

УДК 577.151.34; 577.151.64

Сравнительный биоинформатический анализ структур активных центров эволюционно удаленных гомологов суперсемейства ферментов α, β -гидролаз

Д. А. Суплатов^{1,2}, В. К. Аржаник¹, В. К. Швядас^{1,2*}¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73²Государственное учреждение Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 25.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Сравнительный биоинформатический анализ ферментов является важным шагом в изучении взаимосвязи их структуры и функции. Однако многие ферменты, произошедшие от одного предка и претерпевшие значительные функциональные изменения в ходе естественного отбора, не обладают достаточным сходством по аминокислотным последовательностям для проведения статистически достоверного сравнительного анализа. При этом пространственная организация активных центров таких ферментов может быть консервативной, а остальные части структуры принципиально отличаются. В связи с этим при изучении общих принципов организации гомологичных ферментов представляется целесообразным проводить сравнительный биоинформатический анализ наиболее важных с функциональной точки зрения элементов структуры – активных центров, т.е. аминокислотных остатков, формирующих участки связывания субстрата и участвующих в механизме каталитического превращения. Для создания библиотеки трехмерных структур активных центров ферментов разработан алгоритм, основанный на использовании базы данных структур белков PDB, алгоритмов структурного анализа, а также идентификации функционально важных аминокислотных остатков и полостей в структуре фермента. Предложенный подход был использован для сравнения ряда ферментов суперсемейства α, β -гидролаз и позволил показать консервативность значительной части структуры активных центров, в том числе организации оксианионных центров, а также остатков каталитической триады даже у удаленных гомологов. Разработанный алгоритм может использоваться при сравнении структурной организации каталитических участков и участков связывания субстратов в ферментах различных классов, а также при изучении эволюции ферментов и создании банка данных структур активных центров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоинформатика, сравнительный анализ, активный центр, структурное выравнивание, α, β -гидролазы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PDB – Protein Data Bank; CSA – Catalytic Site Atlas

ВВЕДЕНИЕ

Сравнительный биоинформатический анализ гомологичных белков является важным шагом при изучении взаимосвязи их структуры и функции. Основным методом такого анализа – множественное выравнивание аминокислотных последовательностей. Признаком гомологии белков, т.е. происхождения от одного общего предка, принято считать достоверное сходство по аминокислотным последовательностям или третичным структурам [1], однако ферменты, претер-

певшие значительные функциональные изменения в результате естественного отбора, могут утратить сходство аминокислотных последовательностей. Сравнительный биоинформатический анализ таких белков по их первичной структуре становится практически невозможным.

В процессе эволюции аминокислотная последовательность изменяется с большей скоростью, чем структура [2, 3]. Известны ферменты, обладающие аминокислотной идентичностью на грани статисти-

ческой достоверности (8–15%) и при этом схожие по структуре, а также принципам организации каталитического механизма [4]. В противоположность алгоритмам выравнивания аминокислотных последовательностей, основанным на поиске биохимического сходства в гомологичных позициях первичной структуры [5–7], целью пространственного выравнивания является геометрическое сравнение элементов третичной структуры [8]. В настоящий момент в банке данных трехмерных моделей белков PDB насчитывается более 70000 записей, число которых ежегодно увеличивается [9]. Доступность этой информации предоставляет большие возможности для биоинформатического структурного анализа. Так, например, 3D-выравнивание позволило выявить сходство между ферментами семейства Ntn-гидролаз с низкой степенью сходства по последовательностям [10, 11]. Таким образом, при изучении структурно-функциональных взаимосвязей в семействах ферментов, состоящих из эволюционно дальних родственников, выравнивание третичных структур представляется значительно более информативным и точным, чем выравнивание их аминокислотных последовательностей.

Опыт сравнительного анализа позволяет предположить, что пространственная организация активного центра – наиболее консервативный элемент структуры гомологичных ферментов, в то время как остальные элементы могут принципиально отличаться (рис. 1) [12–15]. Укладка полипептидной цепи и расположение боковых радикалов аминокислот в активном центре определяет характер взаимодействий, необходимых для узнавания, связывания и превращения субстрата. Кроме того, аминокислотные остатки, влияющие на субстратную специфичность и каталитическую активность, как правило, находятся в радиусе 7–15 Å от ключевых каталитических аминокислотных остатков [16]. В связи с этим при изучении закономерностей организации гомологичных ферментов необходимо проводить сравнительный анализ на трех уровнях: аминокислотной последовательности, третичной структуры и структурной организации активных центров. Сравнительный биоинформатический анализ наиболее важных с функциональной точки зрения элементов структуры – активных центров – представляет особый интерес.

