

На правах рукописи  
УДК 548.737

ПАВЛЮК БОГДАН ФИЛИППОВИЧ

**СТРУКТУРНАЯ ОСНОВА МЕХАНИЗМА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ  
НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ *Salmonella typhimurium***

Специальность 01.04.18 – кристаллография, физика кристаллов

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2007

Работа выполнена в Институте кристаллографии имени А.В. Шубникова Российской академии наук

Научные руководители: кандидат физико-математических наук, доцент  
Михайлов Альберт Михайлович

кандидат физико-математических наук  
Габдулхаков Азат Габдрахманович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор  
Фейгин Лев Абрамович

доктор медицинских наук  
Штиль Александр Альбертович

**Ведущая организация: Институт биоорганической химии РАН**

Защита диссертации состоится «06» ноября 2007 г. в «12 час. 30 мин.» на заседании Диссертационного совета Д 002.114.01 в Институте кристаллографии имени А.В. Шубникова РАН по адресу: 119333 Москва, Ленинский проспект, 59

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института кристаллографии имени А.В. Шубникова РАН

Автореферат разослан «06» октября 2007 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
кандидат физико-математических наук

В.М. Каневский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

**Актуальность проблемы.** Уридинфосфорилаза - ключевой фермент пиримидинового обмена, который катализирует обратимый фосфоролитический распад уридина до урацила и рибоза-1'-фосфата. Механизм его взаимодействия с субстратами детально не изучен. Предположительно реакция протекает по механизму нуклеофильного замещения. Интерес к исследованию данного фермента, кроме получения фундаментальных знаний о его структурной организации, вызван еще и тем, что при лечении ряда онкологических заболеваний необходимо ингибировать нуклеозидфосфорилазы и, в частности, уридинфосфорилазы. Уровень гена экспрессии уридинфосфорилазы резко возрастает в клетках злокачественных новообразований у человека (в частности – рак прямой кишки). Высокая концентрация уридинфосфорилазы в раковой клетке снижает терапевтический эффект медицинских препаратов нуклеозидной природы, используемых при химиотерапии (5-фтор-урацил). Кроме того, замечена исключительная важность данного фермента для борьбы с некоторыми кишечными паразитами (например, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*).

Технические трудности, лежащие на пути получения высокоомогенного препарата в достаточном для проведения рентгеноструктурного анализа структуры ферментов из высших организмов, оказались на сегодняшний день непреодолимы. Поэтому все внимание исследователей направлено на изучение структур уридинфосфорилаз из микроорганизмов. Уридинфосфорилаза *Salmonella typhimurium* (далее – *StUPh*), исследуемая нами, близка по первичной последовательности к уридинфосфорилазе из *E. coli*. Однако *StUPh* значительно отличается от *EcUPh* по ряду биохимических свойств: обладает более широкой субстратной специфичностью, а также более высоким сродством к субстрату.

**Цель работы.** Целью данной работы являлось выращивание высокосовершенных монокристаллов фермента, необходимых для получения с использованием синхротронного излучения высококачественных экспериментальных рентгенографических наборов интенсивностей от кристаллов *StUPh*, как в свободном, так и в лигандированном состоянии; решение и уточнение по этим экспериментальным наборам пространственной организации энзима в различных состояниях с целью, прежде всего, непосредственной локализации по синтезам электронной плотности белка области активного центра фермента *StUPh* и однозначной идентификации аминокислотных остатков, входящих в состав нуклеозид- (пиримидин-, рибозо-) и фосфат-связывающих сайтов. На основе сравнительного анализа трехмерных пространственных структур фермента, как нелигандированного, так и его комплексов с субстратом, продуктами ферментативной реакции и другими лигандами, установленных с высокой достоверностью, проанализировать структурно-функциональную взаимосвязь элементов ферментативного центра *StUPh*.

**Научная новизна.** Впервые с высокой достоверностью решены и уточнены структуры нативного фермента *StUPh*, а также комплексов фермента с: уридином; урацилом и ионом фосфата; тимидином и ионом фосфата; и ионом калия. На основе полученных данных построены пространственные структуры свободного и лигандированного фермента. На основе результатов рентгеноструктурного анализа биокристаллов *StUPh* в нативной и лигандированной форме локализованы остатки аминокислот, входящие в состав нуклеозид- (пиримидин-, рибозо-) и фосфат- связывающих сайтов, определена область активного центра фермента. Показано, что в связывании «фермент-субстрат (продукт)» участвуют остатки аминокислот из двух соседних мономеров, образующих гомодимер. Установлено, что с точки зрения структурной организации для

формирования нуклеозид- (пиримидин-, рибозо-) и фосфат-связывающих сайтов необходимым и достаточным условием является гомодимерная организация *StUPh*. На основании полученных структурных данных установлено, что на скорость прохождения ферментативной реакции может влиять положение петли, образованной аминокислотными остатками 223 – 334, которая открывает (закрывает) доступ субстрата в область активного центра белка. Впервые показано, что для свободного фермента *StUPh* имеет место статистическое распределение положения петли - открытая или закрытая конформация. Впервые установлено, что присутствие ионов калия стабилизирует «открытое» положение петли, что способствует доступу субстрата в область активного центра. Идентифицированы аминокислотные остатки фермента, которые участвуют (дополнительно к аминокислотным остаткам 223 – 334, формирующим собственно петлю) в переходе петли из «закрытого» в «открытое» состояние.

**Практическая значимость работы.** Изучение структурных особенностей механизма связывания фермент-лиганд создает предпосылки для разработки перспективных медицинских препаратов, позволяющих: во-первых, проявлять более низкое сродство к *StUPh*, тем самым повышать свою противоопухолевую активность при химиотерапевтическом воздействии; во-вторых, ингибировать уридинфосфорилазы в клетках кишечных паразитов на основании более высокого конкурентного связывания «фермент-субстрат».

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 2 статьи в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах. Список публикаций приведен в конце автореферата. Наборы координат атомов для пяти решенных и уточненных пространственных структур *StUPh* и соответствующие им экспериментальные наборы рентгенодифракционных интенсивностей сданы в Международный банк белковых структур (PDB).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка печатных работ. Она изложена на 112 страницах, содержит 26 рисунков и 12 таблиц.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- Отработка методики выращивания высокосвершенных кристаллов нативной *StUPh* и комплексов фермента с различными субстратами и продуктами реакции. Математическая обработка полученных на синхротронной станции рентгенодифракционных наборов интенсивностей.
- Определение и уточнение кристаллических структур нативных *StUPh* с разрешением 1.90 Å и 1.76 Å соответственно.
- Решение и уточнение пространственных структур *StUPh* в комплексах с: уридином; урацилом и ионом фосфата; тиминном и ионом фосфата; и ионом калия, с разрешениями 2.90 Å, 2.49 Å, 1.7 Å и 2.15 Å соответственно.
- Детальный анализ пространственных структур изучаемого фермента как в нативном состоянии, так и в его комплексах с лигандами для установления структурной основы механизма ферментативной активности в том числе:
  - выявление и идентификация аминокислотных остатков пиримидин-, рибоза- и фосфат-связывающих сайтов активного центра уридинфосфорилазы;
  - установление дополнительных к сайтам связывания субстратов структурных образований фермента, важных для их функционирования; выявление и идентификация аминокислотных остатков, образующих вторичные структуры этих образований;

- установление числа активных центров, приходящихся на гексамерную молекулу уридинфосфорилазы, и их взаимозависимость;
- выяснение роли ионов калия при работе активного центра энзима.

**Личный вклад автора.** Автором выращены кристаллы нелигандированного фермента StUPh, а также его комплексов с различными субстратами, продуктами реакции и ионами калия, пригодные для рентгенографических исследований.

Проведен предварительный рентгенодифракционный анализ выращенных кристаллов с целью выяснения их пригодности для дальнейшей работы. Экспериментальные наборы интенсивностей для этого этапа работы получали на лабораторном источнике рентгеновского излучения (Институт кристаллографии РАН) и на источнике синхротронного излучения на базе станции белковой кристаллографии «Белок» на пучке синхротронного излучения накопителя Сибирь 2 Курчатовского центра синхротронного излучения и нанотехнологий.

Для проведения исследования экспериментальные наборы интенсивностей собраны на белковых станциях синхротрона DESY (Гамбург, Германия). Последующая обработка интенсивностей проведена в комплексе математического обеспечения XDS.

