

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И
ФОТОНИКА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ИНСТИТУТ КРИСТАЛЛОГРАФИИ ИМ. А.В. ШУБНИКОВА РАН

На правах рукописи.

Прокофьев Игорь Игоревич

**СЕЛЕКТИВНОСТЬ ПИРИМИДИНФОСФОРИЛАЗЫ ХОЛЕРНОГО
ВИБРИОНА К ПРИРОДНЫМ НУКЛЕОЗИДАМ И КСЕНОБИОТИКАМ ПО
РЕЗУЛЬТАТАМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА И
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
КОМПЛЕКСОВ**

Специальность 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук, доцент

Михайлов Альберт Михайлович

Москва 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1 Общие сведения об пиримидинфосфорилазах	13
1.2 История открытия нуклеозидфосфорилазы	14
1.3 Два семейства нуклеозидфосфорилаз.....	15
1.4 Роль уридинфосфорилазы в биологии и медицине.....	17
1.4.1 Экспрессия уридинфосфорилазы в опухолевых клетках. Участие уридинфосфорилазы в метаболизме 5-фторурацила.....	17
1.4.2 УФ в качестве прогностического фактора при раке молочной железы.....	20
1.4.3 Защитное действие уридина при ишемии нервной ткани.....	20
1.4.4 Связь между пиримидиновым метаболизмом и накоплением жиров в печени.....	21
1.4.5 Окислительно-восстановительная чувствительность УФ.....	22
1.4.6 Ингибиторы уридинфосфорилазы как перспективные антимикробные и антипаразитарные препараты	24
1.5 Биохимическая характеристика уридинфосфорилаз.	25
1.5.1 Общая биохимическая характеристика.....	25
1.5.2 Специфичность уридинфосфорилазы по результатам химической кинетики	27
1.6 Структура уридинфосфорилазы.....	32
1.6.1 Общее описание структуры.....	32
1.6.2 Описание сайта связывания уридинфосфорилазы.....	38
1.6.2.1 Урацил связывающий сайт.	39
1.6.2.2 Рибозо-связывающий сайт.....	39
1.6.2.3 Фосфат-связывающий сайт.....	40
1.7 Структурный аспект субстратной специфичности уридинфосфорилаз	40
1.8 Постановка задачи	45
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46
2.1 Клонирование, экспрессия гена и выделение и очистка <i>VchUPh</i>	46
2.2 Кристаллизация комплексов <i>VchUPh</i>	49
2.3 Сбор и обработка рентгенодифракционных данных.	53
2.4 Решение и уточнение пространственных структур.	56
2.5 Расчет частичных электрических зарядов атомов.....	62
2.6 Расчет энергии конформаций субстратов в комплексе с <i>VchUPh</i> и в водном растворе.	63
2.7 Молекулярный докинг, оптимизация геометрии и оценка энергии связывания.	65
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	68

3.1	Кристаллическая упаковка молекул	68
3.2	Описание структурной организации <i>VchUPh</i>	72
3.2.1	Четвертичная структура молекулы фермента <i>VchUPh</i>	72
3.2.2	Третичная, вторичная и первичная структуры молекулы комплексов <i>VchUPh</i>	76
3.2.3	Ион Na ⁺	77
3.2.4	Сайты связывания <i>VchUPh</i>	79
3.3	Конформационные изменения структуры <i>VchUPh</i> при связывании с лигандом.....	80
3.3.1	Петля-шлагбаум в структурах комплексов <i>VchUPh</i>	80
3.3.2	Петля L11 молекулы <i>VchUPh</i> в нелигандированном состоянии.....	81
3.3.3	Конформация петли L11 <i>VchUPh</i> при наличии субстратов прямой/обратной реакций в активном сайте энзима.....	82
3.3.4	Фосфат-связывающий сайт. Влияние фосфат-аниона на конформацию аминокислотных остатков сайта связывания.....	85
3.3.5	Состояние активного центра и конформация петли L11 в случае связывания фосфат-аниона.....	88
3.3.6	Влияние кристаллической упаковки на конформацию петли L11.....	90
3.3.7	Двойные положения β-стрендов S5, S8 и петли L5	92
3.4	Структурные аспекты специфичности <i>VchUPh</i> к субстратам прямой реакции	100
3.4.1	Нуклеозид-связывающий сайт в структуре комплекса <i>VchUPh</i> с уридином.....	100
3.4.2	Нуклеозид-связывающий сайт в структуре комплекса <i>VchUPh</i> с тимидином	102
3.4.3	Механизмы узнавания нуклеозидов молекулой <i>VchUPh</i> и разрыва β-N1-гликозидной связи в молекулах субстратов прямой реакции.....	103
3.4.4	Структурный аспект влияния 2-гидроксигруппы рибозной компоненты нуклеозидов на скорость ферментативной реакции.....	105
3.4.5	Структурный и квантовохимический аспекты влияния 5-метилгруппы пиримидиновой компоненты нуклеозидов на скорость ферментативной реакции.....	107
3.5	Структурные и квантово-химические аспекты специфичности <i>VchUPh</i> к субстратам обратной реакции	109
3.5.1	Урацил-связывающий сайт в структуре комплекса <i>VchUPh</i> с урацилом.....	109
3.5.2	Урацил-связывающий сайт в структуре комплекса <i>VchUPh</i> с тимидином	110
3.5.3	Структурный и квантово-химический аспекты влияния 5-метилгруппы азотистых оснований на скорость обратной ферментативной реакции.....	111
3.5.4	Влияние химического строения и конформации фуранозного компонента второго субстрата на скорость обратной ферментативной реакции.....	115
3.5.5	Дополнительные аспекты влияния 5-метилгруппы пиримидиновой компоненты нуклеозидов на напряжение β-N1-гликозидной ковалентной связи.....	116
3.6	Структурные и квантово-химические аспекты специфичности <i>VchUPh</i> к псевдосубстратам	118

3.6.1	Урацил-связывающий сайт в структуре комплекса <i>VchUPh</i> с 6-метилурацилом .	118
3.6.2	Структурный аспект влияния 6-метилгруппы азотистых оснований на возможность прохождения обратной ферментативной реакции.....	119
3.6.3	Урацил-связывающий сайт в структуре комплекса <i>VchUPh</i> с цитозином.	121
3.6.4	Влияние 4-аминогруппы азотистых оснований на скорость обратной ферментативной реакции	122
3.6.5	Структурный и квантово-химический аспекты влияния атома фтора 5-фторурацила на скорость обратной ферментативной реакции.	113
ВЫВОДЫ		127
Благодарности		130
Список литературы		131

Список сокращений

5ФУ – 5-фторурацил

6МУ – 6-метилурацил

СТН - цитидин

СУТ - цитозин

DESY - Deutsches Elektronen-Synchrotron – немецкий электронный синхротрон

DHODH дигидрооротатдегидрогеназы

EcUPh – уридинфосфорилаза из *Escherichia coli*

hUP – уридинфосфорилаза человека

K_M - константа Михаэлиса

IC50 - концентрация полумаксимального ингибирования

NAD⁺ - nicotinamide adenine dinucleotide; никотинамидадениндинуклеотид

NADH-nicotinamideadeninedinukleotidehidride;

никотинамидадениндинуклеотидгидрат

PDB – Protein Data Bank – банк данных белковых структур

PRCG Polak-Ribiere Conjugate Gradient; метод сопряженных градиентов

R1P – рибозо-1-фосфат

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – гель-электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

SoUPh - уридинфосфорилаза из *Shewanella oneidensis*

SpUPh - уридинфосфорилаза из *Streptococcus pyogenes*

StUPh – уридинфосфорилаза из *Salmonella typhimurium*

TDR - тимин

ТНМ - тимидин

UP – уридинфосфорилаза

UPh - уридинфосфорилаза

URA - урацил

URI – уридин

VchUPh - уридинфосфорилаза из *Vibrio cholerae*

ХР – extra precision; повышенная точность
YptUPh - уридинфосфорилаза из *Yersinia pseudotuberculosis*
а.о. – аминокислотные остатки
АТФ - аденозинтрифосфат
БАУ - 5-бензолациклоуридин
ВАК - Высшая аттестационная комиссия
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДПД - дигидропиримидин
ДФУ - дегидрофторурацил
КФ – классификация ферментов
МД – молекулярная динамика
ОФРТ - оротатфосфорибозилтрансфераза
ПНФ - пурипнуклеозидфосфорилазой
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭГ – полиэтилен гликоль
ПЭГ полиэтиленгликоль
РНК - Рибонуклеиновые кислоты
РР - рибонуклеотид редуктаза
ТРИС - трис(гидроксиметил)аминометан
ТС - тимидилатсинтаза
ТФ - тимидинфосфорилаза
УК - уридин киназа
УФ - уридинфосфорилаза
ФДУДФ - фтордезоксиуридиндифосфат
ФДУМФ - фтордезоксиуридинмонофосфат
ФДУР - фтордезоксиуридин
ФДУТФ фтордезоксиуридинтрифосфа
ФУДФ - фторуридиндифосфата
ФУМФ - фторуридинмонофосфат

ФУР - фторуридин

ФУТФ - фторуридинтрифосфат

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Уридинфосфорилаза (UPh, КФ 2.4.2.3) [1-4] осуществляет обратимую реакцию фосфоролитического расщепления до азотистых оснований как уридина, так и с меньшей эффективностью тимидина [5]. В клетках многих видов опухолей человека и в возбудителях инфекций, при развитии заболевания, увеличивается потребность в азотистых пиримидиновых основаниях, что повышает уровень экспрессии уридинфосфорилазы [6-10] и её важность в метаболических процессах.

Уридинфосфорилаза и её лиганды, в частности субстраты и ингибиторы, востребованы в фармации и биотехнологии и их рациональное использование требует знания структурной основы субстратной специфичности энзима-мишени. Следует отметить, что уридинфосфорилазы из различных источников высоко консервативны по трёхмерной структуре сайтов связывания.

Уридинфосфорилазы человека (*hUP1* и *hUP2*) [11-15] участвуют в активации противоопухолевых препаратов, например пролекарства 5-фторурацила – капецитабина [16]. При наличии базы структурно-химических характеристик фермента сконструированные пролекарства будут избирательно активироваться *hUPP1* и *hUPP2* именно в клетках опухолей, оказывая минимальные побочные эффекты на соседние здоровые клетки [16]. Субстратную специфичность уридинфосфорилаз необходимо учитывать и при разработке антибактериальных и антипаразитарных лекарственных препаратов нуклеозидной природы, метаболизирующихся уридинфосфорилазами [17-19].

Следует отметить, что, в то время как химическая специфичность уридинфосфорилаз интенсивно исследуется, то структурному аспекту субстратной специфичности уделяется недостаточно внимания. Изучения структурных основ субстратной специфичности уридинфосфорилаз необходимо для её генно-инженерной модификации при использовании в промышленном ферментативном

синтезе биологически активных нуклеозидов (например арабинофуранозилнуклеозидов) [20]. Несмотря на показанную выше востребованность изучения структурных основ субстратной специфичности уридинфосфорилаз, систематического исследования структур комплексов энзима с субстратами прямой и обратной реакции при атомном разрешении проведено не было. В литературе имеются разрозненные описания некоторых комплексов бактериальных уридинфосфорилаз с субстратами прямой и обратной реакции, решенных при порой недостаточно высоком разрешении [5, 21, 22].

Цель и задачи работы.

Цель данной работы – это установление структурных особенностей специфичности уридинфосфорилазы из патогенной бактерии *Vibrio cholerae* (*VchUPh*) к лигандам методами рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования.

Для достижения поставленных целей решались следующие **задачи**:

1. Кристаллизация комплексов *VchUPh* с лигандами.
2. Определение структур комплексов *VchUPh* атомного разрешения с лигандами методом рентгеноструктурного анализа биомакромолекул.
3. Исследование структурной составляющей специфичности *VchUPh* на основании данных рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования.

Научная новизна:

1. Впервые выращены кристаллы уридинфосфорилазы из патогенной бактерии *Vibrio cholerae* в комплексах с субстратами прямой реакции: фосфат-анионом, уридином, тимидином; обратной реакции: урацилом, тиминном; и псевдосубстратами: цитозином и 6-метилурацилом. Решена и уточнена пространственная структура этих комплексов.
2. Впервые продемонстрировано, что взаимодействие фосфат-аниона с ферментом фиксирует функционально-значимую петлю L11 молекулы энзима

VchUPh в закрытой конформации, перекрывая доступ нуклеозидов в энзиматический сайт, в то время как нахождение молекулы субстрата в нуклеозид связывающем сайте является необходимым, но недостаточным условием закрытия петли L11 и подготовки фермента к акту катализа.

3. Впервые показано, что образование сети водородных связей 2'-гидоксигруппой уридина с атомами аминокислотных остатков активного центра уридинфосфорилаз приводит к изменению конформации рибозной компоненты уридина в сравнении с тимидином на более высокоэнергитическую и, как следствие, – более реакционноспособную. Помимо этого, наличие 5-метильной группы у молекулы тимидина приводит к увеличению разности частичных зарядов атомов, формирующих β -N1-гликозидную связь нуклеозида, что в свою очередь способствует ее стабилизации.

4. Впервые продемонстрировано, что большая избирательность уридинфосфорилаз в отношении рибозо-1-фосфата в сравнении с 2-дезоксирибозо-1-фосфатом обусловлена образованием дополнительных водородных связей фермента с 2-гидроксигруппой лиганда и росту энергии конформации рибозо-1-фосфата.

5. Впервые исследован структурный аспект селективности природных бактериальных уридинфосфорилаз в случае, если нуклеозид имеет метильную группу в 6-ом положении пиримидинового кольца, на примере 6-метилурацила. Отталкивание гидрофобной метильной группой 6-метилурацила гидрофильной гидроксигруппы а.о. Thr93 активного центра, приводит к тому, что рибозная компонента и фосфатная группа рибозо-1-фосфата, не образуют с Thr93 водородные связи, необходимые для проведения ферментативной реакции.

6. Впервые показано, что образование стабильного комплекса *VchUPh* с цитозином возможно только с его таутомерной формой - 4-амино-пиримидин-2(3H)-дионом. В таком таутомере цитозина у атома азота N1 пиримидинового кольца отсутствует протон, необходимый для проведения ферментативной реакции.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты проведенного исследования имеют фундаментальное значение и вносят существенный вклад в понимание структурных особенностей функционирования уридинфосфорилаз. Необходимость знаний о влиянии различных групп фуранозной и пиримидиновой компонент лиганда обусловлена потребностью создания новых лекарственных препаратов.

Практическая значимость работы заключается в установлении влияния модификаций 2'-гидроксильной группы фуранозной компоненты, 6-, 5-метильных групп и 4-гидроксогруппы пиримидиновой компоненты лигандов на специфичность биологически-активных средств, в том числе ингибиторов и пролекарств, к уридинфосфорилазам. Перспективным является применение ингибиторов уридинфосфорилаз для лечения онкологических и некоторых инфекционных заболеваний, вызванными бактериями и простейшими организмами. Кроме того, уридинфосфорилаза становится многообещающим биотехнологически значимым ферментом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Условия кристаллизации комплексов уридинфосфорилазы из патогенной бактерии *Vibrio cholerae* с фосфат-анионом, уридином, урацилом, тимидином, тиминном, цитозином и 6-метиурацилом, в которых выращивались высокосоввершенные кристаллы.

2. Пространственные структуры атомного разрешения уридинфосфорилазы из патогенной бактерии *Vibrio cholerae* в комплексах с фосфат-анионом, уридином, урацилом, тимидином, тиминном, цитозином и 6-метилурацилом на основании результатов рентгеноструктурного анализа.

3. Структурные основы, приводящие к конформационным изменениям третичной структуры фермента при связывании как с нуклеозидом, так и с фосфат-анионом.

4. Объяснение отсутствия ферментативной активности уридинфосфорилазы по отношению к 6-метилурацилу и цитозину.

5. Структурные основы, обуславливающие большую скорость реакции уридинфосфорилазы с уридином, урацилом или рибозо-1-фосфатом в сравнении с тимидином, тиминном или 2-дезоксирибозо-1-фосфатом соответственно.

Публикации и апробация результатов.

Основные результаты работы неоднократно докладывались на международных и национальных конференциях. По материалам диссертационной работы опубликовано 14 печатных работ, из которых 4 статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК. Координаты атомов пространственных структур 15 макромолекулярных соединений по теме диссертации и соответствующие им наборы экспериментальных модулей структурных факторов депонированы в международный банк белковых структур (PDB) (<http://www.rcsb.org/>).

