

УДК 548.737

На правах рукописи



ЛАШКОВ АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

**МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ
SALMONELLA TYPHIMURIUM (STYPH) И *HOMO SAPIENS* (HUPHI) 2,2'-
АНГИДРОУРИДИНОМ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО
АНАЛИЗА И КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Специальность 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и Учреждении Российской академии наук Институте кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН

Научные руководители:

доктор физико-математических наук,
профессор Роман Гербертович Ефремов
кандидат физико-математических наук,
доцент Альберт Михайлович Михайлов

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук,
профессор Владимир Юрьевич Лунин
доктор медицинских наук,
профессор Елена Николаевна Карева

Ведущая организация:

НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «__» ноября 2010 г. в __ ч. __ мин. на заседании диссертационного совета Д 002.114.01 в Учреждении Российской академии наук Институте кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН по адресу 119333, г. Москва, Ленинский проспект, д. 59

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИК РАН

Автореферат разослан «__» октября 2010 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д 002.114.01
кандидат физико-математических наук

В.М. Каневский

Актуальность работы. Уридинфосфорилаза (**UPh**; E.C. 2.4.2.3) является ключевым ферментом метаболизма противоопухолевых препаратов - антиметаболитов пиримидинов, которые, несмотря на их высокую токсичность, остаются основным средством химиотерапии онкологических заболеваний.

В опытах *in vivo* показано, что при консервативном лечении злокачественных новообразований [1] специфичные к уридинфосфорилазе ингибиторы усиливают лечебный эффект 5-фторурацила (5Fura) [1]. В связи с этим имеется возможность, применяя ингибиторы **UPh**, уменьшить дозу вводимого антиметаболита пиримидиновых оснований (5Fura), снизив тем самым токсическое действие последнего на здоровые ткани.

Следует обратить внимание на то, что ингибирование уридинфосфорилазы летально для некоторых паразитов (например, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*), являющихся возбудителями опасных заболеваний человека [2-4]. Таким образом, ингибиторы уридинфосфорилаз являются и перспективными противопаразитарными препаратами.

Установлено влияние **UPh** на устойчивость клеток нервной системы к гипоксии. Показано, что высокое содержание уридина в нейронах уменьшает степень гипоксического повреждения нервной ткани при ишемическом инсульте [5]. Ингибирование **UPh** приводит к снижению концентрации уридина, так как нарушается его ресинтез, в тканях нервной системы, что приводит к ухудшению состояния нервной ткани при инсульте.

Для разработки новых лекарственных препаратов - ингибиторов уридинфосфорилазы необходимо детальное исследование пространственной организации макромолекулярных комплексов уридинфосфорилаз бактерий и высших организмов методами рентгеноструктурного анализа при атомном разрешении и компьютерного моделирования.

Целью данной работы было изучение пространственной организации молекулы уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* (**StUPh**) и уридинфосфорилазы человека (**HUPhI**) в комплексах с разными лигандами и установление структурной основы ингибирования этих уридинфосфорилаз 2,2'-ангидроуридином (ANU) методом рентгеноструктурного анализа. Компьютерное моделирование оптимальных ингибиторов (аналогов 2,2'-ангидроуридина) уридинфосфорилазы человека и бактерий.

Для достижения поставленной цели необходимо решить **следующие задачи**:

- определение атомных структур комплексов (**StUPh**) с 2,2'-ангидроуридином, ионом фосфата и калия методом рентгеноструктурного анализа биомacroмолекул;
- решение структуры комплекса **HUPhI** с 2,2'-ангидроуридином методом молекулярного моделирования;
- анализ структур комплекса “фермент-ингибитор” для **HUPhI** и **StUPh**; молекулярно-динамическое исследование **HUPhI** и **StUPh**;
- компьютерное конструирование потенциальных ингибиторов уридинфосфорилаз.

Научная новизна результатов.

Методом рентгеноструктурного анализа впервые установлены пространственные структуры атомного разрешения с высокой достоверностью комплексов **StUPh** с 2,2'-ангидроуридином, ионами фосфата и калия (ID PDB: 3DPS, 3C74, 1Y1R, 3DDO, 3FWP).

Впервые выявлено место и характер связывания 2,2'-ангидроуридина с **StUPh** (ферментом-мишенью).

Методом молекулярного докинга впервые определена структура комплекса **HUPhI** с 2,2'-ангидроуридином и ионом фосфата. Установлены аминокислотные остатки **HUPhI**, связывающие 2,2'-ангидроуридин. Показаны различия ферментов **HUPhI** и **StUPh** в гидрофобной области сайта, связывающего пиримидиновый компонент 2,2'-ангидроуридина. Впервые установлена идентичность механизма ингибирования **HUPhI** и **StUPh** 2,2'-ангидроуридином.

Впервые исследована лабильность атомов молекул **HUPhI**, **StUPh** и комплекса **StUPh** с ионом калия методом молекулярной динамики. Выявлены отличия в подвижности элементов молекул **StUPh** и **HUPhI**.

Впервые на основе 2,2'-ангидроуридина проведено конструирование *in silico* молекулы оптимального ингибитора, с высокой аффинностью для **HUPhI** и **StUPh**. Это 5-замещенные или 6-замещенные 2,2'-ангидроуридины, где в качестве заместителя выступает короткая алифатическая насыщенная цепочка с ароматической группой на конце.

Практическая значимость. Изучение структурных аспектов взаимодействия уридинфосфорилаз человека и патогенных микроорганизмов с ингибитором - 2,2'-ангидроуридином и компьютерное конструирование структур высокоаффинных аналогов ANU создало основу для синтеза противоопухолевых, противобактериальных и противопаразитарических препаратов нового поколения.

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты рентгеноструктурного анализа **StUPh** и её комплексов с 2,2'-ангидроуридином, ионами фосфата и калия (ID PDB: 3DPS, 3C74, 1Y1R, 3DDO, 3FWP);
- результаты компьютерного моделирования комплекса **HUPhI** с 2,2'-ангидроуридином и ионом фосфата;
- структурные аспекты ингибирования **StUPh** и **HUPhI** 2,2'-ангидроуридином;
- результаты исследования лабильности атомов молекул **HUPhI**, **StUPh** и комплекса **StUPh** с ионом калия методом молекулярной динамики;
- результаты рационального конструирования на базе 2,2'-ангидроуридина новых высокоаффинных ингибиторов уридинфосфорилаз.

Вклад автора. Автором лично выполнены следующие этапы работы:

- 1) обработка экспериментальных интенсивностей рентгеновского спектра синхротронного излучения от кристаллов комплексов **StUPh** с лигандами;
- 2) решение и уточнение пяти атомных структур комплексов **StUPh** (ID PDB: 3DPS, 3C74, 1Y1R, 3DDO, 3FWP);
- 3) определение структуры комплекса **HUPhI** с ANU и ионом фосфата методом молекулярного моделирования;

- 4) исследование подвижности функционально значимых элементов **StUPh** и **HUPhI** методом молекулярной динамики;
- 5) анализ результатов рентгеноструктурного исследования и компьютерного моделирования;
- 6) создание структурной базы для исследования механизма ингибирования **StUPh** и **HUPhI** 2,2'-ангидроуридином;
- 7) молекулярный дизайн *in silico* новых ингибиторов **StUPh** и **HUPhI** на основе созданной структурной базы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах – список прилагается. Координаты атомов пяти пространственных структур макромолекулярных соединений и соответствующие им наборы модулей структурных факторов приняты Международным Банком Белковых Структур (PDB) - ID PDB: 3DPS, 3C74, 1Y1R, 3DDO, 3FWP.

Апробация работы. Результаты исследования доложены на восьми национальных и международных конференциях, в конкурсе научных работ ИК РАН 2009 года – именная премия им. А.В. Белова. Список тезисов докладов прилагается.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка цитированной литературы. Она изложена на 162 страницах, содержит 22 рисунка и 25 таблиц.

Краткое содержание диссертации

Введение. Во введении дана краткая биохимическая характеристика фермента уридинфосфорилазы, обоснована актуальность темы и необходимость исследования структурных аспектов механизма ингибирования уридинфосфорилаз методами рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования.

Глава 1. Литературный обзор

Литературный обзор состоит из трёх тематических разделов. В первом разделе описывается структура гена уридинфосфорилаз, структурная организация исследованных уридинфосфорилаз, ферментативная функция, участие уридинфосфорилаз в метаболизме пиримидиновых оснований в низших и высших организмах.

Второй раздел обзора описывает применение уридинфосфорилаз и её специфических ингибиторов в лечении онкологических, инфекционных и сердечнососудистых заболеваний. Особое внимание уделяется участию уридинфосфорилазы в метаболизме уже применяющихся в медицинской практике фармакологических препаратов – аналогов пиримидиновых оснований. Рассматривается недавно установленный аспект участия уридинфосфорилазы в защите нервной ткани от гипоксического повреждения при инсульте.

Третий раздел посвящён известным ингибиторам уридинфосфорилаз – аналогам субстратов. Приведена классификация, химические названия, биохимические и биологические свойства известных ингибиторов уридинфосфорилаз – аналогов - субстратов и на основе этих данных делается выбор исследуемого ингибитора.

Глава 2. Материалы и методы

В главе описаны биологические и химические материалы. На основе литературных данных и личного опыта автора приведены краткие обзоры, посвященные использованным в работе методам кристаллизации биомакромолекул, съемки и первичной обработки рентгенодифракционных наборов, методам решения и уточнения пространственных структур биомакромолекул, способам оценки достоверности полученных данных, методам компьютерного моделирования и конструирования лекарственных препаратов.

