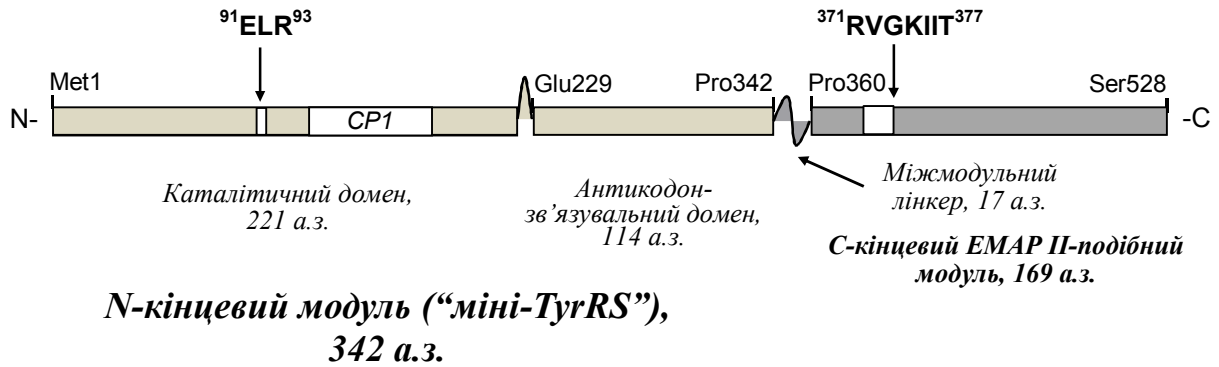
3.1. Побудова повноатомної моделі просторової структури *HsTyrRS*

За результатами пошуку експериментальних робіт виявлено, що структура повнорозмірної цитоплазматичної TyrRS досі є невизначеною. Відомі лише координати окремих N- та С-кінцевих модулів TyrRS людини, отриманих методом рентгеноструктурного аналізу. Це пов'язано з тим, що міжмодульний лінкер є неструктурованим. Спочатку планується отримати мономер *HsTyrRS* (59 кДа) шляхом добудови відсутніх координат із використанням структурних матриць методом молекулярного моделювання. Далі, було побудовано гомодимер повнорозмірної *HsTyrRS* (2x59 кДа) зі структури отриманих координат мономера.

3.1.1. Моделювання просторової структури *HsTyrRS* у вільному стані.

HsTyrRS є гомодимером $\alpha 2$ -типу з молекулярною масою 2x59 кДа (рис. 3.1а). Для побудови структури повнорозмірної *HsTyrRS* в якості матриць N- і С-кінцевих модулів використано відповідні кристалографічні структури: 1N3L:A (роздільна здатність – 1.18 Å) та 1NTG:A (роздільна здатність – 2,21 Å). Застосовуючи програмний пакет Modeller v9.7, добудовано координати відсутніх ділянок: N-кінця синтетази (M1–D3), каталітичної петлі (K222–E228) і міжмодульного лінкера (D343–E359) (рис. 3.1б). В результаті отримано 500 структур мономерів синтетаз, які належать до 5-ти ансамблів по 100 структур у кожному (рис. 3.2).

а

Схема мономера *Hs*TyrRS, 59 кДа

б

MGD APSPEEK	LHLITRNLQE	VLGEEKLKEI	LKERELKIYW	GTATTGKPHV	AYFVPMSKIA	60	} N-модуль
DFLKAGCEVT	ILFADLHAYL	DNMKAPWELL	ELR VSYYENV	IKAMLESIGV	PLEKLFKFIK	120	
TDYQ L SKEYT	LDVYRLSSVV	TQHDSKKAGA	EVVKQVEHPL	LSG L LYPGLQ	ALDEEYLKVD	180	
AQFGGIDQRK	IFTFAEKYLP	ALGYSKRVHL	MNPMVPGLTG	SKMS SSEES	KIDLLDRKED	240	
VKKKLKKAFC	EPGNVENNGV	LSFIKHVLFP	LKSEFVILRD	EKWGGNKTYT	AYVDLEK DFA	300	
AEVVHPGDLK	NSVEVALNKL	LDPIREKFNT	PALKKLASAA	YP DPSKQKPM	AKGPAK NSEP	360	
EEVIPSRLDI	RVGKIIT VEK	HPDADSLYVE	KIDVGAEPR	TVVSGLVQFV	PKEELQDRLV	400	} C-модуль
VVLCNLKPQK	MRGVESQGML	LCASIEGINR	QVEPLDPPAG	SAPGEHVFVK	GYEKGQPDEE	480	
LKPKKKVF EK	LQADFKISEE	CIAQWKQTNF	MTKLGSISCK	SLKGGNIS		528	

Рис. 3.1. (а) – доменна організація окремої субодиниці *Hs*TyrRS (N-модуль має аміноацилюючу активність, а С-модуль є гомологічним до цитокіну EMAP II). Положення двох цитокінових мотивів: $^{91}\text{ELR}^{93}$ і $^{371}\text{RVGKIIT}^{377}$; (б) – амінокислотна послідовність субодиниці TyrRS (GenPept код NP_003671.1); послідовності цитокінових мотивів виділено чорним кольором. Ділянки, для яких не встановлено атомних координат у кристалографічних структурах (PDB коди: 1N3L, 1Q11, 1NTG), виділені сірим кольором. Послідовність, що належить до CP1-вставки, виділено рамкою чорного кольору

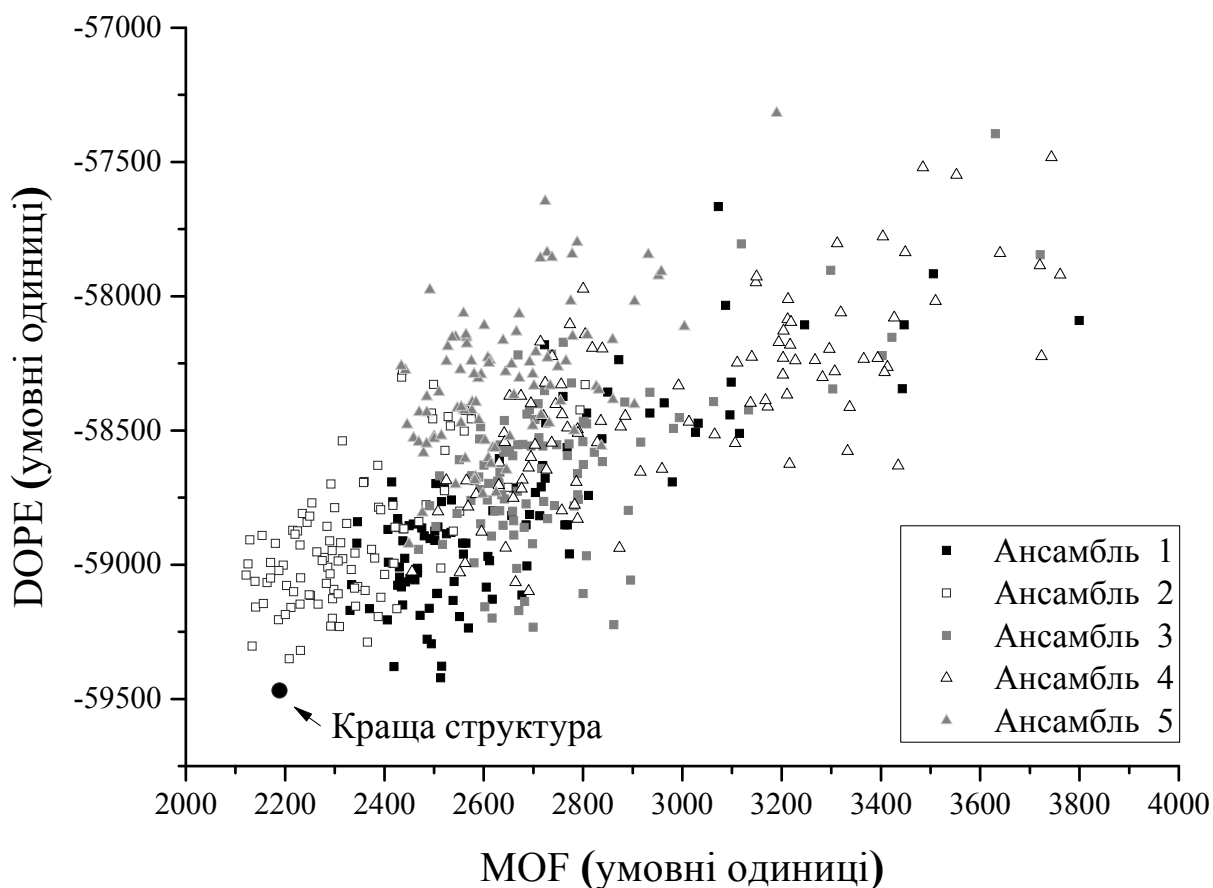


Рис. 3.2. Енергетичні показники MOF (Modeler Objective Function) та DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) п'яти ансамблів, з загальною кількістю 500 структур. Виділено найкращу структуру із другого ансамблю під номером 3.

Побудовані моделі мономерів були охарактеризовані одночасно за чотирма оціночними функціями програми Modeller v9.7: Modeller Objective Function (molpdf), Discrete Optimized Protein Energy (DOPE), Normalized DOPE score і Mol_pct_rank (сумарні оціночні геометричні показники) веб-серверу MolProbity. Відібрано 10 кращих структур, які використано для подальшої роботи (таблиця 3.1).

Побудова 10 димерів повнорозмірної *HsTyrRS* виконана з використанням програмного пакету Swiss-PDB Viewer 4.0 методом суперпозиції на кристалографічну структуру (PDB код: 1N3L) без порушень водневих зв'язків в інтерфейсі димеризації (рис. 3.3).

Таблиця 3.1.

Характеристики десяти структур, які використані як початкові у дослідженнях методом NIEROT. Значення оціночних показників Modeller (менше – краще) та MolProbity (більше – краще) показані для одного з мономерів [9]

Номер структури	Molpdf (умовні од.)	DOPE (умовні од.)	Normalized DOPE (умовні од.)	MolProbity Score	Радіус гірації*, нм
1	2513,18	-59421,80	-1,04	76	3,79
2	2419,23	-59379,84	-1,03	85	4,16
3	2188,63	-59468,36	-1,04	92	4,25
4	2208,57	-59350,75	-1,03	90	5,17
5	2699,56	-59232,81	-1,01	79	4,27
6	2616,82	-59199,10	-1,01	81	4,22
7	2690,47	-59098,57	-1,00	83	4,32
8	2455,57	-59026,08	-0,99	87	3,89
9	2449,47	-58922,91	-0,97	91	3,85
10	2476,73	-58806,62	-0,96	76	6,05

*Примітка. Значення радіусу гірації наведено для гомодимерів

Найкращою з 10 відібраних структур за оціночними показниками обрано під номером 3, яку в подальшому обрано й для розрахунків молекулярної динаміки. Окрім найкращих показників аналізу Molpdf, DOPE і Normalized DOPE від Modeller, структура №3 (рис. 3.4) відповідає кращим оцінкам MolProbity Score зі значенням 92/100 та конформаційних карт Рамачандрана – 97,72%.

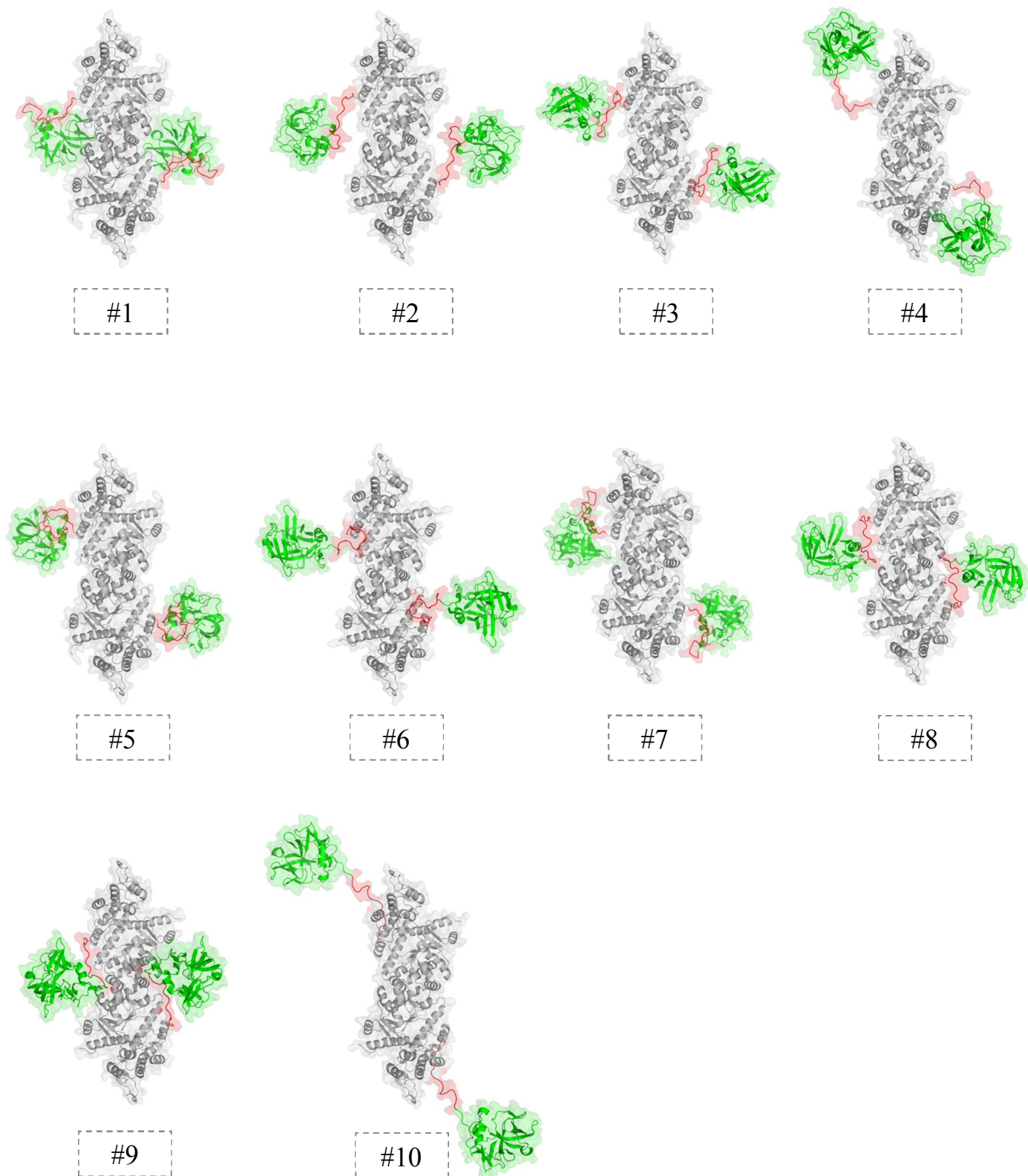


Рис. 3.3. Візуалізація 10 відібраних структур *HsTyrRS* із різною конформацією міжмодульного лінкера за кращими значеннями оціночних показників Modeller та MolProbity. N-, C-кінцеві модулі та лінкер відображені сірим, зеленим і червоним кольором відповідно

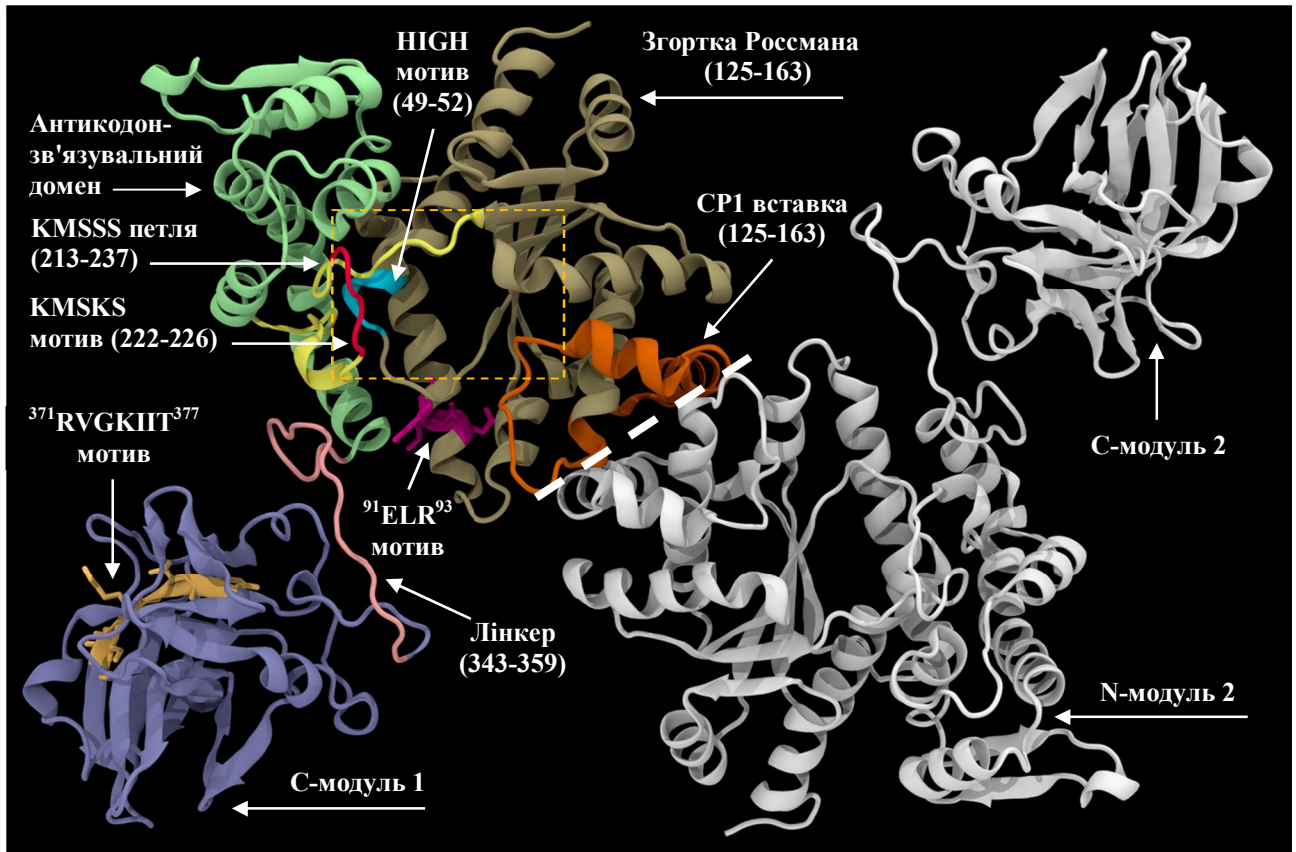


Рис. 3.4. Структурні елементи моделі просторової структури димера *HsTyrRS*. Жовтим пунктиром виділено зону активного центру, білим пунктиром – інтерфейс димеризації

Підсумки:

1. Побудовано просторові структури димера повнорозмірної *HsTyrRS* з різною конформацією міжмодульного лінкера. Відібрано оптимальну *HsTyrRS* структуру, яка відповідає кращим оціночним показникам Modeller (Normalized DOPE: -1,04), MolProbity (Score: 92/100) та карт Рамачандрана (97,72%).

За матеріалами даного дослідження опублікована стаття:

1. Interdomain compactization in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by the hierarchical rotations technique / Yesylevskyy S. O., Savytskyi O. V., Odynets K. A. and Kornelyuk A. I. // *Biophysical Chemistry*. — 2011. — V. 154, N 2-3. — P. 90-98. (Особистий внесок здобувача: здійснено інформаційний пошук і вибір структурних матриць, підбір методології та параметрів моделювання повнорозмірної структури *HsTyrRS*, моделювання й аналіз структур, формування критеріїв та відбір кращих структур, обговорення результатів зі співавторами).

3.2. Оптимізація та адаптація методик із розрахунків молекулярної динаміки та аналізу отриманих траєкторій в ґрід-середовищі

Для біологічних досліджень застосування методу молекулярної динаміки потребує значних обчислювальних потужностей при роботі з великими об'ємами даних. Якість досліджень залежить від часу динаміки, умов для біологічної системи та параметрів симуляції. Чим більше обчислювальних ресурсів і чим вони потужніші – тим довша траєкторія МД, більше статистики та якісніша інтерпретація отриманих даних. Наявне програмне забезпечення, таке як GROMACS, потребує навичок в інформаційних технологіях (ІТ). Постановка задач і аналіз траєкторій МД є досить трудомістким процесом і може складатися з більш ніж 20 етапів, тому автоматизація цього рутинного процесу є актуальним завданням для науковців із біологічних дисциплін в ІТ.

У даній роботі проведено аналіз сучасного стану проблеми взаємодії дослідника з програмним забезпеченням при застосуванні розподілених обчислювальних потужностей та елементів збереження даних в ґрід-середовищі. Запропоновано методики з автоматизації розрахунків молекулярної динаміки біологічних макромолекул та їх аналізу в ґрід-середовищі. Результати впроваджено у віртуальній лабораторії MolDynGrid, яка створена для вирішення задач в галузях структурної біології та біоінформатики, що потребують значних витрат машинного часу та оперують великими об'ємами інформації. В рамках віртуальної лабораторії створена ефективна інфраструктура для проведення *in silico* розрахунків молекулярної динаміки біологічних макромолекул.

3.2.1. Створення віртуальної лабораторії MolDynGrid та її ґрід-сервіси.

Групою дослідників відділу білкової інженерії та біоінформатики ІМБіГ НАН України створено віртуальну організацію (VO:moldyngrid), що функціонує в ґрід-середовищі на базі обчислювального кластера інституту. Метою є розробка

ефективної інфраструктури для проведення розрахунків молекулярної динаміки біологічних макромолекул (протеїнів, нуклеїнових кислот та їх комплексів) у водно-іонному оточенні *in silico*. Для автоматизації високопродуктивних обчислень молекулярної динаміки та її аналізу створено віртуальну лабораторію MolDynGrid (<https://moldyngrid.org>).

До складу веб-порталу віртуальної лабораторії належать шість блоків (рис. 3.5):

1. База даних протеїнів;
2. Розрахунковий блок;
3. База даних обрахованих траєкторій;
4. Аналітичний блок;
5. База даних ЯМР;
6. Навчальний блок.

Комп'ютерні розрахунки молекулярної динаміки проводяться здебільшого в Українській національній грид-інфраструктурі (<http://ung.in.ua/>) з використанням сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid (<http://moldyngrid.org/>).

Доступ до блоків порталу потребує авторизації (наявного сертифікату користувача стандарту X.509).

До MolDynGrid під'єднано 9 ресурсних центрів із загальною кількістю ~2500 процесорних ядер: 1 – Інститут сцинтиляційних матеріалів НАНУ (ISMA); 2 – Київський національний університет імені Тараса Шевченка (KNU); 3 – Інститут харчової біотехнології та геноміки НАНУ (IFBG); 4 – Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ (IMBG); 5 – Головна астрономічна обсерваторія НАНУ (MAO); 6 – НТУУ “Київський політехнічний інститут” (KPI); 7 – Інститут кібернетики імені В.М. Глушкова НАНУ (ICYB); 8 – LRZ Linux Cluster (EGI) – обчислювальний центр імені Лейбніца при Академії наук Баварії; 9 – Федеративний “хмарний” ресурсний центр у Словаччині (EGI Federated Cloud) (рис. 3.6) [6-8, 10].

Рис. 3.5. Веб-портал віртуальної лабораторії MolDynGrid

Окрім автоматизації постановки задач в ґрид, особлива увага приділена й аналітичному блоку MolDynGrid.

Станом на сьогодні, у кожному пакеті для розрахунків молекулярної динаміки існує набір програм для аналізу траєкторій МД. До складу програмного пакету GROMACS 4 входять близько 80 аналітичних програм. Більшість аналітичних програм пакету GROMACS не підтримують масштабування і використовують лише одне ядро центрального процесора при розрахунках (`g_rms`, `g_rmsf`, `g_gyrate` та інш.). Аналітичні обчислення траєкторії молекулярної динаміки проводились послідовно, що не давало змогу використовувати всі вільні ресурси кластеру. Сформований нами підхід дає можливість провести розпаралелювання пакету однопроцесорних завдань для планувальнику PBS (Portable Batch System). Для цього впроваджено систему

автоматизації аналізу траєкторій МД засобами створеного нами скрипту – DAS (Distributed Analyzer Script), який апробовано локально на кластері IMBG [10, 12, 13] та на час написання дисертації впроваджується у веб-портал MolDynGrid [6-8]. Таким чином, користувач може автоматизувати цілий пакет одноядерних аналітичних програм, а не виконувати запуск програми для кожної задачі окремо. Даний підхід, як і автоматизація постановки задач МД, значно зменшує час науковця витрачений на процес підготовки до аналізу траєкторій МД.

Кластер IMBG використовується не лише для обчислювальних потреб локальних користувачів і віртуальної лабораторії MolDynGrid, але й для учасників інших віртуальних організацій Українського національного гріду із біомедичним напрямком досліджень: VO:ukraine, VO:dteam, VO:ops, VO:sysbio, VO:medgrid, VO:compuchemgridua, VO:matmoden [6, 8, 10].

3.2.2. Інтеграція віртуальної лабораторії MolDynGrid в Європейську грид-інфраструктуру. З 2011 року VO:moldyngrid зареєстрована на порталі EGI й офіційно стала частиною її інфраструктури. Це надало можливість міжнародної співпраці, за рахунок чого до VO:moldyngrid залучено п'ять науковців з країн Європейського Союзу.

З 2012 року прийнята участь у Virtual Team GPGPU (General-Purpose computation on Graphics Processing Units) в рамках проекту від EGI (https://wiki.egi.eu/wiki/VT_GPGPU). Проект виконувався під керівництвом Dr. John Walsh (TCD, Ірландія), метою якого було вивчення застосовності обчислень наукових задач на графічних прискорювачах (GPUs) в грид-середовищі. Було внесено ряд практичних пропозицій по реалізації обчислень молекулярної динаміки в програмних пакетах GROMACS і NAMD для системи планування задач при підтримці графічних процесорів nVidia Tesla (CUDA). Отриманий досвід робочої групи впроваджено у віртуальну лабораторію: MolDynGrid та WeNMR (A worldwide e-Infrastructure for NMR and structural biology, <https://www.wenmr.eu>). З 2015 року продовжується співпраця в рамках теми JRA2.4 Accelerated Computing (

Engage:TASK_JRA2.4_Accelerated_Computing) під керівництвом Dr. Marco Verlatо (INFN, Барі, Італія) в співробітництві з Dr. Viet Tran (IISAS, Словаччина). Робота виконується в рамках програми EGI-Engage (Horizon 2020 EU, грант № 654142). Метою групи в рамках цього проекту є впровадження розрахунків із використанням графічних прискорювачів в “хмару” EGI та апробація результатів для програмного забезпечення з обчислень молекулярної динаміки. Досвід роботи також впроваджено в віртуальну лабораторію MolDynGrid, що дало змогу надсилати задачі на обчислювальні ресурси EGI Federated Cloud із графічними прискорювачами (рис. 3.6).

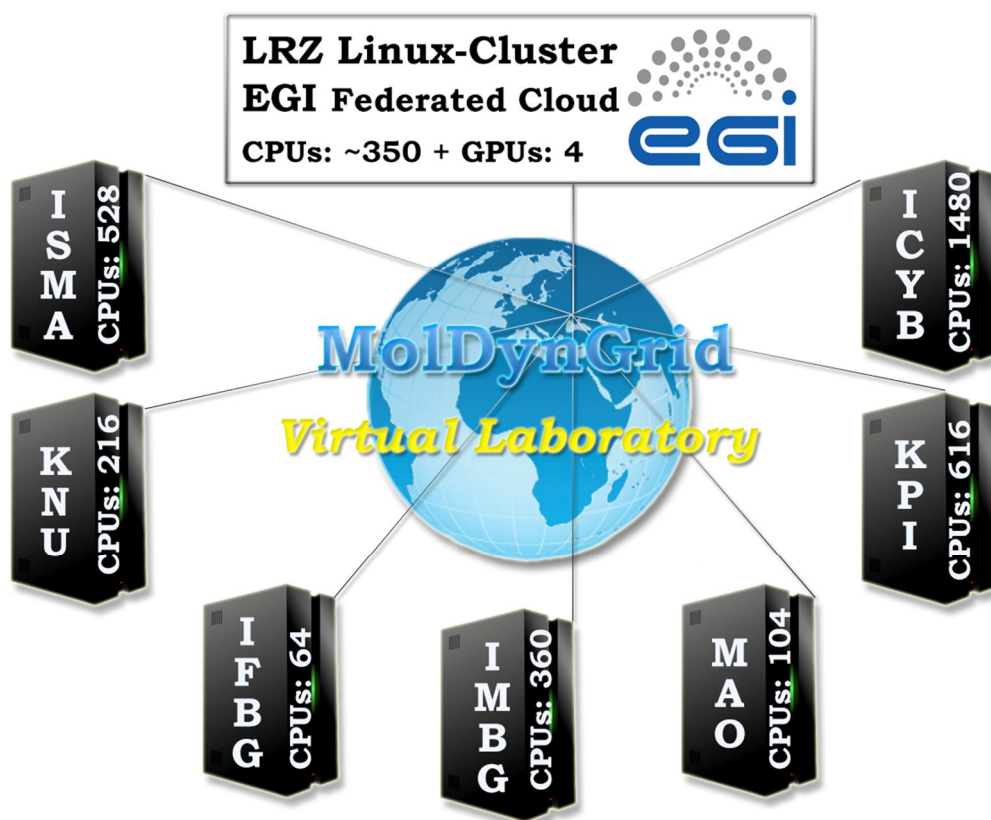


Рис. 3.6. Обчислювальні ресурси віртуальної лабораторії MolDynGrid. Станом на 2016 рік під'єднано 9 ресурсних центрів загальною кількістю ~2500 процесорних ядер, з яких 2 кластера належать до EGI: Leibniz-Rechenzentrum Linux-Cluster (Німеччина) та EGI Federated Cloud (федеративний “хмарний” ресурсний центр) з графічними прискорювачами

Завдяки міжнародній співпраці з EGI до віртуальної лабораторії MolDynGrid додано обчислювальні кластери: Leibniz-Rechenzentrum LRZ Linux-Cluster (Німеччина) та федеративний “хмарний” ресурсний центр (EGI GPGPU Federated Cloud) в Словаччині. Це дало змогу виконувати комп’ютерні розрахунки не тільки в Українській національній гід-інфраструктурі, а й залучити обчислювальні центри країн Європейського Союзу, що значно зменшує час розрахунків.

Підсумки:

1. Сформовано критерії застосування наявних програмних засобів і методик комп’ютерного моделювання та аналізу біологічних систем.
2. Проведено апаратну модернізацію та оновлено програмну інфраструктуру кластера IMBG, що дає можливість отримувати траєкторії МД з відносно великими часовими інтервалами, зберігати та аналізувати траєкторії молекулярної динаміки біополімерів у водно-іонному оточенні.
3. Для автоматизації постановки задач та аналізу траєкторій МД створено віртуальну лабораторію MolDynGrid, яку інтегровано в Український національний гід (UNG) та Європейську гід-інфраструктуру (EGI), що дало змогу задіяти більше обчислювальних ресурсних центрів та підвищити продуктивність розрахунків.
4. Розроблено скрипт автоматизації аналізу траєкторій молекулярної динаміки – DAS (Distributed Analyzer Script), який адаптовано для роботи на високопродуктивних кластерних системах під керуванням PBS TORQUE з ефективним використанням обчислювальних ресурсів, що суттєво зменшує об’єм рутинної роботи дослідника.