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Общие сведения об пиримидинфосфорилазах

Участие нуклеотидов и их предшественников в биологических процессах является определяющим фактором нормального функционирования любого организма. Таким процессом, в частности, является реакция фосфоролиза молекул нуклеозидов пиримидинового ряда. Она заключается в расщеплении фосфат-анионом N-гликозидной связи нуклеозида в присутствии фермента и последующим ковалентном соединении сахара с фосфатной группой. При этом образуется свободное гетероциклическое основание и α -D-рибозо- или α -D-2'-дезоксирибозо-1-фосфат. Эта реакция значительно более выгодна энергетически, чем второй из возможных вариантов - синтез нуклеозидов *de novo*, при котором используются аминокислоты и низкомолекулярные предшественники нуклеозидов. Ферменты, отвечающие за биосинтез пиримидинов, играют ключевую роль в клеточном метаболизме, т.к. пиримидины и их производные являются компонентами многих важных биомолекул, таких как РНК и ДНК [23].

Одними из ферментов нуклеинового обмена являются нуклеозидфосфорилазы, в частности уридинфосфорилаза (УФ). УФ повсеместно распространена в различных организмах, включая прокариоты, дрожжи и высшие организмы [8]. Отметим также, что различия в первичной структуре всех исследованных нуклеозидфосфорилаз сравнительно невелики [24]. Уридинфосфорилаза является центральным ферментом, катализирующим обратимую реакцию фосфоролиза уридина до рибозо-1-фосфата и урацила [1, 2]. Основным физиологическим субстратом уридинфосфорилазы в прямой реакции фосфоролитического расщепления является уридин, а в обратной – урацил (см. рис. 1). Уридинфосфорилаза также способна взаимодействовать с 2'-дезоксипиримидиновыми нуклеозидами, такими как тимидин (в обратной реакции - тимин) [25-27]. Таким образом, катализируя фосфоролиз пиримидиновых

оснований, уридинфосфорилаза снабжает клетку предшественниками нуклеотидов.

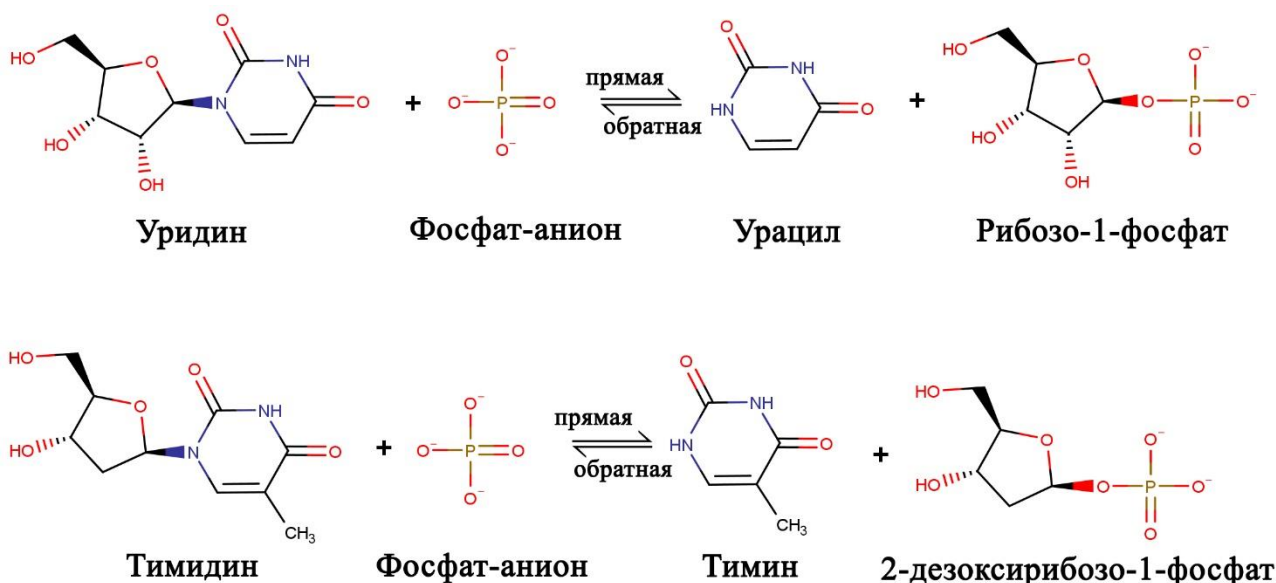


Рисунок 1. Реакции фосфоролитического расщепления субстратов уридинфосфорилазы.

1.2 История открытия нуклеозидфосфорилазы

Р. А. Levene. и F. Medigresanu в 1911 г. впервые обнаружили фермент в плазме крови собаки, который ответственен за расщепление гликозидной связи в пиримидинах и пуринах с последующем образованием рибозы и циклического основания [28, 29]. Исследованный белок был назван «нуклеазой». В дальнейшем те же авторы в 1924 г. опубликовали методы выделения этих ферментов из различных органов собаки [30]. Позже было отмечено, что существует два типа ферментов, осуществляющих расщепление гликозидной связи, один специфичен для пуринов, другой - для пиримидинов [31, 32].

Kalckar в 1945 г. опубликовал результаты экспериментов, согласно которым вторым продуктом реакции помимо гетероциклического основания является рибозо-1-фосфат, а не чистая рибоза (как считалось ранее). Помимо этого, он доказал, что выделенный фермент является пуриннуклеозидфосфорилазой (ПНФ)

и фосфоролитически гидролизует пуриновые нуклеозиды, вследствие атаки фосфат-аниона на атом углерода рибозной компоненты нуклеозидного лиганда. До этого исследования полагали, что гликозидное расщепление является результатом гидролиза [33]. В дальнейшем Kalckar показал, что реакция фосфоролита является обратимой [34]. Кроме того, он выдвинул гипотезу, что ферментативные реакции, катализируемые пиримидинфосфорилазами проходят аналогичным образом. В 1954 г. эта гипотеза была подтверждена в работах по исследованию пиримидинфосфорилазы из печени лошади [35, 36]. В исследовании было выявлено, что происходит фосфоролит только тимидина, а уридина - нет. Таким образом, было сделано предположение о том, что существует две пиримидинфосфорилазы, специфичных по отношению только к уридину или только тимидину. Позже этот факт был подтверждён при исследовании бактериальной пиримидинфосфорилазы, которая расщепляла исключительно уридин [37].

В дальнейшем, Laster и Blair [38] показали, что уридинфосфорилаза из тканей млекопитающих не различает рибозную компоненту уридина от тимидина, однако тимидинфосфорилаза специфична для 2'-дезоксирибозной части тимидина. Еще позже Krenitsky с соавторами [39] описали свойства пиримидиновых нуклеозидфосфорилаз из большого количества прокариот и эукариот. Они показали, что специфичность ферментов по отношению к рибозной компоненте и атому в пятой позиции пиримидинового кольца варьируется у различных видов.

1.3 Два семейства нуклеозидфосфорилаз

Нуклеозидфосфорилазы подразделяются на два семейства NP-1 и NP-2. Структура субъединиц нуклеозидфосфорилазы семейства NP-2 состоит из двух доменов – α -домен и больший размером по сравнению с ним α/β домен. Максимальное отдаление одного домена от другого порядка 10 Å. При этом активный центр в нелигандированном состоянии разделен пространственно на две

части: одна часть находится в одном домене и связывает нуклеозид, а другая – в другом и связывает фосфат-аинон [40]. Для осуществления реакции катализа домены перемещаются вместе с субстратами, сближая сайты связывания фосфат-аинона и нуклеозида [41]. Четвертичной структурой ферментов нуклеозидфосфорилаз семейства NP-2 является димер. У млекопитающих эти ферменты специфичны к тимидину, в то же время у низших организмов наблюдается более широкая специфичность – к тимидину и уридину [42, 43].

К NP-1 семейству относятся ферменты, у которых субъединицы состоят из одного α/β -домена. Четвертичная структура представляет собой димер, тример или гексамер, а активный центр состоит из близкорасположенных областей связывания нуклеозида и фосфат-аинона. Одними из наиболее исследованных ферментов этого семейства являются пуриновые нуклеозидфосфорилазы, из бактерий и из различных тканей млекопитающих [44-51]. К нуклеозидфосфорилазам NP-1 семейства также относятся рассматриваемые в этой работе уридинфосфорилазы [24].

Исследованы свойства уридинфосфорилаз из различных организмов. Показано, что эти ферменты специфичны к уридину и тимидину. Обнаружено, что уридинфосфорилазы прокариот функционируют как гексамеры, состоящие из идентичных субъединиц молекулярной массой ~27 кДа [21]. Уридинфосфорилазы эукариотических клеток представляют собой димер [16, 52].

В PDB (Protein Data Bank – банк данных белковых структур) (<http://www.rcsb.org/>) насчитывается около 80 структур уридинфосфорилаз в различных комплексах. Среди всех этих структур разрешение выше 1.5 Å имеют только 8. Причем 7 из них это структуры *VchUPh* исследованные в настоящей работе.

1.4 Роль уридинфосфорилазы в биологии и медицине

1.4.1 Экспрессия уридинфосфорилазы в опухолевых клетках. Участие уридинфосфорилазы в метаболизме 5-фторурацила.

Несмотря на то, что УФ присутствует в большинстве нормальных и опухолевых тканей, ее активность, а также экспрессия повышается в некоторых типах опухолей, что является важной особенностью, которую можно использовать при разработке химиотерапевтических агентов [53-56]. Обнаружено, что уровень экспрессии ферментов УФ и тимидинфосфорилазы (ТФ) коррелирует с прогрессированием заболевания [9, 54, 57, 58]. Высокий уровень экспрессии УФ в опухолевых клетках по сравнению с нормальными тканями, является одним из механизмов, который приводит к высокой чувствительности раковых клеток к пиримидиновым цитотоксическим аналогам нуклеозидов. Исследования показали, что повышенная экспрессия УФ может регулироваться опухолевыми клетками через цитокины, такие, как интерферон-а, интерферон-с, фактор некроза опухоли, и интерлейкин-1а [53, 59]. Помимо лечения рака повышение концентрации уридина в сочетании с введением докозагексаеновой кислоты, рассматривается как потенциальное лечение болезни Альцгеймера [60] и болезни Паркинсона [61].

УФ влияет на катаболизм нескольких нуклеозидных аналогов, используемых в химиотерапии рака [62]. Эти аналоги нуклеозидов включают в себя 5-фторпроизводные урацила и уридина, такие как 5-фторурацил (5-ФУ) и его пролекарства - 5-фтор-2'-дезоксидеоксиуридин и 5'-дезоксидеокси-5-фторуридин, которые используются в лечении различных типов опухолей [63].

Из класса антиметаболитов 5-ФУ выделяется как наиболее широко используемый лекарственный препарат при лечении различных опухолевых заболеваний: базально-клеточной эпителиомы, гиперпластических и неопластических заболеваний кожи, опухолей кожи, кератоакантомы [6, 64, 65]. 5-

ФУ был разработан в 1957 году [66], [67, 68]. Схема преобразования 5-фторурацила представлена на рисунке 2.

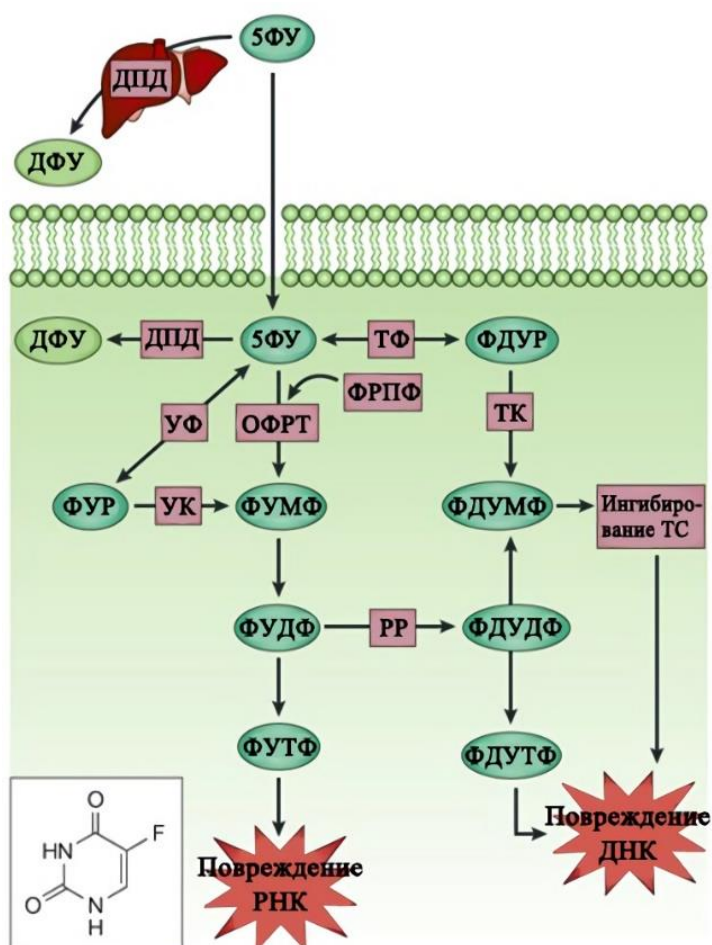


Рисунок 2. Схема преобразования 5-фторурацила (5-ФУ) в три основных активных метаболита: фтордезоксисуридинмонофосфат (ФДУМФ), фтордезоксисуридинтрифосфат (ФДУТФ) и фторуридинтрифосфат (ФУТФ). УФ – уридинфосфорилаза, ТФ – тимидинфосфорилаза, ДПД – дигидропиримидин дегидрогеназа, ОФРТ – оротатфосфорибозилтрансфераза, УК – уридин киназа, РР-рибонуклеотид редуктаза, ТС - тимидилатсинтаза. ДФУ – дегидрофторурацил, ФУР – фторуридин, ФУМФ – фторуридинмонофосфат, ФУДФ – фторуридиндифосфата, ФДУДФ – фтордезоксисуридиндифосфат, ФДУР – фтордезоксисуридин [67, 69].

Основные метаболиты 5-ФУ проявляют свою противоопухолевую активность либо путем нарушения синтеза РНК (ФУТФ), или ингибирования активности

тимидилатсинтазы (ТС), преобразующую дезоксиуридинмонофосфат (ДУМФ) в дезокситимидинмонофосфат, который необходим для синтеза и восстановления ДНК. Используя накаутирование генов, авторы [70] прекратили работу гена УФ мышечных эмбриональных стволовых клеток и обнаружили, что прекращение выработки УФ в этих клетках приводило к 8-ми и 16-ти кратному увеличению значений IC_{50} для 5-ФУ и 5'-дезоксифторуридина, соответственно. Эта генетическая модификация напрямую подтверждает роль УФ в метаболизме фторпиримидинов.

Однако, прием 5-ФУ сопровождается серьезными побочными явлениями: повреждением слизистой оболочки желудка, токсическим действием на костный мозг, повышением свертываемости крови. Кроме того, 5-ФУ кардиотоксичен, вызывает контактный дерматит, негативно влияет на органы зрения [17, 71].

Клинические исследования продемонстрировали способность уридина уменьшать токсичность индуцированную 5-ФУ, оказываемую на костный мозг и желудочно-кишечный тракт без снижения его антиопухолевого эффекта [59, 62, 72, 73]. Из-за короткого периода полураспада уридина в плазме (всего 2 мин) и регуляции гомеостаза уридина в плазме на уровне 2-4 мкМ необходимы высокие дозы уридина для уменьшения токсичности [59, 74]. Соответственно, ингибирование активности УФ является привлекательной терапевтической стратегией для сохранения токсичности 5-ФУ. Аналоги ациклоуридина, в том числе 5-бензолациклоуридин (БАУ), были разработаны в качестве ингибиторов hUP1 и в клинических испытаниях показано, что БАУ способен повышать концентрацию уридина в плазме, тем самым увеличивая терапевтический индекс 5-ФУ [16]. Например ингибитор УФ 2,2'-ангидроуридин и его производные [75], увеличивают терапевтический индекс 5-ФУ в 1.5 раза, снижая тяжесть побочных явлений по сравнению с применением одного лишь 5-ФУ [76]. Таким образом, специфические ингибиторы УФ повышают концентрацию уридина в крови путем

блокирования быстрого катаболизма уридина печеночной УФ без добавления экзогенного уридина [77, 78].