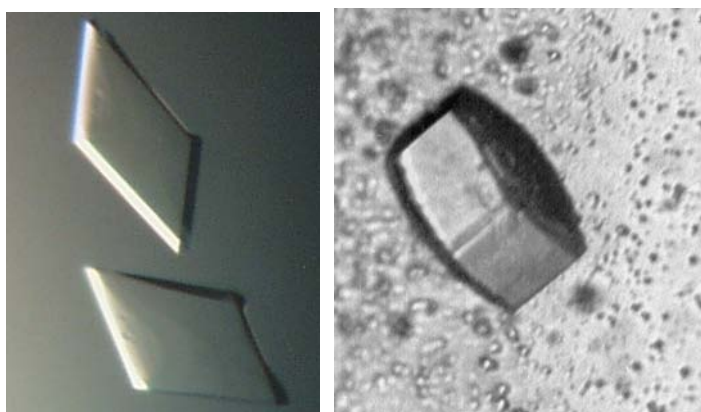
Глава 3. Экспериментальная и расчетная часть

Наработка клеточного материала, содержащего *StUPh*, выделение и очистка белкового препарата проведены по оригинальной методике, описанной в работах [6, 7].

Кристаллизацию нелигандированного фермента проводили методом «висячей» капли при следующих объемах и концентрациях веществ: противораствор объемом 400 мкл содержал 100 мМ калий-ацетатного (рН 5.2) буфера и 20% (в объемных долях) PEG 6000; кристаллизационный раствор составлен из 3.5 мкл раствора *StUPh* (20%) и 3.5 мкл противораствора [8].

Пригодные для рентгенодифракционного анализа кристаллы комплекса *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином были выращены методом сокристаллизации (рис. 1). Противораствор (1 мл) содержал 18% (w/v) PEG 4000 (Sigma) в 0.1М Трис-НСl буфере, рН 5.2. Кристаллизационный раствор получали смешиванием 3 мкл белка (концентрация 13 мг/мл в 0.05 М Трис-НСl буфере, рН 5.2) с 3 мкл противораствора, 0.5 мкл 10 мМ 2,2'-ангидроуридина [9, 10].

Кристаллы комплекса *StUPh* с АНУ и ионами фосфата и калия выращены в аналогичных условиях с добавлением к кристаллизационной капле 0.1 мкл 1 мМ K_2HPO_4 [10].



(a)

(б)

Рисунок 1. Кристаллы молекулы уридинфосфорилазы, упаковка которых соответствует пространственной группе $P2_12_12_1$ (а) и $R3$ (б).

Состав криорастворов при получении рентгенодифракционных наборов при низкой температуре (100К, жидкий азот) подбирали на основе ПЭГ 400 и глицерина.

Наборы рентгенодифракционных интенсивностей для комплексов **StUPh** с лигандами собраны на белковых станциях (таблица 1) синхротрона DESY (Гамбург, Германия).

Первичная обработка экспериментальных наборов интенсивностей, и получение наборов структурных амплитуд осуществлены в комплексе программ "XDS" [11].

Получение стартовых наборов фазовой составляющей структурных факторов проведено методом молекулярного замещения в комплексе программ Phaser [12]. В качестве стартовой модели во всех случаях использовали структуру **StUPh** при разрешении 1.64 Å (ID PDB: 2I8A).

Структуры фермента **StUPh** уточняли в программных комплексах Phenix [13], CNS [14] и Refmac [15]. В процессе уточнения использовали опции "simulated annealing", "individual_sites", "individual_adp", "bulk solvent modeling", "anisotropic scaling". Стадии уточнения структур чередовались с ручной и полуавтоматической правкой моделей с помощью программы Coot [16, 17]. На конечных этапах уточнения в структурах были локализованы молекулы ингибитора, ионов фосфата и других лигандов. Позиции молекул воды определены в программе Coot (опция «Find waters») с использованием карты электронной плотности с коэффициентами $|F_{obs}| - |F_{calc}|$. Достоверность структур оценивалась с использованием программ PROCHECK [18], WHAT_CHECK [19], WEB-сервиса MolProbity [20]. Статистические характеристики уточненных кристаллических структур приведены в таблице 2.

Результирующие координаты биомакромолекул и соответствующие им наборы структурных факторов **StUPh** были приняты Международным банком белковых структур [<http://deposit.pdb.org/validate>].

Молекулярный докинг выполнен с использованием модуля Glide программного пакета Maestro (вариант "Extra Prescription" (XP) с подвижным лигандом и неподвижной мишенью) [21]. Для ранжирования результатов докинга использовали оценочную функцию "Glide Score" [21].

Компьютерный дизайн новых ингибиторов осуществлён с помощью программы CombiGlide [21].

Исследование методом молекулярной динамики осуществлялось в комплексе программ GROMACS [22] с использованием набора силовых полей GROMACS/GMX.. Молекулярно-динамическую симуляцию систем проводили при температуре 310 К с использованием термостата Берендсена при изотропном давлении 101,3 кПа.

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов

Параметры	Нелигандированный фермент	Комплекс с ANU и ионом калия	Комплекс с ANU и ионом фосфата	Комплекс с ионом фосфата	Комплекс с ANU и ионом фосфата и ионом калия
Пространственная группа	R3	P212121	P212121	P212121	P212121
Параметры элементарной ячейки, Å, град	a=150.86; b=150.86; c=47.84; $\alpha=\beta=90$ $\gamma=120$	a=90.37; b=125.31; c=135.18; $\alpha=\beta=\gamma=90$	a=88.87; b=124.05; c=134.38; $\alpha=\beta=\gamma=90$	a=89.60; b=124.92; c=134.93; $\alpha=\beta=\gamma=90$	a=88.790; b=124.070; c=134.100; $\alpha=\beta=\gamma=90$
Число молекул на независимую часть	1/3	1	1	1	1
Белковая станция, детектор	X11, MAR CCD 165 мм.	X13, MAR CCD 165 мм.	BW6, MAR CCD 235 мм.	X13, MAR CCD 165 мм.	X13, MAR CCD 165 мм.
Длина волны, Å	0.8126	1.050	1.050	0.803	0.803
Область разрешения, Å	20-1.8 (1.9-1.8)*	20-2.38 (2.5-2.38)*	30-2.09 (2.15-2.09)*	89-1.50 (1.60-1.50)*	88.00-1.86 (1.87-1.86)*
Общее число рефлексов	143075 (21423)*	227025 (26070)*	269989 (18783)*	1381207 (107637)*	303063 (4828)*
Число независимых рефлексов	37497 (5638)*	59688 (6801)*	87512 (6614)*	216257 (31238)*	110180 (1827)*
Полнота набора, %	99.6 (99.9)*	95.9 (80.7)*	98.9 (93.0)*	86.30 (74.3)*	88.4 (93.6)*
Среднее значение I/ σ I	25.23 (6.45)	6.01 (2.73)*	10.04 (3.76)*	9.17 (1.04)*	10.00 (2.49)*
R _{meas} , %	5.8 (2.6)*	25.1 (61.8)*	12.2 (34.2)*	16.0 (88.6)*	9.4 (50.6)*
R _{meas} , %	4.3 (25.1)*	20.3 (54.3)*	11.1 (41.2)*	15.3 (92.9)*	7.7 (41.0)*

*В скобках приведены значения для слоя высокого разрешения.

Таблица 2. Статистические характеристики уточнения кристаллических структур

Параметры	Нелигандированный фермент	Комплекс с ANU и ионом калия	Комплекс с ANU и ионом фосфата	Комплекс с ANU и ионом фосфата	Комплекс с ANU, ионом фосфата и ионом калия
Область разрешения, Å	18.70-1.80 (1.85-1.80)*	19.94-2.38 (2.44-2.38)*	28.75-2.11 (2.20-2.11)*	19.91-1.50 (1.52-1.50)*	28.00-1.86 (1.91-1.85)*
Срезка набора, $\sigma(F)$	>2	>0	>2	>2	>0
V_m , (Å ³ /Da)	1.96	2.35	2.20	2.11	2.19
Количество растворителя, %	36.70	47.61	44.80	41.11	43.00
Число атомов белка	3567	11010	10937	11142	10965
Число молекул воды	254	374	641	1644	1015
Число атомов лигандов	-	106	47	25	63
R_{cryst} (%)	16.1 (16.8)*	20.8 (25.4)*	18.1 (21.7)*	16.6 (31.0)*	17.6 (24.8)*
R_{free} (%)	20.0 (24.1)*	25.8 (33.9)*	21.9 (27.3)*	21.2 (36.5)*	20.6 (28.0)*
Среднее значение температурного фактора для атомов белка	25.1	34.8	21.0	19.6	19.5
$r.m.s.d.$ (связей), Å	0.006	0.007	0.007	0.007	0.007
$r.m.s.d.$ (углов), град	1.042	1.154	1.499	1.094	1.066
Точность определения координат по Лузати/(DPI), Å	0.166/0.115	0.303/0.267	0.222/0.168	0.234/0.098	0.188/0.132
Статистика Рамачандрана:					
наиболее благоприятная область	89.9	89.5	88.4	89.6	88.7
разрешенная область	9.8	10.0	11.3	9.9	9.8
частично разрешенная область	0.5	0.4	0.2	0.5	0.5
запрещенная область	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
Код структуры в PDB	3DPS	3C74	1Y1R	3DDO	3FWP

*В скобках приведены значения для слоя высокого разрешения.