Решены и уточнены с высокой достоверностью пространственные структуры как свободного фермента в двух кристаллических формах, так и в комплексах с различными субстратами и продуктами реакции. Построены пространственные модели исследуемых структур. Определена область активного центра и установлены остатки аминокислот, входящие в состав нуклеозид- (пиримидин-, рибозо-) и фосфат-связывающих сайтов. Проведен сравнительный анализ полученных структур. Показано, что минимальной структурной организацией фермента, достаточной для связывания субстратов является гомодимер с двумя асинхронно работающими активными центрами. Впервые установлено, что ионы калия стабилизируют петлю активного центра в открытой конформации, что приводит к увеличению (по сравнению с его нативной формой) скорости связывания ферментом субстрата.

**Апробация работы.** Результаты работ представлены на национальных и международных конференциях, в частности: «IV Съезд общества биотехнологов России им. Ю.А.Овчинникова» (Пушино, 2006); «III Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Пушино, 2007); «Российский симпозиум «Космическое материаловедение – 2007» (Калуга, 2007).

Координаты атомов уточненных пространственных структур фермента в нативной форме, а также его комплексов с субстратами и продуктами реакции помещены в Международном банке белковых структур (PDB) под номерами PDB ID: 2OXF, 2IQ5, 2HWU, 2HRD, 2OEC.

## **КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Введение.** Во введении дана краткая характеристика нуклеозидфосфорилаз из различных источников, обоснована актуальность темы, необходимость исследований пространственной организации активного центра энзима как в нелигандированной форме, так и в форме его комплексов с субстратами, ингибиторами и продуктами реакции.

### **Глава 1. Литературный обзор.**

Глава состоит из двух основных тематических разделов, описывающих сравнительный анализ структур однодоменных нуклеозидфосфорилаз из различных источников и медицинское применение ингибиторов уридинфосфорилаз как при

химиотерапевтическом лечении, так и в качестве антибактериальных, противопаразитарных препаратов.

Изучение пространственной организации фермента методом рентгеноструктурного анализа позволяет достаточно точно идентифицировать структурные элементы фермента, участвующие в протекании биохимических реакций, установить аминокислотные остатки активного центра, а также выявить роль наиболее подвижных элементов пространственной организации энзима (петель) для функционирования белка.

Акцент на обзор именно медицинского применения ингибиторов уридинфосфорилаз показывает практическую значимость поставленной задачи и проделанной работы, так как разработка противоопухолевых препаратов на основе полученных структурных и кинетических биохимических данных имеет большое социально-экономическое значение.

## **Глава 2. Материалы и методы.**

В этой главе описаны биологические и химические материалы, использованные при выполнении настоящего исследования. На основании литературных данных приведены краткие обзоры, посвященные описанию принципов выращивания совершенных кристаллов биомакромолекул, методов уточнения атомной структуры белков, способов оценки качества модели в процессе уточнения кристаллической структуры.

## **Глава 3. Экспериментальная часть.**

### **Кристаллизация свободного фермента уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* и получение комплексов «фермент-лиганд» в кристаллах.**

Поиск условий кристаллизации нативной *StUPh* проводили методом диффузии паров в висящей капле с предварительным скринингом компонентов, составляющих как кристаллизационные, так и маточные растворы (противорастворы).

Комплекс *StUPh* с ионом калия в кристаллах получали методом настаивания.

Получение комплексов фермента в кристаллах с субстратом (уридином) и продуктами реакции (урацилом, тиминном и ионом фосфата) проводилось методом сокристаллизации.

Визуальное качество кристаллов определяли с помощью бинокулярного микроскопа, а их рассеивающую способность – на лабораторном источнике рентгеновского излучения Института кристаллографии РАН. Съёмку кристаллов проводили в кварцевых капиллярах.

Состав криорастворов для съёмки при низких температурах (100 К – жидкий азот) подбирался на основе противорастворов, содержащих 25 % ПЭГ 400. Контроль качества криорастворов, а также тестовый сбор рентгенодифракционных данных полученных кристаллов проводился на базе станции белковой кристаллографии «Белок» на пучке синхротронного излучения накопителя Сибирь 2 Курчатовского центра синхротронного излучения и нанотехнологий.

### **Получение наборов дифракционных данных**

Дифракционные наборы данных с кристаллов нативного фермента, а также комплексов *StUPh* с: уридином; урацилом и ионом фосфата; тиминном и ионом фосфата; ионом калия получены на рабочих станциях X11, X13 и BW6 синхротрона DESY (Гамбург, Германия) при температуре 100 К. В качестве детектора использовался MARCCD.

## **Решение и уточнение структур уридинфосфоорилазы *S. typhimurium*. в свободном и связанном состояниях.**

Решение структур свободного и лигандированного фермента *StUPh* проводилось методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser.

Уточнение пространственных структур *StUPh* проводилось с использованием программных комплексов CNS, Phenix и Refmac.

Корректность полученных результатов по ходу уточнения структуры контролировалась на основании данных, полученных при расчетах по программам Procheck, WhatCheck. На конечном этапе уточнения структура тестировалась программами What-IF и WhatCheck [1, 2].

Рисунки были приготовлены с использованием программ: CLUSTALW ([www.infobiogen.fr/doc/ClustalW](http://www.infobiogen.fr/doc/ClustalW)), GENEDOC, Pymol ViewerLite ([www.accelrys.com](http://www.accelrys.com)), DeepView/Swiss-PdbViewer ([www.expasy.org/spdbv](http://www.expasy.org/spdbv)).

## **Глава. 4. Результаты и их обсуждение.**

### **Выращивание кристаллов свободного и лигандированного фермента.**

Первоначальный скрининг и дальнейшее варьирование условий кристаллизации позволили оптимизировать условия выращивания кристаллов нативного фермента. В качестве осадителей использовали полиэтиленгликоли (ПЭГ) разных весов в диапазоне 3000-8000. Концентрация осадителя в противорастворе варьировалась от 8 до 25% с шагом в 2.5%. Рабочие растворы готовили на Трис-малоновом буфере. Диапазон значений pH составил 4.6-5.5. До нужного значения буфер довели 0.1 М раствором NaOH. Концентрация белка в капле варьировалась от 3.5 до 5.6 мг/мл. Объем капли 6 мкл. В каждую каплю добавляли 0.2 мкл диоксана или изопропилового спирта. Кристаллизационная плашка инкубировалась при температуре 21°C.

В результате были получены кристаллы нативной *StUPh* размером 100x50x50 мкм (рис. 1), в условиях: противораствор (1 мл) содержал 25 % ПЭГ 3350, 0.1 М NaOH-Трис-малоновый буфер pH 5.2, концентрация белка в капле 3.5 мг/мл, объем капли 6 мкл, соотношение раствора белка и раствора осадителя в капле составило 1:1.



**Рисунок 1.** Кристаллы нелигандированного фермента *StUPh*

Для получения комплекса *StUPh* с ионом калия методом настаивания кристалл нативной *StUPh* петлей переносили в каплю (состав капли соответствовал

противораствору), содержащую от 50 до 100 мМ ацетата калия. Настаивание проводили в течение 1 часа при температуре 21°C.

Получение кристаллов комплексов фермента с субстратом (уридином), и продуктами реакции (урацилом и ионом фосфата; тиминном и ионом фосфата) проводилось методом сокристаллизации. В данном случае скрининг проводился в более узком диапазоне, так как использовались те условия, при которых были выращены кристаллы хорошего качества нелигандированной *StUPh*. В качестве осадителей использовались ПЭГ 3000 и ПЭГ 3350. Использовались рабочие растворы, приготовленные на Трис-малоновом буфере, pH 5.2. Концентрация белка в капле варьировалась от 3.5 до 5.6 мг/мл. В каплю добавляли эквимолярное количество раствора уридина (урацила, тимина). Суммарный объем кристаллизационного раствора - 6 мкл. В каждую каплю добавляли 0.2 мкл диоксана или изопропилового спирта. Кристаллизационная плашка инкубировалась при температуре 21°C.

В результате были выращены кристаллы комплексов *StUPh*: с урацилом; тиминном; уридином, в условиях: противораствор (1 мл) содержал 20 % ПЭГ 3350, 0.1М NaOH-Трис-малоновый буфер pH 5.2; кристаллизационная капля содержала 4 мкл раствора *StUPh* (9 мг/мл), 1.5 мкл противораствора, 0.5 мкл 10 мМ раствора уридина (урацила, тимина\*). Максимальный размер кристаллов достигал 150 -300 мкм.