За матеріалами даного дослідження опубліковано статті:

1. MolDynGrid virtual laboratory as a part of Ukrainian Academic Grid infrastructure / Salnikov A. O., Sliusar I. A., Sudakov O. O., Savytskyi O. V. and Kornelyuk A. I. // *Proceedings of the 5th IEEE International Workshop on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications, IDAACS 2009*. — 2009. — V. 1, — P. 237-240. (Особистий внесок здобувача: аналіз засобів з автоматизації методу МД *in silico*, обробки та зберігання траєкторій; запропоновано концепцію графічного інтерфейсу блоків веб-порталу віртуальної лабораторії MolDynGrid)

2. Virtual laboratory MolDynGrid as a part of scientific infrastructure for biomolecular simulations / Salnikov A., Sliusar I., Sudakov O., Savytskyi O. and Kornelyuk A. // *International Journal of Computing*. — 2010. — V. 9, N 4. — P. 294-300. (Особистий внесок здобувача: запропоновано структуру блоків веб-порталу, апробація впровадженої системи автоматизації постановки завдань та інших модулів веб-порталу і застосунку *moldynsub_CLI*; аналіз ефективності мережевого інтерконекту *Infiniband* для задач в *GROMACS*, результати якого впроваджено на кластері ІМБіГ; залучення обчислювальних ресурсних центрів для MolDynGrid)

3. The integrated environment of virtual laboratory moldyngrid for calculation of molecular dynamics of biopolymers / Salnikov A., Sudakov O., Savytskyi O., Sliusar I. and Kornelyuk A. // *Medical informatics and engineering*. — 2010. — V. 1, — P. 24-32. (Особистий внесок здобувача: наповнення бази даних траєкторій МД, концепція графічного веб-інтерфейсу; залучення обчислювальних ресурсів для реплікованого зберігання траєкторій, підготовка роботи до друку)

4. Integrated tools for molecular dynamics simulation data analysis in the MolDynGrid virtual laboratory / Savytskyi O.V., Sliusar I.A., Yesylevskyy S.O., Stirenko S.G. and Kornelyuk A.I. // *Proceedings of the 6-th IEEE International Conference on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems:*

Technology and Applications, IDAACS 2011. — 2011. — V. 1, — P. 209-211. (Особистий внесок здобувача: аналіз засобів з аналізу траєкторій МД та її автоматизації; створення застосунку автоматизації аналізу траєкторій – DAS; оновлення апаратної інфраструктури кластера ІМБіГ; залучення обчислювальних ресурсів з графічними прискорювачами для розрахунку МД, підготовка роботи до друку)

5. PTI-1: novel way to oncogenicity / Vislovukh A. A., Shalak V. F., Savytskyi O. V., Kovalenko N. I., Gralievskaya N. L., Negrutskii B. S. and El'skaya A. V. // *Biorolym. Cell.* — 2012. — V. 28, N 5. — P. 404-410. (Особистий внесок здобувача: впровадження й адаптація алгоритмів програмного пакету *Modeller 9v8* для їх ефективного використання на обчислювальному кластері ІМБіГ; апробація розпаралелювання методу молекулярного моделювання на прикладі невеликого протеїну – онкогену *PTI-1*, що може кодувати вкорочену форму фактора елонгації *eEF1A*)

3.3. Дослідження молекулярної динаміки *HsTyrRS* у вільному стані

Детальне вивчення молекулярної динаміки *HsTyrRS* є актуальним, оскільки дозволяє зрозуміти молекулярні механізми функціонування фермента та може сприяти кращому розумінню механізмів патогенезу його мутантних форм, що призводять до нейродегенеративних захворювань [32, 126].

3.3.1. Дослідження *HsTyrRS* методом ієрархічних обертань. Метод ієрархічних обертань (HIEROT) було застосовано для знаходження можливих компактних структур тирозил-тРНК синтетази людини при відсутності субстратів. Для розрахунків використано 10 структур повнорозмірної *HsTyrRS*, які були отримані шляхом молекулярного моделювання з різною конформацією міжмодульного лінкера (рис. 3.2). Для кожної з отриманих структур проведено

20 незалежних розрахунків методом HIEROT. Виявлено інтерфейси зв'язування між С- і N-кінцевими модулями *HsTyrRS*, для аналізу яких нами розроблено методику класифікації інтерфейсів на основі кластеризації. Класифікація інтерфейсів проводилася за алгоритмом, який детально описано у роботах [9, 197, 198].

У результаті всі отримані траєкторії розділено на кластери, що мають більш ніж 20% однакових контактів між С-кінцевими модулями та димером N-кінцевих модулів *HsTyrRS*. Траєкторії з одного кластеру мають інтерфейси між доменами одного і того ж типу, тоді як траєкторії з різних кластерів мають інтерфейси суттєво різних типів. За допомогою статистичного та кластерного аналізу для 400 розрахованих інтерфейсів було виявлено декілька ділянок на молекулярній поверхні для обох модулів синтетази, які містять амінокислотні залишки з високою імовірністю формування міждоменних контактів P_c . Встановлено існування достатньо великої ділянки зв'язування на поверхні С-кінцевого модуля, що містить залишки з $P_c > 45\%$ (Phe445 – Phe448, Glu489 – Lys496, Gln504 – Gln507, Lys523, Asp526). Залишки N-кінцевого модуля є більш гетерогенними по імовірності зв'язування. Головна ділянка зв'язування на N-кінцевому модулі містить амінокислотні залишки від Tyr79 – Leu89. Залишок Trp87 є центром цієї ділянки і має найбільше значення P_c (55%) у всьому N-кінцевому модулі. Друга ділянка зв'язування містить залишки Pro200 – Tyr204 та має значення P_c – 40%. Остання ділянка зв'язування містить амінокислотні залишки Lys335, Ser338 та Ala339 зі значеннями P_c – 41% (рис. 3.7) [9].

Для підтвердження найбільш імовірного інтерфейсу при компактизації структури *TyrRS* застосовано метод моделювання молекулярної динаміки.

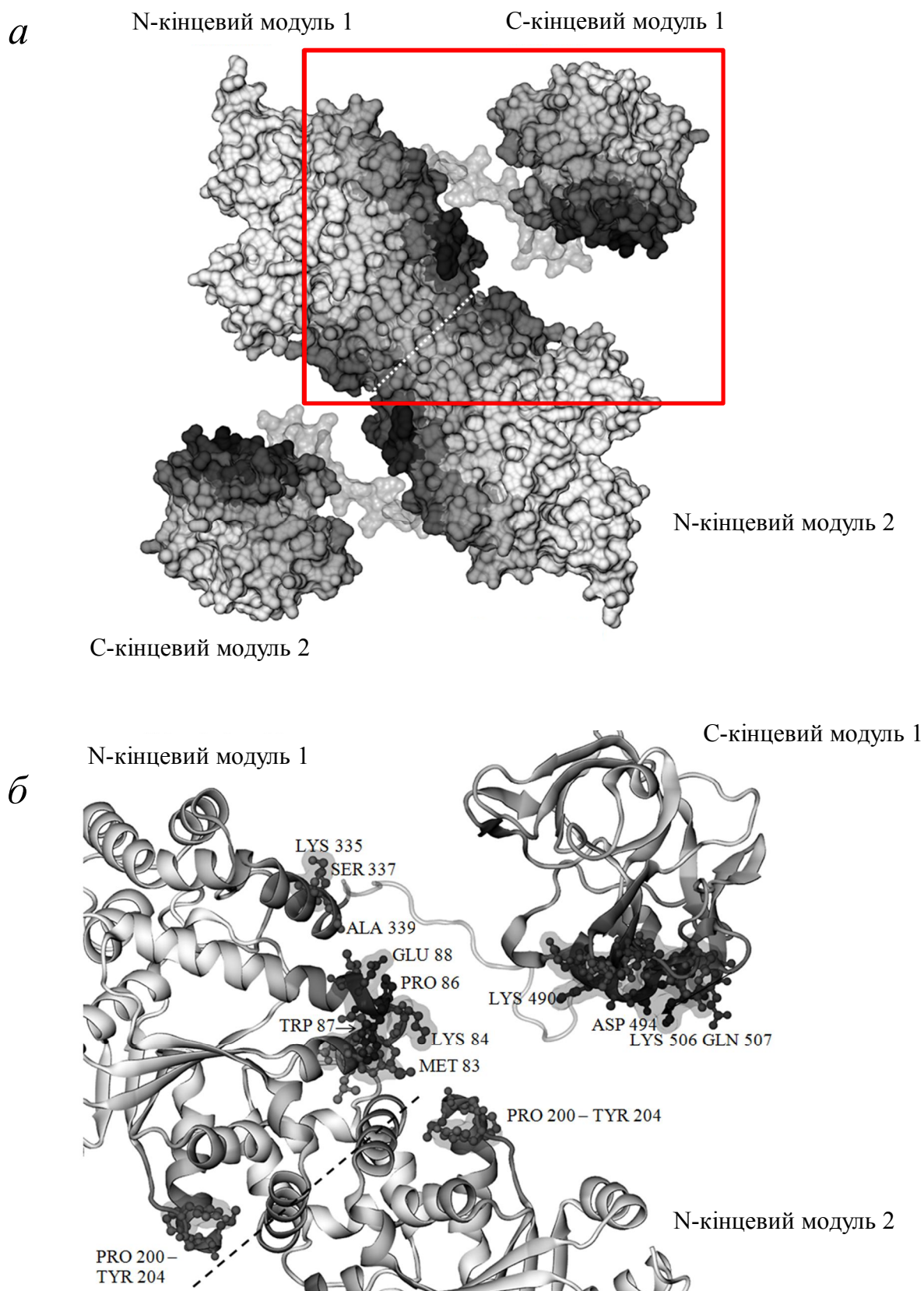


Рис. 3.7. (*a*) – загальний вигляд молекулярної поверхні *HsTyrRS* з відображенням трьох окремих зон взаємодії; (*б*) – деталізація контактів міжмодульних взаємодій для виділеної ділянки у вигляді вторинної структури [9]

3.3.2. Моделювання молекулярної динаміки *HsTyrRS*. Проведено розрахунки молекулярної динаміки *HsTyrRS* у водно-іонному оточенні в часовому інтервалі 100 нс. Для отриманих траєкторій МД *HsTyrRS* проаналізовано середньоквадратичні відхилення (RMSD) за Ca атомами (рис. 3.8). Значення RMSD стабілізуються через 40 нс у всіх траєкторіях, проте амплітуда їх коливань досить сильно відрізняється зарахунок різної конформації міжмодульного лінкера в процесі динаміки. Оскільки значення RMSD суттєво не збільшуються після 40 нс у всіх траєкторіях, останні 60 нс траєкторій було розглянуто як врівноважені та використано для подальшого аналізу.

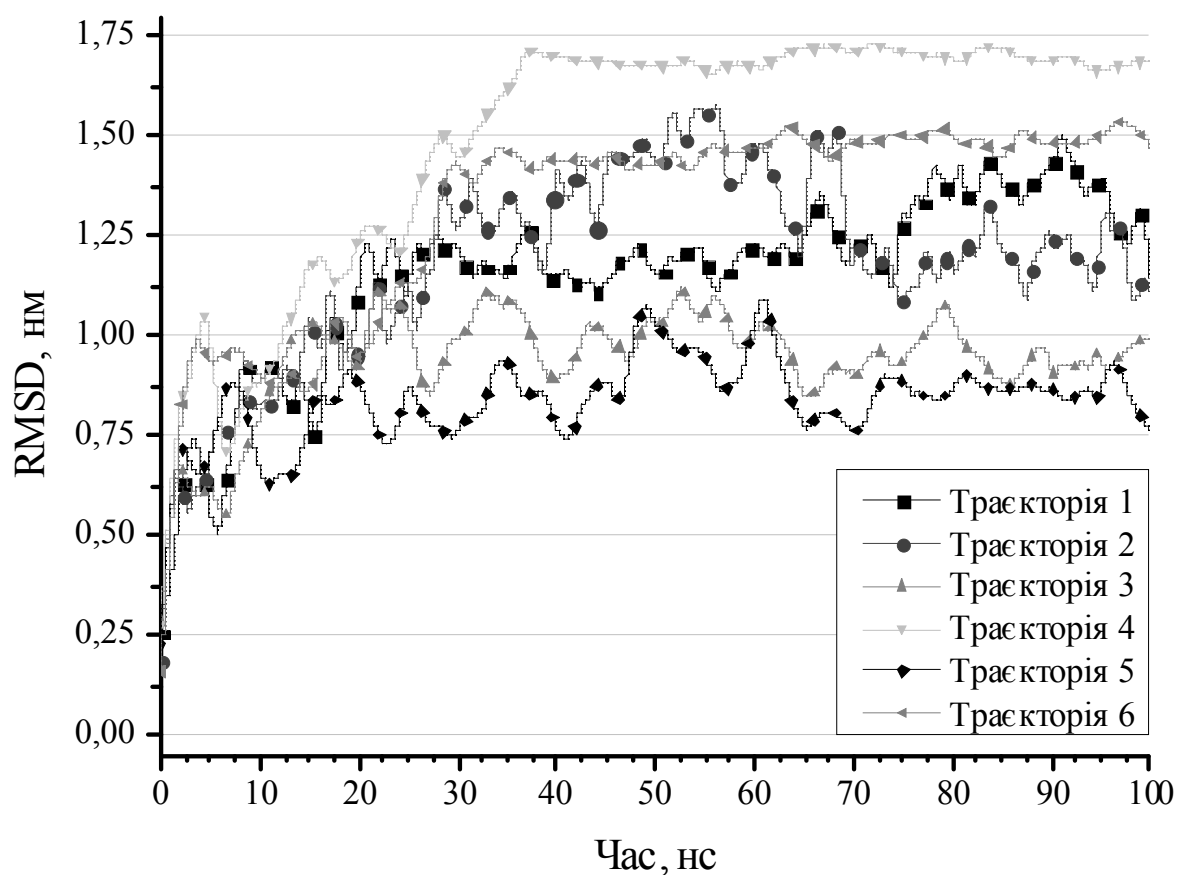


Рис. 3.8. Середньоквадратичні відхилення (RMSD) за Ca атомами для шести траєкторій молекулярної динаміки повнорозмірної *HsTyrRS*. Перші 40 нс відповідають періоду релаксації

Траєкторії 4 і 6 показують досить високі значення RMSD відносно інших траєкторій, що досягають 1,7 і 1,5 нм, відповідно. Це пояснюється наявністю гнучкого міжмодульного лінкера довжиною в 17 а.з., що може призводити до різної просторової локалізації С-модуля відносно N-кінцевого модуля.

Аналіз всіх траєкторій молекулярної динаміки показує формування компактних структур, в яких С-модулі взаємодіють з димером N-модулів, екрануючи їх. Існує виражена асиметрія у зв'язуванні С-модулів, що пояснюється їх незалежними конформаційними рухами в кожному мономері фермента (рис. 3.9).

На жаль, класичний підхід у розрахунках середньоквадратичних флуктуацій (RMSF, Root Mean Square Fluctuation) є досить статичним методом, що не відображає динамічні аспекти відхилень із врахуванням змін у часі. Даний метод було модифіковано і впроваджено у бібліотеку програмного засобу PTEROS [10, 199]. Карти tRMSF (time-resolved Root Mean Square Fluctuation) для трьох обраних траєкторій молекулярної динаміки показані на рис. 3.10. Вертикальні лінії на цих картах відповідають змінам середньоквадратичних флуктуацій окремих амінокислотних залишків у часовому інтервалі 200 пс, а зміни кольору уздовж цих ліній вказують на ступінь рухливості (темніше – більше).

Для підтвердження асиметрії зв'язування проаналізовано енергії зв'язування між кожним С-модулем та димером N-модулів (рис. 3.11). Найнижчі значення енергій (нижче – краще) на рівні -1000 кДж/моль спостерігаються при взаємодії N-кінцевих модулів із С2-модулем траєкторії 1 та при взаємодії N-кінцевих модулів з С1-модулем для траєкторії 6.

Незважаючи на те, що явного інтерфейсу взаємодії між С- і N-кінцевим модулями не було виявлено, все ж для однієї групи амінокислотних залишків спостерігалась деяка перевага у зв'язуванні частіше, ніж для іншої. Було розраховано імовірність формування контактів з урахуванням кожного амінокислотного залишку С- і N-кінцевих модулів.

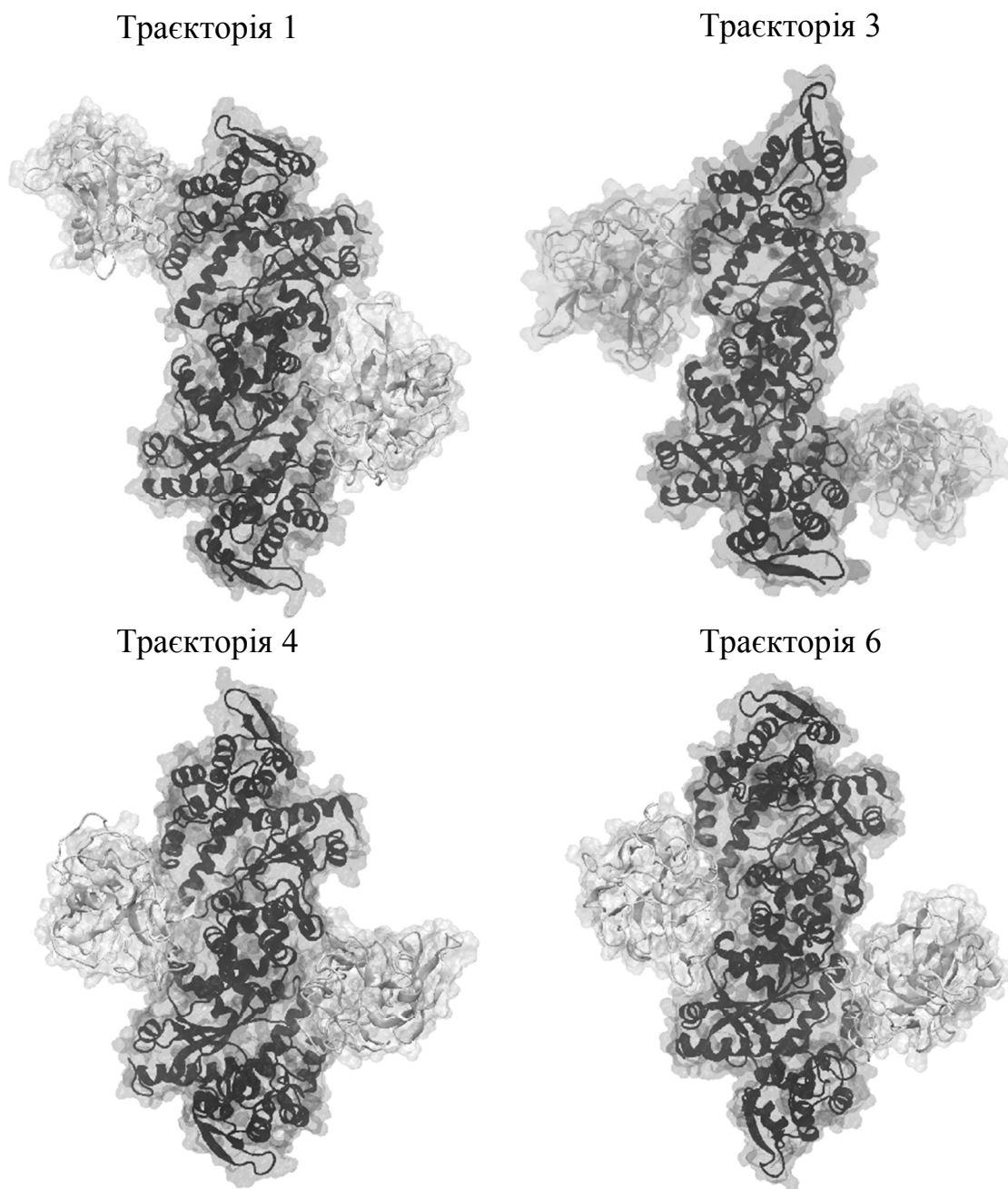


Рис. 3.9. Компактизовані стани структури *HsTyrRS*, отримані в процесі молекулярної динаміки у траєкторіях 100 нс. Димери N-модулів відображено чорним кольором, С-модулі – сірим. Структуру протеїна представлено у вигляді відображення за вторинними елементами з прозорою молекулярною поверхнею. Зафіксовано різні положення С-модулів відносно N-модулів

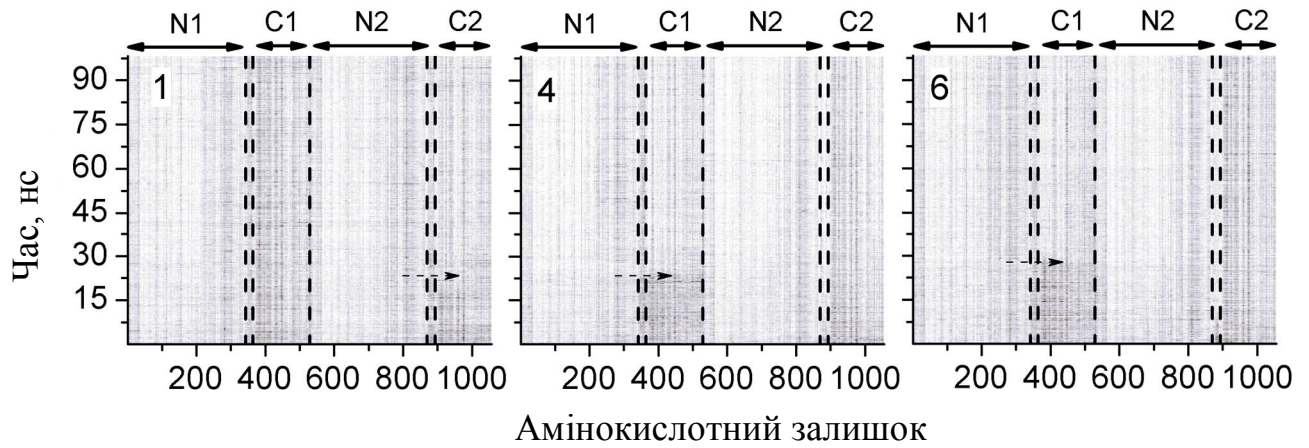


Рис. 3.10. tRMSF-аналіз (середньоквадратичні флуктуації в часовому інтервалі) для траєкторій 1, 4 та 6 молекулярної динаміки. Чорному кольору відповідають найвищі показники флуктуацій, білому – найнижчі. Пунктирні лінії показують межі N- і C-модулів. Стрілки показують різке зменшення рухливості другого C-модуля 1 траєкторії та першого C-модуля в траєкторіях 4 і 6

Кластеризаційний аналіз 12 інтерфейсів (по 2 інтерфейси з C-модулем у кожній траєкторії) показали чотири різних типи інтерфейсів, які мають спільними більше 40% контактів між залишками. На рис. 3.12 показано кожен тип інтерфейсів в залежності від спільних залишків між N- і C-модулями.

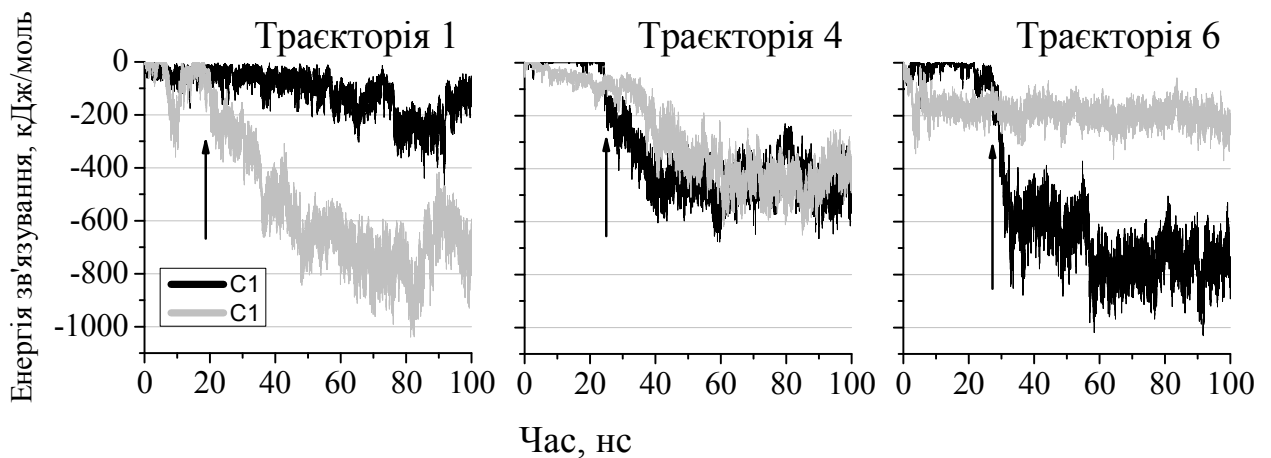


Рис. 3.11. Енергії зв'язування C-модулів з димером N-модулів для трьох обраних траєкторій молекулярної динаміки

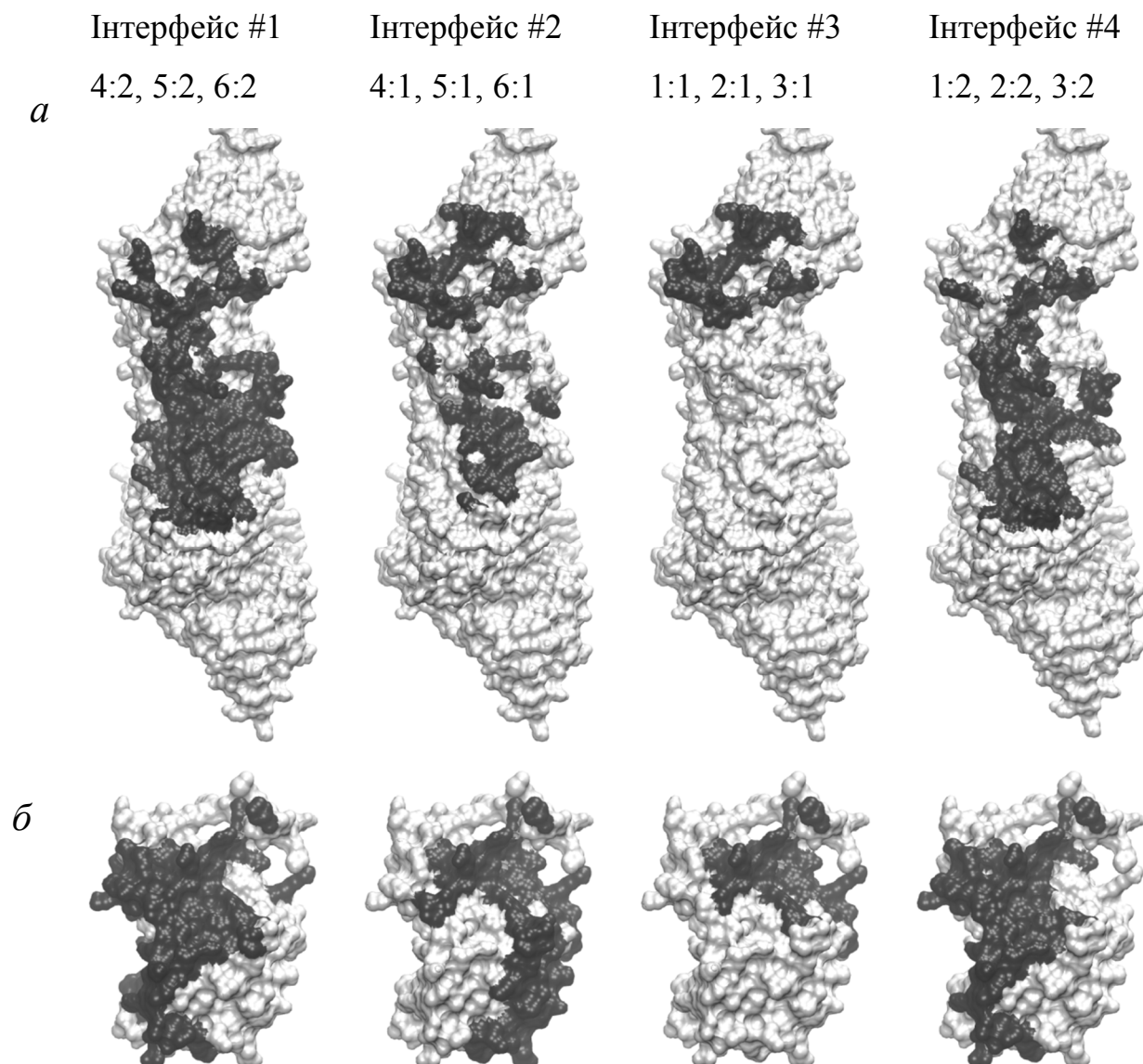


Рис. 3.12. Типи інтерфейсів, виявлених за результатами кластерного аналізу. Для кожної групи залишків, які утворюють контактний інтерфейс, представлено у чорному забарвленні на димері N-модулів (*a*) і на С-модулі (*б*). С-модулі представлені в іншому масштабі для кращого відображення

На рисунках 3.13 і 3.14 показано порівняння значень P_c (імовірність контактів), отриманих із траєкторій молекулярної динаміки, та з урахуванням досліджень ієрархічних обертань методом HIEROT.

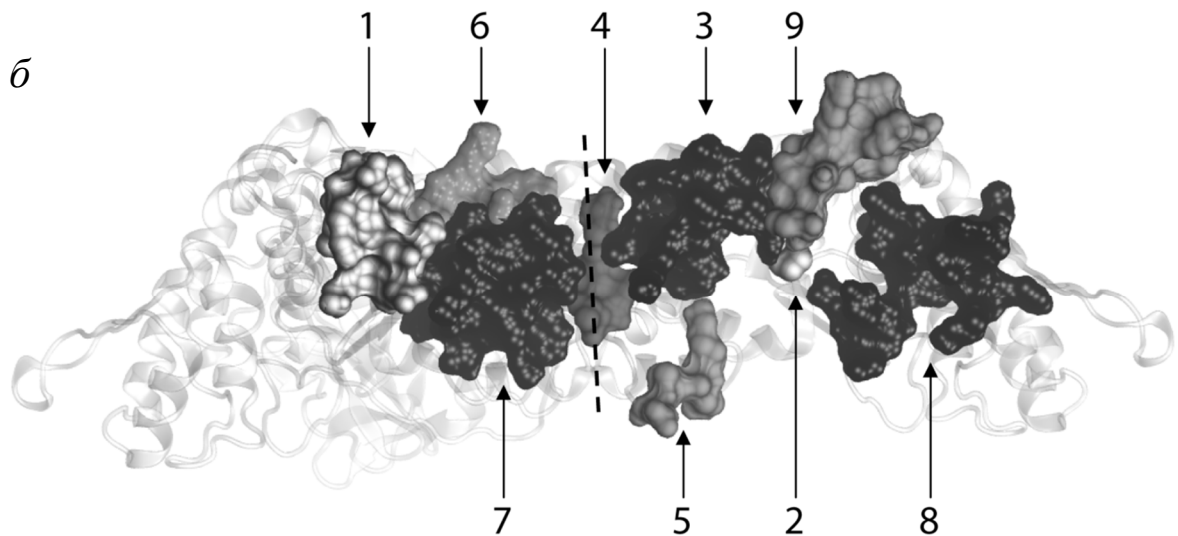
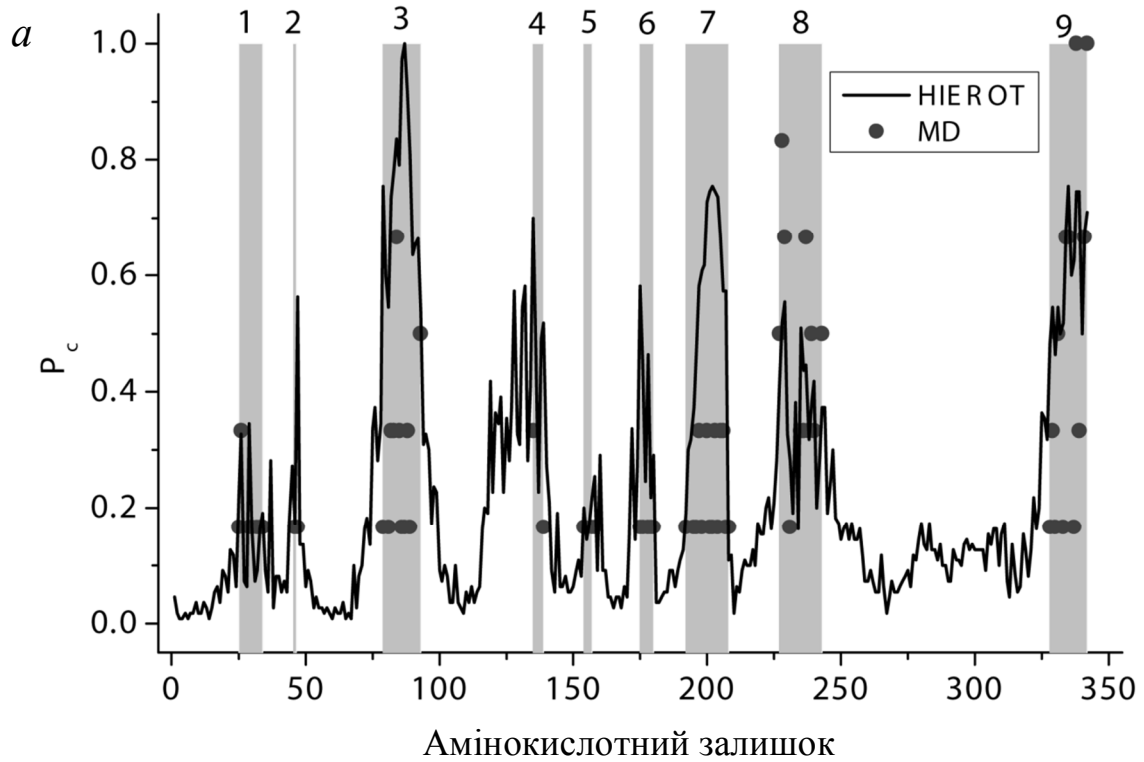


Рис. 3.13. Імовірність (P_c) формування контактів, отриманих методами молекулярної динаміки і HIEROT для N-модуля тирозил-тРНК синтетази – (а); (б) – положення ділянок зв'язування на поверхні димера N-модулів. Пунктирна лінія показує орієнтовне положення інтерфейсу димеризації. Привілейовані регіони відмічено і позначено цифрами

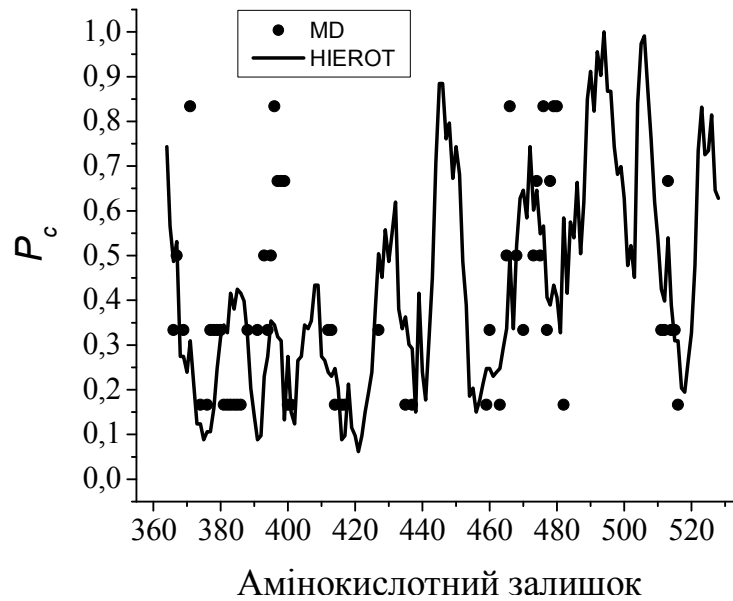


Рис. 3.14. Імовірність (P_c) формування контактів, отриманих методами молекулярної динаміки і HIEROT для С-модулів

3.3.3. Аналіз стану цитокінового ELR-мотиву в *HsTyrRS*. Дані молекулярної динаміки *HsTyrRS* проаналізовано на наявність водневих зв'язків між цитокіновим ELR-мотивом (залишки E91 – R93 N-модуля) і С-модулем (залишки D343 – S528). Встановлено, що ELR-мотив утворює водневі зв'язки в трьох із шести траєкторій МД. Водневі зв'язки між залишками R93 і Q476 другого мономера, що відносяться до N- і С-кінцевих модулів відповідно, були присутні протягом 32% часу молекулярної динаміки. В структурі синтетази, що відповідає траєкторії 4, водневі зв'язки були сформовані між залишками R93 і E473 другого мономера протягом 34% часу. В структурі траєкторії 6 водневі зв'язки існували до 46% часу (27% у першому мономері та 19% у другому мономері) між залишками R93 і Q476, E479. Зміну кількості водневих зв'язків у структурах для 3 обраних траєкторій показано на рис. 3.15, а формування водневих зв'язків в структурі повнорозмірного димера між ELR-мотивом і С-модулем візуалізовано на рис. 3.16.