Глава 4. Результаты и обсуждение

Кристаллическая упаковка молекул

Упаковка молекул более плотная для кристаллов нелигандированной уридинфосфорилазы, чем для кристаллов комплексов уридинфосфорилазы с лигандами (таблица 2). Межмолекулярные контакты представлены водородными связями и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями.

Кристаллы комплексов уридинфосфорилазы с лигандами, пространственная группа которых $P2_12_12_1$, очень похожи как по параметрам элементарной ячейки, так и по кристаллической укладке. На независимую часть ячейки приходится гексамер уридинфосфорилазы (рис.2).

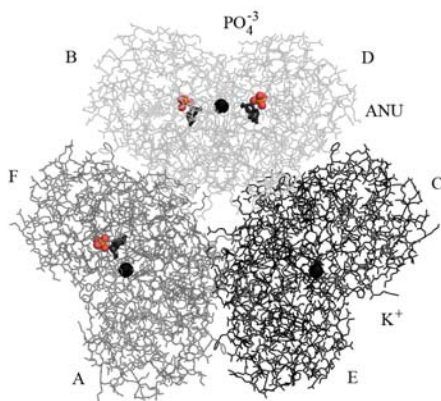


Рисунок 2. Четвертичная структура комплекса молекулы *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином (ANU), ионами фосфата (PO_4^{3-}) и калия (K^+); последние обозначены сферами большего радиуса. **ID PDB: 3FWP.** Буквами А, В, С, D, Е, F обозначены субъединицы *StUPh*.

Общие сведения о структуре молекул *StUPh* и *HUPhI*

Гексамерная молекула *StUPh* (рис. 2), образованная шестью гомологичными субъединицами молекулярной массой 27 kDa каждая, укладка которых в молекуле соответствует точечной группе симметрии L_33L_2 , может быть аппроксимирована тороидом. Высота молекулы около 5\AA , а наружный диаметр $\sim 108\text{\AA}$. В центре молекулы находится канал диаметром 10\AA , который расширяется до 19\AA на её периферии [23].

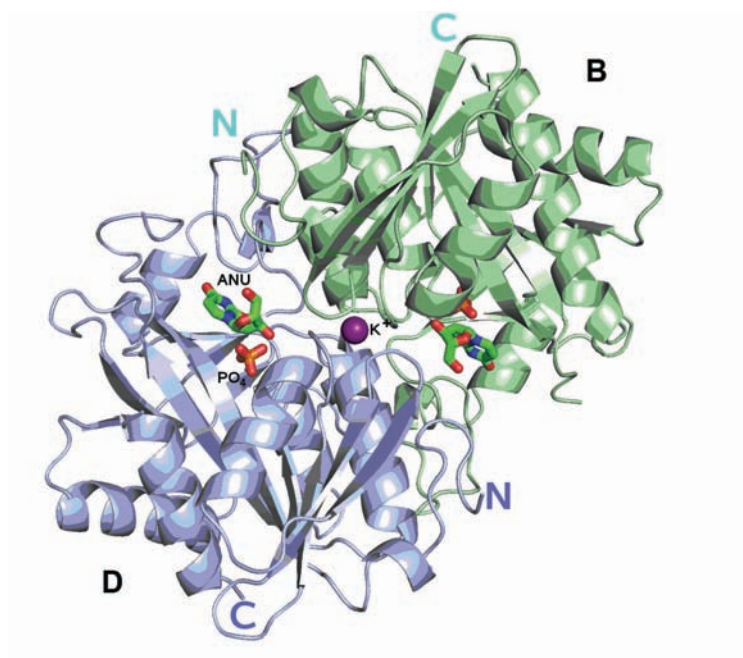


Рисунок 3. Гомодимер BD гексамерной молекулы *StUPh* (ID PDB 3FWP). Показаны положения иона калия (K^+) в межмономерном пространстве, иона фосфата (PO_4^{3-}) и ингибитора (ANU).

Мономер молекулы **StUPh**, полипептидная цепочка которого состоит из 253 аминокислотных остатков, относится к классу комплексов с архитектурой трехслойного $\alpha/\beta/\alpha$ сэндвича. В центральной области мономера находится смешанный β -лист, окруженный спиральями. Трёхмерная структура содержит протяженные петли.

Четвертичная структура **HUPhI** [24], в отличие от бактериальных **StUPh** и **EcUPh** [25], представляет собой гомодимер. Минимально необходимой для функционирования структурной единицей (рис. 3) в исследованных на сегодняшний момент уридинфосфорилазах эукариот и прокариот является гомодимер [6, 23, 24, 26, 27].

Согласно исследованию стабильности и энергии диссоциации (ΔG_{dis}) олигомерных молекулярных комплексов структур **StUPh** и **HUPhI**, проведенных программой PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) [28], существование димера **StUPh**, мономера, тетрамера и гексамера **HUPhI** в растворе представляется сомнительным (табл. 3). Тем самым независимым методом показано, что в условиях водного раствора молекулы **StUPh** находятся в виде гексамера, а **HUPhI** в виде димера.

Таблица 3. Интегральные характеристики поверхности макромолекул [28]

Число субъединиц	Стабильность молекулы в растворе	Свободная энергия сольватации, ΔG_{int} , ккал/моль	Энергия диссоциации, ΔG_{diss} , ккал/моль
2	да	-29.8	29.3
4	нет	-	-
6	условно	-112.8	4.3
6 (StUPh)	да	-102.8	45.6

Активный центр

На каждый гомодимер (рис. 3) молекулы **StUPh** (рис. 2) приходится два структурно идентичных активных центра, составленных аминокислотными остатками обеих субъединиц (рис. 4). Активный центр состоит из фосфат- и нуклеозид-связывающих сайтов. Нуклеозид-связывающий сайт состоит, в свою очередь, из двух частей, остатки которых связывают углеводную и урацильную компоненту лиганда.

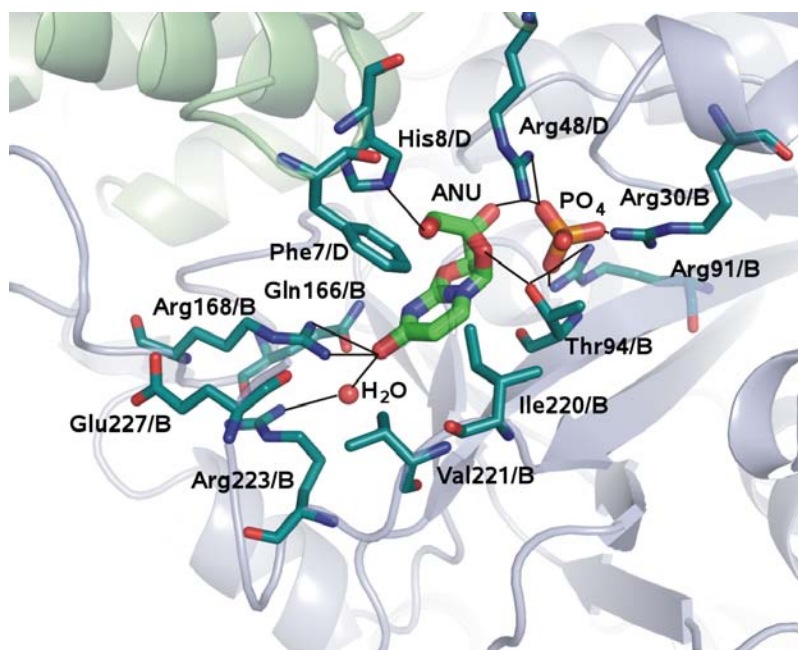


Рисунок 4. Ингибитор (2,2'-ангидроуридин) и ион фосфата в активном центре *StUPh* (ID PDB: 3FWP). Сплошными линиями показаны водородные связи.

Урацил-связывающий сайт

Урацил-связывающий сайт *StUPh* (ID PDB: 1Y1R, 3C74, 3FWP) формируется аминокислотными остатками Gln166/B, Arg168/B, Arg223/B, Gly96/B, Phe162/B, Ile220/B, Val221/B. Ключевыми во взаимодействии с урацильными компонентами ингибитора являются Gln166/B, Arg168/B и Arg223/B. В исследованных бактериальных уридинфосфорилазах эти аминокислотные остатки консервативны и, скорее всего, играют основную роль в узнавании пиримидинового кольца субстрата [23, 25, 26]. В урацил-связывающем сайте атом O4 урацильного фрагмента ингибитора ANU формирует водородные связи с теми же атомами, что и атом O4 ациклоуридинов (BAU, BBAU, BBBA, PTAU, PSAU) [29] и субстратов [27] в *EcUPh*, а именно: с Arg168/B (NH1_Arg168/B - 3.24 Å - O4_ANU; NH2_Arg168/B - 2.82 Å - O4_ANU) и через молекулы воды с боковой группой Arg223/B (O4_ANU - 2.60 Å - HOH - 3.11 Å - NH1_Arg 223/B). В отличие от ациклоуридинов (BAU, PTAU и др.) атом N3 2,2'-ангидроуридина оказался не связанным водородной связью с атомом OE1 боковой цепи Gln166, что объясняется другим по сравнению с ациклоуридинами [29] положением пиримидинового кольца в молекуле 2,2'-ангидроуридина из-за фиксации пиримидинового кольца в син-конформации. Также отсутствует водородная связь между атомом O2 2,2'-ангидроуридина и NE2 боковой цепи Gln166. Однако атом OE1_Gln166/B связан с атомом O4 ингибитора 2,2'-ангидроуридина (OE1_Gln166/B - 3.05 Å - O4_ANU). Кроме того, наблюдается водородная связь между атомом NE2 этого аминокислотного остатка и N3-атомом 2,2'-ангидроуридина (NE2_Gln166/B - 3.39 Å - N3_ANU).