### **Сбор рентгенодифракционных данных с полученных кристаллов, решение и уточнение структур**

Экспериментальные наборы модулей структурных амплитуд для кристаллов нативного и лигандированного фермента получены с помощью программы XDS [3]. Характеристики рентгенодифракционных наборов интенсивностей приведены в табл. 1.

Решение структуры *StUPh* проводили методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser. В качестве стартовой модели была выбрана структура фермента *StUPh* (пр. гр. P6<sub>1</sub>), определенная нами ранее при разрешении 2.5 Å (PDB код 1SJ9) [4]. Молекулы воды и лигандов были исключены из стартовой модели.

Уточнение пространственной структуры *StUPh* проводилось с использованием опций anneal, minimize, bgroup программных комплексов CNS и Phenix. Кроме того, в отдельных случаях использовали опции уточнения пакета программ CCP4.

В ходе уточнения структур для обеспечения контроля процедуры уточнения из экспериментальных данных в самом начале работы были отобраны случайным образом 5% отражений, которые образовали контрольный набор, использовавшийся далее для расчета свободного R-фактора (R<sub>free</sub>). Уточнение позиций атомов модели *StUPh* и их температурных факторов проводили в несколько этапов. На всех этапах уточнения осуществляли контроль над стереохимическими параметрами (длины валентных связей, величины валентных углов, планарность заданных групп атомов, невалентные взаимодействия и др.). Стадии кристаллографического уточнения чередовались с ручной корректировкой модели фермента с использованием разностных синтезов электронной плотности. Визуальная корректировка модели проводилась с использованием графического программного комплекса COOT по картам электронной плотности разностных синтезов Фурье с коэффициентами (2F<sub>o</sub> - F<sub>c</sub>) и (F<sub>o</sub> - F<sub>c</sub>), где F<sub>o</sub>, F<sub>c</sub> - экспериментальные и расчетные модули структурных факторов соответственно. Параметры уточненных структур *StUPh* приведены в табл. 2.

---

\* - Примечание: в случае получения двойных комплексов *StUPh* с «урацил + ион фосфата» и «тимин + ион фосфата» в кристаллизационную каплю добавлялось 0.1 мкл 1 мМ раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>



**Таблица 1.** Основные характеристики наборов дифракционных данных собранных с кристаллов StUPh

Параметры	Наименование объекта (кристалл)					
	Нативный фермент StUPH		Комплекс StUPH с тимином	Комплекс StUPH с ионом калия	Комплекс StUPH с урацилом	Комплекс StUPH с уридином
Пространственная группа	R3 (№ 146 )	R3 (№ 146 )	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (№ 19)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (№ 19)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (№ 19)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (№ 19)
Параметры элементарной ячейки Å, град.	a=b=150.86, c=47.84 $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	a=b=151.66, c=47.92 $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	a = 88.79, b = 124.07, c = 134.11 $\alpha = \beta = \gamma = 90$	a = 88.52, b = 123.98, c = 133.52 $\alpha = \beta = \gamma = 90$	a = 89.00, b = 124.26, c = 133.96 $\alpha = \beta = \gamma = 90$	a = 88.88, b = 123.99, c = 134.16 $\alpha = \beta = \gamma = 90$
Число молекул в асимметричной части	1/3 (димер)	1/3 (димер)	1 (гексамер)	1 (гексамер)	1 (гексамер)	1 (гексамер)
Наименование станции *	X13	X11	X13	X13	BW6	X11
Длина волны, Å	0.813	0.8126	0.8043	1.05	1.05	0.8043
Разрешение, Å	150.86-1.76	76.70-1.90	88.31-1.70	88.52-2.15	79.56-2.49	88.34-2.90
Общее число рефлексов	147750	147750	151477	276750	148261	122693
Число независимых рефлексов	39169	39169	55876	75645	49654	33545
Полнота набора, %	97.99	97.99	95.8	99.6	93.1	98.2
Мозаичность, град.	0.211	0.211	0.31	0.287	0.67	0.43
I/ $\sigma$ (I)	11.5	11.5	13.87	17.87	15.54	6.94
R <sub>merge</sub> , %	6.7	6.7	6.5	4.7	8.6	11.8

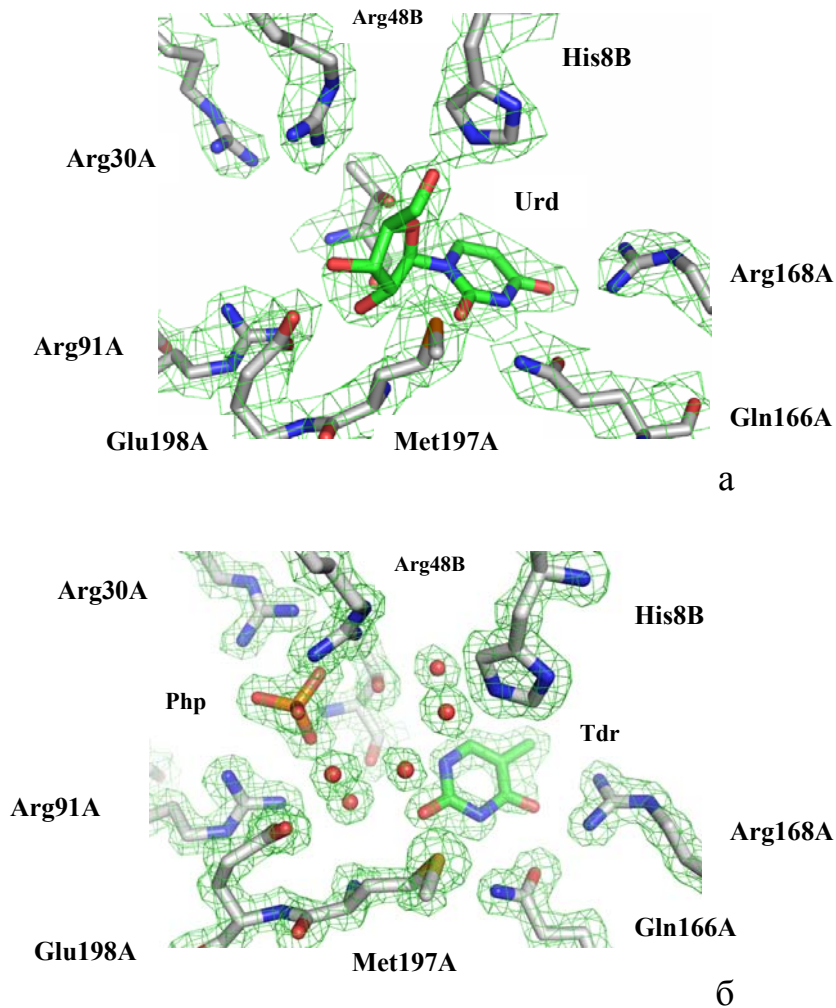
\* Эксперимент по сбору рентгенодифракционных данных проводили на источнике синхротронного излучения (DESY, Гамбург)

**Таблица 2.** Параметры уточнения структур StUPh

Параметры	Наименование объекта (кристалл)					
	Нативный фермент StUPH		Комплекс StUPH с тиминном	Комплекс StUPH с ионом калия	Комплекс StUPH с урацилом	Комплекс StUPH с уридином
Область разрешения, Å	1.76-8.00 (1.760 - 1.807)	8.00-1.90 (1.950-1.900)	15.00-1.72 (1.75-1.72)	8.00-2.15 (2.41-2.15)	26.84-2.49 (2.51-2.49)	21.00-2.90 (2.99-2.90)
Срезка набора, $\sigma( F )$	2	2	0	2	2	0
$V_M$ , (Å <sup>3</sup> /Da)	1.9	1.86	1.7	2.26	2.2	2.29
Количество растворителя, %	39.6	34.02	38.4	45.51	44.7	42.54
Количество атомов аминокислотных остатков	3542	3548	11730	11196	11256	11006
Количество молекул воды	265	175	707	324	218	81
Количество атомов лигандов	0	0	203	3	70	107
$R_{\text{factor}}$ , (%)	16.3(22.5)	20.37 (22.5)	15.5 (16.2)	21.2 (24.8)	22.1 (29.6)	21.2 (26.8)
$R_{\text{free}}$ , (%)	20.7(30.6)	24.69 (30.6)	18.4 (22.4)	24.1 (28.5)	25.4 (34.2)	25.5 (31.9)
Среднее значение температурного фактора (Å <sup>2</sup> ) для атомов:	22.54	33.65	8.46	11.65	25.7	5.87
R.m.s.d.:						
длин связей, Å	0.007	0.009	0.008	0.005	0.006	0.006
валентных углов, град.	1.138	1.223	1.24	0.747	0.976	0.989
Статистика Рамачандрана распределения двугранных углов:						
в наиболее благоприятных областях, %	89.3	89.0	90.2	89.2	88.1	88.9
частично разрешенных областях, %	10.2	10.5	9.3	10.2	11.4	10.6
в разрешенных областях, %	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5
в запрещенных областях, %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Код структуры в PDB	2OXF	2IQ5	2HRD	2OEC		2HWU

Электронная плотность не наблюдалась для первых трех аминокислотных остатков N-конца во всех молекулах исследованных структур уридинфосфорилазы *S. typhimurium* (остатки 1-3 в каждой субъединице молекулы). Эти остатки были исключены из окончательной модели.