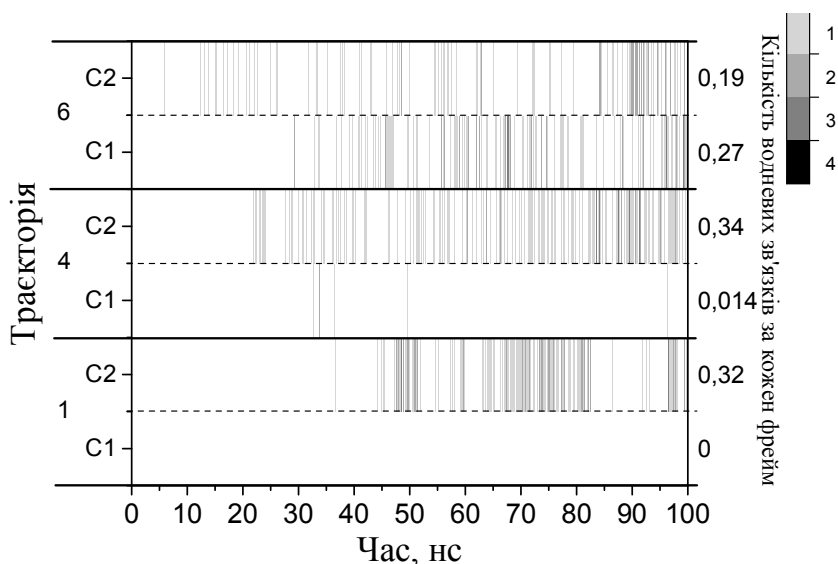


Рис. 3.15. Еволюція водневих зв'язків між ELR-мотивом (залишки E91 – R93 в кожному з мономерів) і поверхнею окремих С-модулів з урахуванням міжмодульного лінкера (залишки D343 – S528). Номери траекторій і С-модулів показані на рисунку зліва. Число водневих зв'язків у кадрі показано у підписі до рисунку справа. Колірний код відповідає числу водневих зв'язків у кожному кадрі траекторії

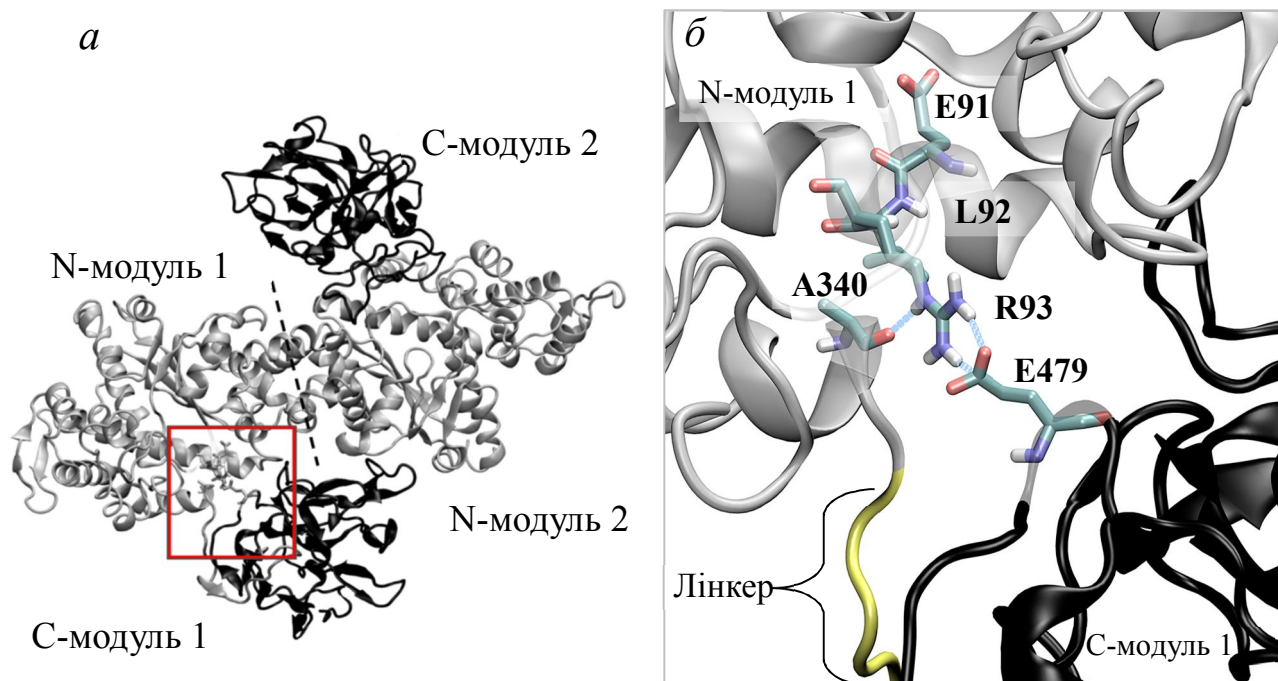


Рис. 3.16. Конфігурація водневих зв'язків між ELR-мотивом N-модуля і С-модулем в *HsTyrRS* (траекторія 6, конформація при 96 нс): (а) – повнорозмірна структура димера *HsTyrRS*; (б) – ділянки взаємодії цитокінового ELR мотиву. N-модулі зображено сірим кольором, С-модулі – чорним

Підсумки:

1. Аналіз даних молекулярної динаміки повнорозмірної *HsTyrRS* показав, що зв'язування С-модулів по відношенню до каталітичних модулів *TyrRS* є асиметричним з точки зору утворення інтерфейсів. Сильне зв'язування одного з С-модулів призводить до різкого зниження його внутрішньої мобільності, при цьому другий С-модуль залишається відносно рухливим. Виявлено чіткі “гарячі регіони” інтерфейсів на поверхні N-модуля *TyrRS* (Tyr79-Leu89, Pro200-Tyr204; Lys335, Ser338; Ala339). Ці контактні регіони між доменами в *HsTyrRS* мають високу ступінь кореляції у порівнянні з крупнозернистим моделюванням *HIEROT*, проведеним у попередніх дослідженнях.

2. Вперше показано формування водневих зв'язків між залишком Arg93 цитокінового ELR-мотиву і залишками Ala340 і Glu479 С-модуля, та екранування ELR-мотива, теоретично передбачене Шиммелем. Отримані дані МД підтверджують гіпотезу про те, що повнорозмірна *HsTyrRS* позбавлена цитокінової активності за рахунок прямих взаємодій між N- та С-кінцевим модулями, які призводять до екранування цитокінового ELR-мотива у компактній структурі.

За матеріалами даного дослідження опубліковано публікації:

1. Interdomain compactization in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by the hierarchical rotations technique / Yesylevskyy S. O., Savytskyi O. V., Odynets K. A. and Kornelyuk A. I. // *Biophysical Chemistry*. — 2011. — V. 154, N 2-3. — P. 90-98. (Особистий внесок здобувача: огляд літератури; побудова, аналіз, відбір кращих структурних моделей; підготовка структур для використання методу *HIEROT*; обговорення результатів зі співавторами та підготовка роботи до друку)

2. Asymmetric structure and domain binding interfaces of human tyrosyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations / Savytskyi O. V., Yesylevskyy S. O. and Kornelyuk A. I. // *J Mol Recognit.* — 2013. — V. 26, N 2. — P. 113-20. (Особистий внесок здобувача: огляд літератури; відбір кращої змодельованої структури HsTyrRS для методу МД; підготовка структур для використання методу МД; підбір параметрів МД, розрахунки МД в грід-середовищі; запропоновано і апробовано метод *tRMSF* для бібліотеки *PTEROS*, аналіз траєкторій МД, опис міжмодульних взаємодій; співставлення даних з методом *HIEROT*, обговорення результатів зі співавторами)

3. Domain binding interfaces in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by the hierot technique and molecular dynamics simulations / Savytskyi O.V., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk O.I. // *Proceedings of the eSSSENCE International Workshop on "Macromolecular Structure and Dynamics"*, 3-5 June 2013, BMC, Uppsala, Sweden. — 2013. — V. 1, — P. 12. (Особистий внесок здобувача: розрахунки МД в грід-середовищі, опис міжмодульних взаємодій, співставлення даних з методом *HIEROT*, обговорення результатів зі співавторами та підготовка роботи до друку)

4. Conformational changes in human tyrosyl-tRNA synthetase studied in the moldyngrid virtual laboratory / Savytskyi O.V., Sliusar I.A., Salnikov A.O., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk A.I. // *Proceedings of the International Conference "NORDUGRID-2013: Distributed systems and Big Data – towards new horizons"*, 4-6 June 2013, Šiauliai, Lithuania. — 2014. — V. 1, — P. 20-21. (Особистий внесок здобувача: розрахунки МД в грід-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)

5. Conformational flexibility and domain binding interfaces in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations / Savytskyi O.V., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk O.I. // *FEBS JOURNAL.* — 2014. — V. 281, — P. 621. (Особистий внесок здобувача: розрахунки МД в грід-середовищі, аналіз траєкторій та опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)

3.4. Комп'ютерне моделювання просторових структур мутантних форм *HsTyrRS* пов'язаних з нейропатією DI-CMTC

Оскільки структурні координати мутантних форм *HsTyrRS*, пов'язаних з нейропатією DI-CMTC, досі невідомі, тому для отримання їх структурних моделей було застосовано метод молекулярного моделювання (рис. 3.17).

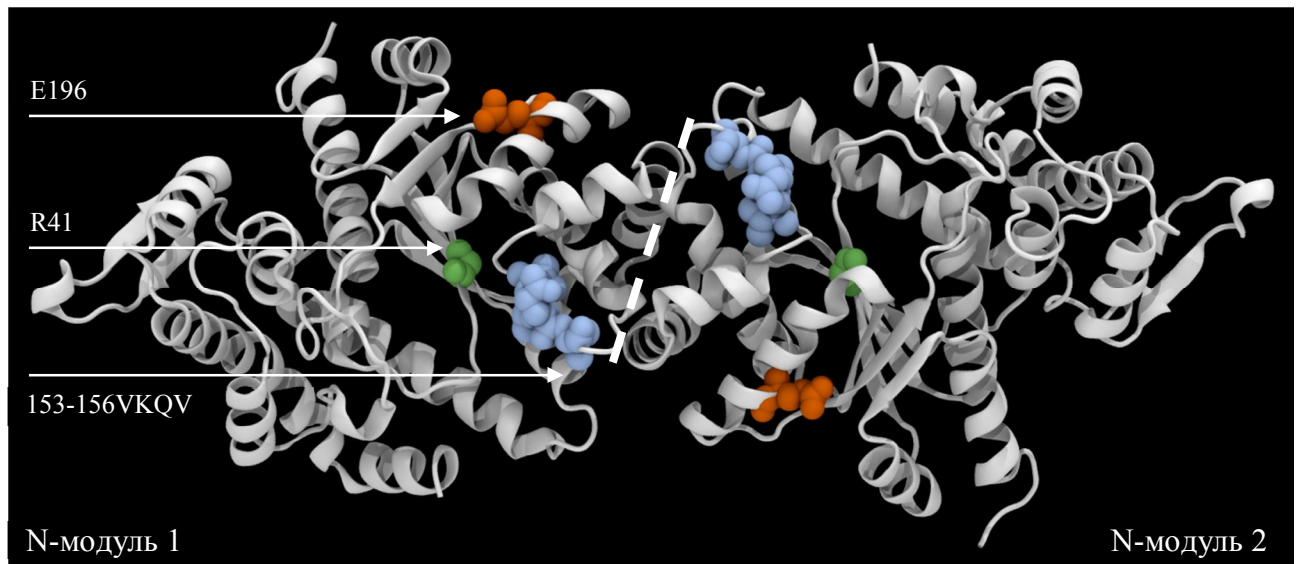


Рис. 3.17. Розташування амінокислотних залишків R41, E196, 153-156VKQV в структурі димера каталітичних N-кінцевих модулів *HsTyrRS*

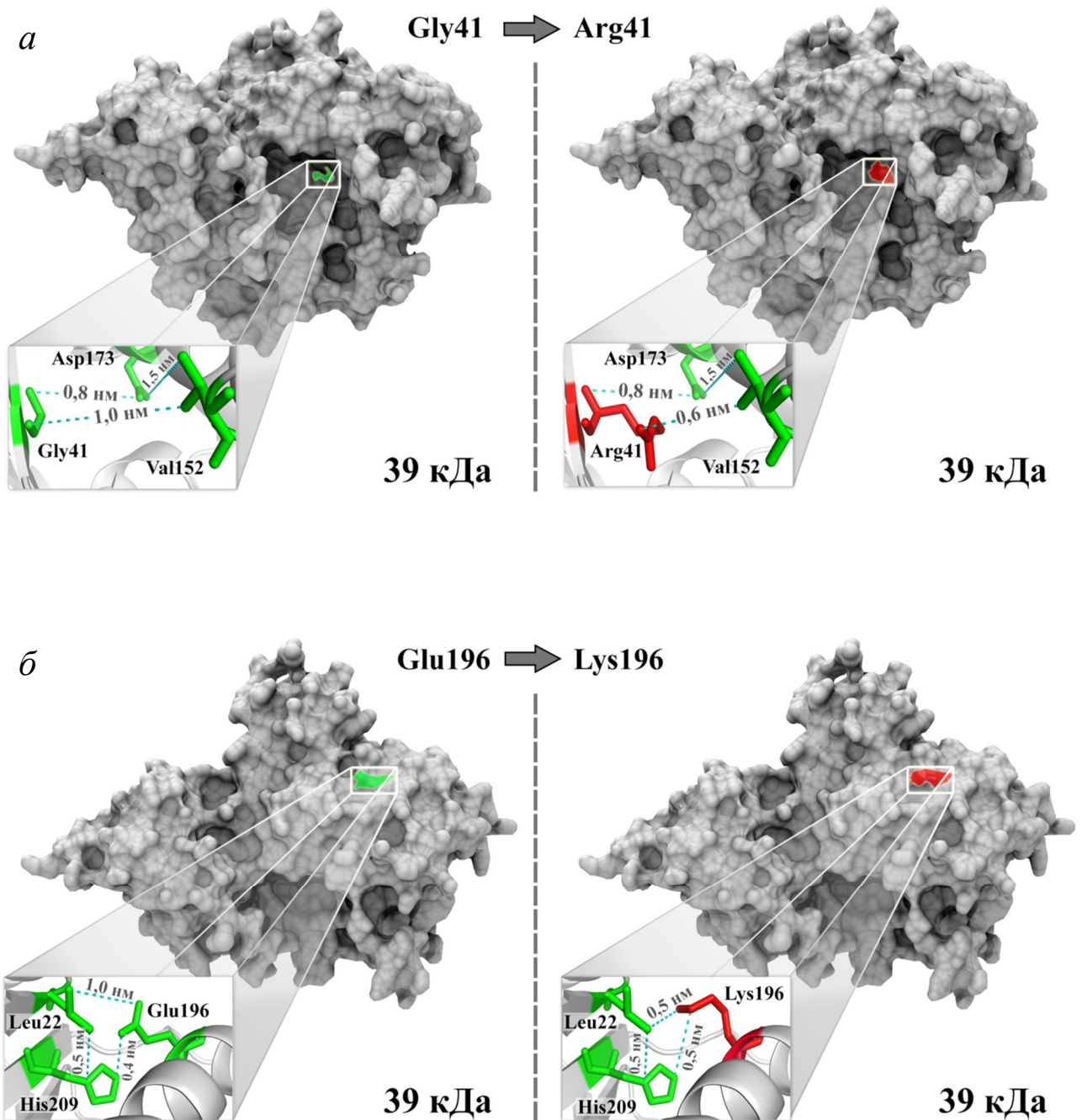
Аналіз вирівнювання послідовностей з відображенням консервативних амінокислотних залишків показано у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей для оточення трьох зазначених мутацій DI-CMTC [205]

TyrRS	G41R	del153-156VKQV	E196K
<i>H. sapiens</i>	YWG T	V V KQ VE	A E KYLP
<i>B. taurus</i>	YWG T	V V KQ VE	S E KYLP
<i>D. melanogaster</i>	YWG T	V V KQ VE	S E KYLP
<i>C. elegans</i>	YWG T	V V KQ VE	A E EQLP
<i>S. cerevisiae</i>	YWG T	V V KQ V A	A E ENLP
<i>N. crassa</i>	YWG T	V V KQ V D	AKDWLP
<i>M. jannaschii</i>	Y I G F	IAREDE	ARELLP
<i>B. tearothermophilus</i>	Y C G F	QSRIET	GLELIR

3.4.1. Комп'ютерний мутагенез *Hs*TyrRS (G41R, E196K, del153-156VKQV). Для проведення комп'ютерного мутагенезу *in silico* була використана змодельована повнорозмірна субодиниця тирозил-тРНК синтетази. Мутацію виконано для обох субодиниць синтетази. Для відображення локалізації мутацій наведено зображення одного з N-кінцевих каталітичних доменів структури (рис. 3.18).



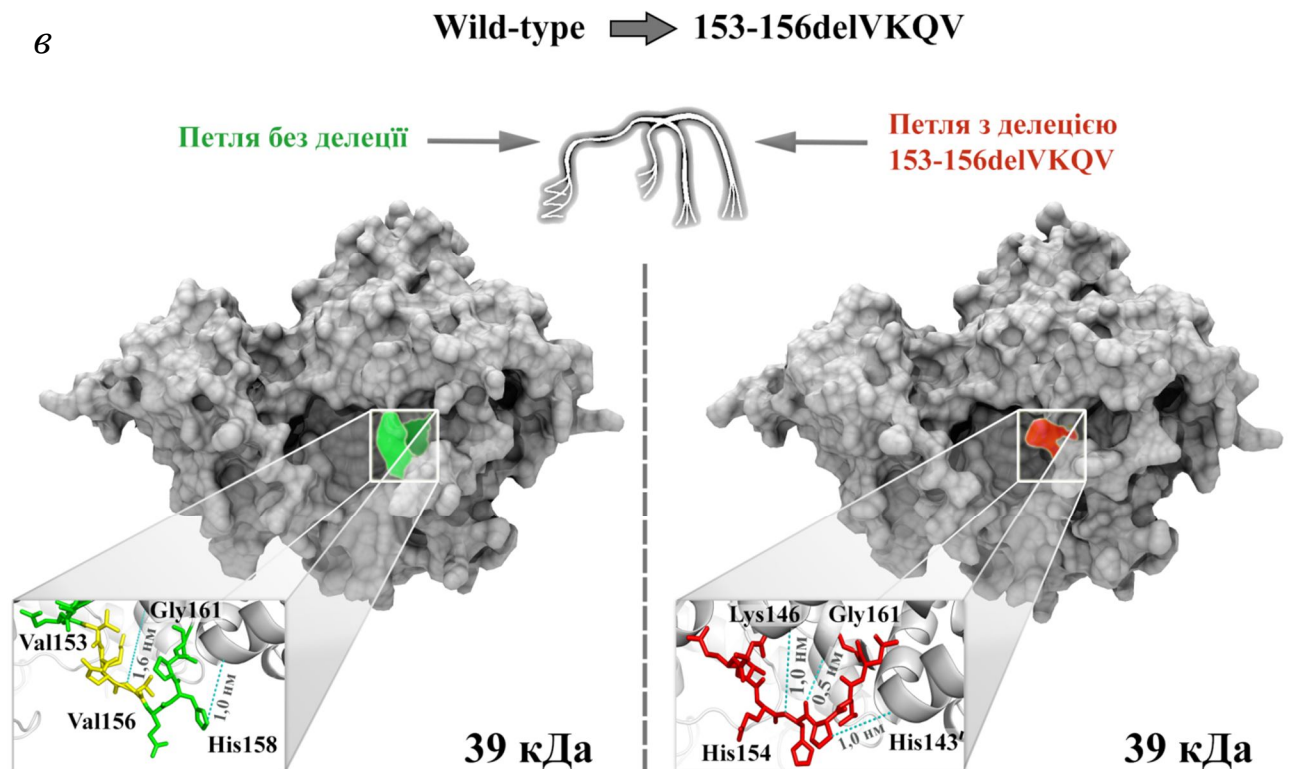


Рис. 3.18. Комп'ютерний мутагенез тирозил-тРНК синтетази людини: (а) – локалізація сайту мутації G41R; (б) – локалізація сайту мутації E196K; (в) – локалізація сайту мутації 153-156delVKQV

Мутантна форма G41R. В активному центрі TyrRS амінокислотний залишок Gly41 локалізований на кінці β -тяжу A1 та належить до найбільш еволюційно-консервативних залишків TyrRS. Внаслідок мутації G41R аргінін має набагато більший розмір, ніж гліцин, до того ж його гуанідинова група є позитивно зарядженою (рис. 3.18а). Тому досить несподіваним є те, що мутація Gly41Arg взагалі сумісна зі стабільною структурою TyrRS. У радіусі 0,5 нм від амінокислотного залишка Gly41 знаходяться атоми шести залишків (39-YW, 42-TA, L72 і F183), з якими Gly41 не утворює водневих зв'язків. В радіусі 0,7 нм від Gly41 знаходяться 17 переважно гідрофобних залишків, з яких п'ять є ароматичними. Залишок Gly41 розташований в кишені, яка сформована залишками W40, T42, A43 і Q188 та має досить значну площу поверхні, яка

доступна для розчинника. Заміна залишку Gly41 на аргінін показала, що в радіусі 0,5 нм від залишку Arg41 знаходяться 11 амінокислотних залишків: 39-YW, 42-TA, L72, A74, Y166, Q170, 182-QF, Q188.

Мутантна форма E196K. Точкова мутація E196K локалізована в каталітичному домені H12 спіралі (Arg189-Tyr198). У радіусі 0,5 нм від амінокислотного залишка Glu196 знаходяться атоми 13 залишків (22-LG, 192-FTFA, 197-KYLP, 206-KR, 209H), а у радіусі 0,7 нм від Glu196 знаходиться 23 залишки (22-LG, A171, E174, 189-RKIFTFA, 197-KYLPA, 204-YSKRVH, M211). Мутація розташована на поверхні молекулярної глобули, що має можливість значного доступу для розчинника та міжмолекулярних взаємодій. Заміна залишку Glu196 на позитивно заряджений лізин показала, що в радіусі 0,5 нм від залишку Lys196 знаходяться 13 амінокислотних залишків: 22-LG, 192-FTFA, 197-KYLP, 206-KR, 209H. (рис. 3.18б)

Мутантна форма 153-156delVKQV. *De novo* мутація del153-156VKQV локалізована в ділянці з'єднувального поліпептиду 1 (Connecting Peptide 1, CP1) згортки Россмана. Послідовність амінокислотних залишків Val153–His158 між α -спіралями H9 і H10 належить до частково невпорядкованої ділянки в каталітичному домені TyrRS, яка розташована на її поверхні біля інтерфейсу димеризації (рис. 3.18в). Цей сегмент є частиною специфічного елемента для впізнавання акцепторного стебла тРНК^{Tyr} (Odynets & Kornelyuk, 2007; Wakasugi, Quinn, Tao, & Schimmel, 1998; Yang et al., 2002). Мутація 153-156delVKQV практично збігається з цією ділянкою, і при делеції цих залишків, відбувається скорочення довжини петлі з 12 до 8 а.з. Ділянка має певну консервативність амінокислотних послідовностей, гомологічних до TyrRS евкаріотів, але не архебактерій.

У радіусі 0,5 нм від амінокислотних залишків петлі Val152–Glu157 знаходяться атоми 13 залишків (77H, 81D, 149-GAE, 158-HPL, 163G, Y166, 187-DQ, 191I), з яких P159 належить до інтерфейсу димеризації та утворює водневий зв'язок із Gln142'. В радіусі 0,7 нм від ділянки петлі знаходиться 22

переважно нейтрально заряджені амінокислотні залишки, з яких два: P159 і Y162 належать до інтерфейсу димеризації.

Для отримання структури даної мутантної форми застосовано метод комп'ютерного мутагенезу за допомогою програми Modeller 9.7. Вкорочення на 4 амінокислотні залишки показало, що в радіусі 0,5 нм від Val152 – Glu153 знаходяться 7 амінокислотних залишків: 149-GAE, 154-HP, 183-DQ.

3.5. Комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантних форм *HsTyrRS*

За літературними даними [113], лише мутації G41R і 153-156delVKQV можуть призводити до порушення формування тирозил-аденілату (більш ніж 100-кратне зменшення). Проте, мутантна форма E196K не призводить до порушень реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}. Авторами [113, 206] запропоновано гіпотезу, в якій спільним механізмом для всіх трьох мутацій є порушення міжмолекулярних взаємодій з іншими молекулами.

Оскільки для мутацій G41R і 153-156delVKQV є спільним порушення на першому етапі реакції аміноацилювання, тому перші розрахунки їх молекулярної динаміки проведено саме для цих структур у вільному від субстратів стані. Для динаміки мутантних форм взято структури на базі міні-TyrRS людини.

3.5.1. Молекулярна динаміка мутантної форми G41R. Ця мутантна форма пов'язана з мутацією в активному сайті каталітичного домену TyrRS. Для структур міні-TyrRS людини та її мутантної форми G41R успішно виконано стадії мінімізації та врівноваження у водно-іонному оточенні. Отримано траєкторії молекулярної динаміки міні-*HsTyrRS* та її мутантної форми G41R в інтервалі 100 нс. Аналіз середньоквадратичних відхилень (RMSD) C α атомів свідчить про стабільність всіх траєкторій в процесі динаміки

з відхиленням 0,4 та 0,55 нм для траєкторії ензиму дикого типу і мутантної форми G41R відповідно. Показано, що значення середньоквадратичних відхилень менші в декілька разів у порівнянні з повнорозмірною структурою ферменту (2x59 кДа), що обумовлено відсутністю лінкера та С-модуля [12]. Перші 40-60 нс відповідають періоду релаксації молекулярної динаміки, що враховано при подальшому аналізі траєкторій (рис. 3.19а).

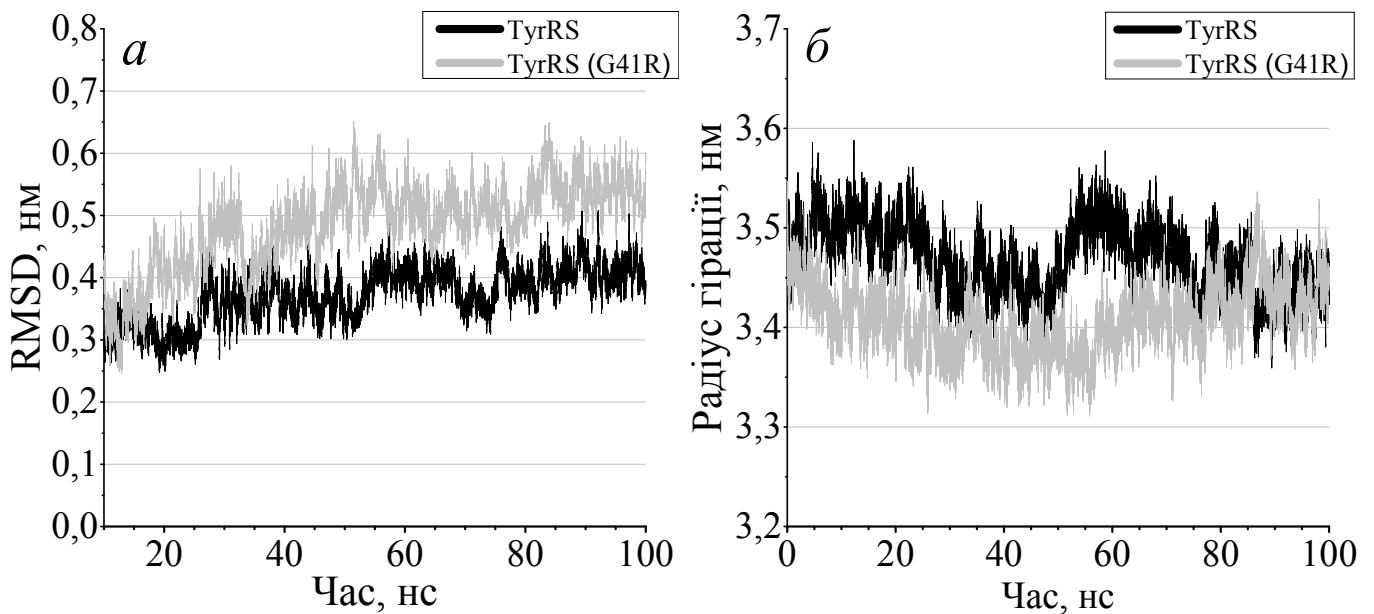


Рис. 3.19. (а) – середньоквадратичні відхилення (RMSD) $C\alpha$ атомів, які свідчать про стабільність траєкторій молекулярної динаміки; (б) – радіус гірації TyrRS та її мутантної форми G41R у часовому інтервалі 100 нс. Перші 40-60 нс відповідають періоду релаксації

Для характеристики компактності структури синтетази у процесі динаміки досліджено зміни радіусу гірації протеїну (рис. 3.19б). Найбільша амплітуда виявлена в перші 60 нс молекулярної динаміки від 3,3 до 3,6 нм. Для мутантної форми G41R спостерігається зменшення значення радіусу гірації до 3,3 нм, яке супроводжується більш плавним переходом. Встановлені зміни компактності молекули є, імовірно, наслідком зміни специфічних перебудов між каталітичним та антикодонзв'язувальним доменами в синтетазі.