В работе предложен алгоритм для создания базы данных структур активных центров ферментов, основанный на использовании базы данных структур белков PDB, алгоритмов структурного анализа, а также идентификации функционально важных аминокислотных остатков и полостей в структуре фермента. Предложенный подход использован для сравнения ряда ферментов суперсемейства α, β -гидролаз.

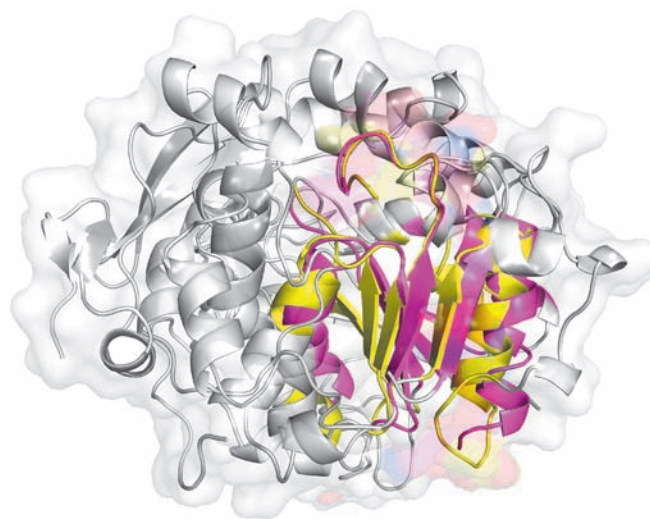


Рис. 1. Структурное выравнивание липазы Б (1TCB) и оксинитрипазы (1YB6). Наиболее консервативные области, содержащие аминокислотные остатки активного центра, у обоих ферментов выделены цветом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка выборки гомологичных ферментов

Поиск структурного сходства выполняли по отношению к липазе Б из *Candida antarctica* по всему банку данных PDB с помощью программы SSM [8]. Полученные результаты фильтровали с учетом процента совпавших элементов вторичной структуры при наложении на структуру 1TCB (не менее 30% элементов вторичной структуры должны совпадать у обоих белков при парном наложении). Поиск гомологичных ферментов по сходству аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы PSI-BLAST [7] по базе данных «Non-redundant». Последовательности, идентичные более чем на 95%, группировали в кластеры, из которых для последующего анализа отбирали только одного представителя.

Подготовка множественного выравнивания

Для множественного структурного выравнивания полноразмерных структур и активных центров ферментов использовали программы t-coffee [17] и Mustang [18].

Визуализация

Структурный анализ проводили с помощью программы Rymol [19]. Программу Jalview [20] использовали для просмотра выравниваний аминокислотных последовательностей.

Статистический анализ выравнивания

Для оценки консервативности колонки I выравнивания использовали параметр, предложенный Valdar и Thornton [21]:

$$C_I = \gamma \sum_i^N \sum_{j>i}^N w_i w_j M(s_i, s_j),$$

где M обозначает матрицу аминокислотных переходов, s_i и s_j – аминокислоты в последовательностях i и j в колонке I , а нормализующий множитель γ рассчитывается как

$$\gamma = \left(\sum_i^N \sum_{j>i}^N w_i w_j \right)^{-1}.$$

Параметры w_i и w_j обозначают веса соответствующих последовательностей в формулировке Vingron и Argos [22]:

$$w_i = \frac{1}{N-1} \sum_{j \neq i}^N d(s_i, s_j),$$

где d – «генетическое» расстояние между последовательностями i и j , выраженное через процент парной идентичности.

В окончательном варианте оценку консервативности колонки i выражали через Z-оценку стандартного нормального распределения:

$$Z_i = \frac{C_i - \langle C_i^{случ} \rangle}{\sigma(C_i^{случ})},$$

где $C_i^{случ}$ – оценка консервативности, вычисленная по случайным образом составленным колонкам выравнивания.