После расчета разностных карт электронной плотности (Fo-Fc) для соответствующих комплексов в области активного центра фермента были обнаружены пики электронной плотности, которые были интерпретированы как молекулы: уридина (рис. 2а); урацила и иона фосфата; тимина и иона фосфата (рис. 2б); и ионы калия. Соответствующие молекулы субстратов, продуктов реакции и растворителя вписаны в области пиков электронной плотности.



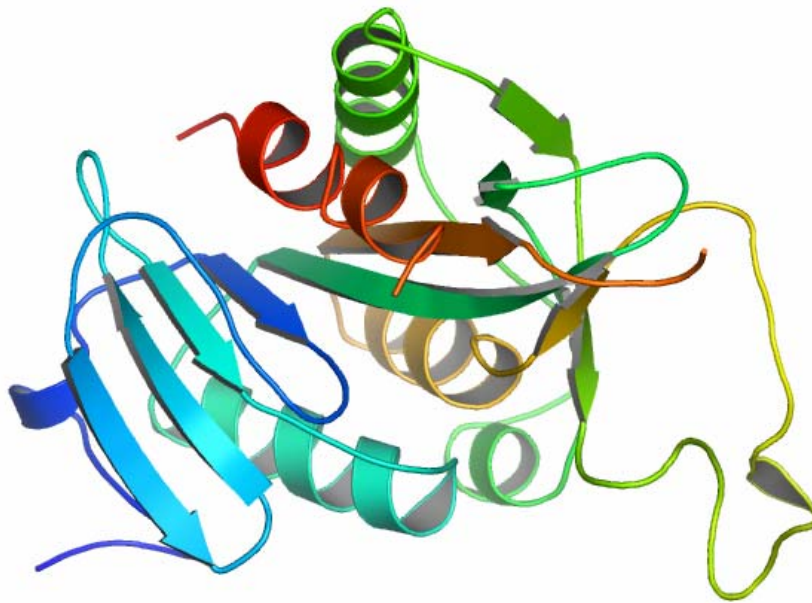
**Рисунок 2.** Область активного центра фермента с вписанными в электронную плотность молекулами лигандов соответствующих комплексов с: (а) уридином (Urd) (ID PDB: 2HWU); (б) тиминем (Tdr) и ионом фосфата (Php) (ID PDB: 2HRD)

Примечание: красными шариками обозначены молекулы воды

### Пространственная организация фермента в свободном и лигандированном состоянии

Третичная структура мономера относится к классу  $\alpha/\beta$ -белков (рис. 3). В центре мономера находится смешанный  $\beta$ -лист, окруженный спиральными участками. Общее содержание спиральных элементов вторичной структуры на мономер составляет 34%, а

$\beta$ -лент – 19%. Внутренняя часть молекулы выстлана преимущественно гидрофобными остатками.



**Рисунок 3.** Пространственная структурная организация мономера StUPh с элементами вторичной структуры молекулы

Из настоящего рентгеноструктурного исследования кристаллов следует, что на асимметричную часть ячейки (табл. 2) приходится один гомодимер (нелигандированный фермент) гексамерной молекулы StUPh, возникающей благодаря кристаллографической оси симметрии третьего порядка, или гексамер (кристаллические комплексы StUPh), имеющий некристаллографическую ось симметрии третьего порядка (рис. 4). Четвертичная структура молекулы StUPh, как в кристаллическом состоянии, так и в растворе (результаты нативного электрофореза) является псевдогексамерным образованием с точечной группой симметрии  $L_33L_2$ , аналогично четвертичной структуре уридинфосфорилазы из *E. coli*. Однако независимой структурно-функциональной единицей молекулы гексамерной молекулы StUPh является именно ее гомодимер.

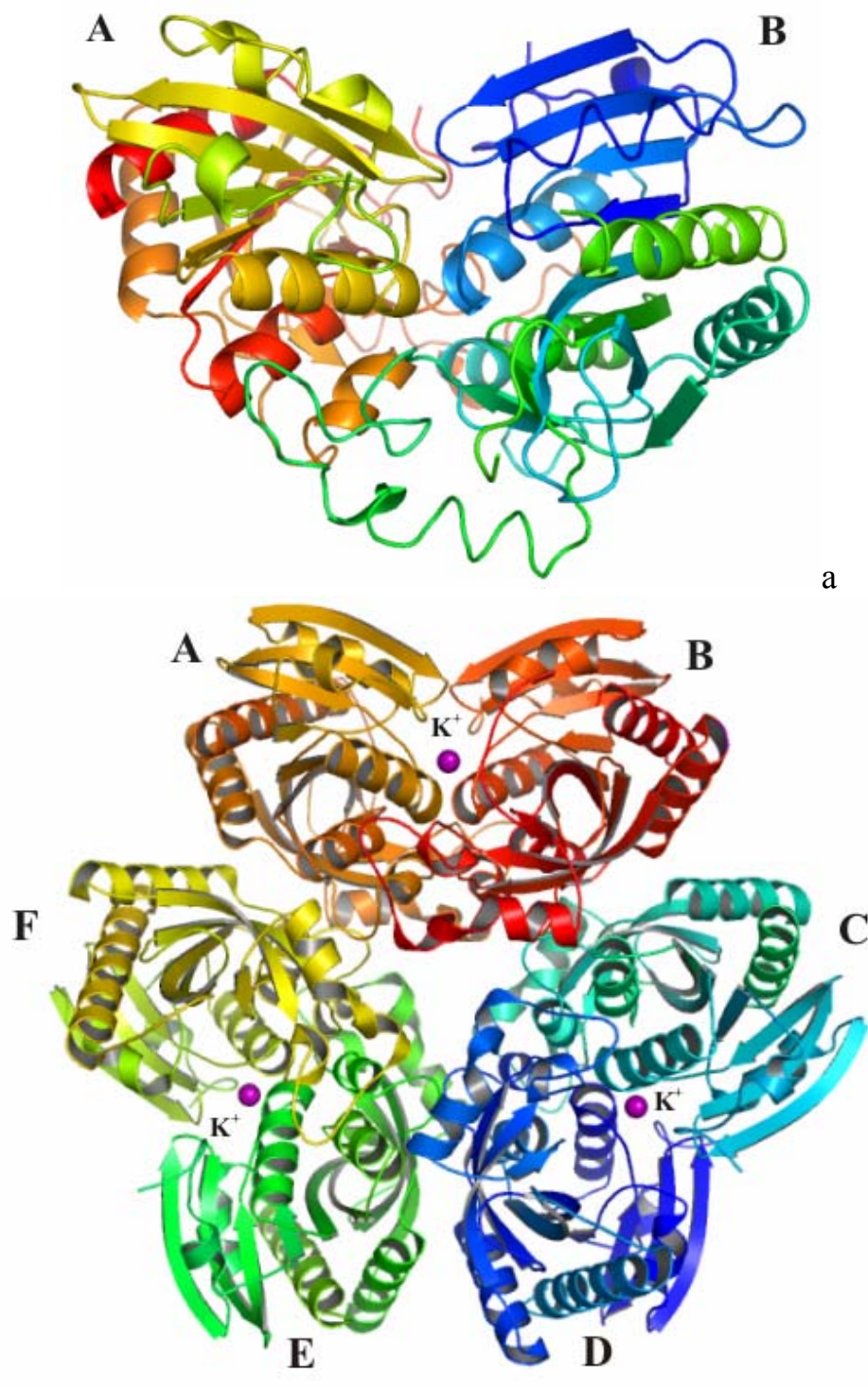
Среднее квадратичное отклонение (**r.m.s.d.**) между атомами основной цепи субъединиц А и В гомодимера составило 0.695 Å, что свидетельствует об идентичности хода основной цепи обоих мономеров. Наибольшее различие приходится, прежде всего, на подвижные участки в области последовательности аминокислотных остатков с 160 по 169 и с 221 по 225.