1.4.2 УФ в качестве прогностического фактора при раке молочной железы

5-ФУ и его пероральное пролекарство капецитабин одобрены для лечения поздних стадий рака молочной железы. Вклад повышенной активности УФ при раке молочной железы был подтвержден исследованием Хирага, и др. [79]. Авторы оценивали влияние активности УФ на эффективность 5'-ДФУР и капецитабина в опухолевом образовании и отдаленных метастазах в кости, легких и печени. В этом исследовании, они обнаружили, что пероральный 5'-ДФУР и капецитабин эффективны для лечения первичных и вторичных опухолей молочной железы, а также для профилактики костных метастазов, при общем осложнении рака молочной железы. При самой низкой дозе 5'-ДФУР (31 мг/кг) и капецитабина (90 мг/кг), образование костных метастазов было предотвращено, хотя эти дозы не были достаточно высоки, чтобы ингибировать развитие ортотопической опухоли, а также метастазов в легких и печени.

Канзаки и др. изучил потенциал УФ в качестве прогностического маркера и сообщили отрицательную корреляцию между экспрессией УФ и клиническим исходом больных раком молочной железы [9]. Они обнаружили, что более высокая экспрессия УФ была обнаружена в опухолях рецидивных больных. Более того, худший показатель выживаемости также наблюдался у пациентов с более высокой экспрессией гена УФ. Поэтому они предложили уровень экспрессии гена УФ при раке молочной железы как прогностический маркер этого заболевания.

1.4.3 Защитное действие уридина при ишемии нервной ткани

УФ играет важную внутриклеточную метаболическую роль, которая очевидна в контексте пиримидиновой реутилизации, однако она также включает в себя защиту

от ишемии [80]. Choi и др. продемонстрировали защитную роль уридина и УФ при ишемических инсульт-индуцированных повреждениях. Их результаты показали, что уридин может быть использован в качестве альтернативного источника энергии во время такого энергетически-кризисного события, как ишемия. Таким образом, эти результаты будут полезны для разработки нового метода лечения церебрального ишемического повреждения. Перорально введенный уридин (50-200 мг/кг) снижал в средней мозговой артерии отношение окклюзии (1,5 ч)/реперфузии (22 ч), которые были индуцированы инфарктом в головном мозге мыши. Кроме того, в головном мозге крысы, подвергнутого такому же ишемическому состоянию, регуляция гена УФ и уровни экспрессии мРНК и белка были повышены. Затем авторы [80] применили глюкозную депривацию в корковых смешанных культурах нейронов и астроцитов *in vitro*. Клетки были лишены глюкозы два часа. По истечении этого времени они получали по 20 мМ глюкозы. В таких условиях, наблюдалась значительная потеря АТФ с последующей смертью нейронов, но не астроцитов, которые были предварительно обработаны уридином. Ингибирование клеточного поглощения уридина с помощью S-(4-нитробензил)-6-тиоинозина блокировал этот эффект уридина. В аналогичных исследованиях *in vivo* авторами обнаружено, что из-за недостатка глюкозы экспрессия УФ увеличивается, причем «эффект уридина» был показан только в присутствии астроцитов. Это исследование впервые дает доказательство того, что уридин защищает нейроны от индуцированного ишемического инсульта и гибели благодаря УФ.

1.4.4 Связь между пиримидиновым метаболизмом и накоплением жиров в печени

Авторами статьи [81] была обнаружена связь между пиримидиновым метаболизмом и накоплением жиров в печени. Жировая инфильтрация печени становится распространенным заболеванием (в особенности в США) из-за эпидемии ожирения у детей раннего возраста [82], увеличения средней

продолжительности жизни [83, 84], а также широкого использования рецептурных препаратов [84]. Жировая инфильтрация печени является признанным фактором риска развития жировой болезни (стеатоза) печени [85]. Лечение этой болезни зависит главным образом от лечения заболеваний, являющихся ее первопричиной, таких как сахарный диабет, ожирение, или гиперлипидемия [86]. В настоящее время не существует прямых методов лечения стеатоза печени [86].

Печеночный микровезикулярный стеатоз индуцируется нарушением гомеостаза уридина через оверэкспрессию hUP1, а также ингибированием дигидрооротатдегидрогеназы (DHODH), фермента, синтезирующего пиримидины *de novo*. Интересно, что добавление уридина полностью подавляет микровезикулярный стеатоз в обоих случаях. Эффективная концентрация (EC50) уридина для подавления микровезикулярного стеатоза составляет для мышей приблизительно 20 мкМ. Уридин не влияет на активность DHODH *in vitro*. Однако, добавление уридина изменяет в печени отношения концентраций $NAD^+/NADH$ и $NADP^+/NADPH$ и меняет особенности ацетилирования метаболических, окислительно-восстановительных и антиоксидантных ферментов. Следует отметить, что ацетилирование белков является ключевым регуляторным механизмом клеточного метаболизма. Эти результаты показывают новую зависимость между гомеостазом уридина, пиримидинового обмена и липидного метаболизма печени.

1.4.5 Окислительно-восстановительная чувствительность УФ

У позвоночных животных наблюдается две изоформы УФ [87], первичная последовательность которых, гомологична друг другу приблизительно на 60% [16, 62, 88]. Сравнение изоформ человеческих уридинфосфорилаз (hUP1 и hUP2), демонстрирует отсутствие значимых структурных различий в а.о. активных центров, которые могли бы повлиять на активность фермента [87]. Авторы статьи [87] на основании исследования двух структур hUP1 и hUP2 обнаружили наличие

у последней активной и неактивной конформации. В структуре этого фермента может формироваться дисульфидный мостик, который смещает аргинин, координирующий фосфат-анион в фосфат-связывающем сайте, что приводит к инактивации фермента. При измерениях активности *in vitro* обоих рекомбинантных hUP2 и hUP2 подтверждена окислительно-восстановительная чувствительность данного фермента, в отличие от hUP1. Анализ первичной последовательности показывает, что эта функция сохраняется среди hUP2 гомологов и отсутствует во всех hUP1 белков из-за отсутствия необходимого а. о. цистеина. Понимание структурной динамики hUP2 помогает рассматривать белки как потенциальные клеточные сенсоры оксидативного стресса.

Кроме того, исследование авторов [87] открывает важные аспекты в разработке следующего поколения ингибиторов УФ. Ранее проведенные исследования были нацелены на изучение УФазной активности, для увеличения концентрации уридина в плазме и тканях, чтобы защитить неопухолевые ткани от цитотоксических фторнуклеотидов, используемых при лечении злокачественных новообразований [89, 90]. Согласно результатам анализа структур hUP2 авторы полагают, что этот фермент можно селективно ингибировать путем химической стабилизации его неактивной конформации. Уровень hUP1 человека часто бывает повышен в образцах опухолевой ткани [56, 91], в то время как УФаза-2 человека главным образом отсутствует в этих клетках [62]. Таким образом, в случае разработки селективного ингибитора, может быть увеличен уровень содержания уридина до защитных концентраций в здоровых клетках, которые экспрессируют hUP2, без уменьшения эффективности химиотерапевтического агента в опухоли, в которой наблюдается повышенная экспрессия hUP1. Кроме того, учитывая недавно полученные данные о том, что традиционные ингибиторы, такие как БАУ, могут повлиять и на другие ферменты, например альдегидоксидазу человека [92], соединения с повышенной селективностью могут стать ключом к созданию улучшенной схемы лечения с приемлемым уровнем побочных эффектов.

1.4.6 Ингибиторы уридинфосфорилазы как перспективные антимикробные и антипаразитарные препараты

Ингибирование фермента УФ приводит к гибели некоторых простейших - возбудителей заболеваний человека и животных (например, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*) [17-19], т.к. у простейших она участвует в синтезе уридина и тимидина [19], а подавляющее большинство нуклеозидов получают путем ресинтеза [93, 94]. Для паразита *Schistosoma mansoni* продемонстрирован цитостатический эффект 2,2'-ангидроуридина [17]. Таким образом, ингибиторы УФ являются сильными антипаразитарными средствами и, вероятно, антимикробными препаратами, из-за того, что большинство паразитов, в отличие от млекопитающих, не имеет фермента селективного по отношению к тимидину и осуществляющего его ресинтез. Помимо этого, у паразитов ресинтез нуклеозидов преобладает над долей нуклеозидов, синтезируемых *de novo* [17].

Авторы публикации [52] выделили фермент УФ из паразита *Trypanosoma brucei* – возбудителя Африканской сонной болезни, и впервые получили и проанализировали ее пространственную структуру. Они отмечают, что этот паразит, по всей видимости, имеет по меньшей мере два пути синтеза пиримидинов: один из них проходит с участием УФ, а другой с участием нуклеозидгидролазы [95].

Недавно вышла публикация [96] по УФ из *Schistosoma mansoni*, в которой помимо решенных и уточненных структур *SmUP*, авторами обнаружено две УФ гомологичные по отношению к друг другу на 92% (*SmUPa* и *SmUPb*). Кинетические эксперименты убедительно показали, что *SmUPa* является уридинфосфорилазой, в то же время активность *SmUPb* не была обнаружена. Авторы публикации нашли причину отсутствия активности *SmUPb* по отношению к уридину в сайте связывания, где заменены два основных а.о. участвующих в связывании субстрата. Однако, авторы не смогли определить альтернативную функцию *SmUPb*, хотя их филогенетические анализы и результаты выделения фермента позволяют

предположить, что *SmUPb* по-прежнему играет определенную роль в обмене веществ паразита. Необычная изоформа *SmUPb*, по мнению авторов, может открыть новые возможности для понимания уникальных особенностей метаболизма *S. mansoni*.

1.5 Биохимическая характеристика уридинфосфорилаз.

1.5.1 *Общая биохимическая характеристика*

Первые результаты кинетических экспериментов на пуриновых нуклеозидфосфорилазах из эритроцитов человека и бычьей селезенки продемонстрировали, что ферментативная реакция проходит через тройной комплекс, состоящий из фермента, фосфат-аниона и нуклеозида, и что она является последовательной, а не осуществляется по пинг-понг механизму, т.е. для протекания ферментной реакции требуется одновременно взаимодействие двух субстратов [97, 98]. При описании пуриновых нуклеозидфосфорилаз (ПНФ) из бычьей щитовидной железы был показан упорядоченный Би-Би механизм, то есть активный центр фермента последовательно образует, комплексы с анионом фосфата и нуклеозидом - и ферментативная реакция протекает в тройном комплексе [99]. В то же время, для пуриновой нуклеозидфосфорилазы из мозга быка была описана обратная последовательность [44]. Механизм Теорелла — Чанса был предложен для ПНФ из эритроцитов человека [100], при таком механизме фермент может взаимодействовать сначала с одним из субстратов с образованием двойного комплекса, который затем атакуется вторым субстратом, в результате чего образуется тройной комплекс, время жизни которого не лимитирует общую скорость реакции. Более поздние кинетические исследования пуриновой нуклеозидфосфорилазы из бычьей селезенки указывают на упорядоченно-последовательный механизм при фосфоролитическом расщеплении, в котором с ферментом сначала связывается анион фосфата, а затем нуклеозид, и случайно-последовательным механизмом при синтезе нуклеозида [44]. Анализ,

основанный на сайт направленном мутагенезе пространственных структур и кинетических данных, обеспечил детальными моделями переходного состояния пуриновых нуклеозидфосфорилаз [44, 101, 102]. Дальнейшие структурные исследования механизма действия пуриновых нуклеозидфосфорилаз из быка и *Cellulomonas* возлагают первичную роль в стабилизации интермедиата на молекулы воды [103, 104]. Для уридинфосфорилаз (УФ) из различных видов кинетические исследования показали, как случайно-последовательный механизм [105], так и упорядоченно-последовательный механизм реакции, в котором анион фосфата, являясь первым субстратом, который связывается с ферментом, и урацил – первый продукт, покидающий фермент [106]. Таким образом, как для ПНФ, так и для УФ, отсутствует единое мнение о том, по какому механизму протекает ферментативная реакция.

Активность фермента и его способность связываться с субстратом зависит и от температуры, и рН внешней среды. рН оптимум фосфоролиза уридина исследованных немутантных УФ, при котором наблюдается максимальная активность фермента, колеблется в пределах от 7,0 для УФ из *Lactobacillus casei* [107] до 8,2 для УФ из печени крысы [108]. рН оптимум *EcUPh* равен 7,3 [2], а рН оптимум *hUP1* составляет 7,6 [109]. При этом УФ сохраняет свою активность в широком диапазоне рН. К примеру, *hUP1* при рН 6,5 обладает 70% активностью от максимальной, а при рН 8,5 около 25% от максимальной активности [56]; *EcUPh* при рН 5,8 около 50% от максимальной активности фермента, а при рН 9,0 - 40% [2]. Недавно опубликована статья [110] в которой авторы используют термостабильную УФ из *Aeropyrum pernix* – аэробной гипертермофильной археи, для биосинтеза нуклеозидных аналогов. Активность фермента была максимальной при рН равном 9,0 и температуре 90°C, при этом она оставалась стабильной в диапазоне рН от 3,0 до 10,0 и температуре от 35 до 100 °С.

Температурный оптимум подавляющего большинства исследованных УФ, в том числе УФ человека и *E. coli*, колеблется в диапазоне от 35 до 40 °С. Однако авторы

[111] получили мутантные формы УФ из *E. coli* которые сохраняли свою стабильность при более высоких температурах необходимых в биотехнологии. По сравнению с природной УФ из *E. coli*, которая имела температурный оптимум при 40°C и периодом полураспада 9,89 часов при 60°C, мутант UPL8 имел температурный оптимум при 60°C и период полураспада 17,3 часов при 60°C.

1.5.2 Специфичность уридинфосфорилазы по результатам химической кинетики

Многими авторами проводились химико-кинетические исследования субстратной специфичности УФ из различных организмов. Основные значения K_M (константы Михаэлиса) по этим исследованиям для УФ из различных организмов для разных субстратов и ссылки на литературные источники суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Основные K_M (константы Михаэлиса) по исследованиям УФ из различных организмов для разных субстратов.

Организм	Уридин (K_M (мМ)/ссылка)	Урацил (K_M (мМ)/ссылка)	Тимидин (K_M (мМ)/ссылка)	α -D-рибозо-1-фосфат (K_M (мМ)/ссылка)	Фосфат (K_M (мМ)/ссылка)	2'-дезоксид-уридин (K_M (мМ)/ссылка)
<i>Rattus norvegicus</i>	0,016/[112]	0,36/[112]	-	0,03/[113]	-	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	0,085/[114]	-	-	-		
<i>Mus musculus</i>	0,064/[115]	-	0,148/[115]	-	0,076/[116]	0,71/[115]
<i>Lactobacillus casei</i>	3,8/[107]	-	-	-		-
<i>Hymenolepis diminuta</i>	0,033/[117]	0,204/[117]	-	0,05/[117]	0,806/[117]	-
<i>Homo sapiens 2</i>	0,076/[62]	-	-	-	-	0,3/[62]
<i>Homo sapiens 1</i>	0,189/[56]	0,209/[56]	-	0,076/[56]	0,202/[56]	
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,24/[118]	-	0,11/[118]	-	-	0,13/[118]
<i>Schistosoma mansoni</i>	0,117/[17]	-	0,187/[17]	-		0,269/[17]
<i>Dictyostelium discoideum</i>	0,24/[119]	0,06/[119]	-	0,14/[119]	0,42/[119]	-
<i>Aeropyrum pernix</i>	0,615/[110]	-	-	-	-	-
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	0,17/[120]	0,11/[120]	-	0,017/[120]	0,12/[120]	-

Из таблицы 1 видно, что, не смотря на высокую гомологию аминокислотных остатков сайта связывания [24], K_M для одинаковых субстратов у ферментов из различных организмов отличаются. Этот факт свидетельствует о том, что в связывании субстрата помимо а.о. сайта связывания участвуют аллостерические регуляционные элементы.

Наиболее полно по результатам химической кинетики проанализирована субстратная специфичность энзима УФ из *E. coli*. Авторами [121] проведены модификации уридина во 2-, 4-, 5 - и 6 - положении пуринового основания и в 2'-, 3'-, 5'- положении фуранозной группы. Некоторые результаты модификаций уридина приведены в таблице 2.

Таблица 2. Кинетические параметры в реакции фосфоролиза катализируемой *EcUPh* при pH 7,5 и 37 °С для уридина и его аналогов [121].