Для аналізу рухливості окремих ділянок ферменту розраховано середньоквадратичні флуктуації (RMSF) окремих Ca атомів. Результати аналізу вказують на виражену асиметрію рухливості мономерів (рис. 3.20).

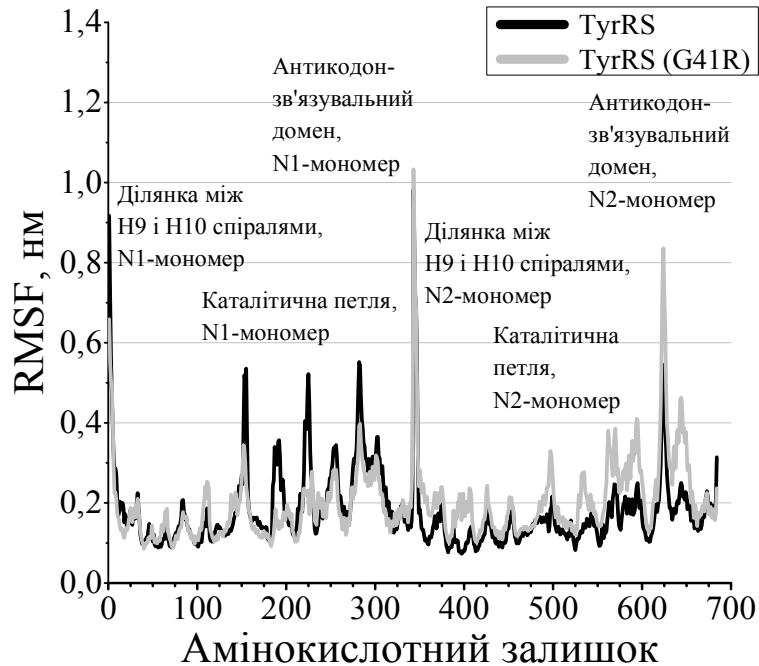


Рис. 3.20. Середньоквадратичні флуктуації (RMSF) у розрахунку на Ca атом із кожного амінокислотного залишку в нанометрах у часовому інтервалі 60-100 нс. Найвищий пік відповідає області Met1 мономера N1 та початку мономера N2 (відповідає номеру 343 по осі X)

Найбільші значення відхилень виявлено для амінокислотних залишків неструктурованої каталітичної петлі синтетази, яка містить KMSKS-подібний каталітичний мотив в *HsTyrRS* – KMSSS, а також антикодонзв'язувального сайту. Для мутантної форми G41R середньоквадратичні відхилення амінокислотних залишків антикодонзв'язувального сайту у середньому на 0,2 нм більші, ніж для ензиму дикого типу у мономері N2, що характеризує асиметрію рухів відносно мономера N1.

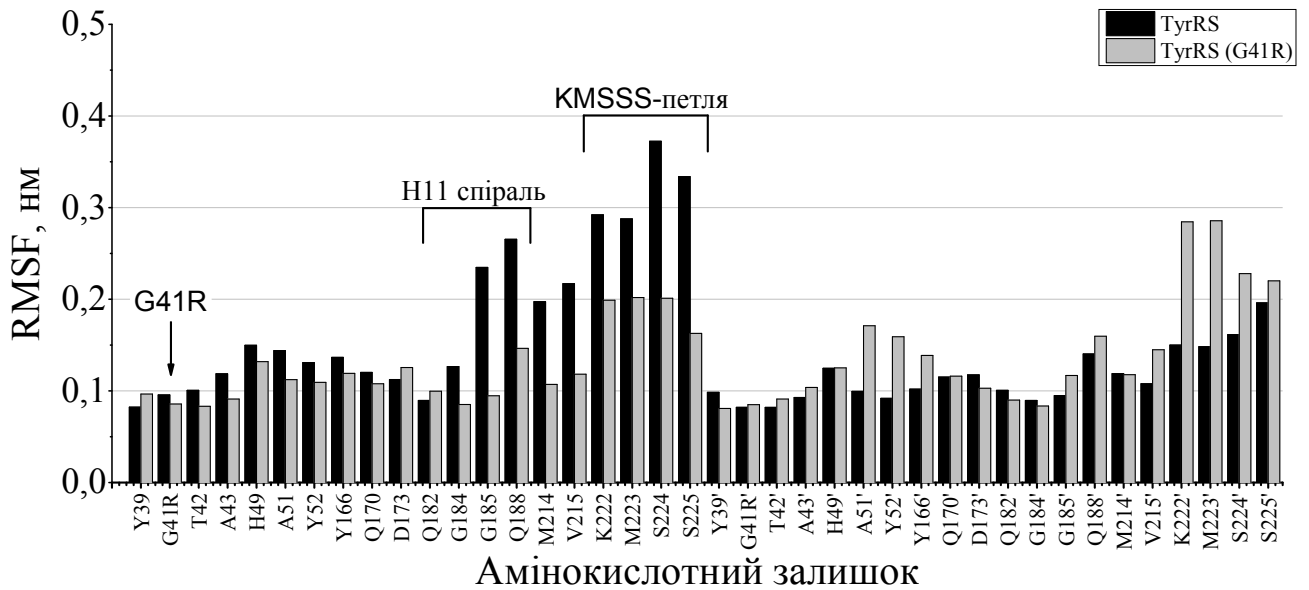


Рис. 3.21. Середньоквадратичні флуктуації RMSF активного центру TyrRS та мутантної форми G41R в розрахунку на Ca атом кожного амінокислотного залишку в часовому інтервалі 60-100 нс

Оскільки мутація G41R локалізована в активному центрі ензиму, нами був проведений детальний аналіз середньоквадратичних флуктуацій (RMSF) для Ca атомів амінокислотного залишку в активному центрі TyrRS людини (рис. 3.21). Для аналізу обрано амінокислотні залишки, що належать до активного центру *HsTyrRS*: Y39, G41(R41), T42, A43, H49, A51, Y52, Y166, Q170, D173, Q182, G184, G185, Q188, M214, V215, K222, M223, S224, S225 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_003671.1). Найбільші значення середньоквадратичних флуктуацій спостерігаються для каталітичної KMSSS-петлі з максимальним показником 0,38 нм відносно конформації початкової структури для мономера N1. У мутантної форми G41R *HsTyrRS* для каталітичної петлі спостерігаються значення середньоквадратичних відхилень не вище, ніж 0,29 нм для мономера N2. Отже, ця мутантна форма TyrRS має більш жорсткішу конформацію в порівнянні з ферментом дикого типу, що супроводжується формуванням більш компактизованого стану за результатами аналізу радіусу гірації (рис. 3.19б). У процесі молекулярної динаміки виявлено шість залишків, які формують водневі зв'язки з Arg41 із тривалістю існування

довше 10% від загальної протяжності динаміки для 100 нс траєкторії: Tyr39 – 62%, Gln188 – 22%, His77 – 18%, Tyr123 – 18%, Asp173 – 17% і Gln170 – 13%. Амінокислотні залишки Tyr39, Gln170 і Asp173 належать до активного центру ферменту, приймаючи участь у зв'язуванні з L-тирозином [116], і є високо еволюційно-консервативними (9/9) за даними баз веб-сервера ConSurf [207]. Таким чином, виявлене утворення зазначених водневих зв'язків із Arg41 може пояснювати молекулярний механізм порушення взаємодії L-тирозину з активним центром у мутантній формі G41R *HsTyrRS*.

Аналіз змін вторинної структури в процесі молекулярної динаміки (DSSP, Define Secondary Structure of Proteins) мутантної форми G41R *HsTyrRS* виявив формування метастабільної β -структури (80% від усього часу, із 20 по 100 нс) в одній з субодиниць димера ензиму, до якої входять залишки Lys147 – Glu157, що локалізовані біля інтерфейсу димера і входять до складу петлі CP1-вставки [36] згортки Россмана (рис. 3.22). При цьому виявлено формування водневих зв'язків між β -структурою Lys147 – Glu157 і амінокислотним залишком каталітичної петлі (тривалість існування більше 10%): Ser225 – 24% та із залишками Lys190 – 51% і Thr193 – 15%, які належать до H11 α -спіралі, що формує водневі зв'язки з Arg41 (Gln188 – 22%).

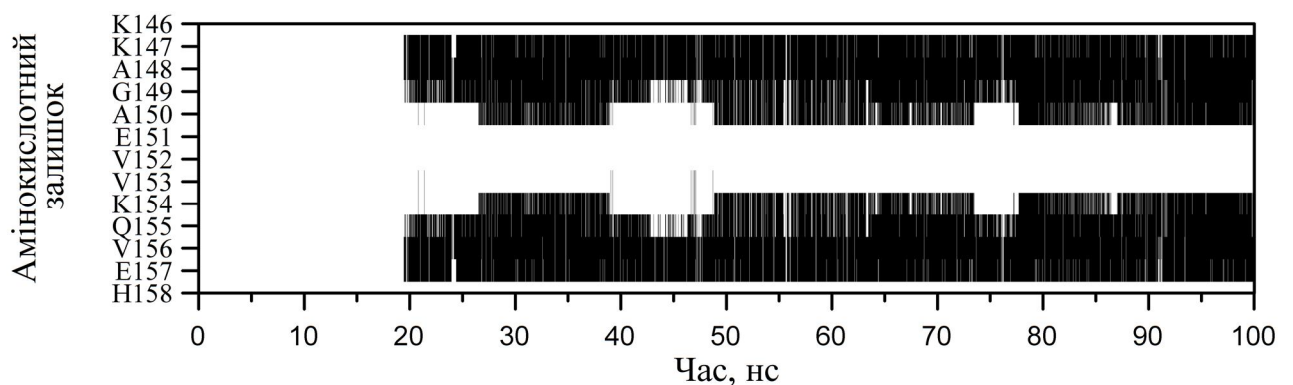


Рис. 3.22. Карта змін вторинної структури DSSP для траєкторії мутантної форми G41R. Чорним кольором показано область формування β -структурного елемента в часовому інтервалі 20-100 нс (80% тривалість існування) за участю амінокислотних залишків Lys147 – Glu157

Структуру ензиму станом на 100 нс молекулярної динаміки візуалізовано у VMD 1.9.1 (рис. 3.23).

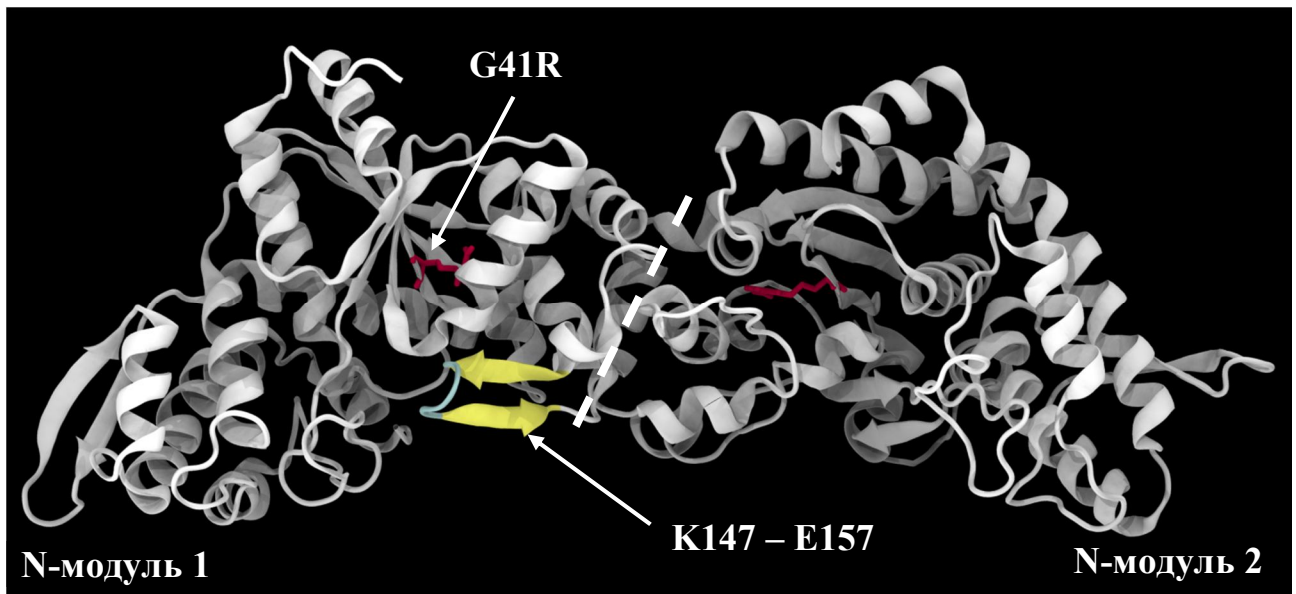


Рис. 3.23. Структура мутантної форми G41R *HsTyrRS* станом на 100 нс молекулярної динаміки. Формування антипаралельної β -структури K147 – E157, послідовність якої належить до неструктурованої петлі CP1-вставки, відображено жовтим кольором. Формування β -структурного елемента спостерігається тільки в одному із каталітичних модулів (N1)

За результатами аналізу активного центру TyrRS методом SASA (Solvent Accessible Surface Area) виявлено, що експонованість молекулярної поверхні активного центру мутантної форми G41R у середньому на 20 nm^2 менша, ніж в ензиму дикого типу. Це можна пояснити тим, що каталітична петля мутантного ензиму стає менш рухливою та компактизується біля активного центру, зменшуючи його площу, а також стеричним прикриттям кишені, в якій має локалізуватись L-тирозин. Найменші усереднені показники SASA для залишків активного центру спостерігаються на рівні 70 nm^2 у мутантної форми G41R (рис. 3.24).

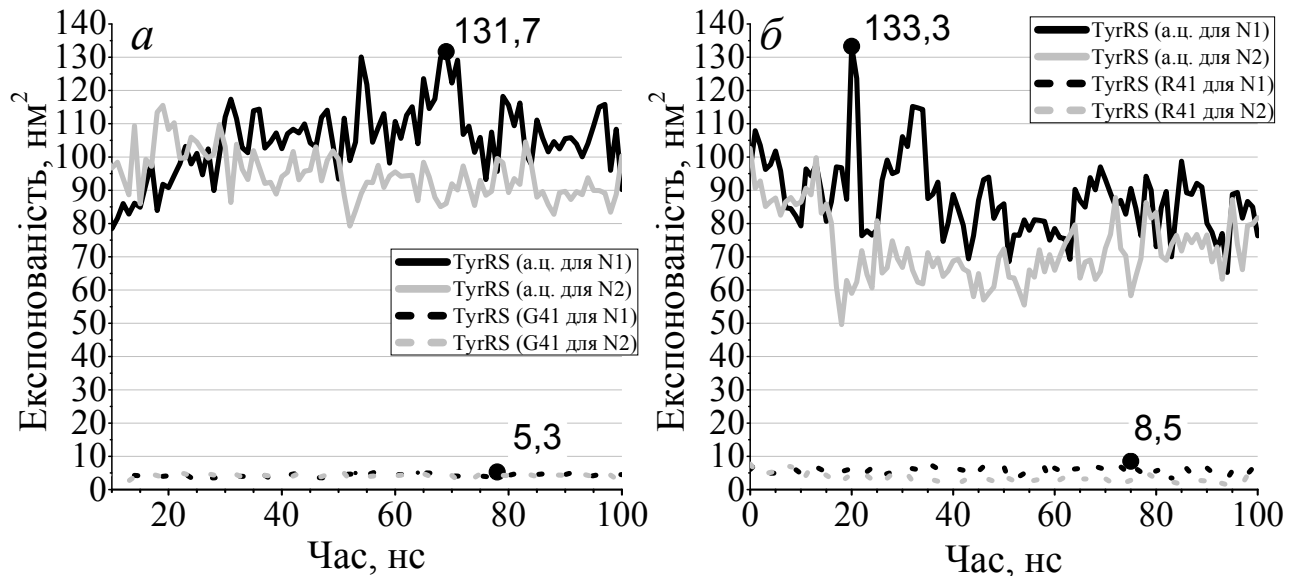


Рис. 3.24. Зміни площі доступності розчиннику залишків активного центру: Y39, G41(R41), T42, A43, H49, A51, Y52, Y166, Q170, D173, Q182, G184, G185, Q188, M214, V215, K222, M223, S224 і S225 у процесі динаміки. Чорний колір відображає значення для мономера N1, сірий – мономера N2. Додатково відображено аналіз експонованості окремих залишків G41 і R41 у траєкторіях молекулярної динаміки TygRS (а) та її мутантної форми G41R (б) відповідно

Водночас Arg41 на 60% є більш експонованим ($8,5 \text{ nm}^2$ відносно $5,3 \text{ nm}^2$ для Gly41) і, як зазначено у попередньому розділі, супроводжується формуванням додаткових водневих зв'язків, що можуть пояснювати утворенням більш жорсткої конформації активного центру мутантної форми.

Таким чином, комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантної форми G41R *HsTygRS* виявило формування антипаралельної β -шпильки у неструктурованій ділянці між спіралями H9 і H10 CP1-вставки згортки Россмана за участю Lys147 – Glu157 у часовому інтервалі 20-100 нс (80% часу). Показано, що формування водневих зв'язків між петлею CP1-вставки Lys147 – Glu157 та залишками каталітичної KMSSS-петлі призводить до істотного зниження флуктуацій петлі. Виявлено зменшення експонованості молекулярної поверхні активного центру мутантної форми G41R *HsTygRS* у середньому на 20 nm^2 . Висловлено припущення, що виявлені конформаційні

ефекти можуть призводити як до зміни конформації активного центру, так і до зміни специфічних взаємодій мутантної форми G41R *Hs*TyrRS з її протеїнами-партнерами у локальному інтерактомі апарату біосинтезу протеїнів, що в результаті може спричиняти розвиток нейродегенеративного захворювання Шарко-Марі-Туса.

3.5.2. Молекулярна динаміка мутантної форми del153-156VKQV. Для структури мутантної форми del153-156VKQV виконано стадії мінімізації та врівноваження макромолекул ферменту у водно-іонному оточенні. Проведено розрахунки молекулярної динаміки мутантної форми del153-156VKQV 100 нс кожна. Аналіз середньоквадратичних відхилень (RMSD) C α атомів свідчить про стабільність всіх траєкторій в процесі динаміки з відхиленням 0,4 та 0,6 нм для траєкторії мутантної форми del153-156VKQV. Перші 60 нс відповідають періоду релаксації, що враховано в подальшому аналізі траєкторій (рис. 3.25a).

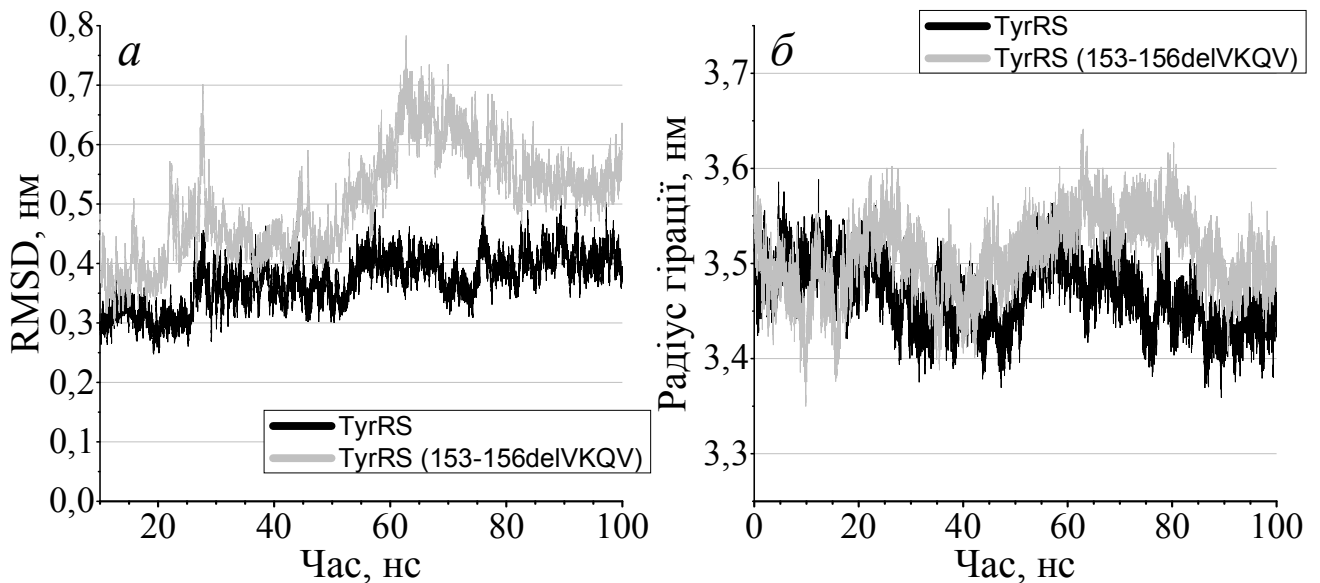


Рис. 3.25. (a) – середньоквадратичні відхилення RMSD (Root-Mean-Square Deviation) C α атомів, які свідчать про стабільність траєкторій молекулярної динаміки; (б) – зміни радіусу гірації TyrRS та мутантної форми del153-156VKQV в процесі динаміки в часовому інтервалі 100 нс. Перші 60 нс відповідають періоду релаксації

Для характеристики компактності структури синтетази у процесі динаміки досліджено зміни радіусу гірації протеїну (рис. 3.25б). Найбільша амплітуда змін радіусу гірації від 3,4 до 3,6 нм спостерігається в перші 60 нс молекулярної динаміки. Для мутантної форми del153-156VKQV *HsTyrRS* спостерігаються дещо більші значення амплітуди на рівні 3,4 – 3,6 нм.

Для аналізу рухливості окремих ділянок протеїну розраховано середньоквадратичні флуктуації (RMSF, Root-Mean-Square Fluctuations) окремих $\text{C}\alpha$ атомів. Результати аналізу вказують на виражену асиметрію рухливості мономерів (рис. 3.26).

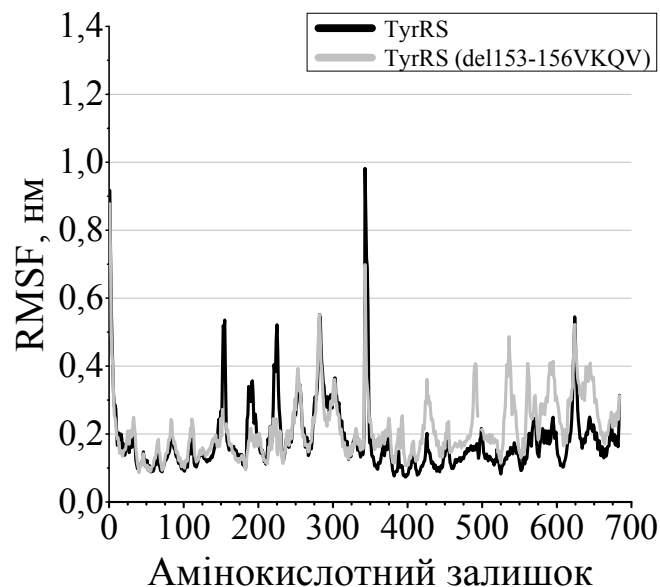


Рис. 3.26. Середньоквадратичні флуктуації (RMSF) у розрахунку на $\text{C}\alpha$ атом із кожного амінокислотного залишку в нанометрах у часовому інтервалі 60-100 нс. Найвищий пік відповідає області Met1 мономера N1 та початку мономера N2 (відповідає номеру 343 по осі X)

Найбільші значення відхилень виявлено для амінокислотних залишків неструктурованої каталітичної петлі синтетази, яка містить KMSKS-подібний каталітичний мотив в *HsTyrRS* – KMSSS, та антикодонзв'язувального сайту. Встановлено, що для мутантної форми del153-156VKQV *HsTyrRS* середньоквадратичні відхилення амінокислотних залишків

антикодонзв'язувального сайту у середньому на 0,2 нм більші, ніж для ензиму дикого типу у мономері N2, що характеризує асиметрію рухів відносно мономера N1.

Оскільки мутація del153-156VKQV локалізована біля активного центру ензиму, нами був проведений детальний аналіз середньоквадратичних флуктуацій (RMSF) в активному центрі TyrRS людини для C α атомів кожного амінокислотного залишку (рис. 3.27).

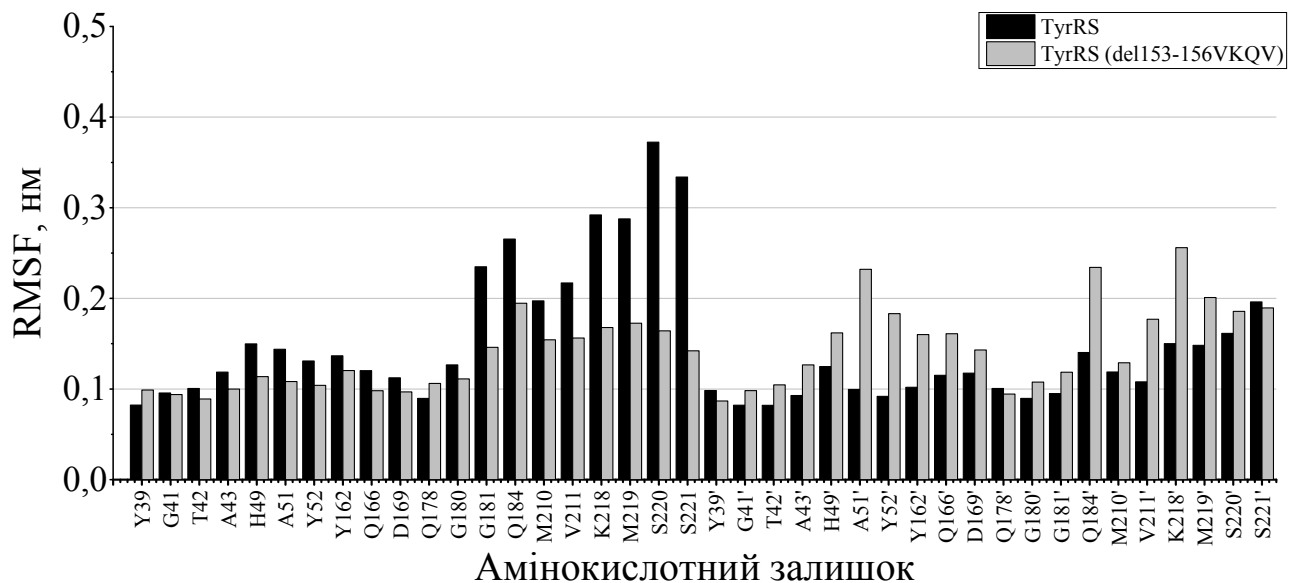


Рис. 3.27. Середньоквадратичні флуктуації RMSF активного центру TyrRS та мутантної форми del153-156VKQV, в розрахунку на C α атом кожного амінокислотного залишку у часовому інтервалі 60-100 нс

Для аналізу обрано амінокислотні залишки, що належать до активного центру *HsTyrRS*: Y39, G41, T42, A43, H49, A51, Y52, Y162, Q166, D169, Q178, G180, G181, Q184, M210, V211, K218, M219, S220, S221. Найбільші значення середньоквадратичних відхилень спостерігаються для каталітичної KMSSS-петлі з максимальним показником 0,38 нм відносно конформації початкової структури для мономера N1. У мутантної форми TyrRS del153-156VKQV в каталітичній петлі спостерігаються значення середньоквадратичних відхилень не більші, ніж 0,29 нм для мономера N2.

Аналіз змін вторинної структури (DSSP) в процесі молекулярної динаміки мутантної форми del153-156VKQV *HsTyrRS* виявив формування метастабільної β -структури (38% від усього часу, із 5 по 65 нс) в одній з субодиниць димера

ензиму, до якої входять залишки S145-V152, що локалізовані біля інтерфейсу димера і входять до складу петлі CP1-вставки згортки Россмана (рис. 3.28).

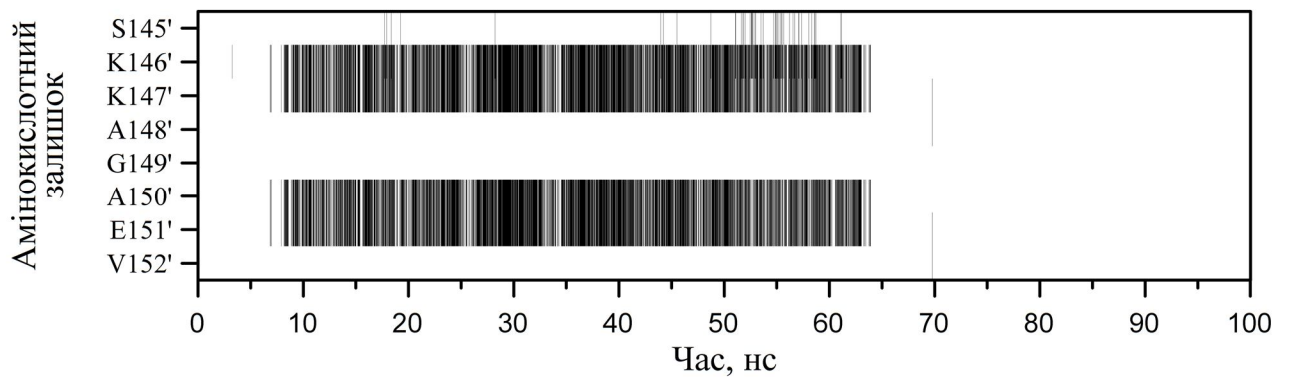


Рис. 3.28. Карта вторинної структури DSSP для мутантної форми del153-156VKQV. Чорним кольором показано область формування β -структурного елемента в період 5-65 нс (38% тривалість існування) за участю амінокислотних залишків K146' – E151'

Структура ензиму станом на 100 нс молекулярної динаміки візуалізована за допомогою VMD 1.9.1 (рис. 3.29). Встановлено, що молекулярна динаміка мутантної форми del153-156VKQV *HsTyrRS* супроводжується плавленням N9 α -спіралі (T141-A148).

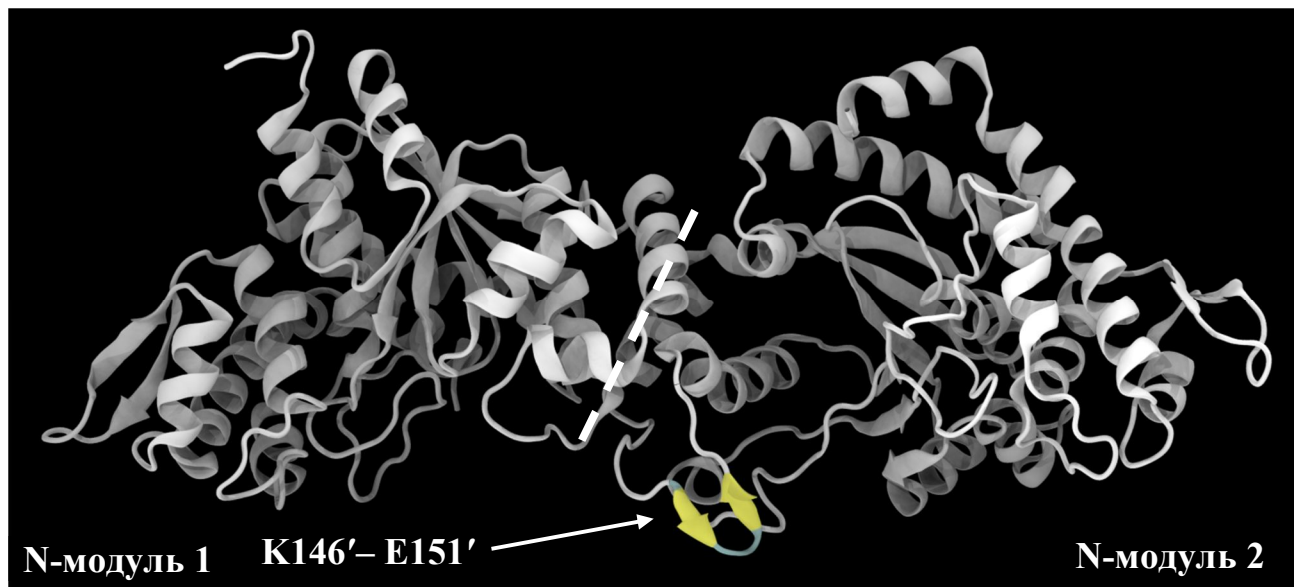


Рис. 3.29. Структура мутантної форми del153-156VKQV *HsTyrRS* станом на 63 нс молекулярної динаміки. Формування антипаралельної β -структури K146' – E151', послідовність якої належить до CP1-вставки, відображено жовтим кольором. Формування β -структурного елемента спостерігається тільки в одному мономері (N2)

Підсумки:

Проведено комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантних форм: G41R і del153-156VKQV тирозил-тРНК синтетази людини.