Значение r.m.s.d. (1.865Å) между атомами боковых цепей субъединиц гомодимера существенно выше, чем для атомов основной цепи, что свидетельствует о большой подвижности атомов боковых групп. Наибольшее отклонение имеют атомы боковых цепей, как в указанных выше участках, так и в аминокислотных остатках Arg30, Lys33, Lys40, Glu49, Arg87, His101, Glu142, Lys145, His240.

Структурно-идентичные гомодимеры стабилизированы, прежде всего, за счет сил гидрофобного взаимодействия и водородных связей, которые практически равномерно распределяются по всей поверхности межсубъединичного контакта.

В каждой из субъединиц гомодимера локализовано по два гидрофобных участка. Так, в А-субъединице одна из гидрофобных областей образована аминокислотными остатками Ile86A, Leu211A, Leu16A, Cys206A, Phe128A, Phe89A, Val42A, Ile63A,

Met205A, Leu203A, Val64A, Trp53A, Cys65A, Leu202A, Val24A, Leu37A, Val31A, Val78A, а вторая, более протяженная гидрофобная область, составлена остатками Leu57A, Leu253A, Leu252A, Val246A, Val245A, Val242A, Cys136A, Leu140A, Ile147A, Val141A, Ile244A, Met215A, Val131A, Val216A, Val109A, Leu108A, Val107A, Val155A, Val219A, Met193A, Val104A, Val192A, Trp187A, Ile228A, Ile220A, Met234A, Tyr195A.

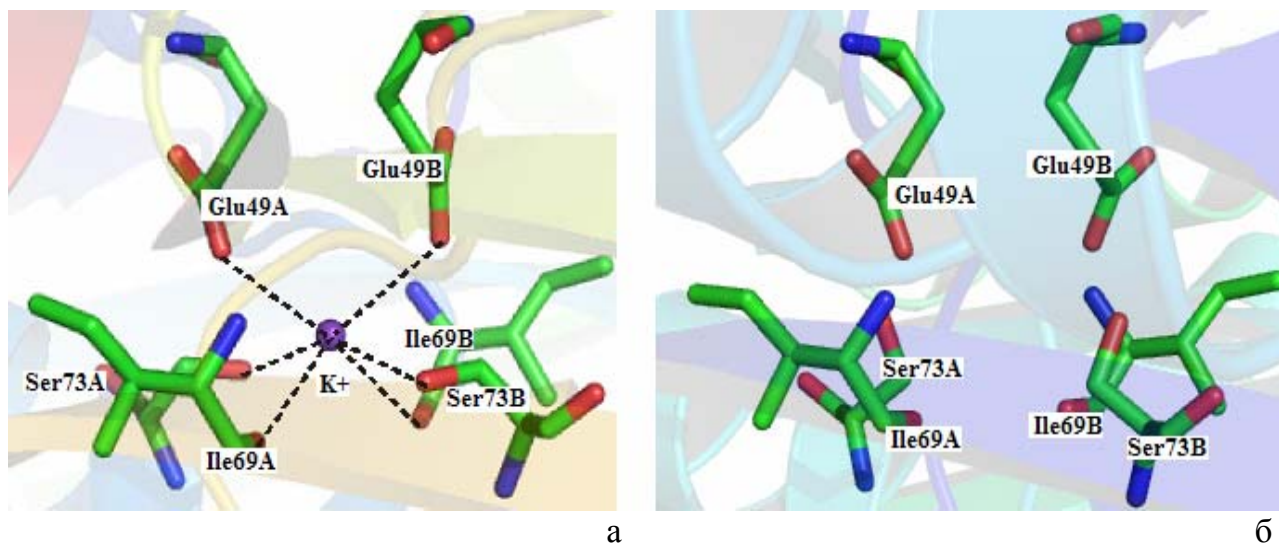


**Рисунок 4.** Пространственная структурная организация с элементами вторичной структуры молекулы: (а) димера (нативная структура фермента, ID PDB: 2OXF); (б) гексамера StUPh (комплекс с ионом калия, ID PDB: 2OEC)

**Влияние ионов калия.** Анализ разностных карт электронной плотности комплекса уридинфосфорилазы с ионом калия позволил локализовать пики электронной плотности



в районе Glu49, Ile69, Ser73, которые были интерпретированы как ионы калия. Координационное окружение иона калия формируется остатками аминокислот из соседних субъединиц гомодимера (рис. 4б). При этом наблюдаются конформационные изменения остатков Glu49 и Ser73, входящих в координационную сферу  $K^+$ , по сравнению со структурой, где ионы калия отсутствуют (рис. 5). Данные структурные изменения аминокислотных остатков, связанные с образованием координационных связей ионов калия, вероятно, способствуют стабилизации гомодимера уридинфосфорилазы.



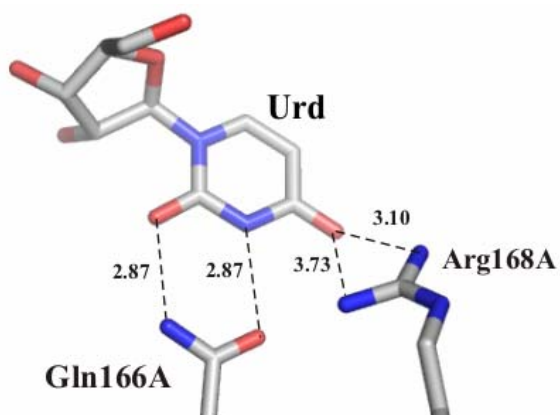
**Рисунок 5.** Конформации аминокислотных остатков в области локализации иона калия при его наличии (а) и отсутствии (б)

### Активный центр фермента StUPh.

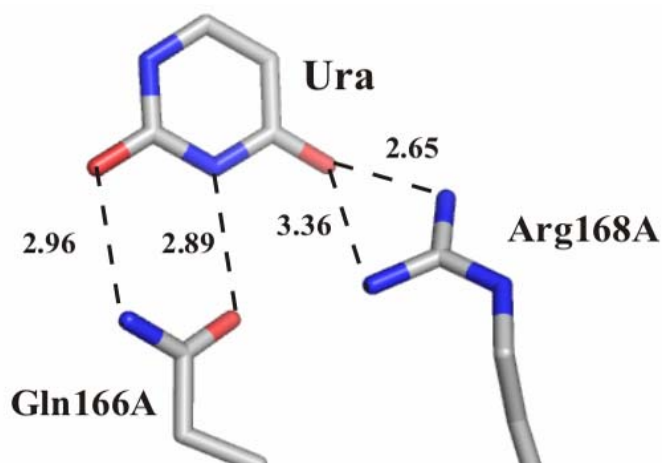
Сравнительный структурный анализ нативного фермента и его комплексов с тиминном и ионом фосфата; урацилом и ионом фосфата; уридином позволил локализовать остатки аминокислот, участвующих в связывании «фермент-субстрат (продукт)», определить нуклеозид- (пиримидин-, рибозо-) и фосфат-связывающие сайты, идентифицировать положение активного центра на поверхности фермента.