Достоверность рассчитанных Z-оценок консервативности определяли с использованием процедуры ранговой статистики Бернулли В-cutoff [23, 24]. Полученные на предыдущем этапе Z-оценки сортировали по убыванию, после чего ранг k рассчитывали таким образом, чтобы первые k -оценок (соответствующие первым k -колонкам выравнивания) представляли результаты, которые с наименьшей вероятностью могут возникнуть в случайном распределении:

$$k = \mathit{arg}_k \min P(\text{there are at least } k \text{ Z-scores } Z \geq Z_k) =$$

$$\mathit{arg}_k \min \left(1 - \sum_{i=n-k+1}^n C_n^i q^i p^{n-i} \right),$$

где n – общее число посчитанных Z-оценок, C_n^i – биномиальный коэффициент, а

$$p = P(Z \geq Z_k) = \int_{Z_k}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-Z^2) dZ, \quad q = 1 - p.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принципиально новую информацию о структурных особенностях организации гомологичных ферментов можно получить путем сравнительного биоинформатического анализа не полноразмерных пространственных структур, а активных центров. При этом под «активным центром» следует понимать не только аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в катализе, но также аминокислоты, формирующие участок (полость) протекания каталитического превращения, которые могут так или иначе взаимодействовать с субстратом или «каталитическими» аминокислотными остатками и опосредовать влияние особенностей структуры на каталитические свойства фермента. Однако для того, чтобы проводить биоинформатический анализ строения активных центров ферментов, необходимо создать библиотеку таких структур. Для локализации и изоляции структуры активного центра фермента (рис. 2) был разработан следующий алгоритм, состоящий из трех этапов:

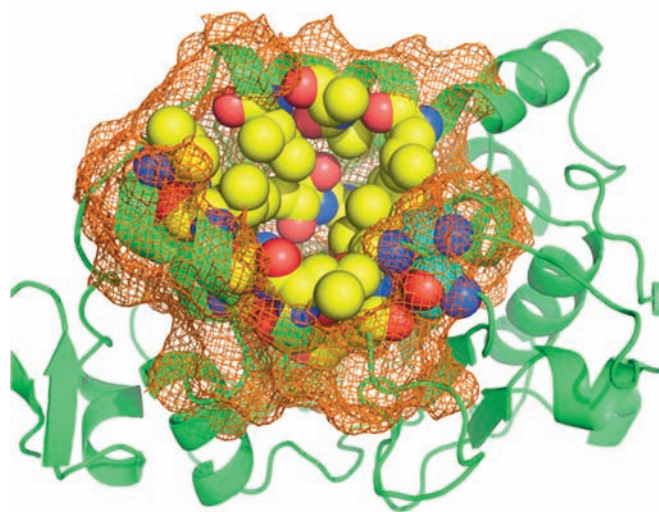


Рис. 2. Область активного центра – фрагмент полноразмерной структуры фермента, состоящий из аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с функциональными группами субстрата как в процессе доставки (диффузии) субстрата в активный центр, так и при его ориентации в активном центре (показаны желтым), а также аминокислотных остатков, обеспечивающих функционирование каталитического механизма (показаны синим), и ряда окрестных остатков, формирующих целостность выделенного фрагмента (показано сеткой).

1. Идентификация аминокислотных остатков активного центра, вовлеченных в каталитический механизм. Это могут быть остатки, принимающие непосредственное участие в каталитическом акте (например, в качестве нуклеофила), изменяющие кислотно-основные свойства аминокислотного остатка или молекулы воды, которая участвует в катализе, и стабилизирующие переходное состояние или интермедиат ферментативной реакции. База данных Catalytic Site Atlas (CSA) [25] содержит аннотацию аминокислотных остатков, вовлеченных в катализ, для ферментов, представленных в банке данных PDB. CSA представлена в открытом доступе в Интернете <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA> и содержит два уровня информации: оригинальную аннотацию аминокислот, составленную вручную на основе анализа опубликованных данных, а также ее экстраполяцию на гомологичные ферменты, определенные с помощью программы PSI-BLAST [7]. В тех случаях, когда фермент не аннотирован в базе данных CSA, необходим поиск нужной информации или идентификация каталитически важных аминокислотных остатков с помощью программ биоинформатического анализа [26–28].