При попарном сравнении аминокислотных остатков урацил-связывающих сайтов нелигандированных *HUPhI* [24] и *StUPh* показана высокая степень гомологии. Об этом свидетельствуют среднеквадратичные отклонения (R.M.S.D.) при попарном сравнении атомов основной цепи: Gln217/A/*HUPhI* → Gln/166/B/*StUPh* - R.M.S.D=0.18 Å; Arg219/A/*HUPhI* → Arg168/B/*StUPh* -

R.M.S.D=0.56 Å; Arg275/A/*HUPhI* → Arg223/B/*StUPh* -R.M.S.D=0.43 Å При попарном сравнении координат атомов боковых цепей: Gln217/A/*HUPhI* → Gln166/B/*StUPh* - R.M.S.D=0.47 Å; Arg219/A/*HUPhI* → Arg168/B/*StUPh* - R.M.S.D=0.75 Å; Arg275/A/*HUPhI* → Arg223/B/*StUPh* - R.M.S.D=0.40 Å (приведены R.M.S.D., полученные при сравнении *StUPh* (3FWP) с *HUPhI*).

Гидрофобное окружение пиримидинового кольца ANU в *StUPh* формируется аминокислотными остатками Gly96/B, Phe162/B, Ile220/B, Val221/B (рис. 4). Из них в комплексах *StUPh* (ID PDB: 1Y1R, 3C74, 3FWP) гидрофобные остатки - Ile220/B и Val221/B - сосредоточены около 5-го положения пиримидинового кольца ANU. Гидрофобное окружение пиримидинового кольца ингибитора в *HUPhI* представлено остатками Gly143/A, Phe213/A, Leu272/A, Leu273/A.

В активном центре субъединицы В *StUPh* (ID PDB: 3FWP) лигандированным ANU боковая цепь Phe7/D из соседнего мономера закрывает доступ растворителя к урацил-связывающему сайту. Положение фенильного кольца Phe7 в комплексах уридинфосфорилазы из *StUPh* (1Y1R, 3C74, 3FWP) с ANU по сравнению с его положением в комплексах *EcUPh* с ВАУ и положением Tyr35/D (аналога остатка Phe7) в комплексе уридинфосфорилазы человека *HUPhI* (Tyr35/D) с ВАУ [24] отличается на 30 градусов. По нашему мнению, это объясняется ван-дер-ваальсовым взаимодействием боковых групп Phe7 (*EcUPh*) и Tyr35 (*HUPhI*) с атомами фенильного кольца ВАУ.

Рибозо-связывающий сайт

Рибозо-связывающий сайт субъединицы В гомодимера ВD *StUPh* (ID PDB: 1Y1R, 3C74, 3FWP) формируется аминокислотными остатками Glu198/B, His8/D, Thr94/B, Met197/B. Участок взаимодействия с рибозной компонентой ANU в *StUPh* (ID PDB: 1Y1R, 3C74, 3FWP) находится в промежутке между урацил- и фосфат-связывающими центрами фермента (рис. 4). 3'-Гидроксил рибозного компонента образует водородные связи с боковой группой Glu198/B (OE2_Glu198/B - 2.42 Å - O3'_ANU; OE1_Glu198/B - 3.03 Å - O3'_ANU) в отличие от структур комплексов *EcUPh* и *HUPhI* с ациклоуридинами, где аналогичный остаток связан с молекулами воды. His8/D/*StUPh* из соседнего мономера образует водородную связь с 5'-гидроксильной группой рибозного компонента ANU (NE2_His8/D/*StUPh* - 2.68 Å - O5'_ANU), подобно структурам комплексов *EcUPh* с ациклоуридинами [29]. Кроме того, гидроксильная группа боковой цепи остатка Thr94/B/*StUPh*, помимо водородной связи с атомами фосфат-иона, образует водородную связь с атомом O4' углеводного компонента ингибитора (OG1_Thr/94B - 3.03 Å - O4'_ANU).

Атом серы Met197/B в *StUPh* (ID PDB: 1Y1R, 3C74, 3FWP) стабилизирует положение рибозной компоненты ANU посредством ван-дер-ваальсовых взаимодействий с атомами фуранозного кольца (C1'-C2'-C3'-C4'-O4') (рис 4). Из этих данных следует, что рибозная компонента ANU связывается подобно рибозной компоненте субстратов данного фермента, в отличие от ациклоуридиновых ингибиторов.

В структуре комплекса *StUPh* с ANU (ID PDB: 3C74) по сравнению со структурой комплекса *StUPh* с ANU, ионами фосфата и калия (ID PDB: 3FWP) иначе ориентирован боковой радикал Arg168. Смещения радикала связаны, скорее всего, с

наличием водородной связи с атомом O4_ANU в субъединицах гомодимера BD из структуры 3C74 (расстояния O4_ANU...NH2_Arg168 равны 3.6Å и 4.04Å, соответственно в В- и D-субъединице). Кроме того, расстояние O2'_ANU...OG1_Thr94 в *StUPh* (ID PDB: 3C74) увеличено с 3.38 Å до 4.23 Å по сравнению со структурой *StUPh* (3FWP), что связано, по-видимому, с влиянием иона фосфата на положение этого аминокислотного остатка.

Фосфат-связывающий сайт

Рассмотрим активный центр В-субъединицы гомодимера BD *StUPh* (3FWP) (рис. 3, 4), в сайте связывания которого находятся одновременно молекула субстрата PO₄³⁻ (в фосфат-связывающем сайте) и молекула ингибитора ANU (в нуклеозид-связывающем сайте).

Ключевыми аминокислотными остатками фосфат-связывающего сайта В-центра являются Arg30/В, Arg91/В из В-субъединицы и Arg48/Д - из D-субъединицы. С каждым из этих аминокислотных остатков атомы кислорода фосфатного иона образуют от одной до двух водородных связей (рис. 4). Кроме этого, во взаимодействии с ионом фосфата принимают участие гидроксильная атом кислорода боковой цепи Thr94/В и атом азота основной цепи NH_Gly26/В. Атом O3' иона фосфата связан водородной связью длиной 2.68 Å с O3'_ANU.

Аминокислотные остатки аргинина связаны с ионом фосфата за счет сильного электростатического взаимодействия между положительно заряженными аминогруппами боковых цепей и отрицательно заряженными атомами кислорода иона фосфата.

По сравнению с активным центром субъединицы С той же молекулы, где ион фосфата отсутствует, положение боковой группы Arg30/В по сравнению с Arg30/С значительно изменилось (R.M.S.D=4.0Å). Менее значительно поменялось положение атомов боковых групп других аминокислотных остатков: Arg91/В (R.M.S.D=1.60 Å) по сравнению с Arg91/С; Arg48/Д (R.M.S.D=1.95Å) по сравнению с Arg48/Е. Атомы основной цепи Arg30/В (R.M.S.D=0.31 Å), Arg91/В (R.M.S.D.=0.24Å) и Arg48/Д (R.M.S.D=0.11 Å) практически не поменяли свое положение по сравнению с соответствующими аминокислотными остатками в нелигандированном активном центре субъединицы С *StUPh* (3FWP).

Боковая цепь Arg64/А в структуре комплекса *HUPhI* с ВАУ и фосфатом не связана с ионом фосфата. Отличие объясняется влиянием остатка Gln296/*HUPhI*, с которым образует водородную связь Arg64 (NH1_Arg64/А/*HUPhI* - 2.96 Å - OE1_Gln296/А/*HUPhI*). Аминокислотный остаток Gln296 по свойствам и положению боковой группы не имеет аналогов в структуре *StUPh*. Однако можно предположить, что у Arg64/*HUPhI* имеется возможность связать ион фосфата при условии образования ротamera, аналогичного ротамеру Arg30/*StUPh*.

Роль петли L9 в связывании ингибитора

Особую роль в структуре *StUPh* играет петля L9, образованная аминокислотными остатками с Arg 223 по Thr 233 (рис. 5), которая открывает или закрывает доступ лигандов в активный центр.

«Закрытая» конформация петли в субъединице В структуры **StUPh** (ID PDB 3FWP) фиксируется водородными связями и солевыми мостиками, которые образует Glu227/B с Arg168/B (рис. 5). Аналогичное положение остатка Glu227 при «закрытой» конформации петли активного центра было отмечено также и для **EcUPh** [27].

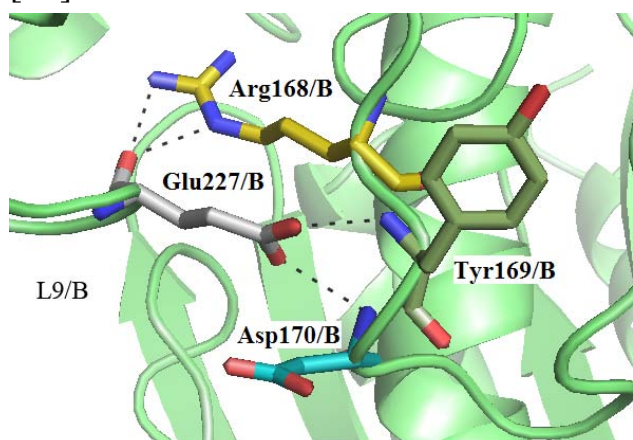


Рисунок 5. Система водородных связей, фиксирующая «закрытую» конформацию петли L9 активного центра в субъединице В (**StUPh**, ID PDB: 3FWP). Пунктирными линиями обозначены водородные связи.