Субстрат	K_M (K_i), мкМ	K_{cat} , c^{-1}	K_{cat}/K_M , $c^{-1}/мкМ$	Субстрат	K_M (K_i), мкМ	K_{cat} , c^{-1}	K_{cat}/K_M , $c^{-1}/мкМ$
Уридин	80	98	1,22	Тимидин	270	5	0,02
4-тиоуридин	130	49	0,38	2-тиоуридин	*	**	-
5-метилуридин	65	4,8	0,074	6-метилуридин	1030	24	0,023
2'-дезоксисуридин	133	14	0,1	1- β -D-арабинофуранозилурацил	500	2	0,004
5'-гомоуридин	174	97	0,56	5'-С-метилуридин (D-allo)	400	45	0,11
5'-С-метилуридин (L-talo)	280	360	1,28	5'-гомотимидин	*	**	-

5'-С-метилтимидин (D-ribo)	(280)	-	-	5'-С- метилтимидин (L-lyxo)	500	1,5	0,003
5'-дезоксисуридин	180	11	0,1	5'- дезокситимидин	*	**	-
5'-дезоксид-5'- метилениуридин	500	3	0,006	3'- дезокситимидин	-	-	-
5'-дезоксид-5'- хлортимидин	*	**	-	5'-дезоксид-5'- азидотимидин	*	**	-
5'-дезоксид-5'- бромтимидин	*	**	-	5'-дезоксид-5'- йодотимидин	*	**	-
3'-фтор-3'- дезоксисуридин	(770)	-	-	2,2'-О- ангидроуридин	(10)	-	-
3'-С-метилуридин	*	**	-	2'-С- метилуридин	*	**	-
рибозо-1-фосфат	140***	-	-	анион -фосфата ***	730	-	-
Уридин	150***	-	-	урацил***	240	-	-

* «-» Практически не ингибирует при концентрации 1 мМ.

** «-» Скорость реакции составляет менее 0,1% от скорости природного субстрата. Ошибка измерений K_M и k_{cat} не превышала 20% [121].

*** Кинетические параметры в реакции фосфоролита катализируемой *EcUPh* при рН 7,5 и 37 °С согласно результатам Leer J.C. и др. [2]

Как следует из таблицы 2, 6-метилуридин медленно превращается в 6-метилурацил и связывание этого субстрата значительно слабее по сравнению с 5-метилпроизводными [122]. Замещение атома кислорода серой (вандерваальсовы радиусы атома О - 1,40 Å; атома S - 1,85 Å) в четвертом положении пиримидинового кольца не оказывает заметного влияния на афинность субстрата

по отношению к ферменту. В противоположность этому, 2- тимоидин не является субстратом для *EcUPh*.

2'-дезоксиуридин и 5'-дезоксиуридин, катализируемые УФ, показали не плохие субстратные свойства в сравнении с уридином. Таким образом, авторы предполагают, что отсутствие 2' - группы или 5' гидроксильной группы не имеет решающего значения для успешного связывания субстрата и фосфоролиза [121]. С другой стороны, отсутствие одновременно 2' - и 5' - гидроксильных групп приводит к неспособности субстрата связываться с ферментом, как и в случае 5'-дезокситимидина, 5'-дезокси-5' -хлортимидина и других 5' - дезокси производных. Отсутствие субстратных свойств 3'-фтор-3' -дезоксиуридина и 3'-дезокситимидина наглядно демонстрирует ключевую роль 3'-гидроксильной группы субстрата. Авторы показали, что гидроксильные группы рибозной части субстрата участвуют в образовании водородных связей, тем самым обеспечивая его связывание с ферментом с образованием фермент-субстратного комплекса.

УФ катализирует фосфоролиз уридина в 20 раз более эффективно, чем 5-метилуридина. Эта разница между 2'-дезоксиуридином и тимидином значительно меньше - в 5 раз (таблица 2). В то же время, *EcUPh* катализирует фосфоролиз уридина в 60 раз эффективнее по сравнению с тимидином. Попарное сравнение вышеприведенных данных свидетельствует о том, что присутствие 2'-гидроксильной группы с одновременным отсутствием громоздкой 5-метильной группы имеет решающее значение для формирования комплекса УФ с субстратом [121].

Эффективность фосфоролиза 1-β-D- арабинофуранозилурацила в 300 раз ниже, чем у уридина, но только в 25 раз ниже по сравнению с 2'-дезоксиуридином. В то же время, 2,2'-О-ангидроуридин - нуклеозид с фиксированной ориентацией вокруг гликозидной связи - связывается с *EcUPh* более эффективно, чем уридин. Все изученные константы равновесия лежат в диапазоне 0,05-0,2 и практически не зависят от структуры субстрата [121].

Авторы [121] также отмечают важность высокоэнергетической конформации субстрата при связывании с ферментом для осуществления реакции фосфолиза, т.к. при этом происходит ослабление гликозидной связи лиганда.

1.6 Структура уридинфосфорилазы.

1.6.1 *Общее описание структуры.*

Описано несколько пространственных структур различных бактериальных уридинфосфорилаз, как в нативной форме, так и в комплексах с субстратами. Детально исследованы структуры УФ из *Escherichia coli* [5, 21, 123-125] и *Salmonella enterica* [126-131], УФ из *Shewanella oneidensis* [132-134], УФ из *Yersinia pseudotuberculosis* [135-137], УФ из *Streptococcus pyogenes* в комплексе с урацилом и рибозо-1-фосфатом [138].

Четвертичная структура исследованных бактериальных УФ (из *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Shewanella oneidensis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio cholerae*) является тороидальным гексамером диаметром около $\sim 100 \text{ \AA}$, представляющим собой тример гомодимеров (см. рис. 3). Он сформирован шестью гомологичными субъединицами. Молекулярная масса каждой субъединицы составляет около 27 кДа (в зависимости от источника выделения фермента). Каждая субъединица состоит из 253 а.о. (252 в случае УФ из *Shewanella oneidensis* и 259 в случае УФ из *Streptococcus pyogenes*). В центре гексамера расположен центральный канал диаметром около 15 \AA . В каждом гомодимере расположено по два энзиматических центра, которые состоят из а.о. обеих субъединиц гомодимера. Таким образом минимальным структурным элементом УФ является гомодимер. Расстояние между активными сайтами, расположенными на противоположных поверхностях гексамера равно 20 \AA .

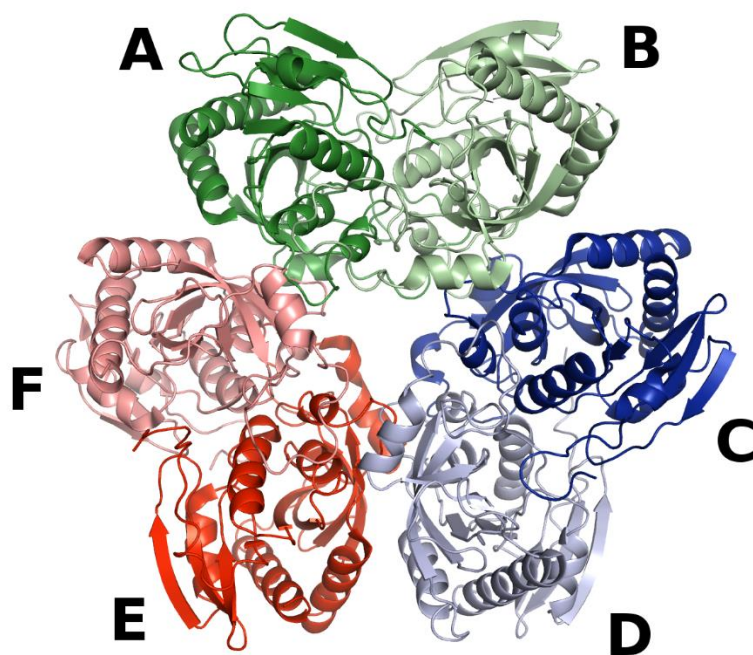


Рисунок 3. Пример четвертичной структуры УФ из *S. typhimurium* (ID PDB: 1ZL2) [127].

Укладка элементов вторичной структуры в субъединицах бактериальных УФ соответствует трехслойной сэндвич-архитектуре $\alpha\beta\alpha$ по классификации Россмана [139]. Укладка субъединиц белковых макромолекул уридинфосфорилаз отличается высокой консервативностью (см. рис. 4). Общие особенности в упаковке субъединиц белковой макромолекулы содержатся в центральном смешанном β -листе, который окружен несколькими α -спиралями. Структура фермента включает в себе протяженные петли, причем одна из них меняет свое положение в зависимости от присутствия субстратов в сайте связывания (этому факту нет подтверждения для структуры *SpUPh*). Сайт связывания субстратов фермента состоит из расположенных рядом фосфат и нуклеозид-связывающих карманов, который в свою очередь делится на пиримидин- и рибозо-связывающий сайты. Эти связывающие участки сформированы а.о. из центрального β -листа, прилегающих к нему петель, а также аминокислотными остатками из соседней субъединицы гомодимера. Бактериальные УФ демонстрируют существенную структурную гомологию, обладая гексамерной четвертичной структурой, количеством и

расположением элементов вторичной структуры (см. рис. 4), а также сходством их укладки в субъединицах (см. рис. 5). [24]

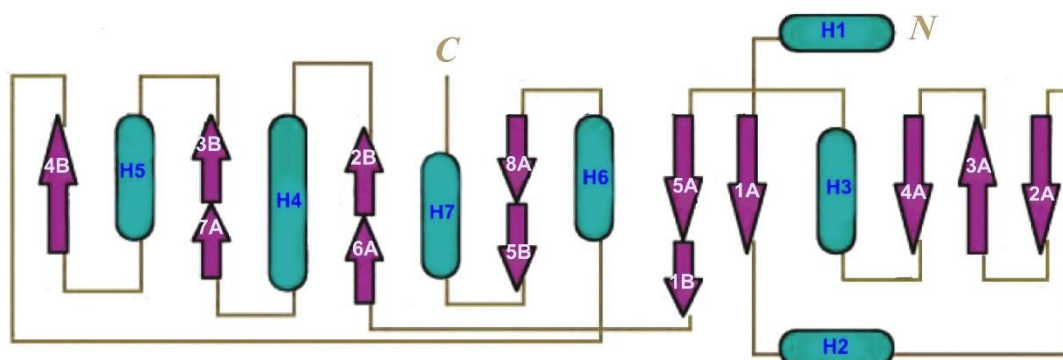


Рисунок 4. Схематичное изображение типичного расположения элементов вторичной структуры в субъединицах уридинфосфорилаз [24]. Голубыми цилиндрами обозначены α -спирали H1-H7. Фиолетовыми стрелками обозначены β -тяжи: 1A-8A - один β лист и 1B-5B - другой β лист.

Помимо этого, на границе контакта двух субъединиц, формирующих функциональный димер, находится ион калия. Авторы публикации [5] показали важность наличия иона калия и его влияние на скорость ферментативной реакции, т.к. в его присутствии скорость ферментативной реакции увеличивается в два раза. По их мнению присутствие иона калия в межсубъединичной области является причиной не только повышения сходства пространственной укладки полипептидной цепи в гомодимере, но и синхронизирует состояние субстрат связывающих сайтов гомодимера, повышая синхронность их действия при совершении каталитической реакции [5].

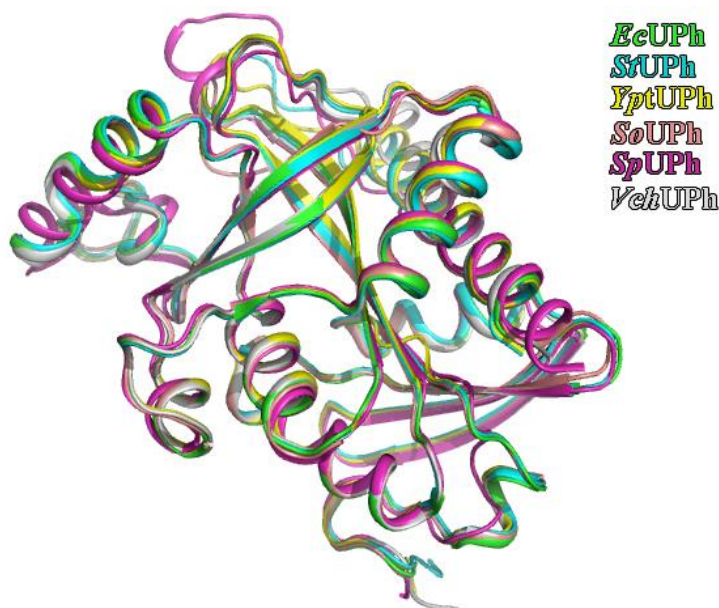


Рисунок 5. Суперпозиция третичной структуры мономеров бактериальных уридинфосфорилаз, депонированных в PDB на данный момент: из *E.coli* (ID PDB: 1U1G) (зеленый), *S. typhimurium* (ID PDB: 2QDK) (голубой), *Yersinia pseudotuberculosis* (ID PDB: 4OF4) (желтый), *Shewanella oneidensis* (ID PDB: 4R2W) (бледно-розовый), *Streptococcus pyogenes* (ID PDB: 3QPB) (розовый), *Vibrio cholerae* (ID PDB: 5EPU) (белый).

Стоит отметить, что все бактериальные УФ обладают высокой степенью гомологии первичной последовательности а.о. (см. рис. 6) Самый высокий уровень гомологии наблюдается между УФ из *E.coli* и УФ из *S. typhimurium* - 97%. Более низкое значение гомологии получено между УФ из *Yersinia pseudotuberculosis* и УФ из *E.coli* - 92%. УФ из *E.coli* гомологична по отношению к УФ из *V. cholerae* на 75% [140], к УФ из *Shewanella oneidensis* на 74% [132] и к УФ из *Streptococcus pyogenes* на 40% [138].

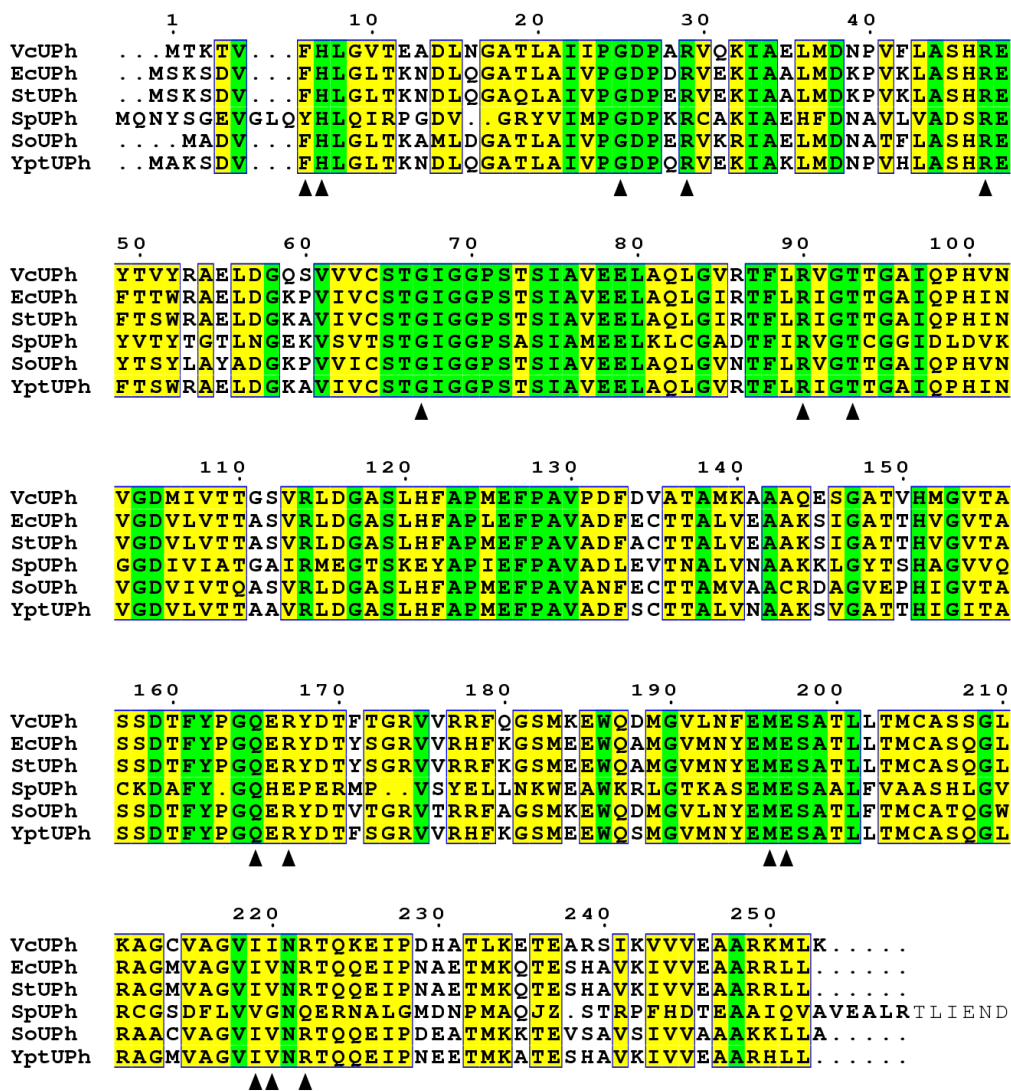


Рисунок 6. Выравнивание первичных последовательностей всех бактериальных (*VchUPh*, *EcUPh*, *StUPh*, *SpUPh*, *SoUPh*, *YptUPh*) УФ, структуры которых депонированы в PDB. Выделены идентичные (зеленым) и гомологичные (желтым) аминокислотные остатки. Стрелками показаны а.о. входящие в сайт связывания фермента. Рисунок выполнен при помощи онлайн сервиса ESPript 3.0 [141].