**Нуклеозид-связывающий сайт.** Анализ комплексов StUPh с урацилом, уридином и тиминном, позволил локализовать пиримидин-связывающий сайт и идентифицировать аминокислотные остатки, входящие в его состав. Основными остатками во взаимодействии с урацилом являются Phe162A, Gln166A, Arg168A и Arg223A (рис. 2) одной А-субъединицы гомодимера АВ. Данные аминокислотные остатки консервативны для большинства уридинфосфорилаз и играют ключевую роль в узнавании пиримидинового кольца субстрата. Следует отметить, что Phe7 сам не вступает во взаимодействие с субстратом, но его положение определяется наличием (отсутствием) пиримидинового кольца субстрата в активном центре. Молекулы урацила, тимина и пиримидиновая часть уридина образуют водородные связи с атомами боковой цепи Gln166 и Arg168 (рис. 6). Показано, что в случае связывания уридина (урацила) NE2 и OE1 атомы Gln166 формируют водородные связи с N3- и O2-атомами пиримидинового кольца, а NH2 атом Arg168 взаимодействует с O4-атомом уридина (урацила). Однако в случае комплексов StUPh с тиминном NE2 и OE1 атомы Gln 166 формируют водородные связи только с N3-атомом пиримидинового кольца основания. Тем самым структурно показано, что сродство фермента к уридиному (урацилу) выше, чем к тимину. Так как StUPh расщепляет нуклеозиды, производные тимина и урацила, но не

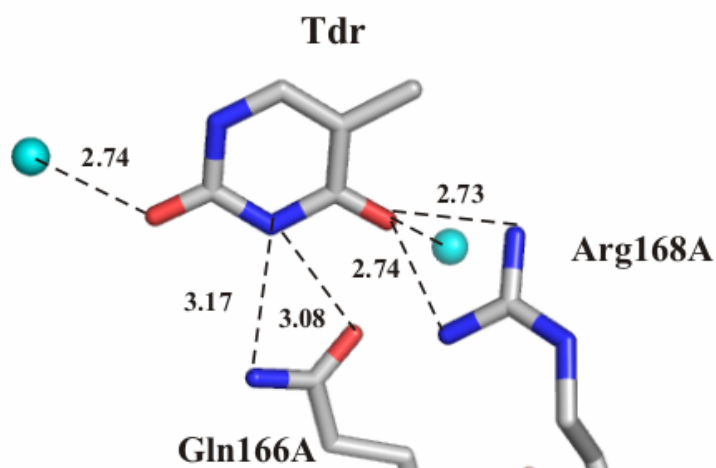
расщепляет производные цитозина, то, следовательно, Gln166 и Arg168 являются ключевыми остатками в узнавании субстрата при прохождении ферментативной реакции.



а



б

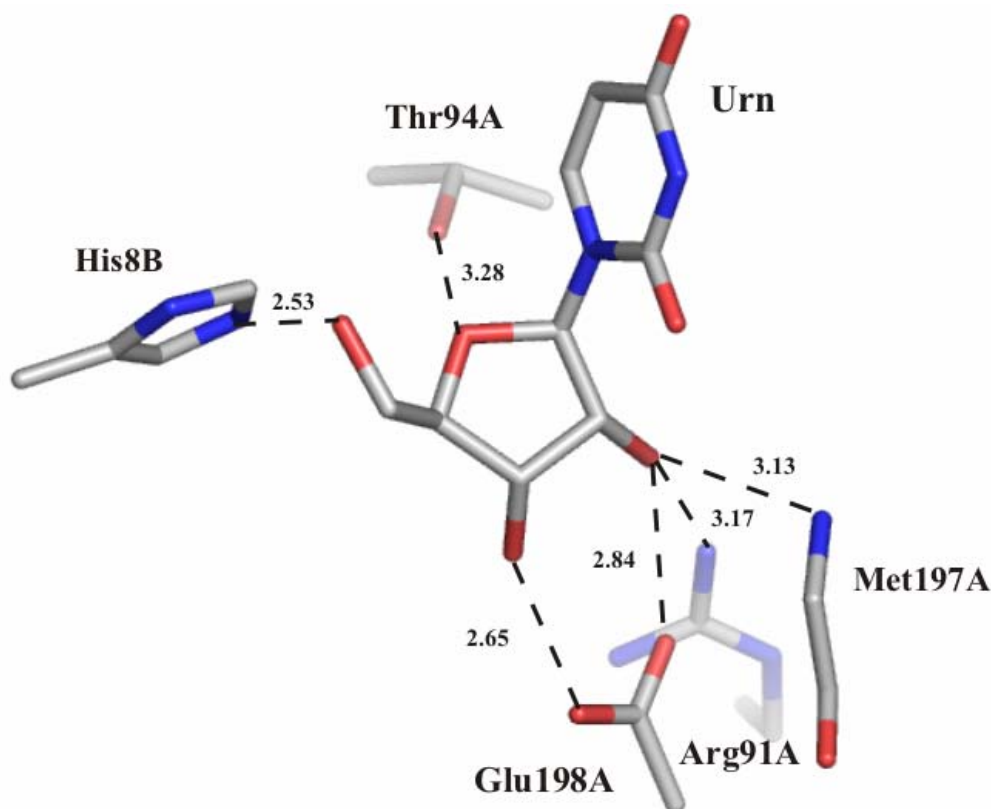


в

**Рисунок 6.** Ключевые аминокислотные остатки урацил-связывающего сайта и связанные с ними молекулы: (а) уридина (Urd) (ID PDB: 2HWU); (б) урацила (Ura); (в) тимина (Tdr) (ID PDB: 2HRD)

Примечание: вероятные водородные связи показаны пунктирными линиями (значение длин связей приведены в Å). Синими шариками обозначены молекулы воды.

Комплекс StUPh с уридином так же позволил локализовать место связывания рибозы (рис. 7). Рибозо-связывающий сайт формируют Arg91A, Thr94A, Met197A, Glu198A А-субъединицы и His8B В-субъединицы гомодимера АВ. С 2'- и 3'-гидроксилами рибозы формируют водородные связи Arg91A, Met197A, Glu198A; с 4'-гидроксилом – Thr94A; с 5'-гидроксилом – His8B. Данные остатки также являются высоко консервативными среди уридинфосфорилаз из различных источников.

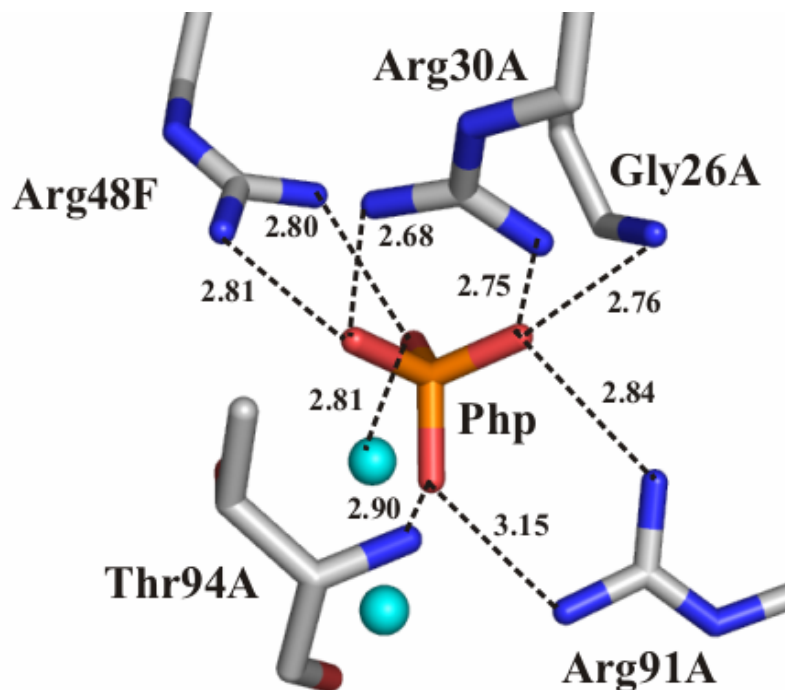


**Рисунок 7.** Ключевые аминокислотные остатки рибозо-связывающего сайта в комплексе StUPh с уридином (Urd) (ID PDB: 2HWU)

Примечание: вероятные водородные связи показаны пунктирными линиями (значение длин связей приведены в Å).

**Фосфат-связывающий сайт.** Комплекс StUPh с тиминном и ионом фосфата позволил локализовать фосфат-связывающий сайт и идентифицировать остатки аминокислот, участвующие в связывании фосфата (рис. 8). Атомы кислорода фосфатного иона образуют водородные связи с Arg30A, Arg91A, Thr94A и Gly26A А-субъединицы и Arg48B В-субъединицы.





**Рисунок 8.** Взаимодействие иона фосфата (Php) с аминокислотными остатками в активном центре StUPh в комплексе с тиминном

Примечание: вероятные водородные связи показаны пунктирными линиями (значение длин связей приведены в Å). Синими шариками обозначены молекулы воды.