При «открытом» состоянии активного центра, свободного от ингибитора и иона фосфата, например, в субъединице А той же структуры **StUPh** (ID PDB: 3FWP), остаток Glu227/А экспонирован в растворитель и взаимодействует с молекулами воды. Можно предположить, что петля действует как ворота, впускающие (выпускающие) лиганды к сайтам связывания. Изменение положения петли в структуре комплекса фермента с ионом фосфата и ANU (ID PDB: 3FWP) индуцируется взаимодействием ингибитора с аминокислотными остатками всех трех сайтов связывания активного центра одновременно. Аналогичная ситуация наблюдается при связывании **EcUPh** как с ациклорибонуклеозидными ингибиторами и ионом фосфата, так и с некоторыми субстратами и псевдосубстратами [27, 29].

В **HUPhI** аналогичная петля L9 образована остатками с Arg 275 по Pro 284 [24]. В структуре комплекса **HUPh** [24] с ВАУ и ионом фосфата петля L9 находится в закрытой конформации. Боковая цепь Asp279, соответствующая боковой цепи Glu227 в **StUPh**, в **HUPh** образует водородные связи с остатками белковой молекулы [24].

Ион калия в структурах комплексов StUPh с ингибитором.

В исследованных структурах **StUPh**, **EcUPh** [10, 27, 30], содержащих ион калия, данный ион находится в межмономерной области каждого гомодимера гексамерной молекулы в месте расположения её локальной оси симметрии второго порядка молекулы.

Сайты связывания **StUPh** в присутствии иона K^+ в молекуле более доступны для молекул субстрата или ингибитора по сравнению с нелигандированным ферментом, не содержащим ион K^+ . [10, 31]. Непосредственного влияния иона калия на структуру сайтов связывания ANU не выявлено.

Отметим, что в нелигандированной структуре **HUPhI** и её комплексе с ВАУ, решенных методом рентгеноструктурного анализа [24], ион калия в межмономерной области авторами публикации [24] не локализован.

Описанные выше результаты рентгеноструктурного анализа могут быть расширены исследованиями подвижности отдельных фрагментов биомакромолекул, используя метод молекулярной динамики (МД).

Согласно графику зависимости среднеквадратичных флуктуаций (R.M.S.F.) положений атомов основной цепи, наблюдаются локальные изменения подвижности остатков петли L9 активного центра и остатков, координирующих ион калия на границе мономеров димера *StUPh* (рис. 6) в зависимости от присутствия иона калия

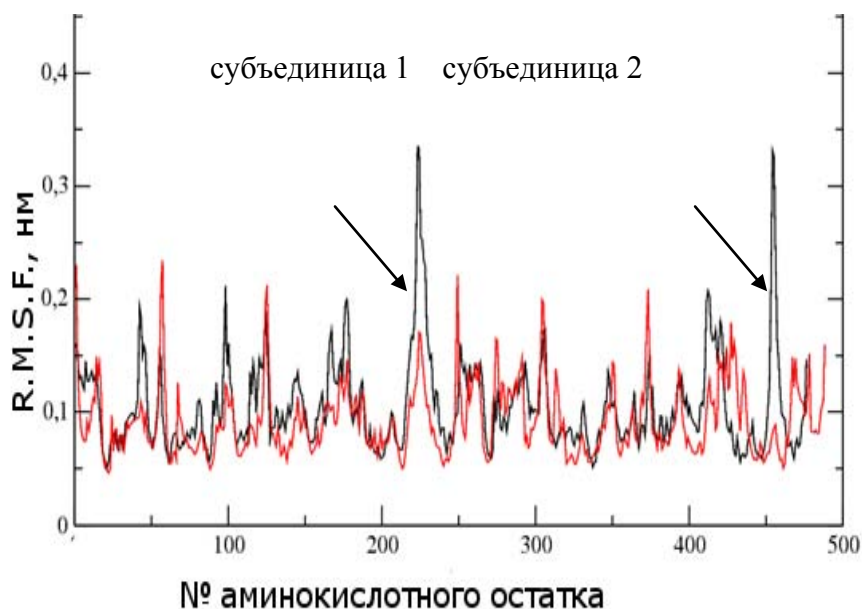


Рисунок 6. График зависимости средних флуктуаций (R.M.S.F.) координат атомов основной цепи аминокислотных остатков от номера остатка для димера *StUPh*: черная линия – нелигандированный фермент, красная – комплекс *StUPh* с ионом калия. Применена последовательная нумерация остатков для димеров. Стрелками показаны пики флуктуаций атомов основной цепи петли L9.

Решение структуры комплекса *HUPhI* с 2,2'-ангидроуридином и ионом фосфата методом молекулярного докинга

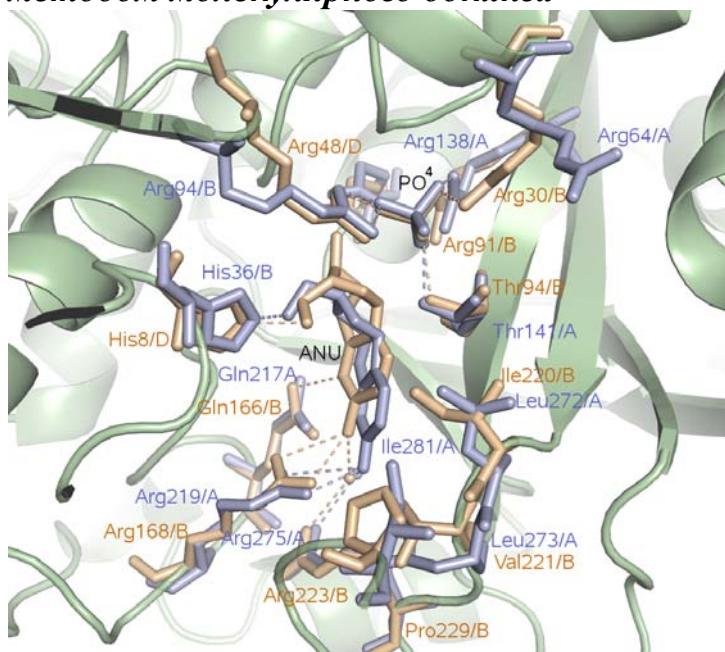


Рисунок 7. Наложение структур активных центров комплексов *StUPh* и *HUPhI* с ANU и ионом фосфата [32]. Аминокислотные остатки активного центра *StUPh* и атомы ингибитора в нём окрашены коричневым цветом, а для *HUPhI* - синим цветом.

Протокол молекулярного докинга был отработан на комплексе *StUPh* с ANU, ионами фосфата и калия. Положение и конформация ANU в смоделированном комплексе соответствовали положению и конформации ANU в кристаллической структуре

StUPh ($R.M.S.D._{ANU} \sim 0.5 \text{ \AA}$). Проведен докинг ANU в активный центр А-субъединицы гомодимера АВ **HUPhI**. ANU в комплексе с **HUPhI** образует следующие водородные связи с аминокислотными остатками сайтов связывания: O4_ANU - 2.63 Å - NH₂_Arg219/A/**HUPhI**; O5'_ANU - 2.91 Å - NE2His36/B/**HUPhI**, O4_ANU - 2.63 Å - NH₂_Arg219/A/**HUPhI**, N7_ANU - 3.52 Å - OE1_Gln217/A/**HUPhI**, O4_ANU - 3.31 Å - HOH - 3.11 Å - NH1_Arg275/A/**HUPhI**. В результате установлено, что аминокислотные остатки активного центра **StUPh** и **HUPh**, образующие водородные связи с ингибитором, идентичны (рис. 7)

Различия аминокислотных остатков гидрофобного «кармана» активного центра **StUPh** и **HUPh** (Pro229/**StUPh** → Ile226/**HUPhI**, Ile220/**StUPh** → Leu257/**HUPhI**, Val221/**StUPh** → Leu258/**HUPhI**) приводят к изменению ван-дер-ваальсовой поверхности этого «кармана». В результате этого происходит смещение ANU в смоделированном комплексе **HUPhI** по сравнению со структурой комплекса **StUPh** с ANU, полученной методом рентгеноструктурного анализа (рис. 7).

Конструирование нового ингибитора уридинфосфорилазы класса 2,2'-ангидроуридина, замещённого в 5-м положении урацильного кольца

На основании результатов рентгеноструктурного анализа комплекса **StUPh** с 2,2'-ангидроуридином и ионом PO₄⁻³ можно предположить, что возможный заместитель пятого положения пиримидинового кольца ANU состоит из короткой гидрофобной цепочки, которая будет взаимодействовать с гидрофобным «карманом» около атома C5 пиримидинового кольца и ароматической группы, которая будет формировать стэкинг взаимодействия с остатками Phe162 и Phe7 соседнего мономера.