1. Виявлено формування нової антипаралельної β -шпильки, яка формується з двох β -стрендів в неструктурованій ділянці між спіралями Н9 і Н10 (CP1-вставка згортки Россмана), що може призводити до змін у взаємодії з іншими протеїнами-партнерами або до можливої неспецифічної агрегації мутантної *HsTyrRS*.

2. Виявлено зменшення експонованості молекулярної поверхні активного центру мутантних форм G41R і del153-156VRQV *HsTyrRS* у середньому на 20 нм².

3. За результатами аналізу траєкторії G41R *HsTyrRS* виявлено формування водневих зв'язків між мутантним Arg41 та висококонсервативними амінокислотними залишками активного центру Tyr39, Gln170 і Asp173. Дані залишки є одними з ключових у зв'язуванні L-тирозина з *HsTyrRS*, що може пояснювати молекулярний механізм порушення взаємодії даного субстрату з активним центром мутантної форми G41R *HsTyrRS*.

4. Висловлено припущення, що виявлені конформаційні ефекти можуть призводити як до зміни конформації активного центру, так і до зміни специфічних взаємодій мутантних форм DI-CMTC з молекулами-партнерами у локальному інтерактомі апарату біосинтезу протеїнів, що в результаті спричиняє розвиток нейродегенеративного захворювання Шарко-Марі-Туса.

За матеріалами даного дослідження опубліковано публікації:

1. Computational modeling of molecular dynamics of G41R mutant form of human tyrosyl-tRNA synthetase, associated with Charcot-Marie-Tooth neuropathy / Savytskyi O. V. and Kornelyuk A. I. // *Ukr Biochem J.* — 2015. — V. 87, N 6. — P. 142-53. (Особистий внесок здобувача: огляд літератури; молекулярне моделювання мутантних форм *HsTyrRS*; підготовка структур для

використання методу МД; підбір параметрів і розрахунок МД в ґрид, аналіз траєкторій, опис конформаційних змін у процесі МД, власноруч написано основну частину статті)

2. Local β -sheet formation in G41R mutant of human tyrosyl-tRNA synthetase associated with Charcot-Marie-Tooth disease / Savytskyi O.V., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk O.I. // *Proceedings of the 6th Theoretical Biophysics Symposium, 24-27 June 2013, Gothenburg, Sweden.* — 2013. — V. 1, — P. 13. (Особистий внесок здобувача: молекулярне моделювання мутантних форм HsTyrRS, розрахунки МД в ґрид-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)

3. Local beta-sheet formation in 153-156delVKQV mutant of human TyrRS associated with CMT disease / Savytskyi O.V. and Kornelyuk A.I. // *European Biophysics Journal.* — 2013. — V. 42, N S1. — P. S198. (Особистий внесок здобувача: молекулярне моделювання мутантних форм HsTyrRS, розрахунки МД в ґрид-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)

3.6. Дослідження впливу мутацій DI-CMTC на взаємодії між HsTyrRS та її субстратами

Станом на сьогодні структурні координати повнорозмірних TyrRS ссавців із низькомолекулярними субстратами та тРНК відсутні. Побудова комплексів з субстратами і проміжним продуктом тирозил-аденілатом може покращити розуміння механізму впливу різних мутацій в HsTyrRS та є необхідним етапом для подальших досліджень у цьому напрямку.

В 2015 році запропоновано гіпотезу [206], в якій мутантні форми (CMT) аміноацил-тРНК синтетази можуть порушувати міжмолекулярні взаємодії з фактором елонгації eEF1A, що відповідає за транспорт аміноацил-тРНК до рибосоми. Також існують дані про те, що в експериментах на мишах із

порушеннями у центральній нервовій системі (ЦНС) спостерігається м'язова дистрофія і нейропатія [208] через мутації, що призводять до зниження активності eEF1A2 [209-211]. Таким чином, порушення роботи eEF1A2, ізоформа якої локалізована переважно в м'язових і нервових тканинах, може призводити до деградації нейронів та сприяти нейродегенеративним захворюванням.

Структурні координати міжмолекулярного комплексу фактору елонгації трансляції eEF1A з тРНК і аміноацил-тРНК синтетазами досі невідомі. Станом на сьогодні отримано лише структури двох ізоформ eEF1A2. Для вивчення впливу мутацій DI-СМТС на міжмолекулярні взаємодії в цій роботі було запропоновано моделювання структурного комплексу TyrRS людини з відповідною тРНК та еукаріотичним фактором елонгації eEF1A2.

3.6.1. Моделювання просторової структури *HsTyrRS* в комплексі з низькомолекулярними субстратами. Оскільки для мутантних форм G41R і 153-156delVKQV *HsTyrRS* спільним є порушення каталітичної реакції при формуванні тирозил-аденілату (100-кратне зменшення) на першому етапі реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr} [113], доречним є моделювання структурних комплексів *HsTyrRS* та її мутантних форм із низькомолекулярними субстратами. Це дасть змогу кращого розуміння молекулярного механізму функціонування ферменту та докладнішої інтерпретації раніше отриманих експериментальних даних [113].

3.6.1.1. Моделювання каталітичної петлі із закритою конформацією. Каталітична петля містить у собі KMSKS-мотив, який відіграє важливу роль в активації L-тироzinу на етапах реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr} [44, 118, 212]. Ця петля об'єднує каталітичний і антикодон-зв'язувальний домени та є критично важливим елементом активного центру усіх APCаз першого структурного класу. Проте, роль каталітичної петлі для TyrRS ссавців менш функціонально виражена у порівнянні з прокаріотичною TyrRS, що може бути

пов'язано з відсутністю другого лізину в послідовності ²²²KMSSS²²⁶, яка характерна для *HsTyrRS* [212]. Для зручності, кожна позиція амінокислотного залишку мотиву буде позначена як K¹ M² S³ K⁴ (S⁴) S⁵. Стани каталітичної KMSKS петлі в даній роботі описано як відкрита (*HsTyrRS*_{Opened}) і закрита (*HsTyrRS*_{Closed}) [14].

Моделювання закритої конформації KMSSS є дуже важливим етапом перед застосуванням методу молекулярного докінгу, оскільки субстрати індукують конформаційні зміни петлі [44, 212]. Для моделювання закритої конформації петлі нами розглянуто дві найбільш гомологічні матриці: *PfTyrRS* (PDB код: 3VGJ) [181] і *HsTrpRS* (PDB код: 2QUI) (таблиця 3.3) [182]. Однак, *HsTrpRS* хоч і відносяться до одного того ж субкласу Ic та схожі за структурною будовою із *HsTyrRS*, але еволюційно набули різних механізмів компенсації другого лізину в KMSSS петлі [213]. Оскільки K⁺ виконує роль відсутнього другого лізину в *HsTyrRS* [117], ми обрали структурну матрицю еукаріотичної *PfTyrRS* із обома лізинами, яка має найбільшу гомологію до послідовності KMSSS петлі та має конформацію закритого стану [14].

Таблиця 3.3.

Порівняння послідовностей каталітичних петель

aaRS	PDB код	Субстрат	Послідовність
<i>HsTyrRS</i>	1N3L	Немає	²¹⁶ PGLTGS--KMSSSEES ²³⁰
<i>PfTyrRS</i>	3VGJ	Тур-АМР	²³⁹ PGLLEGQEKMSKSDENS ²⁵⁵
<i>HsTrpRS</i>	2QUI	АТР+Трп аналог	³⁴¹ PALQGAQTKMSASDPNS ³⁵⁷

Побудовано структурну модель *HsTyrRS*_{Closed} з закритою конформацією каталітичної петлі із застосуванням матриці з послідовністю ²¹⁷PGLLEGQEKMSKSDENS²³⁰ *PfTyrRS* (PDB код: 3VGJ). Методологія моделювання каталітичної петлі TyrRS ссавців докладно описана у роботі [14].

3.6.1.2. Моделювання структурних комплексів *HsTyrRS* з L-тирозином, АТФ, тирозил-аденілатом.

***HsTyrRS* у комплексі з L-тирозином.** Методом молекулярного накладання (суперпозиції) моделі повнорозмірної *HsTyrRS*_{Opened} на кристалографічну структуру міні-*HsTyrRS* (PDB код: 4QBT) отримано комплекс з L-тирозином і K^+ під назвою *HsTyrRS*^{Tyr}.

***HsTyrRS* у комплексі з L-тирозином і АТФ.** Відомо, що для реакції аміноацилювання окрім K^+ необхідною умовою є також наявність Mg^{2+} , який нейтралізує негативно заряджену трифосфатну групу АТФ [41]. Для побудови структурного комплексу *HsTyrRS*^{Tyr+ATP} нами проаналізовано всі структури синтетаз 1 класу за наявності АТФ з іоном Mg^{2+} (PDB коди: 1J09, 1N75, 1M83, 1MAU, 1YID і 2QUI) [14]. Виявлено, що координаційний зв'язок з трьома фосфатними групами є типовими для синтетаз 1-го класу. Серед проаналізованих комплексів ми обрали найбільш відповідний до *HsTyrRS* та експериментально вивчений *GsTrpRS* (PDB код: 1MAU) [155, 184], з якого жорстка структура АТФ: Mg^{2+} застосована для молекулярного докінгу за наявності гнучких залишків активного центру *HsTyrRS* (Trp40, Thr42, His49, Tyr52, Val54, Asn212, Val215, Lys222, Met223, Ser224, Ser225 і Ser226). Відбір кращої структури *HsTyrRS*^{Tyr+ATP} базувався за наступними критеріями: (1) наявність контактів з HIGH і KMSKS мотивами; (2) подібність позиції амінокислотного залишку другого лізину (K^4) в каталітичному KMSKS мотиві з іоном K^+ відносно молекули АТФ.

***HsTyrRS* у комплексі з Tyr-AMP.** Для побудови структурного комплексу *HsTyrRS*^{Tyr-AMP+PPi} задіяно структуру Tyr-AMP з комплексу *PfTyrRS* (PDB код: 3VGJ²⁰¹¹) [181]. Проведено гнучкий докінг на активний *HsTyrRS*_{Opened} з відкритою каталітичною петлею. Для отримання координат пірофосфату накладено координати АТФ: Mg^{2+} на тирозил-аденілат структурного комплексу *HsTyrRS*^{Tyr-AMP} методом суперпозиції. Залишаючи лише координати атомів пірофосфату з іоном Mg^{2+} , побудовано структурний комплекс *HsTyrRS*^{Tyr-}

$AMP+PPi$. В результаті отримано схожу локалізацію обох аденінів AMP і Tyr-AMP в активному центрі фермента [14].

Підсумки:

1. Проведено молекулярне моделювання каталітичної KMSSS петлі *HsTyrRS* із закритою конформацією.
2. Отримано структури *HsTyrRS* в комплексах з L-тирозином, L-тирозином та АТР, тирозил-аденілатом та PPi із врахуванням різного стану каталітичної петлі (відкрита або закрита).

3.6.2. Молекулярна динаміка мутантної форми G41R в комплексі з L-тирозином. Раніше в роботі [113] виявлено, що мутація G41R *HsTyrRS* призводить до 100-кратного зменшення активності реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}. Причиною можуть бути порушення у зв'язуванні з субстратом (L-тирозин). Проте, структура мутантної форми G41R *HsTyrRS* досі є невідомою. Відомо, що мутація G526R (CMT) в активному центрі гліцил-тРНК синтетази приводить до блокування зв'язування L-гліцину. В кристалічній структурі (PDB код: 2PMF) мутантної форми G526R *HsGlyRS* спостерігається наявність іону хлору, який утворює координаційний зв'язок з залишком R526 [114]. Тобто, Cl⁻ може потрапити до активного центру через зміни в електростатичному потенціалі на молекулярній поверхні активного центру ферменту [214].

У зв'язку з цим було проведено розрахунки молекулярної динаміки міні-*HsTyrRS* та її мутантної форми G41R в комплексі з L-тирозином. Результати аналізу траєкторій молекулярної динаміки мутанта G41R показали можливість взаємодії іону хлору Cl⁻ із залишком R41 в активному центрі тирозил-тРНК синтетази (рис. 3.30). Необхідною умовою для каталізу тирозил-тРНК синтетази є наявність позитивно зарядженого іону калію в активному центрі, який виконує функціональну роль другого лізину в каталітичній петлі, що важливо для реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr} [117, 118, 212].

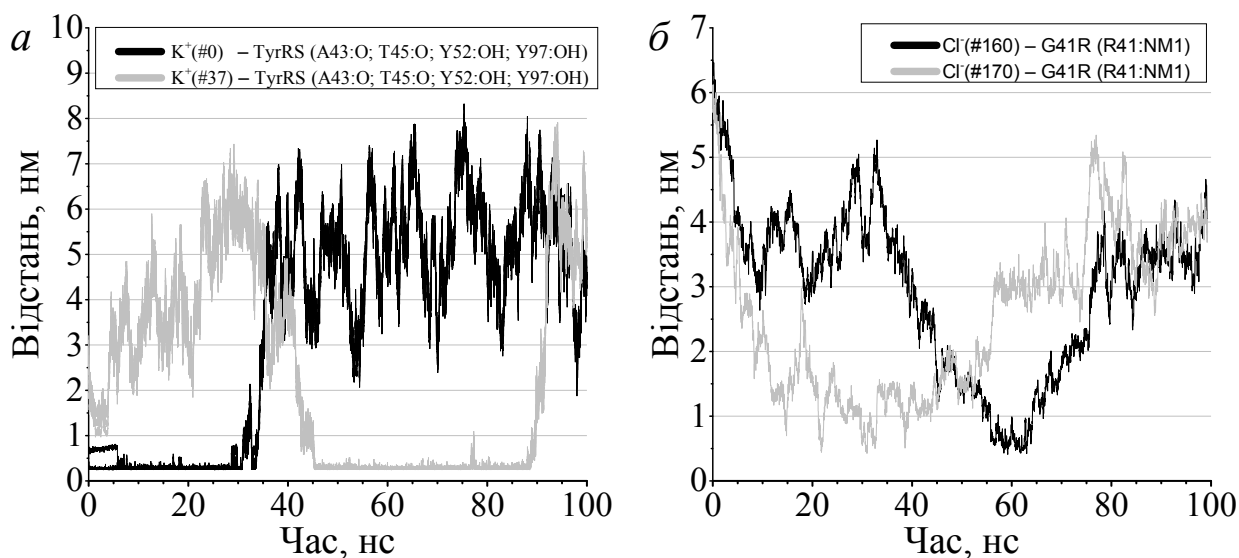


Рис. 3.30. (а) – відстань між іонами калію та залишками активного центру; (б) – відстань між іонами хлору та залишком Arg41 в структурі мутантної форми G41R *Hs*TyrRS

Результати аналізу траєкторій молекулярної динаміки підтверджують можливість взаємодії іону хлору з мутантним залишком аргініну R41 в активному центрі тирозил-тРНК синтетази (рис. 3.30б), який є аналогічним за амінокислотною заміною в мутантній формі G526R гліцил-тРНК синтетази. Проте, для ферменту дикого типу взаємодії активного центру з іонами хлору відсутні, натомість спостерігаються координаційні зв'язки з іоном калію (рис. 3.30а). Дана взаємодія може бути пояснена зміною на позитивно заряджену молекулярну поверхню (~ 20% площі) в активних центрах для обох мутантів: G41R і G526R (рис. 3.31).

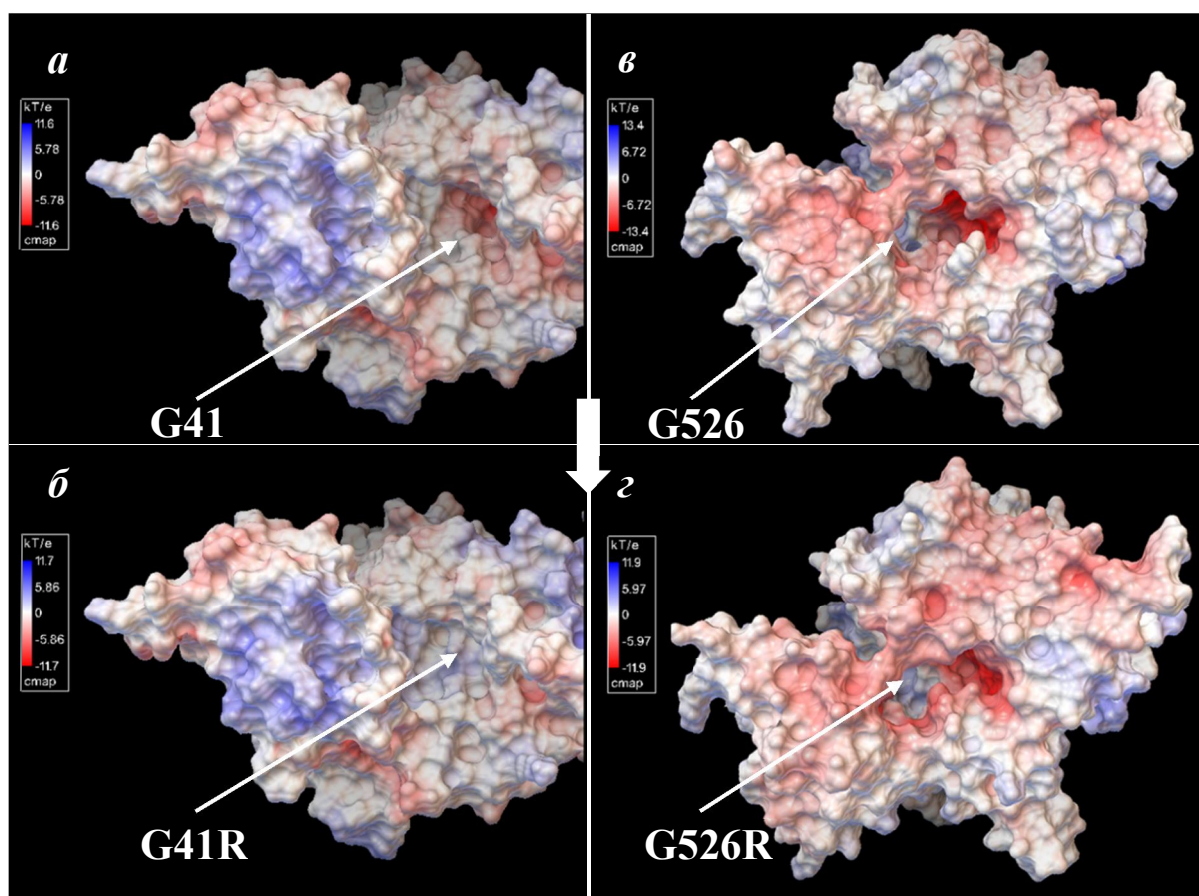


Рис. 3.31. Візуалізація результатів аналізу APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver). Виявлені зміни електростатичного потенціалу на молекулярній поверхні: активного центру *HsTyrRS* дикого типу (*a*); активного центру мутантної форми G41R *HsTyrRS* (*б*); активного центру *HsGlyRS* дикого типу (*в*) та активного центру мутантної форми G526R *HsGlyRS* (*з*)

Для траєкторії МД мутантної форми G41R *HsTyrRS* в комплексі з L-тирозином спостерігається вихід даного субстрату з активного центру *HsTyrRS* (рис. 3.32). Дані спостереження підтверджує аналіз відстані між атомами субстратного L-тирозиону і залишками активного центру *HsTyrRS* (рис. 3.33).

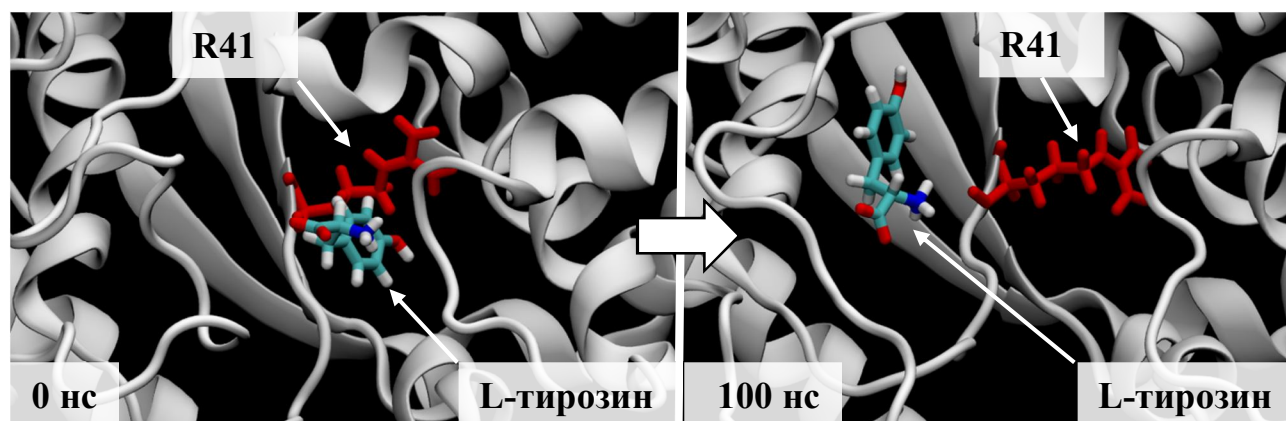


Рис. 3.32. Вихід L-тирози́ну з сайту зв'язування G41R *HsTyrRS*^{Tyr} у ході молекулярної динаміки

Аналіз водневих зв'язків між субстратним L-тиози́ном і залишками G41R *HsTyrRS* у траєкторії МД із часовим інтервалом 0 – 80 нс показав таку тривалість існування (> 10%): Gln170 – 62% , Asp187 – 61%, Lys154 – 15%. Формування водневих зв'язків у часовому інтервалі між 80 – 100 нс: His49 – 20%, Tyr97 – 20%, Asp187 – 20%, Tyr52 – 10%, вказує на зміну локалізації L-тирози́ну під час молекулярної динаміки на сайт, де розташовується АТФ в активному центрі G41R *HsTyrRS*.

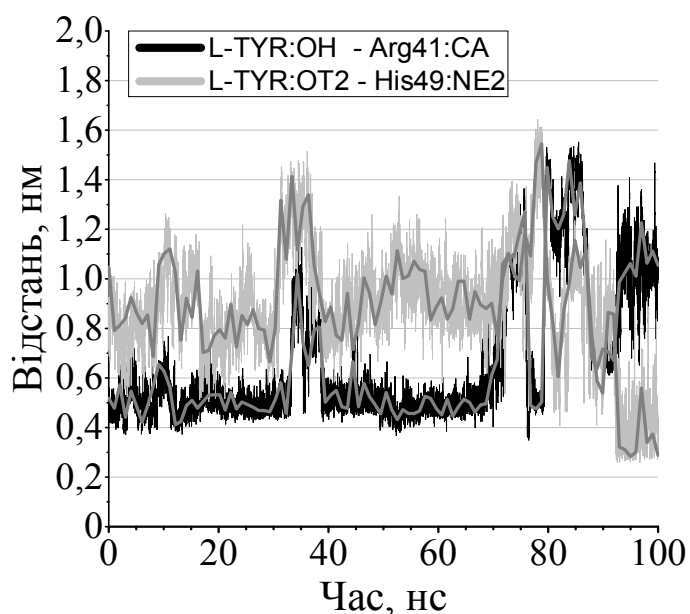


Рис. 3.33. Відстань між ОН-групою L-тирози́ну і Ca атомом мутантного залишку G41R в процесі МД відображено чорним кольором. Відстань між атомом кисню L-тирози́на і атомом азоту NE2 залишком His49, що належить до HIGH-подібного мотиву *HsTyrRS*, відображено сірим кольором

Порівняння оточення L-тирози́ну за різних часових станів відображено на рис. 3.34.

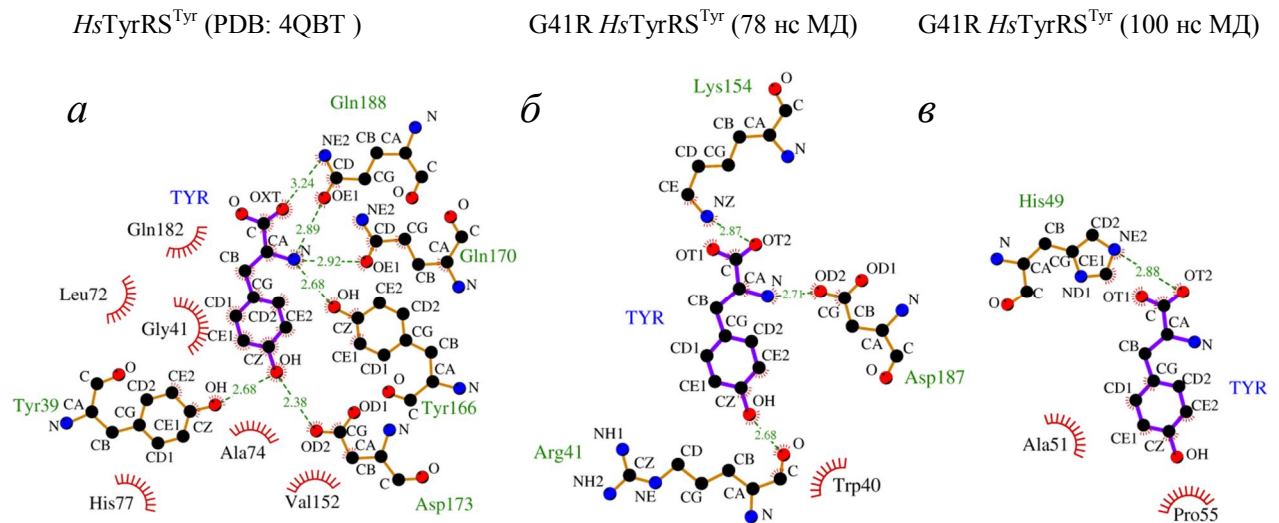


Рис. 3.34. Схематичне представлення водневих зв'язків між субстратом L-тирози́ном та активним центром міні-*HsTyrRS* за різних часових станів: (а) – оточення L-тирози́ну за даними кристалографічної структури (PDB: 4QBT); (б) – оточення L-тирози́ну станом на 78 нс молекулярної динаміки; (в) – оточення L-тирози́ну станом на 100 нс молекулярної динаміки [215]

Методом молекулярного моделювання і молекулярної динаміки було запропоновано молекулярний механізм впливу мутації G41R *HsTyrRS* за яким спостерігається блокування L-тирози́ну та порушення його інтерфейсу взаємодії в активному сайті зв'язування ферменту. Виявлене формування водневих зв'язків L-тирози́ну та His49, який належить до консервативного залишку HIGH-мотиву, що може призводити до порушення взаємодії синтетази з молекулою АТФ.

Підсумки:

1. Дані молекулярної динаміки підтверджують можливість взаємодії іону хлору з залишком аргініну G41R в активному центрі тирозил-тРНК синтетази. Дане спостереження є подібним за молекулярним механізмом до мутантної форми G526R *HsGlyRS* і може бути пояснено заміною на позитивно заряджену ділянку (~ 20% площі) і стеричного перекриття L-тирози́ну з залишком аргініну в активних центрах для обох мутантних форм: G41R і G526R.

2. В процесі динаміки спостерігається вихід L-тирозину з його сайту зв'язування для траєкторії МД мутантної форми G41R *HsTyrRS*, що корелює з молекулярними механізмами впливу мутації G526R на функціонування *HsGlyRS*.

3.6.3. Моделювання структурного комплексу *HsTyrRS* з відповідною тРНК^{Tyr}.

3.6.3.1. Побудова просторової структури тРНК^{Tyr} людини. За допомогою онлайн-інструменту ModeRNA Server [216] проведено пошук структурних матриць для моделювання за наявною нуклеотидною послідовністю тРНК^{Tyr} людини. Із результатів пошуку відібрано структурні комплекси синтетаз з тРНК^{Tyr}: *Methanocaldococcus jannaschii* та *Saccharomyces cerevisiae* (PDB код: 1J1U та 2DLC відповідно). Нуклеотидна послідовність тРНК^{Tyr} архебактерії *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB код: 1J1U) ідентична на ~81% тРНК^{Tyr} людини (рис. 3.35). Проте, у структурі 1J1U відсутні координати останніх трьох нуклеотидних залишків послідовності ⁷⁴ССА⁷⁶ акцепторного стебла. Для добудови ССА-кінця взято фрагмент ⁷³АССА⁷⁶ з координатного файлу (PDB код: 2DLC) тРНК^{Tyr} *Saccharomyces cerevisiae*. Оскільки у моделі (PDB код: 1J1U) присутній сильно експонований аденін 73 і відсутня стекінг взаємодія із гуаніном 72, його було вирішено замінити на аналогічний із тРНК^{Tyr} *Saccharomyces cerevisiae*.

<i>H. sapiens</i>	1	CCUUCGAUAGCUCAGCU-GGUAGAGCGGAGGACUGUAGAUCUUAGGUCGUGGUUCGAUUCGGUCUGGAAGG ACCA	76
<i>M. jannaschii</i>	1	CCGGCGGUAGUUCAGCCUGGUAGAACGGCGGACUGUAGAUCGCAUGUCGUGGUUCAAUCCGGCCCGCGG ACCA	77
<i>S. cerevisiae</i>	1	CUCUCGGUAGCCAAG-UUGGGAAGGCGCAAGACUGUAAAUCUUGAGGUCGGGCGUUCGACUCGCCCCCGGGAG ACCA	76

Рис. 3.35. Порівняння нуклеотидних послідовностей тРНК^{Tyr} людини з тРНК^{Tyr} *Methanocaldococcus jannaschii* та *Saccharomyces cerevisiae*

Для побудови структури *H. sapiens* тРНК^{Tyr} проведено молекулярне моделювання у програмному пакеті MacroMolecule Builder 2.8 (ММВ). Матриці відповідних структур накладено по 4 фосфатах, N1 та N9 атомах піримідинів та пуринів відповідно. Даний підхід дозволяє отримати структурні координати матриць зі збереженням структури фосфатного каркасу та розміщує азотисті

основи з максимальною подібністю до структурних матриць, отриманих експериментально. Також, методом суперпозиції, із матриці перенесено три іони Mg^{2+} на побудовану структуру *Hs*-тРНК^{Tyr}, які необхідні для стабілізації структури тРНК [191].

3.6.3.2. Моделювання комплексу *Hs*TyrRS з тРНК^{Tyr}. Важливим етапом роботи є побудова комплексу тирозил-тРНК синтетази з відповідною тРНК зі збереженням інтерфейсів взаємодії між ними. Наявність специфічних взаємодій забезпечує розпізнавання синтетазою гомологічної тРНК та її подальше аміноацилювання. Інтерфейси взаємодії в комплексах *M. jannaschii* та *S. cerevisiae* відомі та описані раніше [189]. Хоч послідовність структури *Mj*-тРНК^{Tyr} є більш подібною до *Hs*-тРНК^{Tyr}, відповідні синтетази мають менше 35 % ідентичності. Проте, ідентичність синтетази людини та *S. cerevisiae* складає 57,14% (рис. 3.36). Тому їх вирівнювання дає можливість визначити амінокислотні залишки, що забезпечують розпізнавання тРНК в комплексі з *Hs*TyrRS.

```

Hs --MGDAPSPPEEKLHLITRNLQEVLGEEKLKEIL--KERELKIYWGATATTGKPHVAYFVPM 54
Sc MSSAATVDPNEAFGLITKNLQEVLPQIIKDVLEVQKRHLKLYWGTAAPTGRPHCGYFVPM 60
Hs SKIADFLKAGCEVTILFADLHAYLDNMKAPWELLELRVSYENVIKAMLESIGVPLEKLNK 114
Sc TKLADFLKAGCEVTVLLADLHAFLDNMKAPLEVVNYRAKYVELTIKAILRSINVPIEKLNK 120
Hs FIKGTDYQLSKEYTLDVYRLSSVVTQHDSKKGAGAEEVVKQVEHPLLSGLLYPGLQALDEEY 176
Sc FVVGSSYQLTPDYTMDFRLSNIVSQNDAKRAGADVVKQVANPLLSGLIYPLMQALDEQF 180
Hs LKVDAQFGGIDQRKIFTFAEKYLPAAGYSKRVLHMLNPMVPGLT-GSKMSSSEEEKIDLL 235
Sc LDVDCQFGGVDQRKIFVLAEEENLPSLGYKRAHMLNPMVPGLAQGGKMSASDPNSKIDLL 240
Hs DRKEDVKKLKKAFCEPFGNVENNGVLSFIKHVLFPLKSE-----EFVILRDEKWGGNK 287
Sc EEPKQVKKKINSAFCEPFGNVENGLLSFVQYVIAPIQELKFGTNNHEFFIDRPEKFGGPI 300
Hs TYTAYVDLEKDFAAEVVHPGDLKNSVEVALNKLKLDPIREKFN-TPALKKLASAAYP---- 342
Sc TYKSFEEMKLAFLKKEKLSPPDLKIGVADAINELLEPIRQEFANNKEFQEAASEKGYPVATP 360

```

Рис. 3.36. Вирівнювання амінокислотних послідовностей N-кінцевих модулів *Homo sapiens* TyrRS з *Saccharomyces cerevisiae* TyrRS у програмі Clustal Omega. Кольорами виділено амінокислотні залишки, що беруть участь у інтерфейсі зв'язування між TyrRS та тРНК

У ході вирівнювання послідовностей базової та цільової структур було визначено амінокислотні залишки АРСази, що беруть участь у взаємодії з гомологічними тРНК (таблиця 3.4).