Помимо этого, а.о. сайтов связывания бактериальных УФ не только обладают высокой гомологией первичной последовательности (исключение составляет урацил связывающий сайт *SpUPh*), но и сходством конформаций а.о., участвующих в связывании субстрата (см. рис. 7).

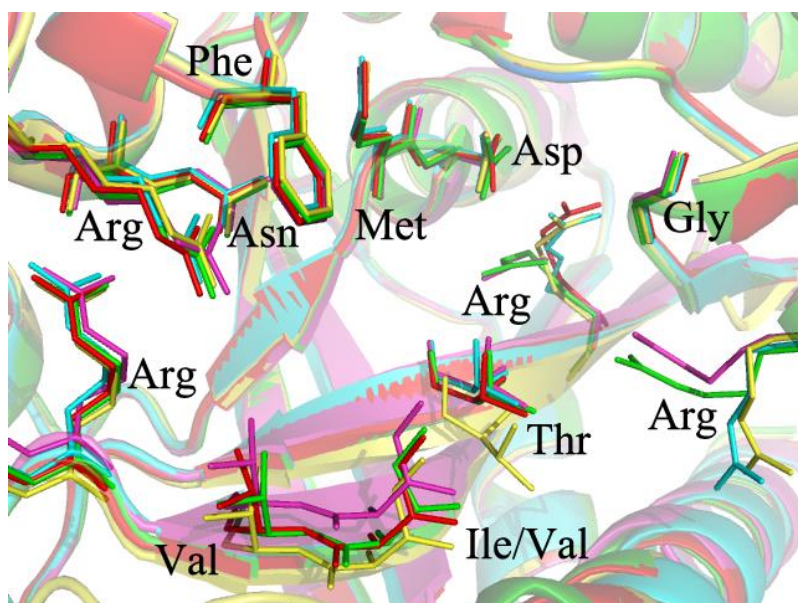


Рисунок 7. Суперпозиция а.о. активного центра бактериальных УФ: из *E.coli*, лигандированный (ID PDB: 1U1G) (красный), *S. typhimurium*, лигандированный (ID PDB: 2QDK) (зеленый), *Yersinia pseudotuberculosis*, нелигандированный (ID PDB: 4OF4) (желтый), *Shewanella oneidensis*, лигандированный (ID PDB: 4R2W) (розовый), *Vibrio cholerae*, лигандированный (ID PDB: 5EPU) (голубой).

Стоит отметить, что гомология и сходство пространственной организации а.о. сайта связывания, не смотря на низкую гомологию первичных последовательностей в целом (24% для *hUP1* и *hUP2* по отношению к *VchUPh* или 27% и 26% соответственно по отношению к *EcUPh*), касается и человеческих УФ обоих типов (см. рис. 8) [16].

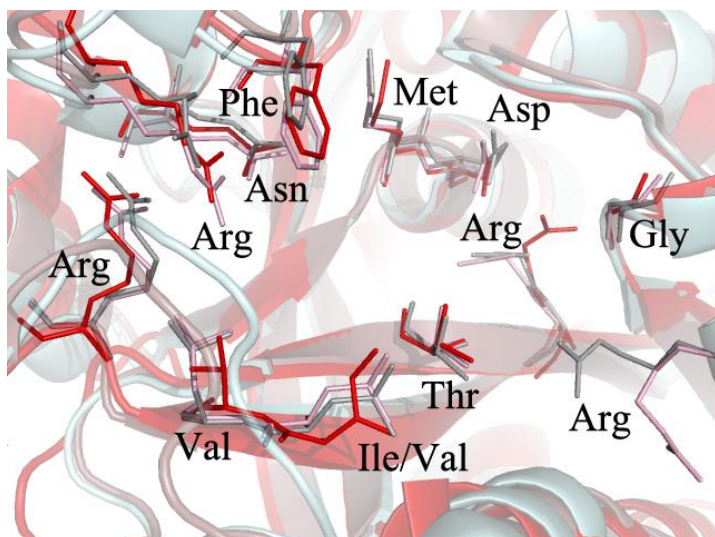


Рисунок 8. Суперпозиция а.о. активного центра УФ из *E.coli* (ID PDB: 1U1G) (красный) и *hUP1* и *hUP2*.

Отметим также, что основное отличие УФ прокариот (в том числе и бактериальных) от эукариот (в том числе и человека) заключается в четвертичной структуре фермента. Ферменты эукариот являются димерами, в то время как ферменты прокариотических клеток - гексамерны. По-видимому, такие различия в четвертичной структуре увеличивают конформационную подвижность каркаса фермента, увеличивая динамическую подвижность доменов относительно друг друга [16]. Помимо этого, из-за того, что ферменты УФ эукариот являются димерами, они имеют намного большую площадь открытой для взаимодействия поверхности по отношению на один а.о. Этот факт, вероятно, важен для образования белок-белковых взаимодействий [87].

1.6.2 Описание сайта связывания уридинфосфорилазы.

Из-за высокого подобия сайтов связывания УФ рассмотрим их на примере наиболее изученной из *EcUPh* (ID PDB: 1RXC). В гомодимере молекулы всех УФ, находится два сайта связывания, которые формируются аминокислотными остатками обеих субъединиц гомодимера [5]. Каталитический центр уридинфосфорилаз включает в себя фосфат-связывающий, урацил-связывающий и

рибозо-связывающий сайты. Два последних сайта объединяют в один – нуклеозид-связывающий сайт.

1.6.2.1 Урацил связывающий сайт.

Располагаясь перпендикулярно по отношению к пиримидиновой компоненте субстрата, Phe162 связывается с ней посредством π -стекинг взаимодействия. Помимо этого, у C5 атома пиримидиновой компоненты расположен гидрофобный карман, который включает в себя а.о. Ile220, Val221 и Phe7, принадлежащего соседней субъединице [5].

Аминокислотный остаток Gln166, консервативный во всех исследованных уридинфосфорилазах, играет ключевую роль в узнавании гетероциклической части субстрата, образуя с ним водородные связи [5]. Между боковыми цепями Arg223 и Phe162 располагается боковая цепь Arg168, которая формирует водородную связь с карбонильными группами главной цепи Phe162 и Glu227 [21, 116, 125].

Как уже упоминалось, а.о. сайта связывания всех бактериальных УФ высококонсервативны. Одним из исключений является УФ из *Streptococcus pyogenes*, где урацилсвязывающий сайт имеет существенные отличия от сайта связывания *EcUPh*. His169 в *SpUPh* играет роль Arg168 в *EcUPh*, Arg223 заменен на Asn223, а в связывании субстрата участвует также Lys162 [138]. Gln168, строго консервативный у всех известных УФ, также связывается с субстратом, однако, имея отличную конформацию от Gln166 в *EcUPh*, образует водородные связи с N3 и O4 атомами пиримидинового субстрата, вместо N3 и O2 у *EcUPh*. Lys162 копланарен урацилу и формирует водородные связи с атомами O2 пиримидинового субстрата и с OE1 а.о. Gln168 [138].

1.6.2.2 Рибозо-связывающий сайт

Рибозо-связывающий сайт располагается между фосфат- и урацил-связывающими сайтами и связывается с рибозой либо рибозной части нуклеозида,

либо рибозо-1-фосфатом. Рибозная компонента субстрата удерживается на месте за счет сети водородных связей, преимущественно боковых цепей His8 соседнего мономера и Glu198. Met197 стабилизирует большую гидрофобную область образованную C2'-C3'-C4' атомами рибозы. Это взаимодействие также может играть роль в корректном расположении рибозы в активном сайте, так как этот метиониновый а.о. полностью консервативен во всех членах NP-1 семейства [24]. Вообще, четыре а.о. (His8, Arg91, Glu198 и Met197), которые формируют водородные связи с рибозой, консервативны для всех УФ (рис. 6).

1.6.2.3 Фосфат-связывающий сайт

А.о. фосфат-связывающего сайта связывают анион фосфата, либо фосфатную группу рибозо-1-фосфата. Сайт связывания формирует карман, который ограничен тремя аргининовыми остатками: Arg30, Arg91 и Arg48 (соседнего мономера). Каждый из этих а.о. образует две водородные связи с атомами кислорода фосфата. Thr94 и Gly26 также взаимодействуют с фосфатом формируя водородные связи [125].

1.7 Структурный аспект субстратной специфичности уридинфосфорилаз

Впервые структурный аспект специфичности уридинфосфорилаз рассмотрел Caradoc-Davies [5] на примере уридинфосфорилазы из *E. coli*. Рассмотренные им структуры не обладали высоким разрешением - от 2.2 Å до 3.1 Å.

УФ специфична по отношению к уридину и тимидину, однако скорость ферментативной реакции с последним лигандом ниже [1, 5]. Неспособность УФ проводить реакцию с производными пуриновых оснований объясняется недостаточным объемом сайта связывания. По мнению авторов статей [2, 56], более высокая афинность по отношению к рибозным компонентам по сравнению с 2'-дезоксирибозидами продиктована наличием трех дополнительных водородных связей 2'ОН группой рибозы с ферментом. Таким образом пониженная афинность

УФ к тимидину в сравнении с уридином вызвана двумя вещами: отсутствием 2'ОН группы и наличием 5-ой метильной группы пиримидиновой компоненты лиганда, которая, по мнению авторов [5], может увеличивать объём кармана связывания фермента, что уменьшает скорость протекания реакции. Таким образом, энергия связывания уридина с УФ выше чем тимидина.

И наоборот, δ^- заряд кислородного атома в 4 позиции пиримидинового кольца уридина повышает его аффинность по отношению к УФ, т.к. этому благоприятствует частичный электрический заряд боковой группы Arg168. Предполагается, что консервативный а. о. Arg168 играет важную роль в субстратной селективности УФ посредством электростатического взаимодействия с субстратом, а именно с атомом в 4 положении пиримидинового основания. Водородная связь же между этими атомами маловероятна из-за неблагоприятной геометрии для ее образования [5].

Авторы публикации [5] также описывают возможный механизм протекания ферментативной реакции. В силу сходства сайтов связывания пространственных структур УФ и пуриннуклеозидфосфорилаз семейства NP-1, а также высокой степени консервативности областей связывания фосфат-аинона и рибозной компоненты, предполагается, что механизмы реакции УФ и ПНФ подобны.

Для ПНФ в свою очередь предлагается две модели прохождения реакции. Одна модель предполагает протонирование атома N7 пурина, что приводит к появлению частичного положительного заряда на пуриновом основании, благодаря чему происходит утечка электронов из расщепляемой гликозидной связи и ее ослабление (см. рис. 9). Подтверждением этой модели являются результаты кинетики гидролиза α -дейтерированных соединений [103, 142-145]. Другая модель наоборот предполагает, избыток электронов на пуриновом основании, за счет перехода электронов с атома O4' рибозной компоненты [24, 101, 102, 104, 146]. Общим для обоих механизмов является связывание нуклеозида в напряженной конформации C4'-*endo* у рибозы, образование частичного заряда на атомах O4' или

C1', позиционирование фосфат-аниона напротив C1' и то, что они подтверждают протекание ферментативной реакции по S_N1 механизму [147, 148]. Этот механизм был в дальнейшем подтвержден исследованиями реакции арсенолиза, которая указывает на существование оксокарбокатиона в переходном состоянии при осуществлении ферментативной реакции [101]. Получившийся высокоэнергетический оксокарбокатион стабилизируется электростатическими взаимодействиями с интермедиатами субстратов и а.о. активного центра [103, 142].



Рисунок 9. Модель прохождения реакции в ПНФ [5].

Итак, авторы полагают [5], что высокоэнергичная конформация нуклеозида растягивает гликозидную связь, делая ее слабее: значение торсионного угла N1-C1'-C2'-N2' приближается к 0°, создавая тем самым перекрытие электронных орбиталей между разрываемой C1'-N1 и C2'-N2' связью [103, 142]. Конформация рибозы у субстратов в публикации различна: в комплексах с 2'-дезоксигуанидином и тимидином пентафураноза находится в C1'-endo(¹E) конформации, в комплексе с 5-фторурацилом и рибозо-1-фосфатом в C1'-exo(E₁) конформации, 5-фторуридин находится в твист-конформации C1'-endo/O4'-exo (¹T₀) [5].

Помимо этого, немаловажный вклад в возможность формирования переходного состояния субстрата заключается в расположении двух кислородов с частичным отрицательным зарядом: O5' атома рибозы и O1 атома аниона фосфата, которые располагаются выше и ниже соответственно атома O4' рибозы, производя таким

образом «электронную атаку», которая способствует переходу электронов с атома O4' [103]. Расстояние от нуклеофильного атома кислорода аниона фосфата до O4' рибозы в комплексах УФ с 5-ФУ/рибоза 1-фосфатом, тимидин/фосфатом и 2-диоксиуридин/фосфатом составляет 3.0 Å, 3.2 Å и 3.6 Å соответственно. Во время каталитической реакции в ПНФ положения пурина и аниона фосфата остаются фиксированными [103]. Авторы статьи [5] отмечают, что электронная плотность для рибозы хуже идентифицировалась в сравнении с эл. плотностью аниона фосфата или пиримидина.

Дополнительным толчком к формированию переходного состояния, вероятно, является протонирование пиримидина. Возможно, протонирование основания происходит при помощи молекулы связанной воды в сайте связывания, т.к. в нем нет подходящих а.о., взаимодействующих с субстратом и являющихся донорами водорода. Также не исключено, что УФ связывает кето таутомер урацила, который переходит в енольную форму во время переходного состояния, по аналогии с ходом реакции в ПНФ [5].

Пространственное расположение боковых групп а.о. His8 и Glu80, по мнению авторов [5], важно для стабилизации рибозной компоненты субстрата. Боковая группа Glu80 формирует водородные связи с атомами азотов основной цепи His8 и Leu9, а также с боковыми группами а.о. His8 и Thr163. В следствие этих взаимодействий боковая группа His8 занимает наиболее выгодную позицию для образования водородной связи с OH5' гидроксогруппой рибозной компоненты [5]. Предполагается, что высоко консервативные среди всех УФ His8 и Glu80, депротонируют гидроксильную группу рибозы OH5', образуя в ней избыток электронов и осуществляя «электронную атаку» на атом O4'. Также более низкую афинность к 2'-дезоксисубстратам авторы связывают с потерей дополнительных водородных связей группы OH2' с Arg91, Glu198 и Met197.

Метильный заместитель в 5 положении, например, в тимидине, приводит к уменьшению скорости реакции в сравнении с уридином [2]. Индуктивный эффект

метильной группы может снижать электронную плотность основания и затруднять расщепление гликозидной связи. С другой стороны, возможно влияние боковых групп Ile220 и Val221, через метильный заместитель в 5-ом положении ароматической группы, на рибозидный торсионный угол, делая его еще более скрученным чем в случае с уридином. Это может содействовать в расщеплении гликозидной связи, однако, по-видимому, индуктивный эффект от метильной группы в 5-ом положении сильнее влияет на скорость ферментативной реакции в сторону ее уменьшения. Однако, биохимические и структурные исследования [56, 124, 149-151] показали, что наличие у лигандов, например, специфических ингибиторов, более объёмных, чем метильная группа тимидина гидрофобных заместителей 5-го положения пиримидинового кольца не препятствует их связыванию с уридинфосфорилазой.