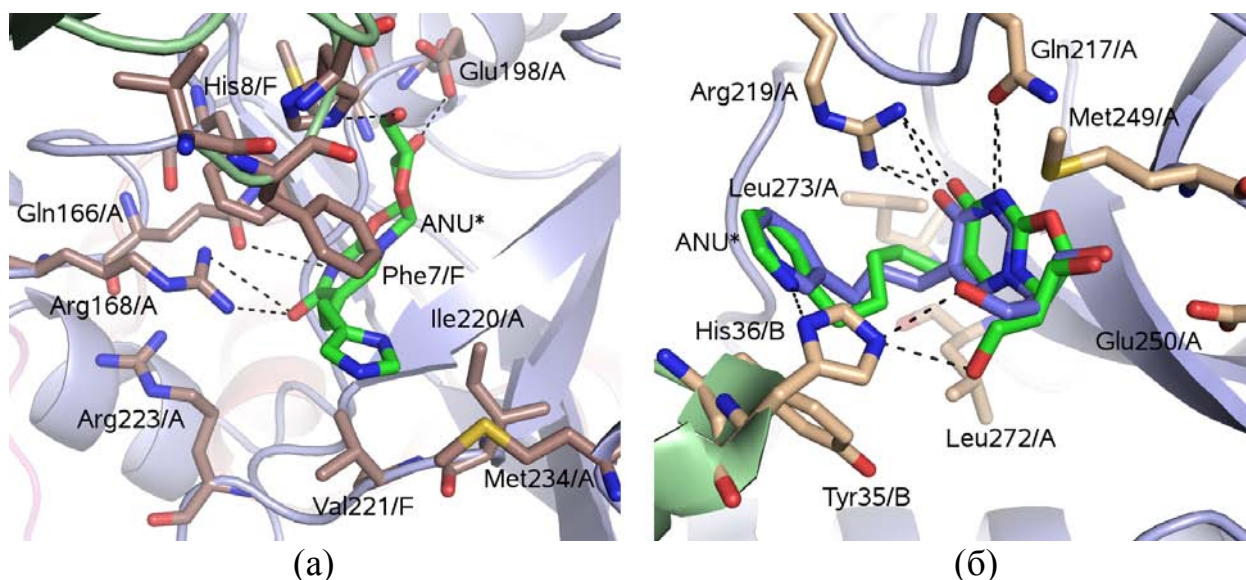


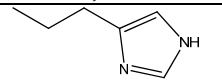
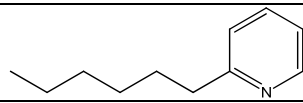
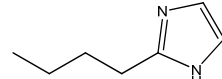
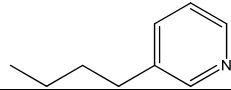
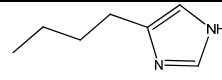
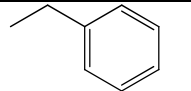
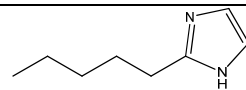
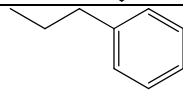
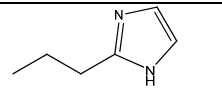
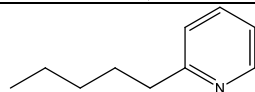
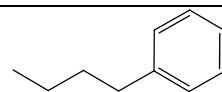
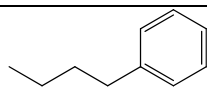
Рисунок 8. Сконструированный ингибитор в активном центре **StUPh** (а) и сконструированные ингибиторы с разным числом звеньев насыщенной углеводородной цепочки в активном центре **HUPhI** (б).

Результаты молекулярного дизайна при «открытой» конформации активного центра **StUPh** (табл. 4, рис. 8а.) и **HUPhI** (табл. 4, рис. 8б) согласуются с предположениями относительно связывания ациклоуридинов, имеющих фенильный

заместитель в 5 положении урацильного кольца (BAU, BBAU, BBBA, PTAU, PSAU), высказанными на основании рентгеноструктурного анализа [29]. Имеющаяся разница в сконструированных заместителях (табл. 4) обусловлена, по всей видимости, разницей в конформации и аминокислотном составе петли (остатки 223-233/*StUPh*, 275-284/*HUPhI*), а также различием в положении и типе боковой группы Phe7/*StUPh*(Tyr35/*HUPhI*).

Наблюдаются различия во взаимодействии групп-заместителей сконструированных ингибиторов с аминокислотными остатками карманов активного центра в рассматриваемых структурах. Для имидазольного кольца ингибитора *StUPh* характерно стэкинг-взаимодействие с Phe7/*StUPh*, которое значительно меньше выражено при рассмотрении контактов пиридинового кольца ингибитора *HUPhI* с Tyr35/*HUPhI*. В свою очередь для атома азота пиридиновой группы сконструированного ингибитора *HUPhI* с заместителем №1 (табл. 4) наблюдается водородная связь с атомом ND1 His36/B/*HUPhI*.

Таблица 4. Выборка оптимальных заместителей 5-го положения ANU.

№ п/п	Заместители урацильного кольца ANU, <i>StUPh</i>	GlideScore	Заместители урацильного кольца ANU, <i>HUPhI</i>	GlideScore
1		-9.02		-10.84
2		-8.92		-10.49
3		-8.83		-10.42
4		-8.81		-10.42
5		-8.68		-10.34
6		-8.67		-10.11

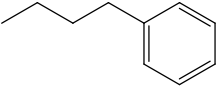
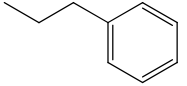
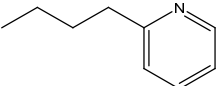
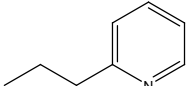
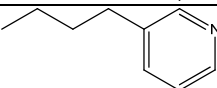
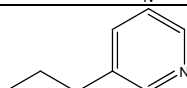
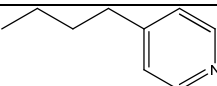
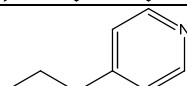
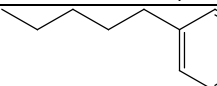
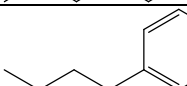
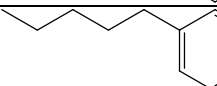
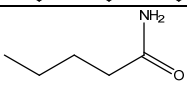
Конструирование нового ингибитора уридинфосфорилазы класса 2,2'-ангидроуридина, замещённого в 6-м положении урацильного кольца

Был проведен молекулярный дизайн заместителя 6-ого положения урацильного кольца. В результате была сформирована выборка заместителей 6-го положения ANU, оптимальных для связывания с *StUPh* и *HUPhI*. Первые шесть заместителей приведены в таблице 5.

Выявлены следующие закономерности в структуре заместителя. Главной функциональной группой является либо бензольное, либо пиридиновое кольцо, вне зависимости от источника уридинфосфорилазы. Различия структур наблюдаются в количестве звеньев оптимальной углеводородной цепочки (табл. 5). Для уридинфосфорилазы человека характерны заместители 6-ого положения

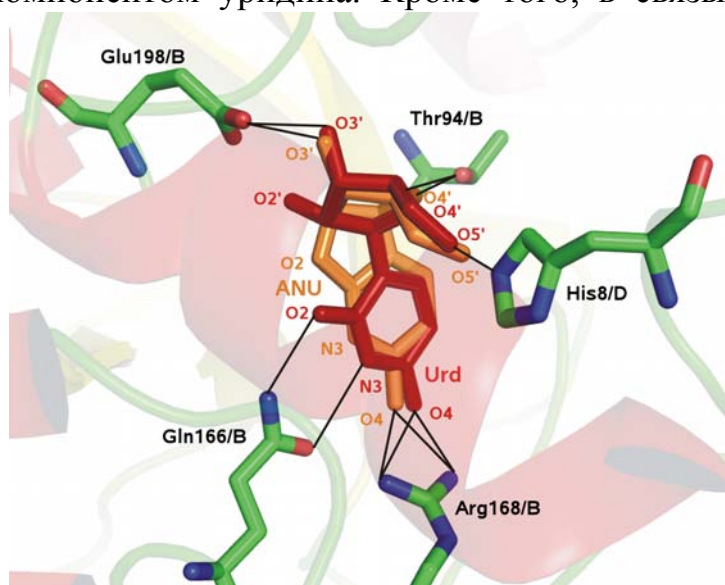
ароматического кольца ANU с числом атомов большим, чем для уридинфосфорилазы *StUPh* (табл. 5).

Таблица 5. Выборка оптимальных заместителей 6-го положения ANU.

№ п/п	Формула заместителя урацильного кольца ANU, <i>StUPh</i> ,	GlideScore	Формула заместителя урацильного кольца ANU, <i>HUPhI</i>	GlideScore
1		-7.42		-7.64
2		-7.21		-7.12
3		-6.31		-7.11
4		-6.14		-7.05
5		-6.04		-6.78
6		-5.88		-6.77

Заключение

1) Основной эффект ингибирования уридинфосфорилазы ANU заключается в установлении связей ANU с аминокислотными остатками нуклеозид-связывающего сайта *StUPh*. Как показано нами выше, определяющую роль в связывании ANU, так же как и субстратов играет связь с рибозным компонентом ингибитора, который располагается в активном центре. Остатки Thr94/B, His8/D, Glu198/B (рис. 4, 9) образуют водородные связи с атомами ингибитора, аналогичные связям с рибозным компонентом уридина. Кроме того, в связывании 2,2'-ангидроуридина принимает участие Arg166/B, образуя контакт с атомом O4 рассматриваемого ингибитора.



участие Arg166/B, образуя контакт с атомом O4 рассматриваемого ингибитора.

Рисунок 9. Сравнение положений ANU (оранжевый) и уридина (красный) по отношению к ключевым остаткам нуклеозид-связывающего сайта активного центра *StUPh*. Сплошными линиями показаны водородные связи.

В случае с уридином остатки Gln166/*StUPh* и Arg168/*StUPh* в стабилизируют обмен электронами между атомом O4'-рибозы и атомами пиримидинового кольца. В результате ион оксокарбения стабилизируется отрицательно заряженным ионом фосфата акте ферментативной реакции [27]. Ион фосфата связывается на α -стороне рибозного кольца, где его расположение позволяет участвовать в S_N1 нуклеофильной атаке C1'-позиции [27].