2. Определение аминокислотных остатков, обеспечивающих доставку, связывание и ориентацию субстрата в активном центре фермента. Связывание субстрата ферментами, как правило, происходит в так называемых карманах, впадинах на поверхности глобулы. Целый ряд аминокислотных остатков, формирующих область активного центра, непосредственно не участвует в каталитическом механизме, а взаимодействует с функциональными группами субстрата как в процессе его доставки (диффузии), так и при ориентации субстрата в активном центре фермента для обеспечения реакционноспособной конформации в результате связывания. Для нахождения аминокислотных остатков такого рода может быть использован алгоритм структурного анализа CASTp [29].

3. Создание координатного файла в формате PDB, содержащего область активного центра фермента. При этом к каталитически важным аминокислотным остаткам (этап 1) и аминокислотным остаткам участка связывания субстрата (этап 2) добавляются окружающие остатки, формирующие элементы вторичной структуры и связывающие их петли.

Таким образом, результатом работы алгоритма является фрагмент полноразмерной структуры фермента, который включает аминокислотные остатки области связывания и превращения субстрата, аминокислотные остатки, обеспечивающие функционирование каталитического механизма, а также некоторые окрестные остатки, формирую-

щие целостность выделенного фрагмента. Технически этот фрагмент сохраняется в виде координатного файла в формате PDB, при этом возможно дополнительное внесение информации о ферменте, его структуре и особенностях катализа из других баз данных. С помощью предложенного алгоритма можно создать базу данных активных центров для всех ферментов, информация о которых представлена в базе данных PDB.

Разработанный алгоритм был использован для сравнительного анализа некоторых ферментов семейства α, β -гидролаз – липазы Б из *C. antarctica* (структура 1ТСВ) [12], сериновой карбоксипептидазы из *Triticum aestivum* (1WHS) [30] и оксинитрилазы из *Hevea brasiliensis* (1YB6) [13], а также их гомологов, отобранных с помощью методов поиска сходства по структуре и аминокислотной последовательности (см. «Экспериментальную часть»). Идентичность по аминокислотным последовательностям между 1ТСВ и 1WHS составляет 7.8%, 1ТСВ и 1YB6 – 12.4%, 1WHS и 1YB6 – 13.7%. Такое низкое сходство не позволяет сравнивать ферменты при помощи выравнивания аминокислотных последовательностей. 3D-выравнивание полноразмерных структур также не обнаруживает достаточного сходства в пространственной организации указанных ферментов. Так, при использовании программы SSM [8] выравниваются только аминокислоты каталитической триады, однако не обнаруживается гомология аминокислотных остатков оксианионного центра; напротив, программа Mustang [18] позволяет выявить гомологичность аминокислотных остатков оксианионного центра и остатка каталитического серина, однако положение других остатков каталитической триады – гистидина и аспартата – между ферментами различается. Это означает, что при таком структурном выравнивании нахождение других функционально важных, но пока неизвестных элементов структуры, вряд ли представляется возможным, а ручная корректировка отдельных фрагментов выравнивания не может быть надежным способом повышения его качества. Такая неоднозначность в работе программ трехмерного выравнивания объясняется большими отличиями полноразмерных структур ферментов, катализирующих разные химические превращения – из 408 аминокислотных остатков структуры 1WHS сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum* только 161 остаток может быть пространственно сопоставлен со структурами липазы Б из *C. antarctica* 1ТСВ и оксинитрилазы из *H. brasiliensis* 1YB6. Поэтому для поиска сходства столь разных ферментов был проведен сравнительный анализ структур активных центров, подготовленных с помощью предложен-

Консервативные аминокислотные остатки в структурах активных центров липазы Б из *S. antarctica*, сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum* и оксинитриказы из *H. brasiliensis*, а также их гомологов