Таблиця 3.4.

Порівняння інтерфейсів міжмолекулярних взаємодій в кристалографічному комплексі *ScTyrRSтРНК^{Tyr} і у змодельованому структурному комплексі *HsTyrRS**тРНК^{Tyr}**

Нуклеотид	Тип взаємодії	Організм	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
G34	Стекінг	Phe296	Trp283
	Гідрофобні	Pro320	Gly307
	Водневий зв'язок	Asp321	Asp308
U35	Водневий зв'язок	Cys255	Cys250
A36	Гідрофобні	Phe254	Phe249
		Pro257	Pro252
		Pro319	Pro306
		Pro320	Gly307
C1	Водневий зв'язок	Arg193	Arg189
G72	Водневий зв'язок	Arg151	Lys147
A73	Водневий зв'язок	Arg193	Arg189

За допомогою методу вирівнювання амінокислотних послідовностей APCаз, із застосуванням відомих взаємодій між відповідними нуклеотидними залишками тРНК та амінокислотними залишками aaRS (*M. jannaschii* та *S. cerevisiae*) було ідентифіковано інтерфейс взаємодії, який враховано і збережено у ході моделювання.

Підсумки:

1. Вперше проведено молекулярне моделювання комплексу TyrRS людини з низькомолекулярними субстратами та відповідною тРНК^{Tyr} із урахуванням їх структурних особливостей.

3.6.4. Молекулярна динаміка структурного комплексу *HsTyrRS* з тРНК^{Tyr}. У більшості закристалізованих структур TyrRS ссавців орієнтація у просторі імідазольного кільця His305 (залишок належить до інтерфейсу впізнавання антикодону) розміщена перпендикулярно за площиною до пуринового залишка G34, що належить до триплету антикодону. Нами раніше виявлено, що у ході молекулярної динаміки комплекс із таким розміщенням або руйнувався і петля антикодону відходила від антикодонзв'язувального домену синтетази, або His305 змінював свою конформацію і утворював стекінг взаємодію з G34 та Trp283, що в результаті призводило до стабілізації комплексу. Така різниця стабільності комплексів із різними конформаціями залишку His305 підтверджує важливість даного залишку та може відобразити механізм впізнавання G34. Оскільки дана стекінг конформація надає структурі найбільшої стабільності, вона була нами використана для досліджень методом молекулярної динаміки [21].

Для підтвердження стабільності змодельованих структурних моделей проведено розрахунки молекулярної динаміки. Отримано траєкторії молекулярної динаміки міні-TyrRS людини в комплексі з тРНК^{Tyr} тривалістю 100 нс. Аналіз траєкторії не виявило ознак руйнування елементів вторинної структури. Аналіз середньоквадратичних відхилень (RMSD) свідчить про стабільність траєкторії з тРНК у ході динаміки. Врівноваження структури міні-*HsTyrRS* спостерігається після 10 нс, а тРНК^{Tyr} після 40 нс молекулярної динаміки (рис. 3.37).

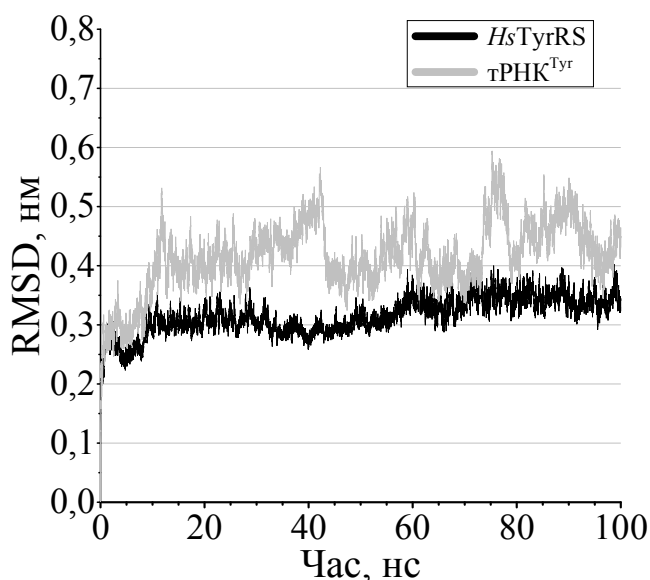


Рис. 3.37. Аналіз середньоквадратичних відхилень (RMSD), який свідчить про стабільність траєкторії комплексу у ході динаміки

Для підтвердження стабільності комплексу з тРНК проведено аналіз енергій зв'язування між міні-*HsTyrRS* і тРНК^{Tyr}. Після врівноваження структур комплексу енергія зв'язування між молекулами відповідає значенням в межах 300 – 400 кДж/моль, що свідчить про посилення взаємодії між *HsTyrRS* і тРНК^{Tyr} впродовж траєкторії молекулярної динаміки (рис. 3.38).

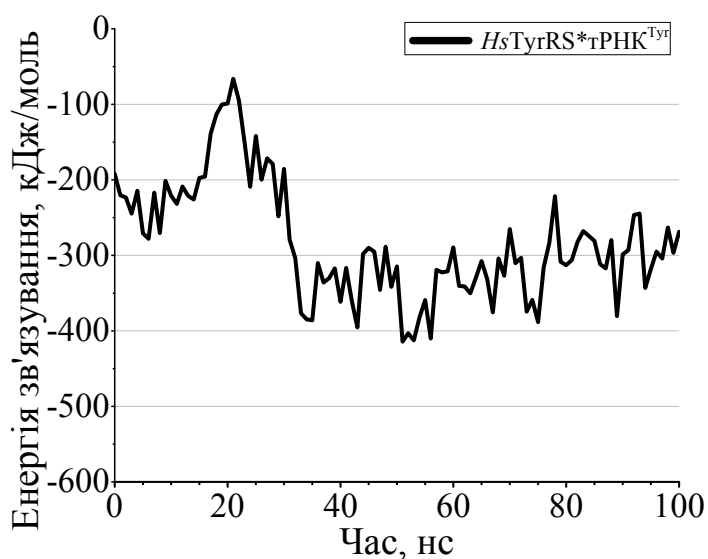


Рис. 3.38. Енергія зв'язування між міні-*HsTyrRS* та відповідною тРНК^{Tyr}

Для аналізу рухливості окремих ділянок комплексу розраховано середньоквадратичні флуктуації (RMSF) Ca атомів в його структурі. Результати аналізу вказують на загальну стабільність міні-*HsTyrRS* у складі комплексу з tRNA^{Tyr} (рис. 3.39).

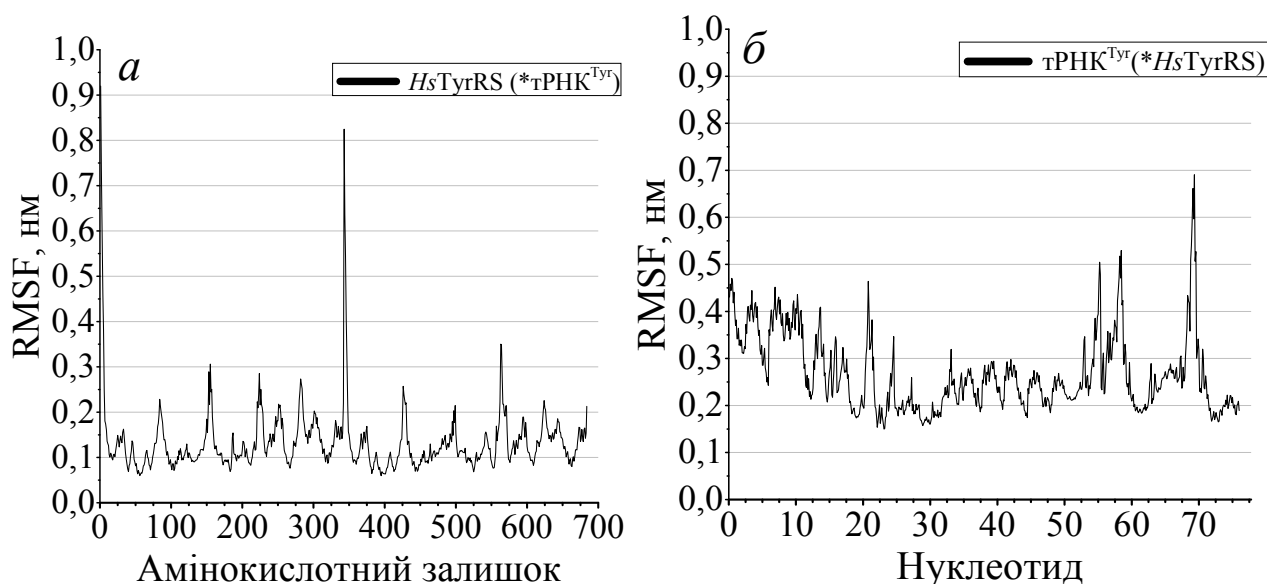


Рис. 3.39. (а) – середньоквадратичні флуктуації (RMSF) у розрахунку на Ca атом з кожного амінокислотного залишку в нанометрах в часовому інтервалі 60-100 нс. Найвищий пік відповідає області Met1 мономера N1 та початку мономера N2 (відповідає номеру 343 по осі X). Середньоквадратичні флуктуації (RMSF) для tRNA^{Tyr} у складі структурного комплексу міні-*HsTyrRS** tRNA^{Tyr} – (б)

Аналіз водневих зв'язків між міні-*HsTyrRS* для послідовності K147-E157 в комплексі з tRNA^{Tyr} показує (тривалість існування >10%): водневий зв'язок E151 синтетази з C75 tRNA існує 39% часу, Q155:A76 – 13%, K147:G72 – 13%, K147:G71 – 10%.

Формування ключових інтерфейсів впізнавання, зокрема взаємодія між Lys147 та G72 першої пари акцепторного стебла tRNA^{Tyr} , формування правильної конформації His305 із утворенням стекінгу із антикодоном tRNA , дозволяє припустити, що структура комплексу в ході динаміки є близькою до нативної та відповідає дійсності.

Таким чином, аналіз траєкторій МД підтвердив наявність водневих зв'язків між залишками неструктурованої CP1 петлі для структури *HsTyrRS* і тРНК. Для мутантних форм G41R і делеції 153-156delVKQV показано формування антипаралельної β -структури саме в цій ділянці, що може відігравати суттєвий вплив на стабілізацію комплексу із високомолекулярними субстратами прямо чи опосередковано.

Підсумки:

1. Проведені розрахунки молекулярної динаміки для структурного комплексу міні-*HsTyrRS* з відповідною тРНК^{Tyr} підтверджують його енергетичну стабільність у часовому інтервалі 100 нс.

2. Виявлено, що амінокислотний залишок His305 *HsTyrRS* приймає активну участь у впізнаванні Gaa34 тРНК^{Tyr} та є важливим для стабілізації міжмолекулярних взаємодій цього комплексу.

3. Підтверджено формування водневих зв'язків між петлею CP1-вставки і тРНК^{Tyr}. Оскільки цей сегмент є частиною специфічного впізнавання акцепторного стебла тРНК^{Tyr}, це дає можливість запропонувати один із механізмів впливу мутацій G41R і делеції 153-156delVKQV *HsTyrRS* у порушенні міжмолекулярних взаємодій, що може призводити до захворювання DI-CMTC.

3.6.5. Побудова просторової структури *HsTyrRS* в комплексі з тРНК^{Tyr} і фактором елонгації eEF1A2. Евкаріотичний фактор елонгації eEF1A бере участь у різноманітних процесах у клітині, в тому числі не пов'язаних з біосинтезом протеїнів. Основна роль eEF1A полягає у зв'язуванні та доставці аміноацил-тРНК до 80S рибосоми. eEF1A є функціональним гомологом бактеріального фактора EF-Tu. В клітинах евкаріот фактор елонгації eEF1A представлено двома ізоформами: eEF1A1 і eEF1A2, які мають подібність ~93% за амінокислотною послідовністю. Ізоформа eEF1A2 в основному присутня у

нейрональній тканині (моторні нейрони) скелетних та серцевих м'язів [210]. Проте, ізоформа eEF1A1 представлена у решті тканин [193, 210, 217].

В якості структурної матриці для моделювання застосовано структуру фактору елонгації кроля *Oryctolagus cuniculus* eEF1A2 (PDB код: 4C0S) [193, 218], який на 100% ідентичний за послідовністю до eEF1A2 людини. Пошук структурних комплексів фактора елонгації з тРНК виявив наявність структури 4CXG (eEF1A в комплексі з тРНК^{Val} ссавців) [194]. Ідентичність тРНК^{Val} (¹GCGGAUUUAGCUCAGUUGGGAGAGCGCCGGUCUCCAAAACCGGAGGU CCUGUGUUCGAUCCACAGAAUUCGCACCA⁷⁶) за нуклеотидною послідовністю до тРНК^{Tyr} людини складає 42,1%. Відсоток гомології є невисоким і не дає можливості коректного накладання канонічними методами на структуру змодельованої тРНК^{Tyr} людини. Тому спочатку визначені нуклеотиди, які приймають участь в інтерфейсі між eEF1A і тРНК^{Val} у комплексі структури (PDB код: 4CXG). До інтерфейсу тРНК^{Val} з відсічкою у 0,35 нм належать такі нуклеотидні залишки: G51, U52, G53, C63, A64, G65, C74, A76. Саме на фосфатну групу цих залишків інтерфейсу було накладено змодельовану тРНК^{Tyr}, що дало змогу отримати спільну зону контакту з фактором елонгації в структурі (PDB код: 4CXG). Методом суперпозиції накладено III-й домен eEF1A2 з структури (PDB код: 4C0S) на 3й домен комплексу (PDB код: 4CXG).

Видаливши наявні координати 4CXG, було отримано структуру *HsTyrRS* у комплексі з тРНК^{Tyr} і III-м доменом eEF1A2. Два інші домени доковано на сервері Cluspro 2.0. Спочатку доковано I домен на *HsTyrRS*, потім доковано II домен. В результаті відібрано структурний комплекс, який відповідає критеріям: краща енергія зв'язування, відсутність стеричних перекриттів, а також відповідність до електростатичних зарядів на поверхні міжмолекулярних інтерфейсів (рис. 4.7). Для кращого розуміння локалізація сайтів мутацій DI-CMTC на побудованому структурному комплексі *HsTyrRS**тРНК^{Tyr}*eEF1A2 відображена на рис. 3.40.

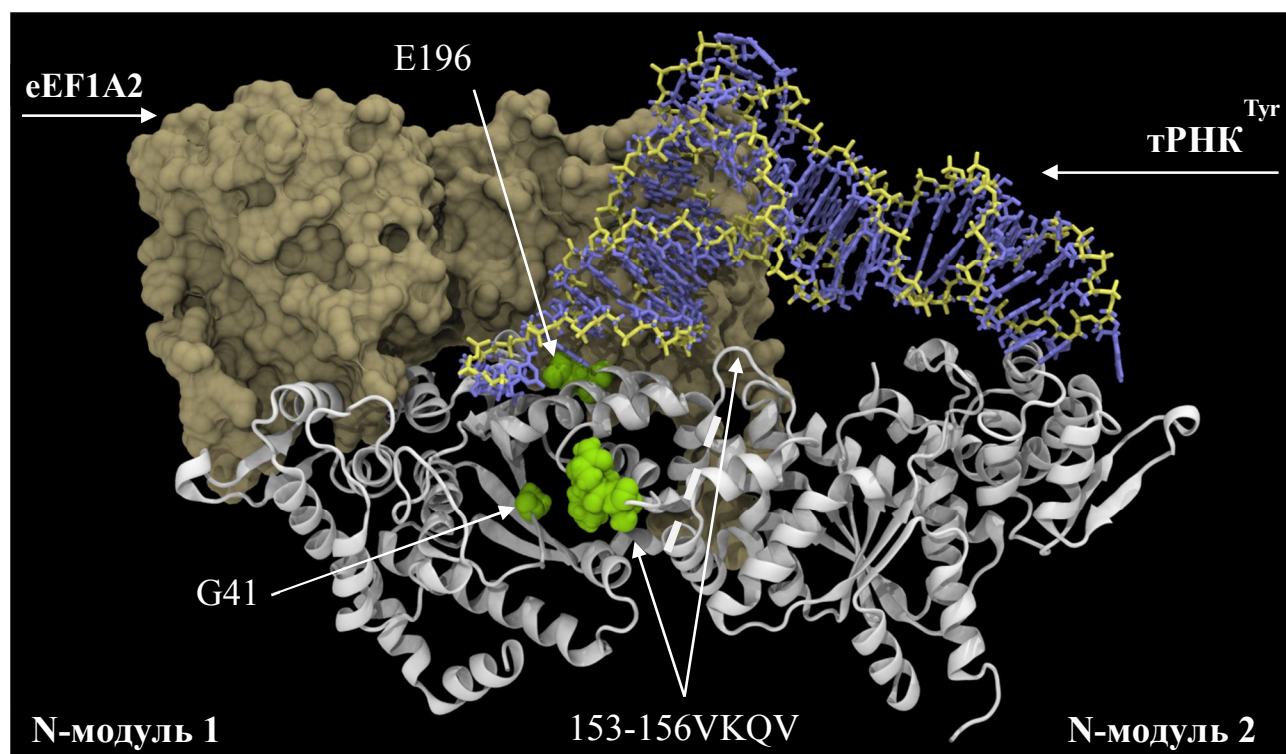


Рис. 3.40. Локалізація сайтів мутацій G41R, E196K і делеції 153-156delVKQV на моделі комплексу міні-*HsTyrRS* із відповідною $tRNA^{Tyr}$ та фактором елонгації eEF1A2

Отриманий структурний комплекс дозволяє аналізувати локалізацію сайтів мутацій відносно просторового розташування молекул партнерів *TyrRS*. Виявлено, що мутація E196K розташована під першою парою акцепторного стебла $tRNA^{Tyr}$ (C1:G72), яка відповідає за розпізнавання еукаріотичною *TyrRS*. В той же час, на відстані 0,5 нм, локалізовано домен II фактору елонгації eEF1A2 побудованого комплексу. Амінокислотний залишок E157 (належить до CP1 вставки *HsTyrRS*) входить в число залишків, які формують контакти з $tRNA^{Tyr}$, що може мати суттєвий вплив на стабілізацію комплексу у випадку укорочення неструктурованої петлі в мутантній формі 153-156delVKQV.

Отримані результати підтримують гіпотезу, що загальним механізмом для всіх трьох мутацій можуть бути порушення міжмолекулярних взаємодій, а саме порушення інтерфейсу між *HsTyrRS* і $tRNA^{Tyr}$ та/або з фактором елонгації eEF1A2.

3.6.5.1. Нова роль неупорядкованої ділянки CP1 вставки у TyrRS ссавців. У APCаз першого класу каталітичний домен містить вставку CP1. У деяких ферментах цього класу вона має активний центр, який редагує помилки трансляції. У *HsTyrRS* вставка CP1 (Leu125–Gly163) не має такої властивості. Проте, у TyrRS CP1 грає важливу роль у розпізнаванні акцепторного стебла тРНК^{Tyr} [36]. Авторами висунуто припущення [36], що неупорядкована ділянка CP1 вставки (Val153–His158) імовірно може набувати впорядкованої структури у процесі зв'язування з тРНК^{Tyr}.

Для вивчення ролі неструктурованої ділянки вставки CP1 проведено дослідження молекулярної динаміки отриманих структурних комплексів *HsTyrRS* з низькомолекулярними субстратами. Виявлено нову роль Lys154 в структурі TyrRS ссавців [14]. Протягом МД, який розташований у цієї петлі, формує стабільний водневий зв'язок з γ -фосфатною групою АТФ. Цей результат добре корелює з експериментальним дослідженням мутантних форм G41R та del153-156VKQV *HsTyrRS*, які пов'язані з невропатією DI-CMTC [113]. Таким чином, однією з найбільш можливих причин є критичний спад каталітичної активності у випадку делеції Val153–Val156 – пряма втрата важливого Lys154. У випадку мутантної форми G41R *HsTyrRS*, у процесі молекулярної динаміки, спостерігається формування β -структури в ділянці послідовності Lys147–Glu157 [13]. Для *GsTrpRS* (PDB ID: 1MAU) раніше було виявлено важливу роль аналогічного Lys111 (у CP1), який також формує водневий зв'язок з γ -фосфатною групою АТФ [155, 219]. Таким чином, одна з можливих причин зменшення каталітичної активності, у випадку G41R *HsTyrRS* мутації, може полягати у локальних конформаційних змінах важливого Lys154 та його фактична відсутність у мутантній формі del153-156VKQV *HsTyrRS*.

Підсумки:

1. Запропоновано модель структурного комплексу міні-TyrRS*тРНК^{Tyr}*eEF1A2 та проаналізовано молекулярний механізм впливу мутацій DI-CMTC. Можливість порушення інтерфейсів між *HsTyrRS* і тРНК^{Tyr}

та з фактором елонгації eEF1A2 може бути врахована при експериментальних дослідженнях.

За матеріалами даного дослідження опубліковано публікації:

1. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates / Kravchuk V. O., Savytskyi O. V., Odynets K. O., Mykuliak V. V. and Kornelyuk A. I. // *J Biomol Struct Dyn.* — 2016. — P. 1-17. (DOI: 10.1080/07391102.2016.1235512) (Особистий внесок здобувача: участь у обговоренні параметрів молекулярного моделювання, оптимізації структур і параметрів МД еукаріотичних TyrRS; порівняння взаємодії іонів K^+ з активними центрами HsTyrRS і BtTyrRS, роль СРІ вставки для HsTyrRS та її мутантних форм).
2. Molecular dynamics simulations of tyrosyl-tRNA synthetase mutant forms associated with Charcot-Marie-Tooth neuropathy / Savytskyi O.V. and Kornelyuk O.I. // *Proceedings of the FEBS/IUBMB Advanced Lecture Course "Molecular basis of human diseases: 50 years anniversary of Spetses summer schools", 27th May - 1st June, 2016, Spetses island, Greece.* — 2016. — V. 1, — P. 41. (Особистий внесок здобувача: молекулярне моделювання мутантних форм HsTyrRS, розрахунки МД в ґрид-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)
3. Molecular dynamics of human tyrosyl-tRNA synthetase active center in the complex with tyrosyl-adenylate / Savytskyi O.V. and Kornelyuk O.I. // *Ukr.Biochem.J.* — 2014. — V. 86, N 5 (Suppl. 1). — P. 77-78. (Особистий внесок здобувача: молекулярне моделювання структурних комплексів з субстратами, розрахунки МД в ґрид-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Тирозил-тРНК синтетаза належить до родини аміноацил-тРНК синтетаз, які є ключовими ферментами у біосинтезі протеїнів. Окрім своєї основної функції синтетази, можуть бути залучені до неканонічних процесів, що дозволяє розглядати їх як перспективні мішені для розробки лікарських препаратів. Порушення їх основних або неканонічних функцій можуть призводити до нейродегенеративних захворювань. Отже, вивчення структури і молекулярної динаміки синтетаз, їх мутантних форм та ролі їх міжмолекулярних взаємодій можуть мати прикладне та фундаментальне значення у вирішенні біомедичних проблем [25]. Структури TyrRS деяких еукаріотів досліджували протягом останніх років, зокрема методами рентгеноструктурного аналізу та обчислювальної біології. Оскільки метод рентгеноструктурного аналізу дає інформацію лише про статичну структуру, для вивчення молекулярної динаміки та конформаційних змін синтетаз застосовано метод комп'ютерного моделювання МД. Слід зазначити, що дослідження інших синтетаз методами МД проводилися й раніше, але в значно менших часових інтервалах і меншою статистикою, що може впливати на інтерпретацію результатів [126]. За останні 30 років розвиток комп'ютерної техніки досяг значного прогресу. Це дало технічну можливість отримувати довші траєкторії та збільшувати розмір системи за рахунок побудови міжмолекулярних комплексів. Грід-технології, які від самого початку розроблялись для вирішень задач фізики високих енергій (ЛНС) знайшли своє застосування і в біомедичних напрямках досліджень [172, 176, 177]. Розробка грід-сервісів дає можливість не лише ефективно автоматизувати роботу із застосуванням обчислювальних ресурсних центрів в грід-середовищі, але й створити платформу для міждисциплінарних підходів при вирішенні складних задач із міжнародною участю.

У даній роботі вперше побудовано структурну модель повнорозмірної TyrRS людини, включаючи неструктурований міжмодульний лінкер. Для виконання цього етапу роботи було застосовано кристалографічні структури її окремих N- і C-кінцевих модулів. Проте навіть вони мали ділянки з відсутніми амінокислотними залишками, які було добудовано в процесі моделювання.

Розрахунки молекулярної динаміки білків є досить трудоемними процесами, який потребують значних витрат машинного часу та оперують великими об'ємами інформації. Комп'ютерний розрахунок однієї 100 нс траєкторії *HsTyrRS* може тривати півроку. Для цього було адаптовано і оптимізовано підходи по розрахунків молекулярної динаміки білків та аналізу траєкторій із використанням грід-технологій. Спільно із співробітниками обчислювального центру Київського національного університету імені Тараса Шевченка створено віртуальну лабораторію MolDynGrid (<http://moldyngrid.org>). Це дало можливість значно ефективніше застосовувати ресурсні центри Українського національного гріду та Європейської грід-інфраструктури.

У даній роботі вперше проведено дослідження молекулярної динаміки *HsTyrRS* на довгих часових інтервалах (100 нс) у водно-іонному оточенні, близькому до фізіологічних умов. Проаналізовано взаємодію між її N- і C-кінцевими модулями та підтверджено гіпотезу Шиммеля про екранування цитокінового ELR-мотиву в структурі повнорозмірної синтетази. Описано інтерфейси, які формують дані взаємодії. Детальне вивчення динаміки *HsTyrRS* та її цитокінових мотивів є актуальним, оскільки може сприяти кращому розумінню механізмів патогенезу її мутантних форм, що призводять до нейродегенеративних захворювань. На сьогодні залишається невідомим вплив мутацій, що призводять до нейродегенеративних захворювань, на цитокінові властивості синтетаз. Одним із молекулярних механізмів розглядають і порушення неканонічних властивостей цитокінового мотиву ELR у випадку мутацій DI-CMTC *HsTyrRS* [32].

Структурні координати мутантних форм *HsTyrRS*, пов'язаних із нейропатією DI-CMTC, досі невідомі, тому для отримання їхніх структурних

моделей було застосовано метод молекулярного моделювання. Відомо, що мутантні форми: G41R і *de novo* делеція 153-156delVKQV проявляють значне зниження в здатності зв'язування L-тироzinу більш ніж у 100 разів у порівнянні з нативною формою. Проте, мутантна форма E196K TyrRS суттєво не впливає на формування проміжного продукту тирозил-аденілату і фактично підвищує швидкість переносу тирозину до тРНК^{Tyr} [113]. Цікавим є також те, що за експериментальними даними [220] бактерійна тРНК^{Tyr} починає приймати участь у реакції аміноацилювання у випадку мутантної форми E196K *Hs*TyrRS. В структурі комплексу амінокислотний залишок E196K розташований під першою парою нуклеотидів тРНК^{Tyr}. Різниця між *B. stearothermophilus* тРНК^{Tyr} і *H. sapiens* тРНК^{Tyr} лише у першій парі нуклеотидів (C1:G72 і G1:C72 відповідно), яка відповідає за розпізнавання з боку акцепторного ССА-кінця тРНК.

У даній роботі вперше проведено молекулярне моделювання і дослідження молекулярної динаміки мутантних форм *Hs*TyrRS при нейропатії DI-CMTC. Аналіз траєкторій молекулярної динаміки мутантних форм G41R і 153-156delVKQV *Hs*TyrRS виявив формування метастабільних β -структурних елементів в CP1-вставці (Leu125–Gly163) згортки Россмана за участі амінокислотних залишків у послідовності K147-E157. Петля CP1 вставки (Val153 – His158) є елементом впізнавання акцепторного стебла тРНК^{Tyr} і, ймовірно, може також набувати впорядкованої конформації. У випадку мутантних форм G41R і 153-156delVKQV *Hs*TyrRS нові β -структурні формування спостерігались в 100 нс часовому інтервалі. Проте, для кристалографічних структур (PDB код: 1N3L і 4QBT) і у траєкторіях молекулярної динаміки *Hs*TyrRS дикого типу вони не були зафіксовані. Передчасне формування вторинних елементів в неструктурованих ділянках можуть призводити до порушень у розпізнаванні гомологічної тРНК або при взаємодії з іншими молекулами партнерами.

Станом на сьогодні структурні координати повнорозмірних TyrRS ссавців із низькомолекулярними субстратами та тРНК відсутні. Побудова комплексів із

субстратами і проміжним продуктом тирозил-аденілатом сприяє розумінню механізму впливу мутацій на структуру і функції *HsTyrRS* та є необхідним етапом для подальших досліджень. Раніше в роботі [113] виявлено, що мутація G41R *HsTyrRS* призводить до 100-кратного зменшення активності реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}. Причиною цього можуть бути порушення зв'язування з субстратом L-тирозином в активному центрі. Проте, просторова структура мутантної форми G41R *HsTyrRS* досі невідома. Водночас відомо, що мутація G526R (СМТ) в активному центрі гліцил-тРНК синтетази приводить до блокування зв'язування L-гліцину. В кристалічній структурі (PDB код: 2PMF) мутантної форми G526R *HsGlyRS* спостерігається іон хлору, який утворює координаційний зв'язок із залишком R526 [114]. Тобто, іон Cl⁻ може потрапити до активного центру через зміни в електростатичному потенціалі на молекулярній поверхні активного центру ферменту [214]. У зв'язку з цим проведено розрахунки молекулярної динаміки міні-*HsTyrRS* та її мутантної форми G41R в комплексі з L-тирозином. Необхідною умовою для каталізу тирозил-тРНК синтетази людини є наявність саме позитивно зарядженого іону калію в активному центрі, який виконує функціональну роль другого лізину каталітичної петлі, що важливо для реакції аміноацилювання тРНК [117, 118, 212]. Результати аналізу підтверджують можливість взаємодії Cl⁻ із мутантним залишком Arg41 в структурі мутантної форми G41R *HsTyrRS* та узгоджується з експериментами для схожої мутантної форми G526R *HsGlyRS* [114]. Цю взаємодію можна пояснити формуванням позитивно зарядженої молекулярної поверхні в активних центрах для обох мутантів: G41R і G526R (~20% площі). Для ферменту дикого типу взаємодії активного центру з іонами хлору відсутні – натомість спостерігаються координаційні зв'язки з іоном калію, що є типовим для *HsTyrRS*. Спостерігається зміна локалізації L-тирозиону в активному центрі. Виявлено формування водневих зв'язків між L-тирозином та His49, який належить до консервативного залишку каталітичного HIGH-мотиву, що може призводити до блокування взаємодії молекули АТФ з активним центром синтетази.

Евкаріотичний фактор елонгації (eEF1A) представлений двома ізоформами. Для моделювання обрано ізоформу eEF1A2, яка локалізована, переважно, в м'язових і нейрональних тканинах, на відміну від ізоформи A1. Для кращого розуміння локалізації сайтів мутацій в *HsTyrRS* при DI-СМТС побудовано структурний комплекс *HsTyrRS**тРНК^{Тур}*eEF1A2. Після аналізу структури отриманого комплексу стало очевидним, що сайт мутації E196K розташований під першою нуклеотидною парою акцепторного стебла тРНК^{Тур} (C1:G72), яка відповідає за специфічність розпізнавання тРНК^{Тур} евкаріотичною *TyrRS*. В той же час, на відстані 0,5 нм локалізовано домен II фактору елонгації eEF1A2 в побудованому комплексі. Виявлено, що неструктурована петля CP1 вставки *HsTyrRS* формує водневі зв'язки з тРНК^{Тур}, що може мати суттєвий вплив у випадку її укорочення у мутантної форми 153-156delVKQV.