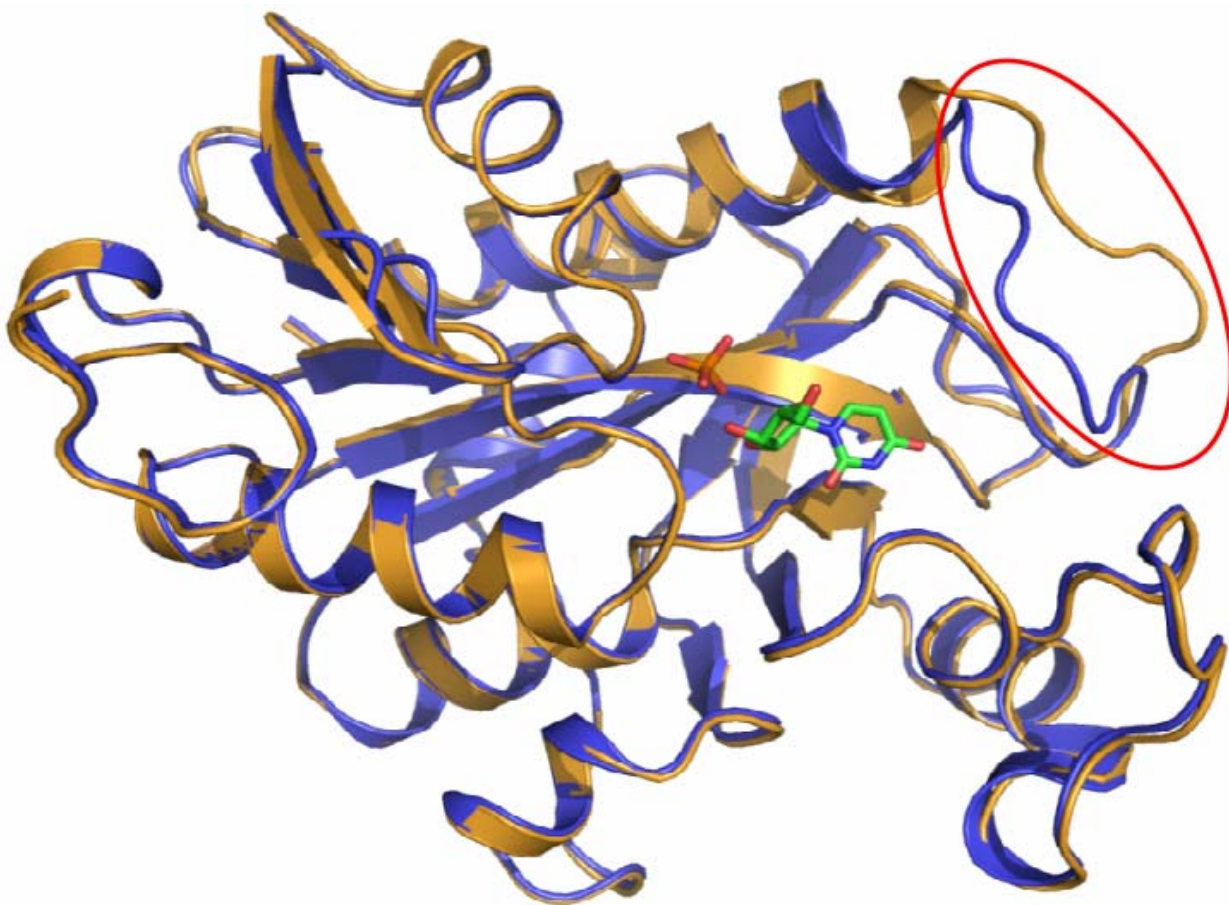
Анализ структур полученных комплексов позволил выявить, что в формировании активного центра принимают участие аминокислотные остатки обеих субъединиц одного гомодимера. Каждый из активных центров включает в себя пиримидин-, рибозо- и фосфат-связывающие сайты. Первый активный центр гомодимера АВ StUPh (А-а.ц.) образован аминокислотными остатками: Gly26А, Arg30А, Arg91А, Thr94А, Gln166А, Arg168А, Met197А, Glu198А, Arg223А А-субъединицы и His8В, Arg48В – В-субъединицы. Второй активный центр (В-а.ц.) – формируют Gly26В, Arg30В, Arg91В, Thr94В, Gln166В, Arg168В, Met197В, Glu198В, Arg223В В-субъединицы и His8А, Arg48А А-субъединицы. Боковые группы остатков аминокислот каждого из активных центров располагаются в области субстратного каньона, находящегося на поверхности фермента.

С точки зрения пространственной структуры А- и В-а. ц. гомодимера достаточно идентичны – r.m.s.d между атомами основной цепи равняется 0.940Å. Следует отметить, что наибольшее различие наблюдается между боковыми группами Arg48А и Arg48В, которые повернуты друг относительно друга приблизительно на 90°, и Arg30А и Arg30В.

Таким образом, на гомодимер гексамерной молекулы StUPh приходится два структурноподобных ферментативных центра, каждый из которых включает в себя пиримидин-, рибозо- и фосфат-связывающие сайты.

Анализ кристаллических структур фермента StUPh, как в свободной, так и в лигандированной формах, позволил локализовать петлю, сформированную аминокислотными остатками 224-234, играющую важную роль при функционировании активного центра и находящуюся или в «открытой», или в «закрытой» конформации. Оказалось, что существенных изменений в позициях аминокислот, взаимодействующих с субстратами, не наблюдается. Основные изменения происходят в окружении

активного центра. Вероятно, данная петля открывает или закрывает доступ растворителя (субстрата) в область активного центра. Показано, что наблюдается статистическое распределение положения петли в нелигандированной *StUPh*, в частности открытая конформация петли была обнаружена в структуре, исследованной с разрешением 1.90Å (ID PDB: 2IQ5), а закрытая – в структуре, исследованной с разрешением 1.76Å (ID PDB: 2OXF). Закрытое положение этой петли фиксируется водородными связями, которые образует Glu227 с Arg168, Tyr169 и Asp170. При открытой конформации петли остаток Glu227 экспонирован в растворитель и взаимодействует с молекулами воды. Наиболее вероятно, что изменение положения петли, формируемой остатками 224-234, индуцируется взаимодействием субстратов и продуктов реакции с аминокислотными остатками активного центра (рис. 9).



**Рисунок 9.** Наложение двух пространственных структур мономеров *StUPh* с открытой и закрытой конформацией петли

Примечание: желтым цветом показана структура фермента с открытой конформацией петли; синим – структура с закрытой конформацией петли. Область петли обведена красным кружком.

Кроме того, было установлено, что присутствие иона калия в структуре фермента стабилизирует открытое положение петли (рис. 10). Вероятно, наличие данного щелочного металла может повышать активность фермента, так как упрощается прохождение молекул субстратов в область активного центра белка, что определяется фиксированным положением петли, имеющей открытую конформацию.

Сравнительный анализ элементов вторичных структур субъединиц нелигандированных ферментов (ID PDB: 2IQ5 и 2OXF) и комплекса StUPh с ионом калия, для которых достаточно надежно идентифицировано открытое и закрытое положение петли на синтезах электронной плотности (1.44  $\sigma$ ), позволил идентифицировать аминокислотные остатки, участвующие в переходе петли из открытого в закрытое положение (рис. 10). В частности, аминокислотные остатки Asn230, Ala231, Glu232 и Thr233 образуют виток спирали при открытой конформации петли, который расплетается и переводит петлю в закрытое положение.

		10	20	30	40	50	60	
1 - 60	*	MSKSDV	FHLGLTKNDLQGAQLAIVPGDPERVEKIAALMDKPKVLASHREFTSWRAELDGK					
	**		T T3333TTT SSS	T3 HHH 33H33ST S	S S T	T T SSSSSTTTT		
	***	T	T TH 33TTT SSS	T3 HHH 33H3TST S	S S T	T T SSSSSTTTT		
		70	80	90	100	110	120	
61 - 120	*	AVIVCSTGIGGPSTSI	AVEELAQLGIRTF	FLRIGTTGAIQPHIN	VGDLVLT	TASVRLDGAS		
	**	SSSS	HHHHHHHHHHHHHNT	SSSSSSSSSS T	TT TTSSSS SSS	33H		
	***	SSSS	HHHHHHHHHHHHHNT	SSSSSSSSSS T	TT TTSSSS SSS	33H		
		130	140	150	160	170	180	
121 - 180	*	LHFAPMEFPAVADFACTTALVEAAKSIGATTHVGV	TASSD	TFYPGQERYD	TYSGR	VVRRF		
	**	333TT T	T HHHHHHHHHHHHNT	SSSS SSSSS	33 TT	T T 3		
	***	333TT T	T HHHHHHHHHHHHNT	SSSS SSSSS	33 TT	T T 3		
		190	200	210	220	230	240	
181 - 240	*	KGSMEEWQAMGVMNYEMESATLLTMCASQGLRAGMVAGVIVNRTQQEIPNAETMKQTESH						
	**	TT HHHHHHHHNT	SSS HHHHHHHHHHNT	SSSSSSSS ST	T	TT HHHHHHHHNT		
	***	TT HHHHHHHHNT	SSS HHHHHHHHHHNT	SSSSSSSS ST	T	TT HHHHHHHHNT		
		250						
241 - 253	*	AVKIVVEAARRLL						
	**	HHHHHHH33H33						
	***	HHHHHHH333333						

**Рисунок 10.** Сравнительный анализ первичной последовательности аминокислотных остатков и элементов вторичной структуры для мономеров молекул нелигандированных ферментов StUPh (ID PDB: 2IQ5 и 2OXF) и комплекса StUPh с ионом калия  
Примечание: (\*) нативная StUPh с открытой конформацией петли (ID PDB: 2IQ5), (\*\*) нативная StUPh с закрытой конформацией петли (ID PDB: 2OXF), (\*\*\*) комплекс с ионом калия с открытой конформацией петли (ID PDB: 2OEC)

### Основные результаты и выводы:

1. Оптимизирована методика получения кристаллов высокого разрешения нелигандированной StUPh в виде димера.