Решённая и уточненная при разрешении 3.1 Å (ID PDB: 1RXU) структура комплекса *EcUPh* с тимидином [5], по нашему мнению не позволяет подтвердить или опровергнуть гипотезу о влиянии 5-метил группы лиганда на связывание его с уридинфосфорилазами, т.к. разрешение структуры 3.1 Å достаточно лишь для того, чтобы анализировать четвертичную структуру и ход основной цепи биомакромолекулы.

Авторы [133] аналогично предполагают схожий механизм катализа у УФ и ПНФ. В структуре комплекса *SoUPh* с уридином разрешением 1.6 Å они отмечают, что уридин принимает высоко-энергетическую high-syn конформацию (торсионный угол гликозидной связи O4'-C1'-N1-C2: $\chi=134^\circ$). Расстояние между карбонильным атомом O2 и атомом C2' рибозы равно 2.92 Å (расстояние между H2' и O2 может оцениваться как 1.8 Å). Короткий контакт также присутствует между O2' и O3' атомами (2.25 Å). В дополнение к этому, кольцо рибозы сильно выровнено, что можно увидеть из значений торсионных углов (C1'-C2'-C3'-C4' составляет -2 градуса и наибольший эндоциклический торсионный угол равен 20 градусам). Атом O4' отклоняется от плоскости проходя через другие четыре атома

пятичленного кольца на 0.3 Å. Это крайне необычно для нуклеозидов, для которых непланарные конформации кольца фуранозы более выгодны энергетически.

1.8 Постановка задачи

В рассмотренных публикациях в полной мере не раскрыт структурный аспект субстратной специфичности УФ ввиду отсутствия полного набора субстратов прямой и обратной реакции. Помимо этого, почти все структуры комплексов, которые рассмотрены в перечисленных публикациях (кроме структуры *Shewanella oneidensis*, ID PDB: 4R2X), определены с низким разрешением, которое недостаточно для локализации атомов лигандов и а.о. в сайте связывания с высокой точностью.

Помимо этого, для корректного рассмотрения структурного аспекта субстратной специфичности необходимо сравнивать структуры комплексов с белками, полученными из одного организма, причем, в идеале, кристаллы комплексов должны быть кристаллизованы при одинаковых условиях, из одного и того же раствора белка.

Цель настоящей работы - установление структурных особенностей специфичности *VchUPh* к лигандам на основании результатов, полученных с использованием методов рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: кристаллизация комплексов *VchUPh* с лигандами, определение структур комплексов *VchUPh* с лигандами квазиатомного разрешения методом рентгеноструктурного анализа биомакромолекул, выявление структурных основ специфичности *VchUPh* на основании данных рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Клонирование, экспрессия гена и выделение и очистка *VchUPh*.

Основываясь на анализе полного генома микроорганизма *V. cholerae*, полученного из GenBank (GCA_000705295.1), выбирались и синтезировались две пары праймеров для амплификации гена уридинфосфорилазы - *udp*. Каждый из олигонуклеотидов содержал сайт рестрикции для последующего клонирования.

Геномная ДНК из *V. cholerae* использовалась в качестве матрицы полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая проводилась в амплификаторе TC480 (Perkin-Elmer Cetus) по следующей схеме: сначала клетки разрушались при 95° С в течение 5 мин. затем проводилось пять циклов амплификации, которые включали в себя денатурацию ДНК при 94° С в течение 30 с, отжиг праймеров при 52° С в течение 40 с и достройку ДНК при 72° С в течение 1 мин [140]. Следующая стадия состояла из 25 циклов амплификации, режим которых отличался от предыдущих циклов только более высокой температурой отжига праймеров - 62°С. На последнем этапе проводилось два цикла при том же температурном режиме, продлевая время достройки ДНК при 72° С до 5 мин. В результате амплификации получены фрагменты ДНК длиной 1007 и 1030 пар оснований, содержащие регуляторную и структурную области гена *udp* фланкированные сайтами узнавания для рестриктаз *EcoRI* и *BamHI*. После электрофоретического разделения продуктов ПЦР в агарозном геле искомые фрагменты ДНК элюировались из геля с помощью набора «GeneClean» (Fermentas). ПЦР продукт обрабатывался рестриктазами *EcoRI* и *BamHI* и клонировался по сайтам *EcoRI-BamHI* в мультикопийный вектор pUC19 с получением плазмиды pMZ21 (см. табл. 3) [140].

Затем штамм *E. coli* AM201 (производный штамма TGI), содержащий делецию гена *metE-udp*, трансформировался с использованием лигазной смеси плазмидой pMZ21 с получением трансформантов AmpRUdp+. Отбор трансформантов AmpRUdp+ проводился на селективной минимальной среде, содержащей

ампициллин (100 мкг/мл). Анализ последовательности ДНК, кодируемой рМЗ21, выявил наличие одной полной открытой рамки считывания для белка в 253 аминокислоты. Полное описание всех процедур описано авторами в публикации [140].

Анализ экспрессии гена *udr* в клетках *E. coli* проводился методом электрофоретического разделения общего белка клеток *E. coli* в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Ночные культуры штамма AM201, содержащего плазмиду рМЗ21, выращивались в богатой среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Клетки собирались центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин. Биомасса суспензировалась в буфере следующего состава: 62,5 мМ ТРИС-НСl рН 6,8; 5% глицерин; 2% меркаптоэтанол; 0,1% SDS (додецисульфат натрия); бромфеноловый синий. Затем клетки разрушались кипячением в течение 10 мин, после чего анализировалась фракция белков с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. В качестве контроля анализировалась фракция белков штамма *E. coli* AM201, содержащего плазмиду без вставки [140].

На электрофоретической картине в дорожках соответствующих штаммам, содержащим конструкции с функциональным геном *udr*, наблюдалась дополнительная фракция мономера белка с молекулярной массой приблизительно в 28 кДа. Это значение приблизительно соответствует молекулярной массе 27,5 кДа, вычисленной по последовательности гена *udr* и так же соответствовало молекулярной массе контрольного образца уридинфосфорилазы из *E. coli* (*EcUPh*).

Культура клеток штамма AM201 *E. coli*, содержащего плазмиду рМЗ21 культивировалась в термостатированном шейкере (250 об/мин) в течение ночи при 37°C. Биомасса собиралась центрифугированием при 5000 об/мин в течение 3 мин. Клетки суспензировались в 50 мл буфера, содержащего 50 мМ ТРИС-НСl (рН 7,5), 1,5М NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,3 мМ PMSF и разрушались ультразвуком. Дебрис осаждался центрифугированием при 10 тыс. об/мин. в течение 30 минут. К супернатанту добавлялось 1/10 объема 10% ПЭГ (полиэтиленгликоль) - (рН 6,0) при перемешивании, после чего оставлялось на мешалке на ночь. Осадок собирался

центрифугированием при 14 тыс. об/мин в течение 30 минут. К супернатанту добавлялся сухой сульфат аммония до конечной концентрации 3М, после чего он оставлялся на ночь. Осадок центрифугировали при 14 тыс. об/мин. в течение 30 минут и разделяли на 2 части. Результаты оценивали методом SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) –электрофореза в денатурирующих условиях.

Половина осадка из под сульфата аммония растворялась в буфере, содержащем 50 мМ ТРИС-НС1 (рН 7,5), 2М сульфат аммония. Суспензия наносилась на колонку с бутил сефарозой (15 мл) со скоростью ~1 мл/мин, уравновешенную тем же буфером. Элюция проводилась градиентом сульфата аммония от 2М до 0М со скоростью ~0,5 мл/мин. Суммарный объем градиента составил 200 мл, объем фракций 5 мл.

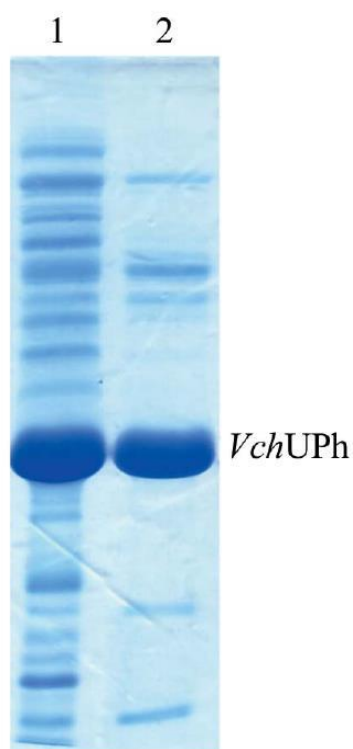


Рисунок 10. SDS-PAGE анализ для фракций *VchUPh* после разделения на бутил-сефарозе (дорожка 1) и Q-сефарозе (дорожка 2).

Далее фракции 15-18, полученные в результате первой очистки, объединялись. Объединенные фракции диализовались в буфер 50 мМ ТРИС-НС1 (рН 7,5), 20 мМ NaCl. Осадок центрифугировался при 4 тыс. об/мин. в течение 20 минут.

Супернатант наносился на колонки, содержащие 15 мл Q-сефарозу со скоростью 1 мл/мин, уравновешенные тем же буфером. Колонка промывалась исходным буфером. Белок элюировался градиентом концентрации NaCl от 20 мМ до 1М со скоростью 1 мл/мин (см. рис. 10). Суммарный объем градиента составил 200 мл, объем фракций - 5 мл [152].

Таблица 3. Экспрессия гена *VchUPh*.

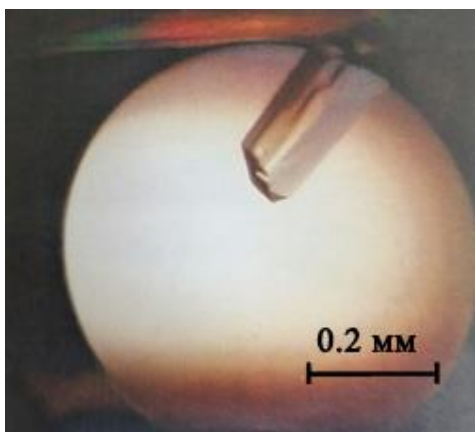
Организм источник	<i>Vibrio cholerae</i> O1 биовар El Tor (штамм: ATCC 39315 / El Tor Inaba N16961)
ДНК источник	<i>Vibrio cholera</i>
Прямой праймер*	5'-CCG <u>GATCC</u> GCGCCACATCAAGTGGCGC-3'
Обратный праймер*	5'-GGG <u>GAA</u> TTCAAGTAGGAAGGGGATAGAGG-3'
Вектор клонирования	pUC19
Вектор экспрессии	pUC19
Организм-продуцент	<i>Escherichia coli</i>
Аминокислотная последовательность конечного фермента	MTKTVFHLGVTEADLNGATLAIIPGDPARVQKIAELMDNPVFLAS HREYTVYRAELDGQSVVVCSTGIGGPSTSIAVEELAQLGVRTFLR VGTTGAIQPHVNVGDMIVTTGSVRLDGASLHFAPMEFPAVPDFD VATAMKAAQESGATVHMGVTASSDTFYPGQERYDTFTGRVVV RFQGSMSKEWQDMGVNLFEMESATLLTMCASSGLKAGCVAGVII NRTQKEIPDHATLKETEARSIKVVVEAARKMLK

*Подчеркнутые символы показывают последовательность нуклеотидов, узнаваемую рестриктазами.

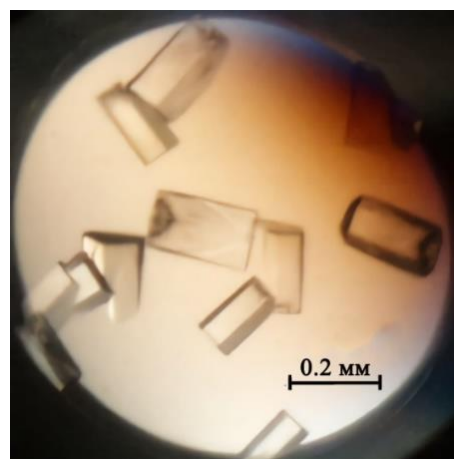
2.2 Кристаллизация комплексов *VchUPh*

Подбор условий кристаллизации комплексов проводился с использованием кристаллизационных наборов The Classics, MbClass и MbClass II Suites (QIAGEN, www.qiagen.com). Для скрининга использовалась роботизированная установка Cartesian Dispensing System (Cartesian Technologies). Скрининг проводился в плашках (Molecular Dimension, 96 ячеек) методом диффузии в парах в варианте сидячей капли.

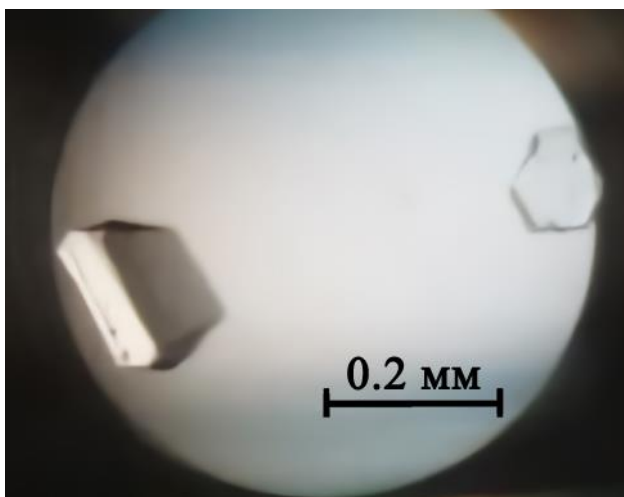
Кристаллизацию комплексов проводили методом диффузии паров в варианте «висящей капли» при температуре 291 К. Кристаллы комплексов *VchUPh* с лигандами, пригодные для рентгеноструктурного анализа, выросли в течении недели. Кристаллизационные капли содержали 1,5 мкл раствора *VchUPh* концентрацией 15 мг/мл в буфере ТРИС-НСl, 1,5 мкл противораствора и 1 мкл водного раствора лиганда. Молярные концентрации растворов лигандов приведены в таблице 4. Фотографии кристаллов представлены на рисунке 11. Наборы рентгенодифракционных экспериментальных интенсивностей собраны от кристаллов *VchUPh* размером от 0,3 до 0,4 мм.



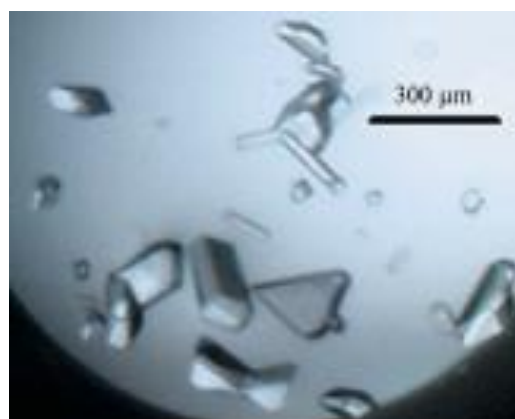
(a)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 11. Фотографии кристаллов комплексов *VchUPh* с а) уридином, б) тимидином в) урацилом г) 6-метилурацилом

Таблица 4. Условия кристаллизации комплексов *VchUPh*

Комплекс <i>VchUPh</i> с	анионом фосфата	уридином	урацилом	тимидином	тимином	6-метилурацилом	цитозином
Метод	Диффузия в парах в варианте висячей капли						
Состав буферного раствора	20 мМ ТРИС -HCl, 20 мМ NaCl, pH 7,5						
Состав противораствора	0,5 М Na ₄ P ₂ O ₇ ; 0,1 М (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,5 М K ₄ P ₂ O ₇ , pH 7,5	0,2 М MgCl ₂ ·6H ₂ O, 15%(w/v) ПЭГ 4000, 0,1 М ТРИС -HCl, pH 8,5					
Объем и соотношения в капле	1 мкл раствора белка, 1 мкл противораствора	2 мкл раствора белка, 2 мкл противораствора и 1 мкл 0,1 М уридина	2 мкл раствора белка, 2 мкл противораствора и 1 мкл 0,2 М урацила	2 мкл раствора белка, 2 мкл противораствора и 1 мкл 0,1 М тимидина	2 мкл раствора белка, 2 мкл противораствора и 1 мкл 0,2 М тимины	2 мкл раствора белка, 2 мкл противораствора и 1 мкл 0,2 М 6-метилурацила	2 мкл раствора белка, 2 мкл противораствора и 1 мкл 0,2 М цитозина
Объем противораствора	300 мкл						

2.3 Сбор и обработка рентгенодифракционных данных.