По сравнению с уридином в случае связывания ANU N-гликозидная связь остается стабильной как за счет фиксации пиримидинового кольца в син-положении атомом O2, так и за счет иного, чем в случае с субстратами уридинфосфорилазы, взаимного расположения урацильного кольца и остатков Glu168 и Arg166 (рис. 9).

Следует учитывать и то, что молекула ANU имеет меньше вращательных степеней свободы, чем уридин. Это приводит к уменьшению энтропийной составляющей свободной энергии комплекса фермент-ингибитор. При практически неизменной энтальпии комплексов, определяемой связями фермент-ингибитор, эффект уменьшения энтропийной составляющей положительно сказывается на «времени жизни» комплекса фермент-ингибитор и вероятности его самопроизвольного распада.

Исходя из аналогичности пространственной организации активных центров *StUPh* и *HUPhI*, можно предположить и идентичность механизмов ингибирования ANU *StUPh* и *HUPhI*.

Сгенерированы структуры предполагаемых лекарственных препаратов – потенциальных высокоселективных ингибиторов уридинфосфорилаз. Они являются 5- или 6-замещенными 2,2'-ангидроуридинами, где в качестве заместителя выступает алифатическая насыщенная цепочка с ароматической группой на конце. Для 5-замещенных 2,2'-ангидроуридинов имеются отличия в предпочтительном типе ароматической группы модельного ингибитора *HUPhI* (пиридиновый цикл) и *StUPh* (имидазольный цикл), что объясняется различным аминокислотным окружением активного центра фосфорилаз из разных источников при высокой гомологии сайтов связывания. Для 6-замещённых 2,2'-ангидроуридинов имеются лишь отличия в длине углеводородной цепочки оптимального заместителя.

Основные результаты и выводы.

- 1) Методом рентгеноструктурного анализа впервые установлены с высокой достоверностью и приняты Международным банком белковых структур (PDB) структуры при атомном разрешении следующих биомакромолекул :
 - нелигандированной *StUPh* при разрешении 1.80 Å (ID PDB 3DPS);
 - комплекса *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином (ANU) и ионом калия при разрешении 2.38 Å (ID PDB 3C74);
 - комплекса *StUPh* с ANU и ионом фосфата при разрешении 2.11 Å (1Y1R);
 - комплекса *StUPh* с ANU, ионами фосфата и калия при разрешении 1.86 Å (ID PDB 3FWP) .
 - комплекса *StUPh* с ионом фосфата при разрешении 1.5 Å (3DDO);

Методом молекулярного моделирования определена структура комплекса уридинфосфорилазы человека с 2,2'-ангидроуридином и ионом фосфата.

- 2) Впервые выявлено место и характер связывания 2,2'-ангидроуридина с **StUPh** (ферментом-мишенью). Взаимодействия между ферментом и ингибитором осуществляются посредством водородных связей, ван-дер-ваальсовых контактов и стэкинг-взаимодействий. Методом рентгеноструктурного анализа показано, что в комплексе **StUPh** с ANU и ионом фосфата состояние петли L9 активного центра предпочтительно «закрытое», в то время как для комплекса только с ANU наблюдаются как «закрытое», так и «промежуточное» состояния. Показано, что 2,2'-ангидроуридин является конкурентным ингибитором **StUPh** и его действие обратимо.
- 3) Установлено, что четвертичной структурой комплекса **HUPhI** с ANU и ионом фосфата является гомодимер. Выявлены аминокислотные остатки **HUPhI**, связывающие ингибитор. Показаны различия ферментов **HUPhI** и **StUPh** в гидрофобной области сайта, связывающего урацильный компонент ANU. Механизм ингибирования **HUPhI** и **StUPh** 2,2'-ангидроуридином аналогичен. Полученные данные можно использовать при дизайне перспективных высокоаффинных ингибиторов уридинфосфорилаз из бактерий и человека, являющихся химиотерапевтическими и противомикробными препаратами.
- 4) Методом молекулярной динамики было установлено влияние иона калия на структурную стабилизацию молекулы **StUPh**. Особенно подвержены изменениям аминокислотные остатки петли L9 активного центра и начального участка спирали H8. Отмечено увеличение плотности контактов в области межсубъединичного взаимодействия в димерах в присутствии иона калия. Методом молекулярной динамики показано, что петля L9 в **StUPh** и **HUPhI** меняет свою конформацию и положение.
- 5) Впервые проведено конструирование *in silico* молекул высокоаффинных ингибиторов как для **HUPhI**, так и для **StUPh** на основе 2,2'-ангидроуридина. Они являются 5- или 6-замещенными ANU, где в качестве заместителя выступает алифатическая насыщенная цепочка с ароматической группой на конце. Для 5-замещенных 2,2'-ангидроуридинов имеются отличия в предпочтительном типе ароматической группы ингибитора **HUPhI** (пиридиновый цикл) и **StUPh** (имидазольный цикл), что объясняется различным аминокислотным окружением активного центра фосфорилаз из разных источников. Для 6-замещённых 2,2'-ангидроуридинов имеются отличия в длине углеводородной цепочки оптимального заместителя.

Список публикаций в рецензируемых журналах по теме диссертации:

- 1) **А.А.Лашков**, Н.Е.Жухлистова, С.Е.Сотниченко, А.Г.Габдулхаков, А.М.Михайлов. Структурная основа механизма ингибирования уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium*. *Кристаллография*, 2010, том 55, №1, стр. 1183-1199.
- 2) **A.A.Lashkov**, N.E.Zhukhlistova, A.G. Gabdoulkhakov, A.A.Shtil, R.G. Efremov, C.Betzel, A.M.Mikhailov. The X-ray structure of *Salmonella typhimurium* uridine nucleoside phosphorylase complexed with 2,2'-anhydrouridine, phosphate and

- potassium ions at 1.86 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D. Biological Crystallography*. 2010, 66(Pt 1), pp.51-60.
- 3) **А.А.Лашков**, Н.Е.Жухлистова, А.Г.Габдулхаков, А.М.Михайлов. Сравнительный анализ пространственной структуры гомодимеров уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* в нелигандированном состоянии и в комплексе с ионом калия. *Кристаллография*, 2009, том 54, №2, стр. 291-302.
 - 4) **А.А.Lashkov**, A.G.Gabdoulkhakov, A.A.Shtil, A.M.Mikhailov. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Salmonella typhimurium* uridine phosphorylase complexed with 5-fluorouracil. *Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications*. 2009, F65, pp. 601-603.
 - 5) В.И.Тимофеев, Б.Ф.Павлюк, **А.А.Лашков**, Т.А.Серёгина, А.Г.Габдулхаков, Б.К.Вайнштейн и А.М.Михайлов. Строение гомодимера молекулы уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* в нативном состоянии при разрешении 1.9 Å. *Кристаллография*, 2007, том 52, №6, стр. 1117-1124.
 - 6) V.I.Timofeev, **А.А.Lashkov**, A.G.Gabdoulkhakov, B.Ph.Pavlyuk, G.S.Kachalova, C.Betzel, E.Yu.Morgunova, N.E.Zhukhlistova, A.M.Mikhailov. Isolation, crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Salmonella typhimurium* uridine phosphorylase crystallized with 2,2'-anhydrouridine. *Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications*. 2007, F63, pp. 852-854.
 - 7) M.V.Dontsova, A.G.Gabdoulkhakov, O.K.Molchan, **А.А.Lashkov**, M.B.Garber, A.S.Mironov, N.E.Zhukhlistova, E.Yu.Morgunova, W.Voelter, Ch.Betzel, Ya.Ahang, S.E.Ealick A.M.Mikhailov. Preliminary investigation of the three-dimensional structure of *Salmonella typhimurium* uridine phosphorylase in the crystalline state. *Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications*. 2005, F61, pp. 337-340.

Список тезисов конференций:

- 1) **Лашков А.А.**, Донцова М.В., Габдулхаков А.Г. и Михайлов А.М. Исследование структурной организации активных центров уридинфосфорилазы *S.typhimurium* по данным рентгеноструктурного анализа. // V Национальная конференция РСНЭ НАНО - 2005. Москва, 14-19 ноября 2005г. Сб. тезисов. С.109.
- 2) Тимофеев В.И., **Лашков А.А.**, Донцова М.В., Габдулхаков А.Г. и Михайлов А.М. Исследование структурной организации активных центров уридинфосфорилазы *S.typhimurium* в нативном состоянии по данным рентгеноструктурного анализа. // V Национальная конференция РСНЭ НАНО - 2005. Москва, 14-19 ноября 2005г. Сб. тезисов. С.142.
- 3) **Лашков А.А.**, Тимофеев В.И., Павлюк Б.Ф. и Михайлов А.М. Рентгеноструктурное исследование комплексов уридинфосфорилазы *S.typhimurium* с ингибитором, ионом фосфата и ионом калия. // VI Национальная конференция РСНЭ НАНО- 2007. Москва, 12-17 ноября 2007г. Сб. тезисов. С.128.
- 4) **Лашков А.А.**, Габдулхаков А.Г., Жухлистова Н.Е., Штиль А.А. и Михайлов А.М. Кристаллизация комплекса белка-мишени уридинфосфорилазы *Salmonella typhimurium* с противораковым лекарственным препаратом 5-фторурацилом. // VIII Национальная конференция по росту кристаллов. Москва, 17-21 ноября 2008г. Сб. тезисов. С.369.