Відомо, що *HsTyrRS* широко розповсюджена у головному і спинному мозку, розміщуючись вздовж моторних нейронів і в філоподіях, та проявляє специфічну роль у нейрональних закінченнях [214]. Тому формування структурного комплексу *HsTyrRS* з eEF1A2 є досить ймовірним.

Отримані результати моделювання потрійного комплексу *HsTyrRS* з тРНК^{Тур} та фактором елонгації eEF1A2 підтримують гіпотезу, що загальним молекулярним механізмом патогенезу для всіх трьох мутацій Шарко-Марі-Туса можуть бути порушення міжмолекулярних взаємодій, а саме інтерфейсів між *HsTyrRS* і тРНК^{Тур} та/або з фактором елонгації eEF1A2.

ВИСНОВКИ

Конформаційна рухливість тирозил-тРНК синтетази *H. sapiens* та її комплексів з субстратами вивчена методами комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки. Для мутантних форм синтетази, пов'язаних з нейропатією Шарко-Марі-Туса, виявлені конформаційні зміни, які можуть призводити як до змін конформації активного центру, так і до змін специфічних взаємодій з тРНК^{Tyr} та фактором елонгації eEF1A2.

1. Виконано комп'ютерне моделювання просторової структури повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази *H. sapiens*, її комплексів із субстратами і мутантних форм, що асоційовані з нейропатією Шарко-Марі-Туса.

2. Для підвищення продуктивності розрахунків молекулярної динаміки створено віртуальну лабораторію MolDynGrid, що функціонує в рамках Українського національного ґрід-ресурсу для вирішення задач в галузях структурної біології і біоінформатики, які потребують значних витрат машинного часу та оперують великими об'ємами інформації.

3. Виконано комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки повнорозмірної *HsTyrRS* в діапазоні 100 нс із застосуванням ґрід-технологій. Дослідження молекулярної динаміки міжмодульного лінкера *HsTyrRS* показало формування динамічних елементів вторинної структури. Показано формування асиметричної компактної структури *HsTyrRS*, в якій цитокіновий ELR-мотив є екранованим у результаті взаємодії з С-модулем, що підтверджує гіпотезу Шиммеля про відсутність цитокінової активності за рахунок екранування цитокінового мотиву в повнорозмірній структурі синтетази.

4. Моделювання молекулярної динаміки мутантних форм тирозил-тРНК синтетази, пов'язаних з нейропатією Шарко-Марі-Туса, показало наявність локальних конформаційних змін в неструктурованій петлі CP1-вставки згортки Россмана, які супроводжуються формуванням метастабільних β -структурних елементів (K147 – E157).

5. Аналіз траєкторії молекулярної динаміки структурного комплексу *HsTyrRS**тРНК^{Тур} показав наявність водневих зв'язків, які підтверджують участь амінокислотних залишків петлі CP1 вставки у взаємодії з відповідною тРНК^{Тур}. Формування метастабільних β -структурних елементів у цій ділянці може призводити до порушень у розпізнаванні акцепторним стеблом відповідної тРНК. В процесі динаміки спостерігається вихід L-тирозину з активного центру мутантної форми G41R *HsTyrRS*, що може призводити до порушення реакції аміноацилювання.

6. Побудовано комп'ютерну модель потрійного комплексу *HsTyrRS* з тРНК^{Тур} та фактором елонгації eEF1A2. На основі цієї моделі запропоновано механізм впливу мутацій Шарко-Марі-Туса на взаємодію з її макромолекулами-партнерами. Висловлено припущення, що виявлені конформаційні ефекти можуть призводити як до зміни конформації активного центру, так і до зміни специфічних взаємодій мутантних форм *HsTyrRS* з фактором елонгації eEF1A та/або тРНК^{Тур}.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Jani-Acsadi A., Krajewski K. and Shy M. E. / Charcot-Marie-Tooth neuropathies: diagnosis and management // *Semin Neurol.* — 2008. — V. 28, N 2. — P. 185-94.
2. Shy M. E., Balsamo J., Lilien J. and Kamholz J. / A molecular basis for hereditary motor and sensory neuropathy disorders // *Curr Neurol Neurosci Rep.* — 2001. — V. 1, N 1. — P. 77-88.
3. Martini R. / The effect of myelinating Schwann cells on axons // *Muscle Nerve.* — 2001. — V. 24, N 4. — P. 456-66.
4. Jordanova A., J. Irobi., Thomas F.P., Van Dijck 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., and Timmerman V. / Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy // *Nat Genet.* — 2006. — V. 38, — P. 197-202.
5. Jordanova A., Thomas F. P., Guergueltcheva V., Tournev I., Gondim F. A., Ishpekova B., De Vriendt E., Jacobs A., Litvinenko I., Ivanova N., Buzhov B., De Jonghe P., Kremensky I., and Timmerman V. / Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35 // *Am J Hum Genet.* — 2003. — V. 73, N 6. — P. 1423-30.
6. Salnikov A. O., Sliusar I. A., Sudakov O. O., Savytskyi O. V. and Kornelyuk A. I. / MolDynGrid virtual laboratory as a part of Ukrainian Academic Grid infrastructure. // *Proceedings of the 5th IEEE International Workshop on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications, IDAACS 2009.* — 2009. — V. 1, — P. 237-240.
7. Salnikov A., Sliusar I., Sudakov O., Savytskyi O. and Kornelyuk A. / Virtual laboratory MolDynGrid as a part of scientific infrastructure for biomolecular

- simulations. // *International Journal of Computing*. — 2010. — V. 9, N 4. — P. 294-300.
8. Salnikov A. , Sudakov O. , Savytskyi O. , Sliusar I. and Kornelyuk A. / The integrated environment of virtual laboratory moldyngrid for calculation of molecular dynamics of biopolymers // *Medical informatics and engineering*. — 2010. — V. 1, — P. 24-32.
 9. Yesylevskyy S. O., Savytskyi O. V., Odynets K. A. and Kornelyuk A. I. / Interdomain compactization in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by the hierarchical rotations technique // *Biophysical Chemistry*. — 2011. — V. 154, N 2-3. — P. 90-98.
 10. Savytskyi O. V., Sliusar I. A., Yesylevskyy S. O., Stirenko S. G. and Kornelyuk A. I. / Integrated tools for molecular dynamics simulation data analysis in the MolDynGrid virtual laboratory. // *Proceedings of the 6-th IEEE International Conference on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications, IDAACS 2011*. — 2011. — V. 1, — P. 209-211.
 11. Vislovukh A. A., Shalak V. F., Savytskyi O. V., Kovalenko N. I., Gralievskaya N. L., Negrutskii B. S. and El'skaya A. V. / PTI-1: novel way to oncogenicity // *Biopolym. Cell*. — 2012. — V. 28, N 5. — P. 404-410.
 12. Savytskyi O. V., Yesylevskyy S. O. and Kornelyuk A. I. / Asymmetric structure and domain binding interfaces of human tyrosyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations // *J Mol Recognit*. — 2013. — V. 26, N 2. — P. 113-20.
 13. Savytskyi O. V. and Kornelyuk A. I. / Computational modeling of molecular dynamics of G41R mutant form of human tyrosyl-tRNA synthetase, associated with Charcot-Marie-Tooth neuropathy // *Ukr Biochem J*. — 2015. — V. 87, N 6. — P. 142-53.
 14. Kravchuk V. O., Savytskyi O. V., Odynets K. O., Mykuliak V. V. and Kornelyuk A. I. / Computational modeling and molecular dynamics

- simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates // *J Biomol Struct Dyn.* — 2016. — P. 1-17.
15. Savytskyi O.V., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk O.I. / Domain binding interfaces in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by the hierot technique and molecular dynamics simulations. // *Proceedings of the eSSENCE International Workshop on "Macromolecular Structure and Dynamics", 3-5 June 2013, BMC, Uppsala, Sweden.* — 2013. — V. 1, — P. 12.
 16. Savytskyi O.V., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk O.I. / Local β -sheet formation in G41R mutant of human tyrosyl-tRNA synthetase associated with Charcot-Marie-Tooth disease // *Proceedings of the 6th Theoretical Biophysics Symposium, 24-27 June 2013, Gothenburg, Sweden.* — 2013. — V. 1, — P. 13.
 17. Savytskyi O.V. and Kornelyuk A.I. / Local beta-sheet formation in 153-156delVKQV mutant of human TyrRS associated with CMT disease // *European Biophysics Journal.* — 2013. — V. 42, N S1. — P. S198.
 18. Savytskyi O.V., Sliusar I.A., Salnikov A.O., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk A.I. / Conformational changes in human tyrosyl-tRNA synthetase studied in the moldyngrid virtual laboratory // *Proceedings of the International Conference "NORDUGRID-2013: Distributed systems and Big Data – towards new horizons", 4-6 June 2013, Šiauliai, Lithuania.* — 2014. — V. 1, — P. 20-21.
 19. Savytskyi O.V., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk O.I. / Conformational flexibility and domain binding interfaces in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations // *FEBS JOURNAL.* — 2014. — V. 281, — P. 621.
 20. Savytskyi O.V. and Kornelyuk O.I. / Molecular dynamics of human tyrosyl-tRNA synthetase active center in the complex with tyrosyl-adenylate // *Ukr.Biochem.J.* — 2014. — V. 86, N 5 (Suppl. 1). — P. 77-78.
 21. Savytskyi O.V. and Kornelyuk O.I. / Molecular dynamics simulations of tyrosyl-tRNA synthetase mutant forms associated with Charcot-Marie-Tooth

- neuropathy // *Proceedings of the FEBS/IUBMB Advanced Lecture Course "Molecular basis of human diseases: 50 years anniversary of Spetses summer schools", 27th May - 1st June, 2016, Spetses island, Greece.* — 2016. — V. 1, — P. 41.
22. Woese C. R. / On the evolution of cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2002. — V. 99, N 13. — P. 8742-7.
23. 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. and Ackerman S. L. / Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration // *Nature.* — 2006. — V. 443, N 7107. — P. 50-5.
24. Park S. G., Schimmel P. and Kim S. / Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2008. — V. 105, N 32. — P. 11043-9.
25. Yao P. and Fox P. L. / Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease // *EMBO Mol Med.* — 2013. — V. 5, N 3. — P. 332-43.
26. Pang Y. L., Poruri K. and Martinis S. A. / tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond // *Wiley Interdiscip Rev RNA.* — 2014. — V. 5, N 4. — P. 461-80.
27. Bullwinkle T. J. and Ibba M. / Emergence and evolution // *Top Curr Chem.* — 2014. — V. 344, — P. 43-87.
28. Eriani Gilbert, Delarue Marc, Poch Olivier, Gangloff Jean and Moras Dino / Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs // *Nature.* — 1990. — V. 347, N 6289. — P. 203-206.
29. Ribas de Pouplana L. and Schimmel P. / Two classes of tRNA synthetases suggested by sterically compatible dockings on tRNA acceptor stem // *Cell.* — 2001. — V. 104, N 2. — P. 191-3.
30. Mascarenhas A. P., An S., Rosen A. E., Martinis S. A. and Musier-Forsyth K. / Fidelity Mechanisms of the Aminoacyl-tRNA Synthetases // — 2009. — V. 22, — P. 155-203.

31. Cusack S. / Eleven down and nine to go // *Nat Struct Biol.* — 1995. — V. 2, N 10. — P. 824-31.
32. Storkebaum E. / Peripheral neuropathy via mutant tRNA synthetases: Inhibition of protein translation provides a possible explanation // *Bioessays.* — 2016. — V. 38, N 9. — P. 818-29.
33. Perona John J. and Gruic-Sovulj Ita / Synthetic and Editing Mechanisms of Aminoacyl-tRNA Synthetases // — 2013. — V. 344, — P. 1-41.
34. Irwin M. J., Nyborg J., Reid B. R. and Blow D. M. / The crystal structure of tyrosyl-transfer RNA synthetase at 2.7 Å resolution // *Journal of Molecular Biology.* — 1976. — V. 105, N 4. — P. 577-586.
35. Brick P., Bhat T. N. and Blow D. M. / Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 2.3 Å resolution. Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate // *J Mol Biol.* — 1989. — V. 208, N 1. — P. 83-98.
36. Yang X.-L., Skene R.J., McRee D.E. and Schimmel P. / Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2002. — V. 99, N 24. — P. 15369-15374.
37. Schmitt E., Meinnel T., Blanquet S. and Mechulam Y. / Methionyl-tRNA synthetase needs an intact and mobile 332KMSKS336 motif in catalysis of methionyl adenylate formation // *J Mol Biol.* — 1994. — V. 242, N 4. — P. 566-76.
38. Webster T., Tsai H., Kula M., Mackie G. A. and Schimmel P. / Specific sequence homology and three-dimensional structure of an aminoacyl transfer RNA synthetase // *Science.* — 1984. — V. 226, N 4680. — P. 1315-7.
39. Yadavalli S. S. and Ibba M. / Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis its role in translational fidelity // *Adv Protein Chem Struct Biol.* — 2012. — V. 86, — P. 1-43.
40. Schmidt Eric and Schimmel Paul / Residues in a Class I tRNA Synthetase Which Determine Selectivity of Amino Acid Recognition in the Context of tRNA // *Biochemistry.* — 1995. — V. 34, N 35. — P. 11204-11210.

41. Doublet S., Bricogne G., Gilmore C. and Carter C. W., Jr. / Tryptophanyl-tRNA synthetase crystal structure reveals an unexpected homology to tyrosyl-tRNA synthetase // *Structure*. — 1995. — V. 3, N 1. — P. 17-31.
42. Arnez J. G. and Moras D. / Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction // *Trends Biochem Sci*. — 1997. — V. 22, N 6. — P. 211-6.
43. Fersht A. R., Knill-Jones J. W., Bedouelle H. and Winter G. / Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase: a mobile loop envelopes the transition state in an induced-fit mechanism // *Biochemistry*. — 1988. — V. 27, N 5. — P. 1581-7.
44. First E. A. and Fersht A. R. / Analysis of the role of the KMSKS loop in the catalytic mechanism of the tyrosyl-tRNA synthetase using multimutant cycles // *Biochemistry*. — 1995. — V. 34, N 15. — P. 5030-5043.
45. Ilyin V. A., Temple B., Hu M., Li G., Yin Y., Vachette P. and Carter C. W., Jr. / 2.9 Å crystal structure of ligand-free tryptophanyl-tRNA synthetase: domain movements fragment the adenine nucleotide binding site // *Protein Sci*. — 2000. — V. 9, N 2. — P. 218-31.
46. Kobayashi T., Takimura T., Sekine R., Kelly V. P., Kamata K., Sakamoto K., Nishimura S. and Yokoyama S. / Structural snapshots of the KMSKS loop rearrangement for amino acid activation by bacterial tyrosyl-tRNA synthetase // *J Mol Biol*. — 2005. — V. 346, N 1. — P. 105-17.
47. Mykuliak V. V., Dragan A. I. and Kornelyuk A. I. / Structural states of the flexible catalytic loop of *M. tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase in different enzyme-substrate complexes // *Eur Biophys J*. — 2014. — V. 43, N 12. — P. 613-22.
48. Cusack Stephen, Berthet-Colominas Carmen, Härtlein Michael, Nassar Nicolas and Leberman Reuben / A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å // *Nature*. — 1990. — V. 347, N 6290. — P. 249-255.

49. Arnez J. G., Harris D. C., Mitschler A., Rees B., Francklyn C. S. and Moras D. / Crystal structure of histidyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* complexed with histidyl-adenylate // *EMBO J.* — 1995. — V. 14, N 17. — P. 4143-55.
50. Ruff M., Krishnaswamy S., Boeglin M., Poterszman A., Mitschler A., Podjarny A., Rees B., Thierry J. C. and Moras D. / Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp) // *Science.* — 1991. — V. 252, N 5013. — P. 1682-9.
51. Yaremchuk A., Kriklyvi I., Tukalo M. and Cusack S. / Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition // *EMBO J.* — 2002. — V. 21, N 14. — P. 3829-40.
52. Hausmann C. D. and Ibba M. / Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed // *FEMS Microbiol Rev.* — 2008. — V. 32, N 4. — P. 705-21.
53. Kaminska M., Havrylenko S., Decottignies P., Gillet S., Le Marechal P., Negrutskii B. and Mirande M. / Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex // *J Biol Chem.* — 2009. — V. 284, N 10. — P. 6053-60.
54. Dias J., Renault L., Perez J. and Mirande M. / Small-angle X-ray solution scattering study of the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals an elongated and multi-armed particle // *J Biol Chem.* — 2013. — V. 288, N 33. — P. 23979-89.
55. Motorin Yury A., Wolfson Alexey D., Lohr Dirk, Orlovsky Alexander F. and Gladilin Kirill L. / Purification and properties of a high-molecular-mass complex between Val-tRNA synthetase and the heavy form of elongation factor 1 from mammalian cells // *European Journal of Biochemistry.* — 1991. — V. 201, N 2. — P. 325-331.
56. Bec G., Kerjan P. and Waller J. P. / Reconstitution in vitro of the valyl-tRNA synthetase-elongation factor (EF) 1 beta gamma delta complex. Essential roles

- of the NH₂-terminal extension of valyl-tRNA synthetase and of the EF-1 delta subunit in complex formation // *J Biol Chem.* — 1994. — V. 269, N 3. — P. 2086-92.
57. Park S. G., Ewalt K. L. and Kim S. / Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers // *Trends Biochem Sci.* — 2005. — V. 30, N 10. — P. 569-74.
58. Guzzo C. M. and Yang D. C. / Lysyl-tRNA synthetase interacts with EF1alpha, aspartyl-tRNA synthetase and p38 in vitro // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2008. — V. 365, N 4. — P. 718-23.
59. Mazumder B., Sampath P. and Fox P. L. / Translational control of ceruloplasmin gene expression: beyond the IRE // *Biol Res.* — 2006. — V. 39, N 1. — P. 59-66.
60. Smirnova E. V., Lakunina V. A., Tarassov I., Krashennnikov I. A. and Kamenski P. A. / Noncanonical functions of aminoacyl-tRNA synthetases // *Biochemistry (Mosc).* — 2012. — V. 77, N 1. — P. 15-25.
61. Futernyk P. V., Olszak K., Przykorska A., Kornelyuk A. I. and Negrutskii B. S. / Investigation of non-canonical complexes of eukaryotic elongation factor 1A with tRNA^{Tyr} and tyrosyl-tRNA synthetase. Role of different domains of the synthetase in interaction with tRNA // *Biopolymers and Cell.* — 2005. — V. 21, N 5. — P. 400-406.
62. Nangle L. A., Motta C. M. and Schimmel P. / Global effects of mistranslation from an editing defect in mammalian cells // *Chem Biol.* — 2006. — V. 13, N 10. — P. 1091-100.
63. Karkhanis V. A., Boniecki M. T., Poruri K. and Martinis S. A. / A viable amino acid editing activity in the leucyl-tRNA synthetase CP1-splicing domain is not required in the yeast mitochondria // *J Biol Chem.* — 2006. — V. 281, N 44. — P. 33217-25.
64. Howard O. M., Dong H. F., Yang D., Raben N., Nagaraju K., Rosen A., Casciola-Rosen L., Hartlein M., Kron M., Yang D., Yiadom K., Dwivedi S., Plotz P. H., and Oppenheim J. J. / Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-

- tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells // *J Exp Med.* — 2002. — V. 196, N 6. — P. 781-91.
65. Wakasugi K., Slike B. M., Hood J., Ewalt K. L., Cheresch D. A. and Schimmel P. / Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase // *J Biol Chem.* — 2002. — V. 277, N 23. — P. 20124-6.
66. Wakasugi K. and Schimmel P. / Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. // *J. Biol. Chem.* — 1999. — V. 274, — P. 23155-23159.
67. Wakasugi K. and Schimmel P. / Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. // *Science.* — 1999. — V. 284, — P. 147-151.
68. Kornelyuk A. I., Tas M. P. R., Dybrovsky A. and Murray C. / Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. // *Biopolymers and Cell (Kiev).* — 1999. — V. 15, — P. 168-172.
69. Wakasugi K., Slike B. M., Hood J., Otani A., Ewalt K. L., Friedlander M., Cheresch D. A. and Schimmel P. / A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2002. — V. 99, N 1. — P. 173-7.
70. Otani A., Slike B. M., Dorrell M. I., Hood J., Kinder K., Ewalt K. L., Cheresch D., Schimmel P. and Friedlander M. / A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2002. — V. 99, N 1. — P. 178-83.
71. Halwani R., Cen S., Javanbakht H., Saadatmand J., Kim S., Shiba K. and Kleiman L. / Cellular distribution of Lysyl-tRNA synthetase and its interaction with Gag during human immunodeficiency virus type 1 assembly // *J Virol.* — 2004. — V. 78, N 14. — P. 7553-64.
72. Ko Y. G., Kim E. Y., Kim T., Park H., Park H. S., Choi E. J. and Kim S. / Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutaminyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1 // *J Biol Chem.* — 2001. — V. 276, N 8. — P. 6030-6.

73. Guo M., Yang X. L. and Schimmel P. / New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation // *Nat Rev Mol Cell Biol.* — 2010. — V. 11, N 9. — P. 668-74.
74. Greenberg Y., King M., Kiosses W. B., Ewalt K., Yang X., Schimmel P., Reader J. S. and Tzima E. / The novel fragment of tyrosyl tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells // *FASEB J.* — 2008. — V. 22, N 5. — P. 1597-605.
75. Konovalova S. and Tyynismaa H. / Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases in human disease // *Mol Genet Metab.* — 2013. — V. 108, N 4. — P. 206-11.
76. Diodato D., Ghezzi D. and Tiranti V. / The Mitochondrial Aminoacyl tRNA Synthetases: Genes and Syndromes // *Int J Cell Biol.* — 2014. — V. 2014, — P. 787956.
77. Florentz C. / Molecular investigations on tRNAs involved in human mitochondrial disorders // *Biosci Rep.* — 2002. — V. 22, N 1. — P. 81-98.
78. t Hart L. M., Hansen T., Rietveld I., Dekker J. M., Nijpels G., Janssen G. M., Arp P. A., Uitterlinden A. G., Jorgensen T., Borch-Johnsen K., Pols H. A., Pedersen O., van Duijn C. M., Heine R. J., and Maassen J. A. / Evidence that the mitochondrial leucyl tRNA synthetase (LARS2) gene represents a novel type 2 diabetes susceptibility gene // *Diabetes.* — 2005. — V. 54, N 6. — P. 1892-5.
79. Coller H. A., Grandori C., Tamayo P., Colbert T., Lander E. S., Eisenman R. N. and Golub T. R. / Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2000. — V. 97, N 7. — P. 3260-5.
80. Han J. M., Park S. G., Liu B., Park B. J., Kim J. Y., Jin C. H., Song Y. W., Li Z. and Kim S. / Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein 1/p43 controls endoplasmic reticulum retention of heat shock protein gp96: its pathological implications in lupus-like autoimmune diseases // *Am J Pathol.* — 2007. — V. 170, N 6. — P. 2042-54.

81. Kim K. J., Park M. C., Choi S. J., Oh Y. S., Choi E. C., Cho H. J., Kim M. H., Kim S. H., Kim D. W., Kim S., and Kang B. S. / Determination of three-dimensional structure and residues of the novel tumor suppressor AIMP3/p18 required for the interaction with ATM // *J Biol Chem.* — 2008. — V. 283, N 20. — P. 14032-40.
82. Kunst C. B., Mezey E., Brownstein M. J. and Patterson D. / Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions // *Nat Genet.* — 1997. — V. 15, N 1. — P. 91-4.
83. Nowaczyk M. J., Huang L., Tarnopolsky M., Schwartzentruber J., Majewski J., Bulman D. E., Forge Canada Consortium Care Rare Canada Consortium, Hartley T. and Boycott K. M. / A novel multisystem disease associated with recessive mutations in the tyrosyl-tRNA synthetase (YARS) gene // *Am J Med Genet A.* — 2017. — V. 173, N 1. — P. 126-134.
84. Simons C., Griffin L. B., Helman G., Golas G., Pizzino A., Bloom M., Murphy J. L., Crawford J., Evans S. H., Topper S., Whitehead M. T., Schreiber J. M., Chapman K. A., Tiffit C., Lu K. B., Gamper H., Shigematsu M., Taft R. J., Antonellis A., Hou Y. M., and Vanderver A. / Loss-of-function alanyl-tRNA synthetase mutations cause an autosomal-recessive early-onset epileptic encephalopathy with persistent myelination defect // *Am J Hum Genet.* — 2015. — V. 96, N 4. — P. 675-81.
85. Latour P., Thauvin-Robinet C., Baudalet-Mery C., Soichot P., Cusin V., Faivre L., Locatelli M. C., Mayencon M., Sarcey A., Broussolle E., Camu W., David A., and Rousson R. / A major determinant for binding and aminoacylation of tRNA(Ala) in cytoplasmic Alanyl-tRNA synthetase is mutated in dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease // *Am J Hum Genet.* — 2010. — V. 86, N 1. — P. 77-82.
86. Taft R. J., Vanderver A., Leventer R. J., Damiani S. A., Simons C., Grimmond S. M., Miller D., Schmidt J., Lockhart P. J., Pope K., Ru K., Crawford J., Rosser T., de Coo I. F., Juneja M., Verma I. C., Prabhakar P., Blaser S., Raiman J., Pouwels P. J., Bevova M. R., Abbink T. E., van der Knaap M. S.,

- and Wolf N. I. / Mutations in DARS cause hypomyelination with brain stem and spinal cord involvement and leg spasticity // *Am J Hum Genet.* — 2013. — V. 92, N 5. — P. 774-80.
87. Puffenberger E. G., Jinks R. N., Sougnez C., Cibulskis K., Willert R. A., Achilly N. P., Cassidy R. P., Fiorentini C. J., Heiken K. F., Lawrence J. J., Mahoney M. H., Miller C. J., Nair D. T., Politi K. A., Worcester K. N., Setton R. A., Dipiazza R., Sherman E. A., Eastman J. T., Francklyn C., Robey-Bond S., Rider N. L., Gabriel S., Morton D. H., and Strauss K. A. / Genetic mapping and exome sequencing identify variants associated with five novel diseases // *PLoS One.* — 2012. — V. 7, N 1. — P. e28936.
88. Vester A., Velez-Ruiz G., McLaughlin H. M., Program Nisc Comparative Sequencing, Lupski J. R., Talbot K., Vance J. M., Zuchner S., Roda R. H., Fischbeck K. H., Biesecker L. G., Nicholson G., Beg A. A., and Antonellis A. / A loss-of-function variant in the human histidyl-tRNA synthetase (HARS) gene is neurotoxic in vivo // *Hum Mutat.* — 2013. — V. 34, N 1. — P. 191-9.
89. Casey J. P., McGettigan P., Lynam-Lennon N., McDermott M., Regan R., Conroy J., Bourke B., O'Sullivan J., Crushell E., Lynch S., and Ennis S. / Identification of a mutation in LARS as a novel cause of infantile hepatopathy // *Mol Genet Metab.* — 2012. — V. 106, N 3. — P. 351-8.
90. van Meel E., Wegner D. J., Cliften P., Willing M. C., White F. V., Kornfeld S. and Cole F. S. / Rare recessive loss-of-function methionyl-tRNA synthetase mutations presenting as a multi-organ phenotype // *BMC Med Genet.* — 2013. — V. 14, — P. 106.
91. Hadchouel A., Wieland T., Griese M., Baruffini E., Lorenz-Depiereux B., Enaud L., Graf E., Dubus J. C., Halioui-Louhaichi S., Coulomb A., Delacourt C., Eckstein G., Zarbock R., Schwarzmayer T., Cartault F., Meitinger T., Lodi T., de Blic J., and Strom T. M. / Biallelic Mutations of Methionyl-tRNA Synthetase Cause a Specific Type of Pulmonary Alveolar Proteinosis Prevalent on Reunion Island // *Am J Hum Genet.* — 2015. — V. 96, N 5. — P. 826-31.

92. Gonzalez M., McLaughlin H., Houlden H., Guo M., Yo-Tsen L., Hadjivassiliou M., Speziani F., Yang X. L., Antonellis A., Reilly M. M., Zuchner S., and Inherited Neuropathy Consortium / Exome sequencing identifies a significant variant in methionyl-tRNA synthetase (MARS) in a family with late-onset CMT2 // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. — 2013. — V. 84, N 11. — P. 1247-9.
93. Wolf N. I., Salomons G. S., Rodenburg R. J., Pouwels P. J., Schieving J. H., Derks T. G., Fock J. M., Rump P., van Beek D. M., van der Knaap M. S., and Waisfisz Q. / Mutations in RARS cause hypomyelination // *Ann Neurol*. — 2014. — V. 76, N 1. — P. 134-9.
94. Karaca E., Harel T., Pehlivan D., Jhangiani S. N., Gambin T., Coban Akdemir Z., Gonzaga-Jauregui C., Erdin S., Bayram Y., Campbell I. M., Hunter J. V., Atik M. M., Van Esch H., Yuan B., Wiszniewski W., Isikay S., Yesil G., Yuregir O. O., Tug Bozdogan S., Aslan H., Aydin H., Tos T., Aksoy A., De Vivo D. C., Jain P., Geckinli B. B., Sezer O., Gul D., Durmaz B., Cogulu O., Ozkinay F., Topcu V., Candan S., Cebi A. H., Ikbali M., Yilmaz Gulec E., Gezdirici A., Koparir E., Ekici F., Coskun S., Cicek S., Karaer K., Koparir A., Duz M. B., Kirat E., Fenercioglu E., Ulucan H., Seven M., Guran T., Elcioglu N., Yildirim M. S., Aktas D., Alikasifoglu M., Ture M., Yakut T., Overton J. D., Yuksel A., Ozen M., Muzny D. M., Adams D. R., Boerwinkle E., Chung W. K., Gibbs R. A., and Lupski J. R. / Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease // *Neuron*. — 2015. — V. 88, N 3. — P. 499-513.
95. McMillan H. J., Schwartzentruber J., Smith A., Lee S., Chakraborty P., Bulman D. E., Beaulieu C. L., Majewski J., Boycott K. M. and Geraghty M. T. / Compound heterozygous mutations in glycyl-tRNA synthetase are a proposed cause of systemic mitochondrial disease // *BMC Med Genet*. — 2014. — V. 15, — P. 36.
96. Antonellis A., Ellsworth R. E., Sambuughin N., Puls I., Abel A., Lee-Lin S. Q., Jordanova A., Kremensky I., Christodoulou K., Middleton L. T., Sivakumar

- K., Ionasescu V., Funalot B., Vance J. M., Goldfarb L. G., Fischbeck K. H., and Green E. D. / Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V // *Am J Hum Genet.* — 2003. — V. 72, N 5. — P. 1293-9.
97. Antonellis A., Lee-Lin S. Q., Wasterlain A., Leo P., Quezado M., Goldfarb L. G., Myung K., Burgess S., Fischbeck K. H. and Green E. D. / Functional analyses of glycyl-tRNA synthetase mutations suggest a key role for tRNA-charging enzymes in peripheral axons // *J Neurosci.* — 2006. — V. 26, N 41. — P. 10397-406.
98. Antonellis A. and Green E. D. / The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* — 2008. — V. 9, — P. 87-107.
99. McLaughlin H. M., Sakaguchi R., Liu C., Igarashi T., Pehlivan D., Chu K., Iyer R., Cruz P., Cherukuri P. F., Hansen N. F., Mullikin J. C., Program Nisc Comparative Sequencing, Biesecker L. G., Wilson T. E., Ionasescu V., Nicholson G., Searby C., Talbot K., Vance J. M., Zuchner S., Szigeti K., Lupski J. R., Hou Y. M., Green E. D., and Antonellis A. / Compound heterozygosity for loss-of-function lysyl-tRNA synthetase mutations in a patient with peripheral neuropathy // *Am J Hum Genet.* — 2010. — V. 87, N 4. — P. 560-6.
100. Santos-Cortez R. L., Lee K., Azeem Z., Antonellis P. J., Pollock L. M., Khan S., Irfanullah, Andrade-Elizondo P. B., Chiu I., Adams M. D., Basit S., Smith J. D., University of Washington Center for Mendelian Genomics, Nickerson D. A., McDermott B. M., Jr., Ahmad W., and Leal S. M. / Mutations in KARS, encoding lysyl-tRNA synthetase, cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB89 // *Am J Hum Genet.* — 2013. — V. 93, N 1. — P. 132-40.
101. McMillan H. J., Humphreys P., Smith A., Schwartzentruber J., Chakraborty P., Bulman D. E., Beaulieu C. L., Consortium Forge Canada, Majewski J., Boycott K. M., and Geraghty M. T. / Congenital Visual Impairment and

- Progressive Microcephaly Due to Lysyl-Transfer Ribonucleic Acid (RNA) Synthetase (KARS) Mutations: The Expanding Phenotype of Aminoacyl-Transfer RNA Synthetase Mutations in Human Disease // *J Child Neurol.* — 2015. — V. 30, N 8. — P. 1037-43.
102. Zhang X., Ling J., Barcia G., Jing L., Wu J., Barry B. J., Mochida G. H., Hill R. S., Weimer J. M., Stein Q., Poduri A., Partlow J. N., Ville D., Dulac O., Yu T. W., Lam A. T., Servattalab S., Rodriguez J., Boddaert N., Munnich A., Colleaux L., Zon L. I., Soll D., Walsh C. A., and Nabbout R. / Mutations in QARS, encoding glutaminyl-tRNA synthetase, cause progressive microcephaly, cerebral-cerebellar atrophy, and intractable seizures // *Am J Hum Genet.* — 2014. — V. 94, N 4. — P. 547-58.
103. Scheper G. C., van der Klok T., van Andel R. J., van Berkel C. G., Sissler M., Smet J., Muravina T. I., Serkov S. V., Uziel G., Bugiani M., Schiffmann R., Krageloh-Mann I., Smeitink J. A., Florentz C., Van Coster R., Pronk J. C., and van der Knaap M. S. / Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation // *Nat Genet.* — 2007. — V. 39, N 4. — P. 534-9.
104. Finsterer J. / Mitochondrial ataxias // *Can J Neurol Sci.* — 2009. — V. 36, N 5. — P. 543-53.
105. Ko H. S., von Coelln R., Sriram S. R., Kim S. W., Chung K. K., Pletnikova O., Troncoso J., Johnson B., Saffary R., Goh E. L., Song H., Park B. J., Kim M. J., Kim S., Dawson V. L., and Dawson T. M. / Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death // *J Neurosci.* — 2005. — V. 25, N 35. — P. 7968-78.
106. Baets J., De Jonghe P. and Timmerman V. / Recent advances in Charcot-Marie-Tooth disease // *Curr Opin Neurol.* — 2014. — V. 27, N 5. — P. 532-40.
107. Seburn K. L., Nangle L. A., Cox G. A., Schimmel P. and Burgess R. W. / An active dominant mutation of glycyl-tRNA synthetase causes neuropathy in a

- Charcot-Marie-Tooth 2D mouse model // *Neuron*. — 2006. — V. 51, N 6. — P. 715-26.
108. Chihara T., Luginbuhl D. and Luo L. / Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization // *Nat Neurosci*. — 2007. — V. 10, N 7. — P. 828-37.
109. Ribas de Pouplana L., Buechter D., Sardesai N. Y. and Schimmel P. / Functional analysis of peptide motif for RNA microhelix binding suggests new family of RNA-binding domains // *EMBO J*. — 1998. — V. 17, N 18. — P. 5449-57.
110. Safka Brozkova D., Deconinck T., Griffin L. B., Ferbert A., Haberlova J., Mazanec R., Lassuthova P., Roth C., Pilunthanakul T., Rautenstrauss B., Janecke A. R., Zavadakova P., Chrast R., Rivolta C., Zuchner S., Antonellis A., Beg A. A., De Jonghe P., Senderek J., Seeman P., and Baets J. / Loss of function mutations in HARS cause a spectrum of inherited peripheral neuropathies // *Brain*. — 2015. — V. 138, N Pt 8. — P. 2161-72.
111. Storkebaum E., Leitão-Gonçalves R., Godenschwege T., Nangle L., Mejia M., Bosmans I., Ooms T., Jacobs A., Van Dijck P., Yang X.L., Schimmel P., Norga K., Timmerman V., Callaerts P., and Jordanova A. / Dominant mutations in the tyrosyl-tRNA synthetase gene recapitulate in *Drosophila* features of human Charcot-Marie-Tooth neuropathy. // *Proc Natl Acad Sci USA*. — 2009. — V. 106, — P. 11782-11787.
112. Jordanova A., Irobi J., Thomas F. P., Van Dijck P., Meerschaert K., Dewil M., Dierick I., Jacobs A., De Vriendt E., Guerguelcheva 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., and Timmerman V. / Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy // *Nat Genet*. — 2006. — V. 38, N 2. — P. 197-202.