Рентгенодифракционный набор экспериментальных интенсивностей комплексов *VchUPh* с тиминном получен на белковой станции P11 синхротрона PETRA III (DESY, Гамбург, Германия); с тимидином, фосфат-анионом, 6-метилурацилом - на белковой станции X13, синхротрона DORIS (DESY/EMBL, Гамбург, Германия); с уридином, урацилом и цитозином на белковой станции 14.1 синхротрона BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Берлин, Германия). Рентгенодифракционные наборы регистрировались при температуре 100 К. Перед экспонированием кристаллы помещались на 5 с. в криораствор, содержащий 40% глицерола в противорастворе.

Обработка наборов экспериментальных рентгенодифракционных интенсивностей осуществлена в программе XDS [153]. Соответствующие статистические данные для всех полученных комплексов *VchUPh* с лигандами представлены в таблице 5. Шкалирование интенсивностей и расчет модулей структурных факторов проведены в программе SCALA [154].

Таблица 5. Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов

Комплекс <i>VchUPh</i> с	уридином	тимидином	урацилом	тиминном	анионом фосфата	6-метил-урацилом	цитозином
Длина волны (Å)	0,89	0,81	0,89	1,00	0,81	0,83	0,98
Детектор	PSI pilatus 6M	MAR CCD 165 мм	PSI pilatus 6M	PSI pilatus 6M	MAR CCD 165 мм	PSI pilatus 6M	PSI pilatus 6M
Дистанция от кристалла до детектора (мм)	142,63	71,38	100,20	156,61	180,69	247,70	161,18
Шаг прецессии (°)	0,5	0,5	0,5	0,2	0,5	0,1	0,1
Диапазон сканирования (°)	360						
Время экспозиции (с)	1	30	1	1	30	1	1
Пространственная группа	<i>P1</i>	<i>P2</i> ₁	<i>P1</i>	<i>P2</i> ₁	<i>P1</i>	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁
Число молекул на независимую часть элементарной ячейки	1						
<i>a, b, c</i> (Å)	64,32; 72,04; 89,19	91,74; 95,85; 91,83	64,52; 71,96; 89,35	92,75; 96,50; 92,78	63,67; 71,06; 87,91	93,01; 97,10; 93,02	92,85; 96,72; 92,89
α, β, γ (°)	110,56; 107,53; 85,83	90; 119,96; 90	69,21 72,19 85,58	90; 119,99; 90	69,63; 72,56; 85,73	90; 119,99; 90	90; 119,96; 90
Мозаичность (°)	0,06	0,19	0,13	0,09	0,14	0,15	0,10
Диапазон разрешения (Å)	46,21–1,03 (1,09-1,03)*	29,65–1,29 (1,34-1,29)*	32,03- 1,28 (1,36-1,28)*	41,81–1,25 (1,32-1,25)*	78,79–1,29 (1,36-1,29)*	80,56–1,17 (1,20-1,17)*	46,46–1,06 (1,12-1,06)*
Полное число отражений	2282101 (320758)*	1435540 (153760)*	1344228 (190750)*	786665 (330285)*	1254860 (127989)*	1555812 (62318)*	3991627 (463430)*

Число независимых отражений	658820 (92238)*	345305 (36724)*	345622 (49330)*	383390 (54747)*	327958 (47257)*	859424 (38791)*	615831 (87100)*
Полнота набора (%)	93,2 (89,3)*	99,2 (99,1)*	94,0 (82,9)*	98,3 (96,5)*	95,5 (94,3)*	90,7 (55,3)*	95,6 (83,7)*
Повторяемость	3,5 (3,5)*	2,3 (2,3)*	3,5 (3,8)*	6,7 (6,0)*	3,8 (2,7)*	3,5 (3,2)*	6,5 (5,3)*
Среднее значение $\langle I/\sigma(I) \rangle$	8,5 (1,7)*	9,3 (2,0)*	10,5 (1,8)*	17,0 (2,7)*	14,2 (2,3)*	11,9 (3,2)*	16,3 (2,5)*
Общий температурный фактор Вильсона (\AA^2)	11,21	14,59	9,05	10,56	14,22	12,83	11,28

* В скобках приведены значения параметров в последней зоне высокого разрешения.

2.4 Решение и уточнение пространственных структур.

Наборы начальных фазовых компонент структурных факторов для решения пространственных структур комплексов *VchUPh* с анионом фосфата, уридином, урацилом и тиминном получены методом молекулярного замещения в программе Molrep [155], а для структур комплексов *VchUPh* с тимидином, цитозином, 6-метилурацилом – в программе Phaser [156].

Для того чтобы рассчитать начальный фазовый набор требуется модель структуры, которая как можно лучше аппроксимирует положение структуры неизвестной молекулы в элементарной ячейке кристалла. Стартовой моделью для структуры комплекса *VchUPh* с тимидином являлась нелигандированная *VchUPh*, определенная с разрешением 1,7 Å (ID PDB: 3O6V), в остальных случаях в качестве стартовой модели использовалась структура комплекса *VchUPh* с тимидином при разрешении 1,29 Å (ID PDB: 4LZW). Из всех стартовых структур предварительно были удалены атомы всех лигандов, включая молекулы связанной воды.

Для определения положения структуры неизвестной модели проводится две стадии. На первой стадии находится такое ортогональное преобразование Ω , которое дает наилучшее равенство ориентаций неизвестной и известной структур. На второй стадии ведется поиск вектора трансляции \mathbf{v} , для задания позиции структуры в элементарной ячейке кристалла. Эти преобразования находятся через сравнение функций Паттерсона искомой P_x и известной структуры P_m .

По определению функция Паттерсона представляет собой:

$$P(\mathbf{r}) = \frac{1}{|V|} \int_V \rho(\mathbf{u}) \rho(\mathbf{u} - \mathbf{r}) dV_u, \quad (1)$$

где V - объём элементарной ячейки, ρ – электронная плотность в точке пространства, рассчитанная как:

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{|V|} \sum_{\mathbf{s} \in \mathfrak{R}} F(\mathbf{s}) \exp(i\varphi(\mathbf{s})) \exp(-2\pi i(\mathbf{s}, \mathbf{r})) \quad (2)$$

где, \mathbf{r} – точка пространства, определяемая координатами в базисе из минимальных периодов кристалла $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}: \mathbf{r} = x\mathbf{a} + y\mathbf{b} + z\mathbf{c}$

\mathbf{s} – «вектор рассеяния», задаваемый в базисе $\{\mathbf{a}^*, \mathbf{b}^*, \mathbf{c}^*\}$, сопряженном базису $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}: \mathbf{s} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$. (Суммирование в (2) идет по всем векторам \mathbf{s} с целочисленными координатами (hkl))

V – элементарная ячейка кристалла: параллелепипед, построенный на векторах $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$; $|V|$ – объём элементарной ячейки.

Подставляя (2) в (1) и интегрируя полученное выражение, находим:

$$P(\mathbf{r}) = \frac{1}{|V|} \sum_{\mathbf{h}} F^2(\mathbf{h}) \exp(-2\pi i(xh + yk + lz)), \quad (3)$$

где $\mathbf{h} = (h, k, l)$ - миллеровские индексы.

Удобство функции Паттерсона заключается в том, что она выражается через F^2 , а не через F , и её всегда можно рассчитать по экспериментальным интенсивностям.

Функция вращения, представляющая собой интеграл перекрытия функций $P_x(\mathbf{r})$ и $P_m(\Omega\mathbf{r})$, является условием согласованности ориентации известной структуры и искомой.

$$R(\Omega) = \int_U P_x(\mathbf{r}) P_m(\Omega\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (4)$$

Интегрирование ведется по области U , которая представляет собой сферический слой с центром в начале координат с минимальным и максимальным радиусами r_{min} и r_{max} .

Эта функция максимальна в области U в том случае, если системы векторов известной структуры и искомой ориентированы одинаково.

Применяя теорему Парсеваля и преобразование Фурье к уравнению (4), получим выражение для $R(\Omega)$ в обратном пространстве:

$$R(\Omega) = \sum_{\mathbf{h}} |\mathbf{F}_x(\mathbf{h})|^2 |\mathbf{F}_m(\Omega^T \mathbf{h})|^2, \quad (5)$$

где $\mathbf{h} = (h, k, l)$ - миллеровские индексы, а $\Omega^T \mathbf{h}$ - транспонированная матрица оператора преобразования Ω .

Для того чтобы получить максимальную контрастность пиков функции вращения $R(\Omega)$ в программах Phaser [157], MolRep [155], изменялись параметры: d_{min} и d_{max} - диапазона разрешения Фурье-спектра структурных амплитуд, r_{min} и r_{max} – радиусы сферического слоя интегрирования, $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$, $\Delta\gamma$ - шаг по углам Эйлера.

На второй стадии определяется позиция искомой структуры в элементарной ячейке. В этом случае условием наилучшей совмещенности искомой и известной структур в элементарной ячейке является функция трансляции (6):

$$T(\mathbf{v}) = \sum_{\mathbf{h}} |\mathbf{F}_x(\mathbf{h})|^2 \left(\sum_j |\mathbf{F}_m(S_j \mathbf{h})| \exp(2\pi i S_j \mathbf{h} \mathbf{v}) \right)^2, \quad (6)$$

где S_j - операторы симметрии пространственной группы,

\mathbf{v} - вектор трансляции, описывающий позицию структуры в элементарной ячейке.

Уточнение структур комплексов *VchUPh* с лигандами проводили в программах *phenix.refine* [158] и *Refmac5* [159]. Алгоритмы уточнения этих программ варьируют координаты, заселенности (только *phenix.refine*), температурные факторы атомов структуры для достижения лучшей тождественности рассчитанных для решенной модели структурных амплитуд с наблюдаемыми. В общем случае алгоритмы уточнения сводятся к поиску минимума функционала:

$$Q = \sum_h w(h) \left(|F_x(h)| - |F_m(h)| \right)^2, \quad (7)$$

где $|F_x(\mathbf{h})|$, $|F_m(\mathbf{h})|$ - экспериментальная и расчетная амплитуды структурного фактора соответственно, $w(\mathbf{h})$ – «весовые» коэффициенты.

При уточнении всех структур комплексов *VchUPh* с лигандами на заключительном этапе температурные факторы атомов полагались анизотропными. Этапы автоматического уточнения чередовались с ручной правкой в программе Coot [160, 161]. Локализация как атомов лиганда, так и атомов молекул воды проводилась с использованием σ_A -взвешенных карт фурье-синтеза электронной плотности с коэффициентами mF_o-DF_c и $2mF_o-DF_c$. Качество уточнения атомных структур оценивали при помощи программы PROCHECK [162], сервиса MolProbity [163] и PDB Validation Server (<http://validate.rcsb.org/>).

Основные значения параметров уточненных структур приведены в таблице 6. Рисунки выполнены в программе PyMol [164]. Последовательность а.о. получена в программе ClustalW2 [165]. Информация о вторичной структуре получена при помощи онлайн сервиса ESPript 3.0 [141]. Схематические диаграммы взаимодействия ферментов с субстратами построены в программе LIGPLOT [166]. Структуры депонированы в RCSB PDB - ID PDB (<http://www.rcsb.org/>).

Таблица 6. Статистические характеристики решения и уточнения пространственных структур.

Комплекс <i>VchUPh</i> с	тимидином	timiном	анионом фосфата	уридином	урацилом	6-метил-урацилом	цитозином
Диапазон разрешения (Å)	19,89–1,29 (1,30–1,29)*	7,99–1,25 (1,26–1,25)*	18,93–1,29 (1,31–1,29)*	44,46–1,03 (1,04–1,03)*	32,03–1,28 (1,30–1,28)*	40,28–1,17 (1,19–1,17)*	46,46–1,06 (1,09–1,06)*
Срезка набора, $\sigma(F)$	$F > 2,0\sigma(F)$	$F > 0,0\sigma(F)$	$F > 2,0\sigma(F)$	$F > 0,0\sigma(F)$	$F > 2,0\sigma(F)$	$F > 0,0\sigma(F)$	$F > 0,0\sigma(F)$
Число рефлексов в рабочем наборе (N_{work})	342140 (10708)*	381769 (11734)*	324967 (9339)*	658757 (20687)*	345585 (6774)*	449273 (6181)*	585343 (31808)*
Число рефлексов в тестовом наборе (N_{free})	17105 (563)*	19179 (648)*	16457 (520)*	6558 (209)*	3629 (72)*	22536 (323)*	30490 (1750)*
R_{work}^1	0,178 (0,255)*	0,115 (0,200)*	0,172 (0,431)*	0,117 (0,248)*	0,133 (0,269)*	0,108 (0,155)*	0,105 (0,239)*
R_{free}^1	0,211 (0,285)*	0,147 (0,240)*	0,200 (0,482)*	0,137 (0,262)*	0,169 (0,306)*	0,128 (0,170)*	0,122 (0,240)*
Cruickshank DPI (Å)	0,06	0,04	0,06	0,03	0,05	0,04	0,02
Число уточняемых неводородных атомов							
Белка	11192	11243	11257	11531	11711	11480	11743
Ионов	18	3	5	10	10	31	11
Лигандов	131	134	81	170	128	129	154
Воды	1967	2169	1998	1761	1912	2482	2207
R.m.s.d. от «идеальной» геометрии							
По длинам валентных связей (Å)	0,014	0,008	0,008	0,016	0,014	0,016	0,009
По валентным углам (°)	1,324	1,273	1,216	1,355	1,327	1,185	1,504
Среднее значение <i>B</i> фактора для атомов (Å ²)							
белка	10,1	15,6	9,6	14,5	13,9	11,3	12,5
ионов	14,9	14,7	23,2	22,8	24,5	15,9	18,1
лигандов	12,0	22,4	28,1	20,5	21,5	15,3	17,2

воды	24,7	31,7	23,6	33,7	28,4	30,7	24,9
Статистика Рамачандрана							
Число а.о. в наиболее благоприятных областях (%)	98,79	98,46	98,79	99,01	98,52	98,59	98,05
Число а.о. в разрешённых областях (%)	1,44	1,19	0,81	0,58	1,12	1,01	1,60
ID PDB	4LZW	4OGL	4IP0	5M2T	5MIW	4K6O	5EPU

* В скобках приведены значения параметров в последней зоне высокого разрешения.

¹В общем случае:

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}, \quad (8)$$

где $|F_{obs}|$, $|F_{calc}|$ - модули экспериментальной и расчетной структурной амплитуды соответственно [167].

2.5 Расчет частичных электрических зарядов атомов

Для прояснения вопроса о зависимости химико-физических свойств лигандов от их строения и связи этих свойств с селективностью фермента выполнен расчёт частичных электрических зарядов атомов. Вместо тимидина для данных вычислений выбран аналог тимидина - 5-метилуридин, чтобы отследить влияние 5-метильной группы на внутримолекулярное зарядовое распределение и не учитывать отсутствие 2'-гидроксигруппы в молекуле тимидина по сравнению с уридином.

Для расчета частичных электрических зарядов атомов был выбран алгоритм, описанный авторами [168]. Электростатический потенциал в нашем случае:

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|r-R_A|} - \sum_{\mu,\tau} P_{\mu\tau} \int \frac{\varphi_\mu \varphi_\tau}{|r-r'|} dr' \quad (9)$$

где Z_A - заряд атома A молекулы, находящейся на расстоянии R_A ,

$P_{\mu\tau}$ – элемент матрицы плотности, определяемый методом Хартри-Фока,

$\varphi_\tau, \varphi_\mu$ – базисные функции, в нашем случае использовался набор базисных функций 3-21G.

Электростатический потенциал определяется в выбранном числе точек вокруг молекулы. Наименьший квадрат соответствия электростатических потенциалов получается путем нахождения минимума функции y :

$$y(q_1, q_2, \dots, q_n) = \sum_{i=1}^m (V_i - E_i(q_1, q_2, \dots, q_n))^2 \quad (10)$$

где m – общее количество точек расчета

V_i – электростатический потенциал в точке расчета

E_i – электростатический потенциал в приближении монополя, определяемый как:

$$E_i = \sum_{j=1}^n \left(\frac{q_j}{r_{ij}} \right) \quad (11)$$

n – количество атомов в молекуле.