Ранг	Z-оценка	P-оценка	Позиция	Состав колонки выравнивания
1	5.909034	1.496923E-07	224H	NNNNN NNNNN ... NNNNN NH
2	5.909034	1.107511E-14	187D	DDDDD DDDDD ... DDDDD DD
3	5.909034	5.399159E-22	105S	SSSSS SSSSS ... SSSSS SS
4	5.585937	4.061221E-26	39G	GGGGG GGGGG ... GNTTG GG
5	4.976042	1.329205E-25	108G	GGGGG GGGGG ... AAAAA GG
6	3.643481	2.960176E-15	103T	GGGGG GGTTS ... STTSS AG
7	3.077561	7.318560E-12	107G	AAAAA AAGGG ... GGGGG GG
8	2.282191	6.757472E-06	106Q	YYYYY YYQLQ ... YFFYY FF
9	2.097392	2.845755E-05	190V	CCCCC CCCCC ... VVVVL LL
10	1.970983	5.325320E-05	184S	GGGGG GGGGG ... SNNSS NN
11	1.833495	1.540646E-04	80T	AAAAA AAAAA ... GAAVA YY
12	1.525180	8.996767E-03	42T	GGGGG GGGGG ... TRVAG GG
13	1.238283	1.410807E-01	132A	NNNNN NNNNN ... AAAAD DD
14	1.203052	1.191297E-01	133P	GGGGG GGGGG ... PPPPP PG
15	1.173696	9.573976E-02	82Y	DDDDD NNDSN ... QEEQQ YY

Примечание. Результаты биоинформатического анализа представлены в порядке уменьшения статистической достоверности (Z-оценка). P-оценка для позиции ранга *i* означает вероятность возникновения результатов с первого по *i* в случайном выравнивании. Нумерация позиций представлена по кристаллографической структуре 1ТСВ. Красным выделен порог наибольшей статистической достоверности.

ного алгоритма. Полученные структурные файлы включали 170 аминокислотных остатков для 1ТСВ (54% от полноразмерной структуры), 287 для 1WHS (70%) и 159 для 1YB6 (62%). Анализ множественного структурного выравнивания активных центров показал консервативность значительной части полипептидной цепи, причем наиболее консервативными являются аминокислотные остатки каталитической триады – Ser105, His224, Asp187 (нумерация по 1ТСВ, *таблица*). Аминокислотные остатки одного типа не только содержатся в одинаковых позициях структуры активных центров рассмотренных ферментов, но имеют схожую пространственную ориентацию (*рис. 3, 4*). При геометрическом сравнении активных центров ферментов, катализирующих разные химические превращения, также обнаруживается сходство в организации оксианионных центров – выравниваются участки структуры, содержащие аминокислотные остатки Thr40 в липазе Б, Ile12 в оксинитриказе и Gly53 в сериновой карбоксипептидазе. Другой остаток оксианионного центра – Gln106 в липазе Б, который следует за каталитическим Ser105, также выравнивается с гомологами в других ферментах: Tyr147 в сериновой

карбоксипептидазе и Cys81 в оксинитриказе. Вариабельность типов аминокислот в этих позициях объясняется тем, что стабилизация тетраэдрического интермедиата, как правило, происходит при участии аминокислот основной цепи этих аминокислот [12, 13]. Такая тождественность структурной организации особенно интересна применительно к оксинитриказам, в каталитическом механизме действия которых образование тетраэдрического интермедиата и его стабилизация в оксианионном центре не происходит [31]. Таким образом, при сравнительном анализе структур активных центров удалось показать консервативность пространственной организации этих функционально важных участков эволюционно родственных, но удаленных ферментов: сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum*, липазы Б из *S. antarctica* и оксинитриказы из *H. brasiliensis*.

ВЫВОДЫ

Для создания библиотеки трехмерных структур активных центров ферментов разработан алгоритм, основанный на использовании базы данных структур белков PDB, алгоритмов структурного анализа, а также идентификации функционально важных