113. Froelich C. A. and First E. A. / Dominant Intermediate Charcot-Marie-Tooth disorder is not due to a catalytic defect in tyrosyl-tRNA synthetase // *Biochemistry*. — 2011. — V. 50, N 33. — P. 7132-45.
114. Xie W., Nangle L. A., Zhang W., Schimmel P. and Yang X. L. / Long-range structural effects of a Charcot-Marie-Tooth disease-causing mutation in human glycyl-tRNA synthetase // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2007. — V. 104, N 24. — P. 9976-81.
115. Yang X.-L., Liu J., Skene R.J., McRee D.E. and Schimmel P. / Crystal Structure of an EMAP-II-like Cytokine Released from a human tRNA Synthetase // *Helv. Chim. Acta*. — 2003. — V. 86, — P. 1246-1257.
116. Sajish M. and Schimmel P. / A human tRNA synthetase is a potent PARP1-activating effector target for resveratrol // *Nature*. — 2015. — V. 519, N 7543. — P. 370-3.
117. Austin J. and First E. A. / Potassium functionally replaces the second lysine of the KMSKS signature sequence in human tyrosyl-tRNA synthetase // *J Biol Chem*. — 2002. — V. 277, N 23. — P. 20243-8.
118. Austin J. and First E. A. / Catalysis of tyrosyl-adenylate formation by the human tyrosyl-tRNA synthetase // *J Biol Chem*. — 2002. — V. 277, N 17. — P. 14812-20.
119. Fersht Alan R., Mulvey Roderick S. and Koch Gordon L. E. / Ligand binding and enzymic catalysis coupled through subunits in tyrosyl-tRNA synthetase // *Biochemistry*. — 1975. — V. 14, N 1. — P. 13-18.
120. Avis J. M., Day A. G., Garcia G. A. and Fersht A. R. / Reaction of modified and unmodified tRNA(Tyr) substrates with tyrosyl-tRNA synthetase (*Bacillus stearothermophilus*) // *Biochemistry*. — 1993. — V. 32, N 20. — P. 5312-20.
121. Kornelyuk A. I., Klimenko I. V. and Odynets K. A. / Conformational change of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase induced by tyrosyl adenylate formation // *Biochem Mol Biol Int*. — 1995. — V. 35, N 2. — P. 317-22.
122. Bernhard S. A. and MacQuarrie R. A. / Half-site reactivity and the "induced-fit" hypothesis // *J Mol Biol*. — 1973. — V. 74, N 1. — P. 73-8.

123. Kleeman T.A., Wei D., Simpson K.L. and First E.A. / Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine. // *J Biol Chem.* — 1997. — V. 272, N 22. — P. 14420-14425.
124. Lee C. P. and RajBhandary U. L. / Mutants of Escherichia coli initiator tRNA that suppress amber codons in Saccharomyces cerevisiae and are aminoacylated with tyrosine by yeast extracts // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1991. — V. 88, N 24. — P. 11378-82.
125. Hinds Mark G. and Norton Raymond S. / NMR spectroscopy of peptides and proteins // *Molecular Biotechnology.* — 1997. — V. 7, N 3. — P. 315-331.
126. Li R., Macnamara L. M., Leuchter J. D., Alexander R. W. and Cho S. S. / MD Simulations of tRNA and Aminoacyl-tRNA Synthetases: Dynamics, Folding, Binding, and Allostery // *Int J Mol Sci.* — 2015. — V. 16, N 7. — P. 15872-902.
127. De Vivo M., Masetti M., Bottegoni G. and Cavalli A. / Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery // *J Med Chem.* — 2016. — V. 59, N 9. — P. 4035-61.
128. Levitt M. and Warshel A. / Computer simulation of protein folding // *Nature.* — 1975. — V. 253, N 5494. — P. 694-8.
129. McCammon J. A., Gelin B. R. and Karplus M. / Dynamics of folded proteins // *Nature.* — 1977. — V. 267, N 5612. — P. 585-90.
130. Smith J. C. and Roux B. / Eppure si muove! The 2013 Nobel Prize in Chemistry // *Structure.* — 2013. — V. 21, N 12. — P. 2102-5.
131. Nussinov R. / The significance of the 2013 Nobel Prize in Chemistry and the challenges ahead // *PLoS Comput Biol.* — 2014. — V. 10, N 1. — P. e1003423.
132. MacKerell A. D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D. T., Prodhom B., Reiher W. E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J. C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiorkiewicz-Kuczera J., Yin D., and Karplus M. /

- All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins // *J Phys Chem B*. — 1998. — V. 102, N 18. — P. 3586-616.
133. Huang J. and MacKerell A. D., Jr. / CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data // *J Comput Chem*. — 2013. — V. 34, N 25. — P. 2135-45.
134. Perez A., Marchan I., Svozil D., Sponer J., Cheatham T. E., 3rd, Laughton C. A. and Orozco M. / Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of alpha/gamma conformers // *Biophys J*. — 2007. — V. 92, N 11. — P. 3817-29.
135. Lin Z. and van Gunsteren W. F. / Refinement of the application of the GROMOS 54A7 force field to beta-peptides // *J Comput Chem*. — 2013. — V. 34, N 32. — P. 2796-805.
136. Case D. A., Cheatham T. E., 3rd, Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K. M., Jr., Onufriev A., Simmerling C., Wang B. and Woods R. J. / The Amber biomolecular simulation programs // *J Comput Chem*. — 2005. — V. 26, N 16. — P. 1668-88.
137. Brooks B. R., Brooks C. L., 3rd, Mackerell A. D., Jr., Nilsson L., Petrella R. J., Roux B., Won Y., Archontis G., Bartels C., Boresch S., Caflisch A., Caves L., Cui Q., Dinner A. R., Feig M., Fischer S., Gao J., Hodoscek M., Im W., Kuczera K., Lazaridis T., Ma J., Ovchinnikov V., Paci E., Pastor R. W., Post C. B., Pu J. Z., Schaefer M., Tidor B., Venable R. M., Woodcock H. L., Wu X., Yang W., York D. M., and Karplus M. / CHARMM: the biomolecular simulation program // *J Comput Chem*. — 2009. — V. 30, N 10. — P. 1545-614.
138. Abraham Mark James, Murtola Teemu, Schulz Roland, Páll Szilárd, Smith Jeremy C., Hess Berk and Lindahl Erik / GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. — 2015. — V. 1-2, — P. 19-25.

139. Plimpton Steve / Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics // *Journal of Computational Physics*. — 1995. — V. 117, N 1. — P. 1-19.
140. Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kale L. and Schulten K. / Scalable molecular dynamics with NAMD // *J Comput Chem*. — 2005. — V. 26, N 16. — P. 1781-802.
141. Kutzner C., Pall S., Fechner M., Esztermann A., de Groot B. L. and Grubmuller H. / Best bang for your buck: GPU nodes for GROMACS biomolecular simulations // *J Comput Chem*. — 2015. — V. 36, N 26. — P. 1990-2008.
142. Lau F. T. and Karplus M. / Molecular recognition in proteins. Simulation analysis of substrate binding by a tyrosyl-tRNA synthetase mutant // *J Mol Biol*. — 1994. — V. 236, N 4. — P. 1049-66.
143. Perryman A. L., Lin J. H. and McCammon J. A. / HIV-1 protease molecular dynamics of a wild-type and of the V82F/I84V mutant: possible contributions to drug resistance and a potential new target site for drugs // *Protein Sci*. — 2004. — V. 13, N 4. — P. 1108-23.
144. Ghosh A., Sakaguchi R., Liu C., Vishveshwara S. and Hou Y. M. / Allosteric communication in cysteinyl tRNA synthetase: a network of direct and indirect readout // *J Biol Chem*. — 2011. — V. 286, N 43. — P. 37721-31.
145. Grant T. D., Luft J. R., Wolfley J. R., Snell M. E., Tsuruta H., Corretore S., Quartley E., Phizicky E. M., Grayhack E. J. and Snell E. H. / The structure of yeast glutaminyl-tRNA synthetase and modeling of its interaction with tRNA // *J Mol Biol*. — 2013. — V. 425, N 14. — P. 2480-93.
146. Yamasaki S., Nakamura S., Terada T. and Shimizu K. / Mechanism of the difference in the binding affinity of E. coli tRNA^{Gln} to glutaminyl-tRNA synthetase caused by noninterface nucleotides in variable loop // *Biophys J*. — 2007. — V. 92, N 1. — P. 192-200.

147. Black Pyrkosz A., Eargle J., Sethi A. and Luthey-Schulten Z. / Exit strategies for charged tRNA from GluRS // *J Mol Biol.* — 2010. — V. 397, N 5. — P. 1350-71.
148. Sethi A., Eargle J., Black A. A. and Luthey-Schulten Z. / Dynamical networks in tRNA:protein complexes // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2009. — V. 106, N 16. — P. 6620-5.
149. Liu R. J., Tan M., Du D. H., Xu B. S., Eriani G. and Wang E. D. / Peripheral insertion modulates the editing activity of the isolated CP1 domain of leucyl-tRNA synthetase // *Biochem J.* — 2011. — V. 440, N 2. — P. 217-27.
150. Strom A. M., Fehling S. C., Bhattacharyya S. and Hati S. / Probing the global and local dynamics of aminoacyl-tRNA synthetases using all-atom and coarse-grained simulations // *J Mol Model.* — 2014. — V. 20, N 5. — P. 2245.
151. Hagiwara Y., Nureki O. and Tateno M. / Identification of the nucleophilic factors and the productive complex for the editing reaction by leucyl-tRNA synthetase // *FEBS Lett.* — 2009. — V. 583, N 12. — P. 1901-8.
152. Ghosh A. and Vishveshwara S. / A study of communication pathways in methionyl- tRNA synthetase by molecular dynamics simulations and structure network analysis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2007. — V. 104, N 40. — P. 15711-6.
153. Budiman M. E., Knaggs M. H., Fetrow J. S. and Alexander R. W. / Using molecular dynamics to map interaction networks in an aminoacyl-tRNA synthetase // *Proteins.* — 2007. — V. 68, N 3. — P. 670-89.
154. Bhattacharyya M., Ghosh A., Hansia P. and Vishveshwara S. / Allostery and conformational free energy changes in human tryptophanyl-tRNA synthetase from essential dynamics and structure networks // *Proteins.* — 2010. — V. 78, N 3. — P. 506-17.
155. Kapustina M. and Carter C. W., Jr. / Computational studies of tryptophanyl-tRNA synthetase: activation of ATP by induced-fit // *J Mol Biol.* — 2006. — V. 362, N 5. — P. 1159-80.

156. Li T., Froeyen M. and Herdewijn P. / Comparative structural dynamics of Tyrosyl-tRNA synthetase complexed with different substrates explored by molecular dynamics // *Eur Biophys J.* — 2008. — V. 38, N 1. — P. 25-35.
157. Li L., Yu L. and Huang Q. / Molecular trigger for pre-transfer editing pathway in Valyl-tRNA synthetase: a molecular dynamics simulation study // *J Mol Model.* — 2011. — V. 17, N 3. — P. 555-64.
158. Thompson D., Plateau P. and Simonson T. / Free-energy simulations and experiments reveal long-range electrostatic interactions and substrate-assisted specificity in an aminoacyl-tRNA synthetase // *Chembiochem.* — 2006. — V. 7, N 2. — P. 337-44.
159. Thompson D. and Simonson T. / Molecular dynamics simulations show that bound Mg²⁺ contributes to amino acid and aminoacyl adenylate binding specificity in aspartyl-tRNA synthetase through long range electrostatic interactions // *J Biol Chem.* — 2006. — V. 281, N 33. — P. 23792-803.
160. Archontis G., Simonson T. and Karplus M. / Binding free energies and free energy components from molecular dynamics and Poisson-Boltzmann calculations. Application to amino acid recognition by aspartyl-tRNA synthetase // *J Mol Biol.* — 2001. — V. 306, N 2. — P. 307-27.
161. Polydorides S., Amara N., Aubard C., Plateau P., Simonson T. and Archontis G. / Computational protein design with a generalized Born solvent model: application to Asparaginyl-tRNA synthetase // *Proteins.* — 2011. — V. 79, N 12. — P. 3448-68.
162. Arnez J. G., Flanagan K., Moras D. and Simonson T. / Engineering an Mg²⁺ site to replace a structurally conserved arginine in the catalytic center of histidyl-tRNA synthetase by computer experiments // *Proteins.* — 1998. — V. 32, N 3. — P. 362-80.
163. Hughes S. J., Tanner J. A., Hindley A. D., Miller A. D. and Gould I. R. / Functional asymmetry in the lysyl-tRNA synthetase explored by molecular dynamics, free energy calculations and experiment // *BMC Struct Biol.* — 2003. — V. 3, — P. 5.

164. Hughes S. J., Tanner J. A., Miller A. D. and Gould I. R. / Molecular dynamics simulations of LysRS: an asymmetric state // *Proteins*. — 2006. — V. 62, N 3. — P. 649-62.
165. Sanford B., Cao B., Johnson J. M., Zimmerman K., Strom A. M., Mueller R. M., Bhattacharyya S., Musier-Forsyth K. and Hati S. / Role of coupled dynamics in the catalytic activity of prokaryotic-like prolyl-tRNA synthetases // *Biochemistry*. — 2012. — V. 51, N 10. — P. 2146-56.
166. Dutta S. and Nandi N. / Dynamics of the Active Sites of Dimeric Seryl tRNA Synthetase from *Methanopyrus kandleri* // *J Phys Chem B*. — 2015. — V. 119, N 34. — P. 10832-48.
167. Bushnell E. A., Huang W., Llano J. and Gault J. W. / Molecular dynamics investigation into substrate binding and identity of the catalytic base in the mechanism of Threonyl-tRNA synthetase // *J Phys Chem B*. — 2012. — V. 116, N 17. — P. 5205-12.
168. Meyer P. A., Socias S., Key J., Ransey E., Tjon E. C., Buschiazzo A., Lei M., Botka C., Withrow J., Neau D., Rajashankar K., Anderson K. S., Baxter R. H., Blacklow S. C., Boggon T. J., Bonvin A. M., Borek D., Brett T. J., Caflisch A., Chang C. I., Chazin W. J., Corbett K. D., Cosgrove M. S., Crosson S., Dhe-Paganon S., Di Cera E., Drennan C. L., Eck M. J., Eichman B. F., Fan Q. R., Ferre-D'Amare A. R., Christopher Fromme J., Garcia K. C., Gaudet R., Gong P., Harrison S. C., Heldwein E. E., Jia Z., Keenan R. J., Kruse A. C., Kvensakul M., McLellan J. S., Modis Y., Nam Y., Otwinowski Z., Pai E. F., Pereira P. J., Petosa C., Raman C. S., Rapoport T. A., Roll-Mecak A., Rosen M. K., Rudenko G., Schlessinger J., Schwartz T. U., Shamoo Y., Sondermann H., Tao Y. J., Tolia N. H., Tsodikov O. V., Westover K. D., Wu H., Foster I., Fraser J. S., Maia F. R., Gonen T., Kirchhausen T., Diederichs K., Crosas M., and Sliz P. / Data publication with the structural biology data grid supports live analysis // *Nat Commun*. — 2016. — V. 7, — P. 10882.
169. Chien A., Foster I. and Goddette D. / Grid technologies empowering drug discovery // *Drug Discov Today*. — 2002. — V. 7, N 20 Suppl. — P. S176-80.

170. Foster I. / The anatomy of the grid: enabling scalable virtual organizations // — 2001. — P. 6-7.
171. Green E. D., Watson J. D. and Collins F. S. / Human Genome Project: Twenty-five years of big biology // *Nature*. — 2015. — V. 526, N 7571. — P. 29-31.
172. Avramenko V. , Zagorodniy A. and Martynov Ye. / Peculiarities of grid-technology application in medicine // *Visnik NAN Ukrainy*. — 2008. — V. 10, — P. 5-15.
173. Granberg T., Martola J., Bergendal G., Shams S., Damangir S., Aspelin P., Fredrikson S. and Kristoffersen-Wiberg M. / Corpus callosum atrophy is strongly associated with cognitive impairment in multiple sclerosis: Results of a 17-year longitudinal study // *Mult Scler*. — 2015. — V. 21, N 9. — P. 1151-8.
174. Westermann A. J., Forstner K. U., Amman F., Barquist L., Chao Y., Schulte L. N., Muller L., Reinhardt R., Stadler P. F. and Vogel J. / Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions // *Nature*. — 2016. — V. 529, N 7587. — P. 496-501.
175. Neumann A., Baginski M. and Czub J. / How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets // *J Am Chem Soc*. — 2010. — V. 132, N 51. — P. 18266-72.
176. Kornelyuk O. I. and Mintser O. P. / Up-to-date computer grid-technologies and their application in medical researches // *Medical Informatics and Engineering*. — 2008. — V. 1, — P. 23-29.
177. Karpov P. A. and Blume Ya B. / Efficiency and Perspectives of High-Throughput Screening in Grid – Cslabgrid Experience in Effective Searching for New Biologically Active Compounds // *Visnik Nacional'noi' akademii' nauk Ukrai'ni*. — 2016. N 08. — P. 68-72.
178. Eswar N., Marti-Renom M.A., Webb B., Madhusudhan M.S., Eramian D., Shen M., Pieper U. and Sali A. Comparative protein structure modeling with MODELLER. — *John Wiley & Sons, Inc.*, 2006. — 5.6.1-5.6.30 P.

179. Nagar Bhushan, Hantschel Oliver, Young Matthew A., Scheffzek Klaus, Veach Darren, Bornmann William, Clarkson Bayard, Superti-Furga Giulio and Kuriyan John / Structural Basis for the Autoinhibition of c-Abl Tyrosine Kinase // *Cell*. — 2003. — V. 112, N 6. — P. 859-871.
180. Guex N. and Peitsch M. C. / SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis*. — 1997. — V. 18, N 15. — P. 2714-23.
181. Bhatt T. K., Khan S., Dwivedi V. P., Banday M. M., Sharma A., Chandele A., Camacho N., Ribas de Pouplana L., Wu Y., Craig A. G., Mikkonen A. T., Maier A. G., Yogavel M., and Sharma A. / Malaria parasite tyrosyl-tRNA synthetase secretion triggers pro-inflammatory responses // *Nat Commun*. — 2011. — V. 2, — P. 530.
182. Shen N., Zhou M., Yang B., Yu Y., Dong X. and Ding J. / Catalytic mechanism of the tryptophan activation reaction revealed by crystal structures of human tryptophanyl-tRNA synthetase in different enzymatic states // *Nucleic Acids Res*. — 2008. — V. 36, N 4. — P. 1288-99.
183. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C. and Ferrin T. E. / UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis // *J Comput Chem*. — 2004. — V. 25, N 13. — P. 1605-12.
184. Retailleau P., Huang X., Yin Y., Hu M., Weinreb V., Vachette P., Vonnrhein C., Bricogne G., Roversi P., Ilyin V., and Carter C. W., Jr. / Interconversion of ATP binding and conformational free energies by tryptophanyl-tRNA synthetase: structures of ATP bound to open and closed, pre-transition-state conformations // *J Mol Biol*. — 2003. — V. 325, N 1. — P. 39-63.
185. Morris G., Goodsell D., Halliday R., Huey R., Hart W., Belew R. and Olson A. / Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function // *Journal of computational chemistry*. — 1998. — V. 19, N 14. — P. 1639-1662.

186. Chen D., Menche G., Power T., Sower L., Peterson J. and Schein C. / Accounting for ligand-bound metal ions in docking small molecules on adenylyl cyclase toxins // *Proteins*. — 2007. — V. 67, N 3. — P. 593-605.
187. Flores S. C., Sherman M. A., Bruns C. M., Eastman P. and Altman R. B. / Fast flexible modeling of RNA structure using internal coordinates // *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*. — 2011. — V. 8, N 5. — P. 1247-57.
188. Tek A., Korostelev A. A. and Flores S. C. / MMB-GUI: a fast morphing method demonstrates a possible ribosomal tRNA translocation trajectory // *Nucleic Acids Res*. — 2016. — V. 44, N 1. — P. 95-105.
189. Tsunoda M., Kusakabe Y., Tanaka N., Ohno S., Nakamura M., Senda T., Moriguchi T., Asai N., Sekine M., Yokogawa T., Nishikawa K., and Nakamura K. T. / Structural basis for recognition of cognate tRNA by tyrosyl-tRNA synthetase from three kingdoms // *Nucleic Acids Res*. — 2007. — V. 35, N 13. — P. 4289-300.
190. Kobayashi T., Nureki O., Ishitani R., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S., Sakamoto K. and Yokoyama S. / Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion // *Nat Struct Biol*. — 2003. — V. 10, N 6. — P. 425-32.
191. Misra Vinod K. and Draper David E. / Mg²⁺ binding to tRNA revisited: the nonlinear poisson-boltzmann model // *Journal of Molecular Biology*. — 2000. — V. 299, N 3. — P. 813-825.
192. Dunbrack R. L., Jr. / Rotamer libraries in the 21st century // *Curr Opin Struct Biol*. — 2002. — V. 12, N 4. — P. 431-40.
193. Crepin T., Shalak V. F., Yaremchuk A. D., Vlasenko D. O., McCarthy A., Negrutskii B. S., Tukalo M. A. and El'skaya A. V. / Mammalian translation elongation factor eEF1A2: X-ray structure and new features of GDP/GTP exchange mechanism in higher eukaryotes // *Nucleic Acids Res*. — 2014. — V. 42, N 20. — P. 12939-48.
194. Budkevich T. V., Giesebrecht J., Behrmann E., Loerke J., Ramrath D. J., Mielke T., Ismer J., Hildebrand P. W., Tung C. S., Nierhaus K. H.,

- Sanbonmatsu K. Y., and Spahn C. M. / Regulation of the mammalian elongation cycle by subunit rolling: a eukaryotic-specific ribosome rearrangement // *Cell*. — 2014. — V. 158, N 1. — P. 121-31.
195. Kozakov D., Beglov D., Bohnuud T., Mottarella S. E., Xia B., Hall D. R. and Vajda S. / How good is automated protein docking? // *Proteins*. — 2013. — V. 81, N 12. — P. 2159-66.
196. Yesylevskyy S. O., Kharkyanen V. N. and Demchenko A. P. / The change of protein intradomain mobility on ligand binding: is it a commonly observed phenomenon? // *Biophys J*. — 2006. — V. 91, N 8. — P. 3002-13.
197. Yesylevskyy S. O., Kharkyanen V. N. and Demchenko A. P. / Hierarchical clustering of the correlation patterns: new method of domain identification in proteins // *Biophys Chem*. — 2006. — V. 119, N 1. — P. 84-93.
198. Yesylevskyy S. O., Kharkyanen V. N. and Demchenko A. P. / Dynamic protein domains: identification, interdependence, and stability // *Biophys J*. — 2006. — V. 91, N 2. — P. 670-85.
199. Yesylevskyy S. O. / Pteros 2.0: Evolution of the fast parallel molecular analysis library for C++ and python // *J Comput Chem*. — 2015. — V. 36, N 19. — P. 1480-8.
200. Hess B., Kutzner Carsten, van der Spoel David and Lindahl Erik / GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // *J. Chem. Theor. Comp*. — 2008. — V. 4, N 3. — P. 435-447.
201. Oostenbrink C., Villa A., Mark A. E. and van Gunsteren W. F. / A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6 // *J Comput Chem*. — 2004. — V. 25, N 13. — P. 1656-76.
202. MacKerell A. D., Jr., Banavali N. and Foloppe N. / Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids // *Biopolymers*. — 2000. — V. 56, N 4. — P. 257-65.
203. Humphrey W., Dalke A. and Schulten K. / VMD - Visual Molecular Dynamics // *J. Molec. Graphics*. — 1996. — V. 14, N 1. — P. 33-38.

204. Humphrey W., Dalke A. and Schulten K. / VMD: visual molecular dynamics // *J Mol Graph.* — 1996. — V. 14, N 1. — P. 33-8, 27-8.
205. Odynets K. A. and Kornelyuk A. I. / Bioinformatical analysis of influence of human tyrosyl-tRNA synthetase mutations associated with neuropathy Charcot-Marie-Tooth, type C, on its local spatial structure properties // *Biopolym. Cell.* — 2007. — V. 23, N 5. — P. 449-460.
206. Niehues S., Bussmann J., Steffes G., Erdmann I., Kohrer C., Sun L., Wagner M., Schafer K., Wang G., Koerdt S. N., Stum M., Jaiswal S., RajBhandary U. L., Thomas U., Aberle H., Burgess R. W., Yang X. L., Dieterich D., and Storkebaum E. / Impaired protein translation in *Drosophila* models for Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mutant tRNA synthetases // *Nat Commun.* — 2015. — V. 6, — P. 7520.
207. Ashkenazy H., Abadi S., Martz E., Chay O., Mayrose I., Pupko T. and Ben-Tal N. / ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules // *Nucleic Acids Res.* — 2016. — V. 44, N W1. — P. W344-50.
208. Ishimura R., Nagy G., Dotu I., Zhou H., Yang X. L., Schimmel P., Senju S., Nishimura Y., Chuang J. H. and Ackerman S. L. / RNA function. Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration // *Science.* — 2014. — V. 345, N 6195. — P. 455-9.
209. Abbott C. M., Newbery H. J., Squires C. E., Brownstein D., Griffiths L. A. and Soares D. C. / eEF1A2 and neuronal degeneration // *Biochem Soc Trans.* — 2009. — V. 37, N Pt 6. — P. 1293-7.
210. Newbery H. J., Loh D. H., O'Donoghue J. E., Tomlinson V. A., Chau Y. Y., Boyd J. A., Bergmann J. H., Brownstein D. and Abbott C. M. / Translation elongation factor eEF1A2 is essential for post-weaning survival in mice // *J Biol Chem.* — 2007. — V. 282, N 39. — P. 28951-9.
211. Chambers D. M., Peters J. and Abbott C. M. / The lethal mutation of the mouse wasted (*wst*) is a deletion that abolishes expression of a tissue-specific isoform

- of translation elongation factor 1alpha, encoded by the Eef1a2 gene // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 1998. — V. 95, N 8. — P. 4463-8.
212. Austin J. and First E. A. / Comparison of the catalytic roles played by the KMSKS motif in the human and *Bacillus stearothermophilus* trosyl-tRNA synthetases // *J Biol Chem*. — 2002. — V. 277, N 32. — P. 28394-9.
213. Yang X. L., Guo M., Kapoor M., Ewalt K. L., Otero F. J., Skene R. J., McRee D. E. and Schimmel P. / Functional and crystal structure analysis of active site adaptations of a potent anti-angiogenic human tRNA synthetase // *Structure*. — 2007. — V. 15, N 7. — P. 793-805.
214. Nangle L. A., Zhang W., Xie W., Yang X. L. and Schimmel P. / Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant tRNA synthetases linked to altered dimer interface and neurite distribution defect // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2007. — V. 104, N 27. — P. 11239-44.
215. Laskowski R. A. and Swindells M. B. / LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery // *J Chem Inf Model*. — 2011. — V. 51, N 10. — P. 2778-86.
216. Rother M., Rother K., Puton T. and Bujnicki J. M. / ModeRNA: a tool for comparative modeling of RNA 3D structure // *Nucleic Acids Res*. — 2011. — V. 39, N 10. — P. 4007-22.
217. Soares D. C., Barlow P. N., Newbery H. J., Porteous D. J. and Abbott C. M. / Structural models of human eEF1A1 and eEF1A2 reveal two distinct surface clusters of sequence variation and potential differences in phosphorylation // *PLoS One*. — 2009. — V. 4, N 7. — P. e6315.
218. Yaremchuk A., Shalak V. F., Novosylina O. V., Negrutskii B. S., Crepin T., El'skaya A. V. and Tukalo M. / Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of mammalian translation elongation factor eEF1A2 // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. — 2012. — V. 68, N Pt 3. — P. 295-7.
219. Retailleau P., Huang X., Yin Y., Hu M., Weinreb V., Vachette P., Vonnrhein C., Bricogne G., Roversi P. and Ilyin V. / Interconversion of ATP binding and

- conformational free energies by tryptophanyl-tRNA synthetase: structures of ATP bound to open and closed, pre-transition-state conformations // *Journal of molecular biology*. — 2003. — V. 325, N 1. — P. 39-63.
220. Froelich C.A. PhD Dissertation: Kinetic analysis of tyrosyl-tRNA synthetase variants associated with dominant-intermediate Charcot-Marie-Tooth type C — United States: *ProQuest LLC.*, 2010. — 192 P.