Получены наборы рентгенодифракционных интенсивностей на источнике синхротронного излучения с разрешением 1.76Å.

Решены и уточнены кристаллические структуры нелигандированного фермента с параметрами элементарной ячейки  $a=150.86$  Å,  $c=47.84$  Å,  $\gamma = 120^\circ$ , пр.гр. R3,  $R_{\text{factor}}=16.3\%$ ,  $R_{\text{free}}=20.7\%$ , r.m.s.d. по длинам связей и валентным углам 0.007Å и  $1.138^\circ$  соответственно (открытая конформация петли активного центра) и параметрами  $a=151.66$  Å,  $c=47.92$ Å, пр.гр. R3,  $R_{\text{factor}}=20.37\%$ ,  $R_{\text{free}}=24.69\%$ , r.m.s.d. по длинам связей и валентным углам 0.009Å и  $1.223^\circ$  соответственно (закрытая конформация петли).

2. Исходя из разработанных условий кристаллизации нативного фермента, были оптимизированы условия получения комплексов StUPh с: ионом калия; уридином; урацилом и ионом фосфата; тиминном и ионом фосфата.

С выращенных кристаллов комплексов получены наборы рентгенодифракционных интенсивностей на источнике синхротронного излучения с разрешениями: 1.70Å (комплекс с тиминном и ионом фосфата); 2.15Å (комплекс с ионом калия), 2.49Å (комплекс с урацилом и ионом фосфата), 2.90Å (комплекс с уридином).

Решены и уточнены структуры комплексов StUPh с субстратами и продуктами реакции. Параметры для комплекса с урацилом:  $a=89.00$  Å,  $b=124.26$  Å,  $c=133.96$ Å, пр.гр. P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>,  $R_{\text{factor}}=22.1\%$ ,  $R_{\text{free}}=25.4\%$ , r.m.s.d. по длинам связей и валентным углам 0.006Å и  $0.976^\circ$  соответственно; для комплекса с тиминном:  $a=88.79$  Å,  $b=124.07$  Å,  $c=134.11$ Å, пр.гр. P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>,  $R_{\text{factor}}=15.5\%$ ,  $R_{\text{free}}=18.4\%$ , r.m.s.d. по длинам связей и валентным углам 0.008Å и  $1.24^\circ$  соответственно; для комплекса с ионом калия:  $a=88.52$  Å,  $b=123.98$  Å,  $c=133.52$ Å, пр.гр. P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>,  $R_{\text{factor}}=21.2\%$ ,  $R_{\text{free}}=24.1\%$ , r.m.s.d. по длинам связей и валентным углам 0.005Å и  $0.747^\circ$  соответственно; для комплекса с уридином:  $a=88.88$  Å,  $b=123.99$  Å,  $c=134.16$ Å, пр.гр. P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>,  $R_{\text{factor}}=21.2\%$ ,  $R_{\text{free}}=25.5\%$ , r.m.s.d. по длинам связей и валентным углам 0.006Å и  $0.989^\circ$  соответственно.

3. На основании анализа уточнённых структур комплексов StUPh с лигандами:

- установлены аминокислотные остатки пиримидин-, рибоза- и фосфат-связывающих сайтов;
- показано, что на гомодимер приходится два асинхронно работающих активных центра фермента, каждый из которых формируется аминокислотными остатками обеих субъединиц гомодимера.

4. Анализ пространственной организации ферментативного центра StUPh показал, что аминокислотные остатки с 222 по 230(233) включительно образуют петлю, регулирующую доступ субстрата к сайтам связывания энзима. В двух своих крайних положениях петля находится в «открытой» конформации (составлена а.о. с 222 по 230) или «закрытой» (составлена а.о. с 222 по 233).

Впервые показано, что для свободного фермента возможна, как «открытая», так и «закрытая» конформация петли.

Впервые показано, что присутствие ионов калия стабилизирует положение петли в открытой конформации, что может привести к увеличению скорости ферментативной реакции.

5. Сравнительный анализ нуклеозид- (пиримидин-, рибозо-) связывающего сайта комплексов StUPh с уридином, урацилом и тиминном показал, что сродство фермента к урдину (урацилу) выше, чем к тимину. Кроме того, можно предположить, что разница в скорости биохимической реакции расщепления ферментом нуклеозидов производных



пиримидина связана не только с особенностью строения фермента, а также определяется природой, индуктивными и мезомерными эффектами заместителей нуклеозида.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Б.Ф. Павлюк, В.И. Тимофеев, М.В. Донцова, А.А. Лашков, А.Г. Габдулхаков, А.М. Михайлов “*Структурная организация молекулы фермента уридинфосфорилазы из *S. Typhimurium* в свободном состоянии с разрешением 1.90 Å*” // «IV Съезд общества биотехнологов России им Ю. А. Овчинникова». С. 192-193, 2006.
- 2) В.И. Тимофеев, Б.Ф. Павлюк, А.А. Лашков, Т.А. Серегина, А.Г. Габдулхаков, Б.К.Вайнштейн, А.М.Михайлов “*Строение гомодимера молекулы уридинфосфорилазы *salmonella typhimurium* в нативном состоянии при разрешении 1.9 Å*” // Кристаллография, 2007, том 52, №6, с. 1117-1124.
- 3) Vladimir I. Timofeev, Alexandr A. Lashkov, Bogdan Ph. Pavlyuk, Tat'yana A. Seregina, Galina S. Kachalova, Christian Betzel, Azat G. Gabdoulkhakov, Nadezhda E. Zhukhlistova and Al'bert M. Mikhailov “*Crystallization and preliminary X-ray structure of the Salmonella typhimurium uridine phosphorylase with 2,2'-anhydrouridine and potassium ion*” // Acta Crystallographica., Section F, 2007, F63, Part 10, pp 852-854.
- 4) Т.А. Серегина, Б.Ф. Павлюк, В.И. Тимофеев, А.В. Ляшенко, Н.Е. Жухлистова, А.М. Михайлов “*Кристаллизация уридинфосфорилазы из *salmonella typhimurium* в наземных условиях, микро- и макро- гравитации*” // «Российский симпозиум «Космическое материаловедение – 2007». С. 65, 2007.
- 5) Михайлов А.М., Лашков А.А., Тимофеев В.И., Павлюк Б.Ф., Корнилов В.В. “*Атомная структура комплекса уридинфосфорилазы *Salmonella typhimurium* с фосфат-ионом и 2,2'-ангидроуридином*” // «III Российский симпозиум «Белки и пептиды»», Пушкино – 2007, Тезисы докладов, С.26, 2007.

### СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vaguine, A.A., J. Richelle, and S.J. Wodak, SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. Acta Crystallographica Section D, 1999. 55(1): p. 191-205.
2. Laskowski, R.A., et al., PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography, 1993. 26(2): p. 283-291.
3. Kabsch, W., *Integration, scaling, space-group assignment and post refinement. XDS.*, in *International Tables for Crystallography*, M.G. Rossmann and E.F. Arnold, Editors. 2001, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
4. Dontsova M.V., Gabdoulkhakov A.G., Molchan O.K. et al. Preliminary investigation of the three-dimensional structure of *Salmonella Typhimurium* uridine phosphorylase in the crystalline state. Acta Cryst. F. 2005. V.61. P.337-40.