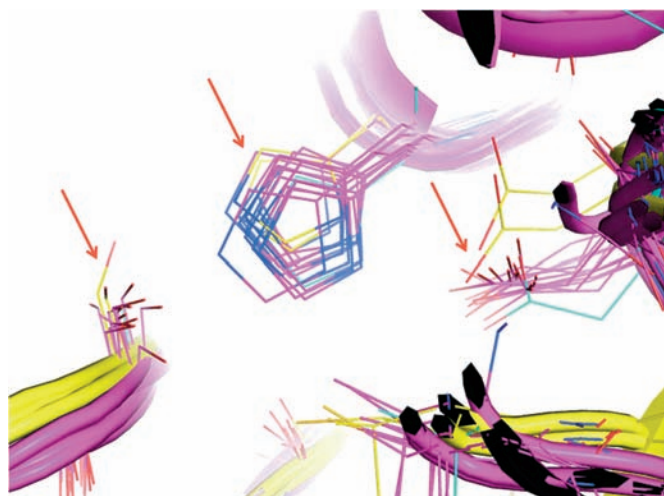


Рис. 3. Пространственное выравнивание структур активных центров ферментов семейства α,β -гидролаз: сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum*, липазы Б из *C. antarctica*, оксинитриказы из *H. brasiliensis*, а также их гомологов. Одинаковое расположение и ориентация аминокислотных остатков каталитической триады в структуре показаны стрелками.

аминокислотных остатков и полостей в структуре фермента. Предложенный подход был использован для сравнения ряда ферментов суперсемейства α,β -гидролаз. Проведенный биоинформатический анализ эволюционно родственных, но удаленных ферментов: сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum*, липазы Б из *C. antarctica* и оксинитриказы из *H. brasiliensis*, показал высокое сходство значительной части структуры активных центров, в то время как сходство полноразмерных третичных структур, а также аминокислотных последовательностей значительно ниже. Даже при существенном различии функциональных свойств и способности катализировать различные химические реакции сериновая карбоксипептидаза, липаза Б и оксинитриказа сохранили общую структурную организацию оксианионных центров и остатков каталитической триады. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при биоинформатическом анализе ферментов и изучении общих принципов биокатализа нельзя ограничиваться выравниванием аминокислотных последовательностей и третичных структур. Сравнительный биоинформатический анализ пространственной организации активных центров – наиболее важных с функциональной точки зрения элементов структуры – может позволить обнаружить сходство даже у отдаленных

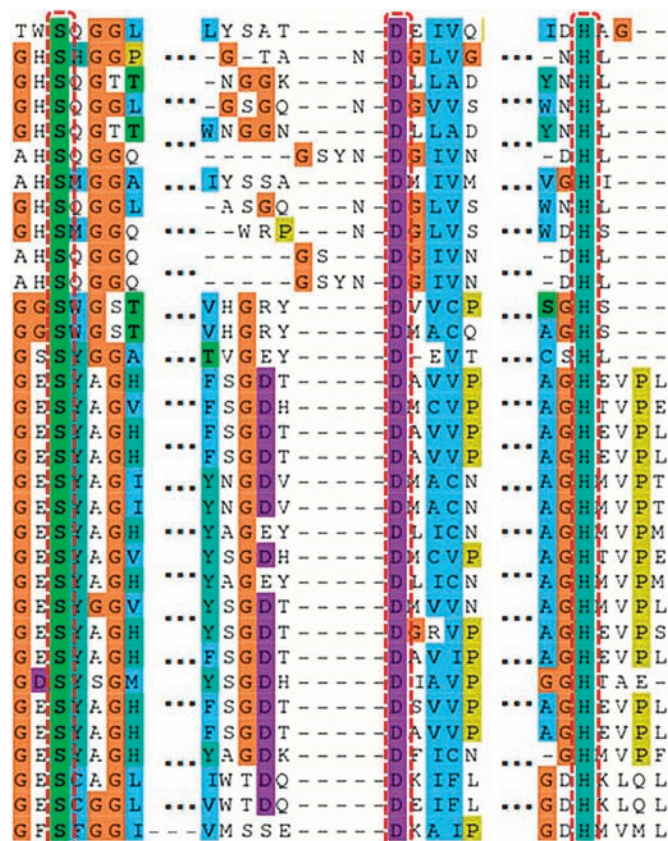


Рис. 4. Текстовое отображение пространственного выравнивания структур активных центров ферментов семейства α,β -гидролаз: сериновой карбоксипептидазы из *T. aestivum*, липазы Б из *C. antarctica*, оксинитриказы из *H. brasiliensis*, а также их гомологов. Консервативные аминокислотные остатки каталитической триады показаны пунктиром.