- 5) **Лашков А.А.**, Жухлистова Н.Е., Штиль А.А. и Михайлов А.М. Атомная структура наноразмерного комплекса белка-мишени уридинфосфорилазы *Salmonella typhimurium* с противораковым лекарственным препаратом 5-фторурацилом.// Всероссийская научная конференция с международным участием «Нанотехнологии в онкологии». Москва, 6 декабря 2008г. Сб. тезисов. С.152.
- 6) **Лашков А.А.**, Пырков Т.В., Михайлов А.М., Ефремов Р.Г. Структурное исследование комплексов уридинфосфорилазы *Salmonella typhimurium* и компьютерный дизайн эффективных ингибиторов.// XXI зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва, 9-11 2009г. Сб. тезисов. С.34.
- 7) **Лашков А.А.**, Жухлистова Н.Е., Ефремов Р.Г. и Михайлов А.М. Структура комплексов человеческой и бактериальной уридинфосфорилаз с ингибитором 2,2'-ангидроуридином.// VII- Национальная конференция РСНЭ-НБИК 2009. Москва, 16-21 ноября 2009г. Сб. тезисов. С.38.
- 8) Жухлистова Н.Е., **Лашков А.А.**, Михайлов А.М. Особенности пространственного строения активного центра уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* в кристаллических комплексах с ингибитором и (или) субстратом.// VII-Национальная конференция РСНЭ-НБИК 2009. Москва, 16-21 ноября 2009г. Сб. тезисов. С.77.

Список цитируемой литературы:

1. Iigo, M., Nishikata, K., Nakajima, Y., Szinai, I., Veres, Z., Szabolcs, A. & De Clercq, E., *Differential effects of 2,2'-anhydro-5-ethyluridine, a uridine phosphorylase inhibitor, on the antitumor activity of 5-fluorouridine and 5-fluoro-2'-deoxyuridine*. Biochem Pharmacol, 1990. **39**(7): p. 1247-53.
2. el Kouni, M. H., Naguib, F. N., Niedzwicki, J. G., Iltzsch, M. H. & Cha, S., *Uridine phosphorylase from Schistosoma mansoni*. J Biol Chem, 1988. **263**(13): p. 6081-6.
3. Jimenez, B. M., Kranz, P., Lee, C. S., Gero, A. M. & O'Sullivan, W. J., *Inhibition of uridine phosphorylase from Giardia lamblia by pyrimidine analogs*. Biochem Pharmacol, 1989. **38**(21): p. 3785-9.
4. Lee, C. S., Jimenez, B. M. & O'Sullivan, W. J., *Purification and characterization of uridine (thymidine) phosphorylase from Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol, 1988. **30**(3): p. 271-7.
5. Choi, J. W., Shin, C. Y., Choi, M. S., Yoon, S. Y., Ryu, J. H., Lee, J. C., Kim, W. K., El Kouni, M. H. & Ko, K. H., *Uridine protects cortical neurons from glucose deprivation-induced death: possible role of uridine phosphorylase*. J Neurotrauma, 2008. **25**(6): p. 695-707.
6. Dontsova, M. V., Savochkina, Y. A., Gabdoulkhakov, A. G., Baidakov, S. N., Lyashenko, A. V., Zolotukhina, M., Errais Lopes, L., Garber, M. B., Morgunova, E. Y., Nikonov, S. V., Mironov, A. S., Ealick, S. E. & Mikhailov, A. b. M., *Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of uridine phosphorylase from Salmonella typhimurium*. Acta Crystallographica Section D, 2004. **60**(4): p. 709-711.

7. Molchan, O. K., Dmitrieva, N. A., Romanova, D. V., Lopes, L. E., Debabov, V. G. & Mironov, A. S., *Isolation and initial characterization of the uridine phosphorylase from Salmonella typhimurium*. Biochemistry (Mosc), 1998. **63**(2): p. 195-9.
8. Тимофеев, В. И., Павлюк, Б. Ф., Лашков, А. А., Серёгина, Т. А., Габдулхаков, А. Г., Вайнштейн, Б. К. & Михайлов, А. М., *Строение гомодимера молекулы уридинфосфорилазы из Salmonella typhimurium в нативном состоянии при разрешении 1.9 Å*. Кристаллография, 2007. **52**(6): p. 1117-1124.
9. Timofeev, V. I., Lashkov, A. A., Gabdoulkhakov, A. G., Pavlyuk, B. P., Kachalova, G. S., Betzel, C., Morgunova, E. Y., Zhukhlistova, N. E. & Mikhailov, A. M., *Isolation, crystallization and preliminary crystallographic analysis of Salmonella typhimurium uridine phosphorylase crystallized with 2,2'-anhydrouridine*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2007. **63**(Pt 10): p. 852-4.
10. Лашков, А. А., Жухлистова, Н. Е., Габдулхаков, А. Г. & Михайлов, А. М., *Сравнительный анализ пространственной структуры гомодимеров уридинфосфорилазы из Salmonella typhimurium в нелигандированном состоянии и в комплексе с ионом калия*. Кристаллография, 2009. **54**(2): p. 291-302.
11. Kabsch, W., Integration, scaling, space-group assignment and post refinement. XDS., in International Tables for Crystallography, Rossmann, M. G. & Arnold, E. F., Editors. 2001, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
12. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J., *Phaser crystallographic software*. Journal of Applied Crystallography, 2007. **40**(4): p. 658-674.
13. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. & Zwart, P. H., *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallographica Section D, 2010. **66**(2): p. 213-221.
14. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L., *Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination*. Acta Crystallographica Section D, 1998. **54**(5): p. 905-921.
15. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J., *Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1997. **53**(Pt 3): p. 240-55.
16. Emsley, P. & Cowtan, K., *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallographica Section D, 2004. **60**(12 Part 1): p. 2126-2132.
17. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K., *Features and development of Coot*. Acta Crystallographica Section D, 2010. **66**(4): p. 486-501.
18. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M., *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. Journal of Applied Crystallography, 1993. **26**(2): p. 283-291.
19. Hoof, R. W. W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E. E., *Errors in protein structures*. Nature, 1996. **381**: p. 272-272.

20. Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., 3rd, Snoeyink, J., Richardson, J. S. & Richardson, D. C., *MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W375-83.
21. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P. & Shenkin, P. S., *Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy*. J Med Chem, 2004. **47**(7): p. 1739-49.
22. David Van Der, S., Erik, L., Berk, H., Gerrit, G., Alan, E. M. & Herman, J. C. B., *GROMACS: Fast, flexible, and free*. Journal of Computational Chemistry, 2005. **26**(16): p. 1701-1718.
23. Dontsova, M. V., Gabdoulkhakov, A. G., Molchan, O. K., Lashkov, A. A., Garber, M. B., Mironov, A. S., Zhukhlistova, N. E., Morgunova, E. Y., Voelter, W., Betzel, C., Zhang, Y., Ealick, S. E. & Mikhailov, A. M., *Preliminary investigation of the three-dimensional structure of Salmonella typhimurium uridine phosphorylase in the crystalline state*. Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2005. **61**(Pt 4): p. 337-40.
24. Roosild, T. P., Castronovo, S., Fabbiani, M. & Pizzorno, G., *Implications of the structure of human uridine phosphorylase 1 on the development of novel inhibitors for improving the therapeutic window of fluoropyrimidine chemotherapy*. BMC Struct Biol, 2009. **9**: p. 14.
25. Morgunova, E., Mikhailov, A. M., Popov, A. N., Blagova, E. V., Smirnova, E. A., Vainshtein, B. K., Mao, C., Armstrong Sh, R., Ealick, S. E., Komissarov, A. A. & et al., *Atomic structure at 2.5 Å resolution of uridine phosphorylase from E. coli as refined in the monoclinic crystal lattice*. FEBS Lett, 1995. **367**(2): p. 183-7.
26. Burling, F. T., Kniewel, R., Buglino, J. A., Chadha, T., Beckwith, A. & Lima, C. D., *Structure of Escherichia coli uridine phosphorylase at 2.0 Å*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 1): p. 73-6.
27. Caradoc-Davies, T. T., Cutfield, S. M., Lamont, I. L. & Cutfield, J. F., *Crystal structures of Escherichia coli uridine phosphorylase in two native and three complexed forms reveal basis of substrate specificity, induced conformational changes and influence of potassium*. J Mol Biol, 2004. **337**(2): p. 337-54.
28. Krissinel, E. & Henrick, K., *Inference of macromolecular assemblies from crystalline state*. J Mol Biol, 2007. **372**(3): p. 774-97.
29. Bu, W., Settembre, E. C., el Kouni, M. H. & Ealick, S. E., *Structural basis for inhibition of Escherichia coli uridine phosphorylase by 5-substituted acyclouridines*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2005. **61**(Pt 7): p. 863-72.
30. Lashkov, A. A., Zhukhlistova, N. E., Gabdoulkhakov, A. H., Shtil, A. A., Efremov, R. G., Betzel, C. & Mikhailov, A. M., *The X-ray structure of Salmonella typhimurium uridine nucleoside phosphorylase complexed with 2,2'-anhydrouridine, phosphate and potassium ions at 1.86 Å resolution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 1): p. 51-60.
31. Лашков, А. А., Жухлистова, Н. Е., Сотниченко, С. Е., Габдулхаков, А. Г. & Михайлов, А. М., *Структурная основа механизма ингибирования*

уридинфосфорилазы из Salmonella typhimurium. Кристаллография, 2010. **55**(1): p. 1183-1199.

32. Lashkov, A. A., Zhukhlistova, N. E., Gabdoulkhakov, A. H., Shtil, A. A., Efremov, R. G., Betzel, C. & Mikhailov, A. M., *The X-ray structure of Salmonella typhimurium uridine nucleoside phosphorylase complexed with 2,2'-anhydrouridine, phosphate and potassium ions at 1.86 Å resolution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **66**(Pt 1): p. 51-60.