гомологов. Разработанный алгоритм может быть использован при сравнении структурной организации каталитических участков и участков связывания субстратов в ферментах различных классов, а также при изучении эволюции ферментов и для создания банка данных структур активных центров. Предложенный метод может быть использован и для сравнения не обладающих структурным сходством ферментов с аналогичной функцией, возникшей независимо в ходе конвергентной эволюции. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства образования и науки России
(госконтракт № 02.740.11.0866).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koonin E.V., Galperin M.Y. Sequence-Evolution-Function: Computational approaches in comparative genomics. Boston: Kluwer Academic, 2003. 488 p.
2. Holm L., Sander C. // *Science*. 1996. V. 273. № 5275. P. 595–603.
3. Grishin N.V. // *J. Mol. Evol.* 1997. V. 45. № 4. P. 359–369.
4. Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolof F., Franken S.M., Harel M., Remington S.J., Silman I., Schrag J., Sussman J.L., Verschueren K.H.G., Goldman A. // *Protein Engineering*. 1992. V. 5. P. 197–211.
5. Smith T.F., Waterman M.S. // *Adv. Appl. Math.* 1981. V. 2. P. 482–489.
6. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410.
7. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
8. Krissinel E., Henrick K. // *Acta Cryst.* 2004. V. D60. P. 2256–2268.
9. Dutta S., Zardecki C., Goodsell D.S., Berman H.M. // *J. Appl. Crystall.* 2010. V. 43. № 5. P. 1224–1229.
10. Suresh C.G., Pundle A.V., SivaRaman H., Rao K.N., Brannigan J.A., McVey C.E., Verma C.S., Dauter Z., Dodson E.J., Dodson G.G. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. № 5. P. 414–416.
11. Carita O., Rouvinen J. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. P. 2329–2337.
12. Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar S., Jones T.A. // *Curr. Biol.* 1994. V. 2. P. 293–398.
13. Gartler G., Kratky C., Gruber K. // *J. Biotechnol.* 2007. V. 129. № 1. P. 87–97.
14. Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. № 6. P. 1001–1013.
15. Варфоломеев С.Д., Упоров И.В., Федоров Е.В. // *Биохимия*. 2002. Т. 67. № 10. С. 1328.
16. Morley K., Kazlauskas R.J. // *TRENDS Biotechnol.* 2005. V. 23. № 5. P. 231–237.
17. Notredame C., Higgins D., Heringa J. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 302. P. 205–217.
18. Konagurthu A., Whisstock J., Stuckey P., Lesk A. // *Proteins*. 2006. V. 64. P. 559–574.
19. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.0r1. Schrödinger, LLC.
20. Waterhouse A., Procter J., Martin D., Clamp M., Barton G. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 1189–1191.
21. Valdar W.S.J., Thornton J.M. // *Proteins*. 2001. V. 42. P. 108–124.
22. Vingron M., Argos P. // *Comput. Appl. Biosci.* 1989. V. 5. P. 115–121.
23. Vinogradov D.V., Mironov A.A. // *Proc. 3rd Int. Conf. On Bioinformatics of Genome Regulation and Structure BGRS'2002*, 2002. Novosibirsk, Russia, July 1. P. 28–30.
24. Kalina O.V., Gelfand M.S., Russel R.B. // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. P. 174–198.
25. Porter C.T., Bartlett G.J., Thornton J.M. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. D129–D133.
26. Casari G., Sander C., Valencia A. // *Nat. Struct. Biol.* 1995. V. 2. P. 171–178.
27. Sankararaman S., Sha F., Kirsch J.F., Jordan M.I., Sjolander K. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 5. P. 617–624.
28. Pazos F., Bang J.-W. // *Curr. Bioinformatics*. 2006. V. 1. P. 15–23.
29. Dundas J., Ouyang Z., Tseng J., Binkowski A., Turpaz Y., Liang J. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. W116–W118.
30. Liao D.-I., Breddam K., Sweet R.M., Bullock T., Remington S.J. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 9796–9812.
31. Gruber K., Garter G., Krammer B., Schwab H., Kratky C. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 19. P. 20501–20510.