Минимум функции y находится методом множителей Лагранжа через нахождение стационарных точек функции Лагранжа:

$$z(q_1, q_2, \dots, q_n) = y(q_1, q_2, \dots, q_n) + \lambda g(q_1, q_2, \dots, q_n) \quad (12)$$

где функция g является требованием к воспроизведению полного числа зарядов:

$$g(q_1, q_2, \dots, q_n) = (\sum q_i) - q_{tot} = 0 \quad (13)$$

Приравняв к нулю частные производные функции Лагранжа z по λ и по q_k , необходимо составить систему из $n+1$ уравнений. Решение этой системы дает искомый частичный заряд каждого атома системы.

Расчет частичных зарядов атомов лигандов как 5-метилуридина и уридина, так и тимина, урацила, цитозина проводился по вышеописанному алгоритму в программе Jaguar 7.9 [169] в водном окружении методом Хартри-Фока используя набор базисных функций 3-21G.

2.6 Расчет энергии конформаций субстратов в комплексе с VchUPh и в водном растворе.

Для расчёта энергии конформаций молекул лигандов в растворе и в связанном с VchUPh состоянии использовалась программа MacroModel [170]. Для расчетов использовался набор силовых полей OPLS-2005 [171] с неявным заданием влияния растворителя. Для анализа энергии независимой от прямого взаимодействия лигандов с атомами белка или водного окружения использовалась величина E' , в соответствии с (14):

$$E' = E_{\text{stretch}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{non_bonded}}, \quad (14)$$

E_{stretch} – энергия деформации растяжения-сжатия валентных связей,

$$E_{\text{stretch}} = \sum_{\text{all bonds}} K_r (r - r_0)^2 \quad (15)$$

E_{bend} – энергия деформации сгибания валентных связей,

$$E_{\text{bend}} = \sum_{\text{all angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (16)$$

E_{torsion} – энергия торсионных углов,

$$E_{\text{torsion}} = \sum_{\text{all torsion}} \frac{V_1}{2} (1 + \cos(\varphi - \varphi_1)) + \frac{V_2}{2} (1 - \cos(2\varphi - \varphi_2)) + \frac{V_3}{2} \left(1 + \cos(3\varphi - \varphi_3) \right) + \frac{V_4}{2} (1 - \cos(4\varphi - \varphi_4)) \quad (17)$$

$E_{\text{non_bonded}}$ – потенциал Леннард-Джонса и энергия кулоновского взаимодействия.

$$E_{\text{non_bonded}} = \sum_{i < j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i e^2 q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (18)$$

$E_{\text{non_bonded}}$ рассчитывается в том случае, если атомы в одной молекуле разделены по крайней мере тремя связями.

K_r , K_θ , A_{ij} , C_{ij} – эмпирически получаемые константы, r_0 , θ_0 – идеальные длина и угол валентной связи для пары атомов, V_{1-4} – фурье коэффициенты торсионных углов.

Для получения конформации лигандов в растворе использовалась опция “Minimization” программы MacroModel. Использовались следующие параметры минимизации энергии: максимальное число итераций – 2000, порог сходимости – 0,02 кДж/моль, алгоритм минимизации – PRCG (Polak-Ribiere Conjugate Gradient, алгоритм сопряженных градиентов Полака–Райбера) [172].

2.7 Молекулярный докинг, оптимизация геометрии и оценка энергии связывания.

Подготовка структур комплексов *VchUPh* с тиминном и урацилом, для молекулярного докинга вторых субстратов обратной реакции (рибозо-1-фосфата и 2-дезоксирибозо-1-фосфата) с добавлением недостающих координат атомов водорода и расчётом частичных зарядов атомов осуществляли с использованием опции «Protein preparation wizard» программного пакета "Maestro" (Schrödinger Release 2014-4: Maestro, version 10.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014.). Стереохимические величины о структурах рибозо-1-фосфата и 2-дезоксирибозо-1-фосфата получены из PubChem Database [173]. Оптимизация геометрии молекул лигандов проведена в WEB-сервисе PRODRG [174]. Молекулярный докинг выполнен в программе Glide программного пакета Maestro (вариант "Extra Prescription" с подвижным лигандом и неподвижной мишенью) [150]. Ранжирование результатов докинга проводили при помощи оценочной функции "Glide Score" [150].

$$\text{XP GlideScore} = E_{\text{non_bonded}} + E_{\text{bind}} + E_{\text{penalty}}, \quad (19)$$

где $E_{\text{non_bonded}}$ - сумма кулоновской и вандерваальсовой энергий взаимодействия (18), а E_{bind} и E_{penalty} определяются как,

$$E_{\text{bind}} = E_{\text{hyd_enclosure}} + E_{\text{h_bond}} + E_{\text{metal_binding}} + E_{\text{polar}} \quad (20)$$

$$E_{\text{penalty}} = E_{\text{desolvation}} + E_{\text{ligand_strain}} \quad (21)$$

где $E_{\text{hyd_enclosure}}$ - функция, присваивающая липофильным атомам лиганда потенциал в зависимости от их расстояния до гидрофобных атомов белка,

$E_{\text{h_bond}}$ - функция потенциала взаимодействия, разделенная на несколько компонент, которые зависят от того, являются ли атомы донора и акцептора нейтральными, один нейтрален, а другой заряжен или оба заряжены.

$E_{\text{metal_binding}}$ - дополнительная потенциальная энергия лиганда с заряженными химическими группами в том случае, если в сайте связывания присутствует анион.

E_{polar} - дополнительная потенциальная энергия лиганда с полярными атомами (но не донорами водородов) вблизи гидрофобных областей.

$E_{\text{desolvation}}$ - функция, которая «штрафует» те лиганды, которые энергитически не выгодно расположены по отношению к молекулам воды в сайте белка.

$E_{\text{ligand_strain}}$ - штрафная функция, применяемая к лигандам, имеющим высокоэнергитическую конформацию.

Параметризацию атомных характеристик для оптимизации геометрии полученных решений докинга проводили с использованием набора полноатомных силовых полей GROMACS/GMX [149]. Модели молекулярных комплексов помещали в виртуальную ячейку, представляющую собой прямоугольный параллелепипед с длинами ребер 80 Å x 70 Å x 75 Å. Минимальное расстояние между координатами атомов белка и гранью ячейки составляло 9 Å. Параметризацию атомных характеристик молекул воды и их распределение в объеме виртуальной ячейки осуществляли в программе genbox (GROMACS [149]). Использовалась трёх центровая модель воды SPC216. Компенсацию полного заряда системы осуществляли добавлением к моделям ионов натрия. Оптимизацию геометрии проводили в пакете программ GROMACS со следующими параметрами: шаг интегрирования – 0,001 псек, число шагов интегрирования – 10000, метод расчёта электростатических взаимодействий - суммирование по Эвальду.

Оценку свободной энергии связывания цитозина в комплексе с *VchUPh* проводили в программе SeeSAR [175]. Оценка аффинности лиганда в ней проводится алгоритмом HYDE [175], который проводит расчет энергии десольватации и энергии водородных связей на основе эмпирических оценочных функций.

Свободная энергия связывания в таком случае оценочно рассчитывается как:

$$\Delta G_{binding} = \sum_i (\Delta G_{i,dehydration} + \Delta G_{i,H-bond}) \quad (22)$$

Суммирование ведется по всем атомам, участвующим во взаимодействии.

Отличительной чертой этого алгоритма является то, что оценку свободной энергии связывания можно рассчитать для любого интересующего атома лиганда в комплексе, а не для всего соединения в целом.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Кристаллическая упаковка молекул

Пространственная группа симметрии кристаллов комплексов уридинфосфорилазы с анионом фосфата, уридином, урацилом соответствует P1. На независимую часть ячейки приходится гексамер уридинфосфорилазы. Содержание растворителя в ячейке меняется от 42,95% до 45,05%, а коэффициент Мэтьюса 2,15-2,25 Å³/Да во всех структурах комплексов. Во всех структурах вышеуказанных комплексов кристаллографические контакты представлены водородными связями и вандерваальсовыми взаимодействиями. Кристаллографические контакты для вероятных акцепторов и доноров водородных связей атомов белка с расстояниями, не превышающими 3,2 Å, приведены в таблице 7.

Таблица 7. Контакты между гомодимерами, связанные кристаллографической симметрией, гексамерной молекулы на примере *VchUPh* в комплексе с уридином (ID PDB: 5M2T).

Атомы остатков, образующих кристаллографические контакты	Расстояние, Å	Оператор преобразования симметрии
Thr 223B CG2 – Thr 223E O	3,20	X, Y, Z
Thr 223E O – Thr 223B CG2	3,20	X, Y, Z
Gln 224B O – Glu 226E CD	3,16	X, Y, Z
Glu 226E CD – Gln 224B O	3,16	X, Y, Z
Glu 12B OE1 – Glu 226F CB	3,13	X, Y, Z
Glu 226F CB – Glu 12B OE1	3,13	X, Y, Z
Gln 31C NE2 – Lys 250F NZ	3,10	X, Y, Z
Lys 250F NZ – Gln 31C NE2	3,10	X, Y, Z
Gln 31A NE2 – Lys 250D NZ	3,09	X, Y, Z
Lys 250D NZ – Gln 31A NE2	3,09	X, Y, Z
Lys 250B NZ – Gln 31E NE2	3,08	X, Y, Z
Gln 31E NE2 – Lys 250B NZ	3,08	X, Y, Z

Glu 145B OE2 – Gln 31E NE2	2,97	X, Y, Z
Gln 31E NE2 – Glu 145B OE2	2,97	X, Y, Z
His 100B NE2 – Gln 187E OE1	2,94	X, Y, Z
Gln 187B NE2 – Thr 223E O	2,94	X, Y, Z
Lys 225B NZ – Tyr 168E O	2,94	X, Y, Z
Tyr 168E O – Lys 225B NZ	2,94	X, Y, Z
Gln 187E OE1 – His 100B NE2	2,94	X, Y, Z
Thr 223E O – Gln 187B NE2	2,94	X, Y, Z
Glu 12B OE1 – Glu 226F N	2,91	X, Y, Z
Glu 226F N – Glu 12B OE1	2,91	X, Y, Z
Glu 226A OE2 – His 230D CE1	2,89	X, Y, Z
His 230D CE1 – Glu 226A OE2	2,89	X, Y, Z
Glu 226A OE2 – His 230D ND1	2,88	X, Y, Z
His 230D ND1 – Glu 226A OE2	2,88	X, Y, Z
Gln 187B OE1 – Gln 224E NE2	2,86	X, Y, Z
Gln 31C NE2 – Glu 145F OE2	2,86	X, Y, Z
Glu 145D OE2 – Gln 31A NE2	2,86	X, Y, Z
Gln 224E NE2 – Gln 187B OE1	2,86	X, Y, Z
Glu 145F OE2 – Gln 31C NE2	2,86	X, Y, Z
Phe 42A N – Glu 145D O	2,83	X, Y, Z
Glu 145D O – Phe 42A N	2,83	X, Y, Z
Glu 145B O – Phe 42E N	2,82	X, Y, Z
Phe 42C N – Glu 145F O	2,82	X, Y, Z
Phe 42E N – Glu 145B O	2,82	X, Y, Z
Glu 145F O – Phe 42C N	2,82	X, Y, Z
Glu 12B OE2 – Lys 225F N	2,75	X, Y, Z
Lys 225F N – Glu 12B OE2	2,75	X, Y, Z

Схематическое изображение кристаллической упаковки гексамеров комплекса уридинфосфорилазы с уридином приведено на рисунке 12.

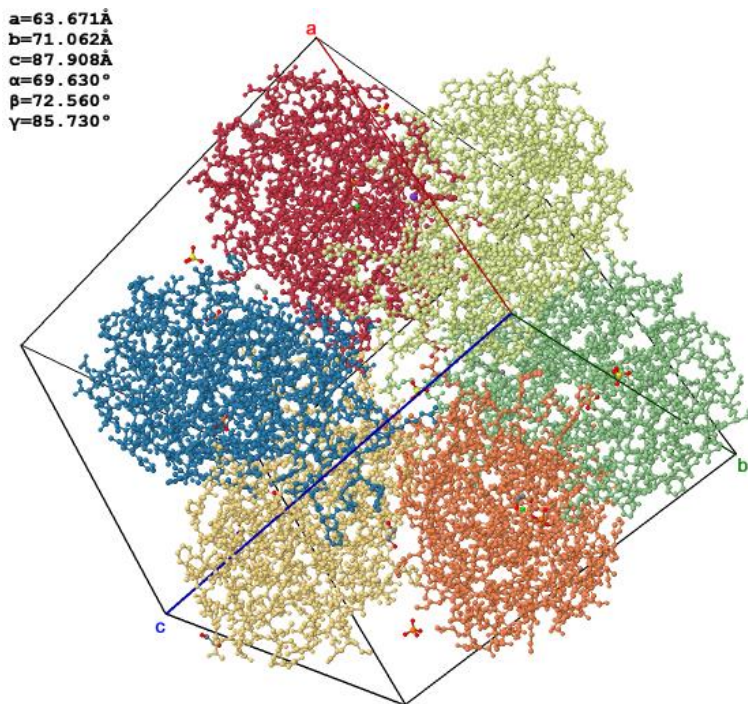


Рисунок 12. Схематическое изображение кристаллической упаковки гексамера комплекса уридинфосфорилазы с уридином в элементарной ячейке (ID PDB: 5M2T). Пространственная группа P1.

Пространственная группа симметрии кристаллов комплексов уридинфосфорилазы с тимидином, тиминном, цитозином и 6-метилурацилом соответствует P2₁. На независимую часть ячейки приходится гексамер уридинфосфорилазы. Содержание растворителя в ячейке меняется от 43,87% до 45,75%, а коэффициент Мэтьюса 2,19-2,27 Å³/Да во всех структурах комплексов. Кристаллографические контакты для вероятных акцепторов и доноров водородных связей атомов белка с расстояниями, не превышающими 3,2 Å, приведены в таблице 8.

Таблица 8. Контакты между гомодимерами, связанные кристаллографической симметрией, гексамерной молекулы на примере *VchUPh* в комплексе с цитозином (ID PDB: 5EPU).

Атомы остатков, образующих кристаллографические контакты	Расстояние, Å.	Оператор преобразования симметрии
Glu 145A O – Phe 42D N	2,83	X, Y, Z
Glu 145A OE2 – Gln 31D NE2	2,84	X, Y, Z
Lys 250A NZ – Gln 31D NE2	3,11	X, Y, Z
Gln 31B NE2 – Lys 250E NZ	3,08	X, Y, Z
Gln 31B NE2 – Glu 145E OE2	2,88	X, Y, Z
Phe 42B N – Glu 145E O	2,84	X, Y, Z
Gly 173B O – Gln 224E NE2	3,1	-X, Y+1/2,
Thr 223B O-His 230E N	2,87	-X, Y+1/2,
Gln 224B O – Ala 231E N	2,87	-X, Y+1/2,
Glu 145C O – Phe 42F N	2,82	X, Y, Z
Glu 145C OE2 – Gln 31F NE2	2,91	X, Y, Z
Gly 173C O – Gln 224F NE2	3,05	-X, Y+1/2,
Thr 223C O – His 230F N	2,89	-X, Y+1/2,
Gln 224C O – Ala 231F N	2,89	-X, Y+1/2,
Lys 250C NZ – Gln 31F NE2	3,11	X, Y, Z
Gln 31D NE2 – Lys 250A NZ	3,11	X, Y, Z
Gln 31D NE2 – Glu 145A OE2	2,84	X, Y, Z
Phe 42D N – Glu 145A O	2,83	X, Y, Z
Glu 145E O – Phe 42B N	2,84	X, Y, Z
Glu 145E OE2 – Gln 31B NE2	2,88	X, Y, Z
Gln 224E NE2 – Gly 173B O	3,1	-X, Y+1/2,
His 230E N – Thr 223B O	2,87	-X, Y+1/2,
Ala 231E N – Gln 224B O	2,87	-X, Y+1/2,
Lys 250E NZ – Gln 31B NE2	3,08	X, Y, Z
Gln 31F NE2 – Glu 145C OE2	2,91	X, Y, Z
Gln 31F NE2 – Lys 250C NZ	3,11	X, Y, Z
Phe 42F N – Glu 145C O	2,82	X, Y, Z
Gln 224F NE2 – Gly 173C O	3,05	-X, Y+1/2,

His 230F N – Thr 223C O	2,89	-X, Y+1/2,
Ala 231F N – Gln 224C O	2,89	-X, Y+1/2,

Схематическое изображение кристаллической упаковки гексамеров комплекса уридинфосфорилазы с цитозином приведено на рисунке 13.

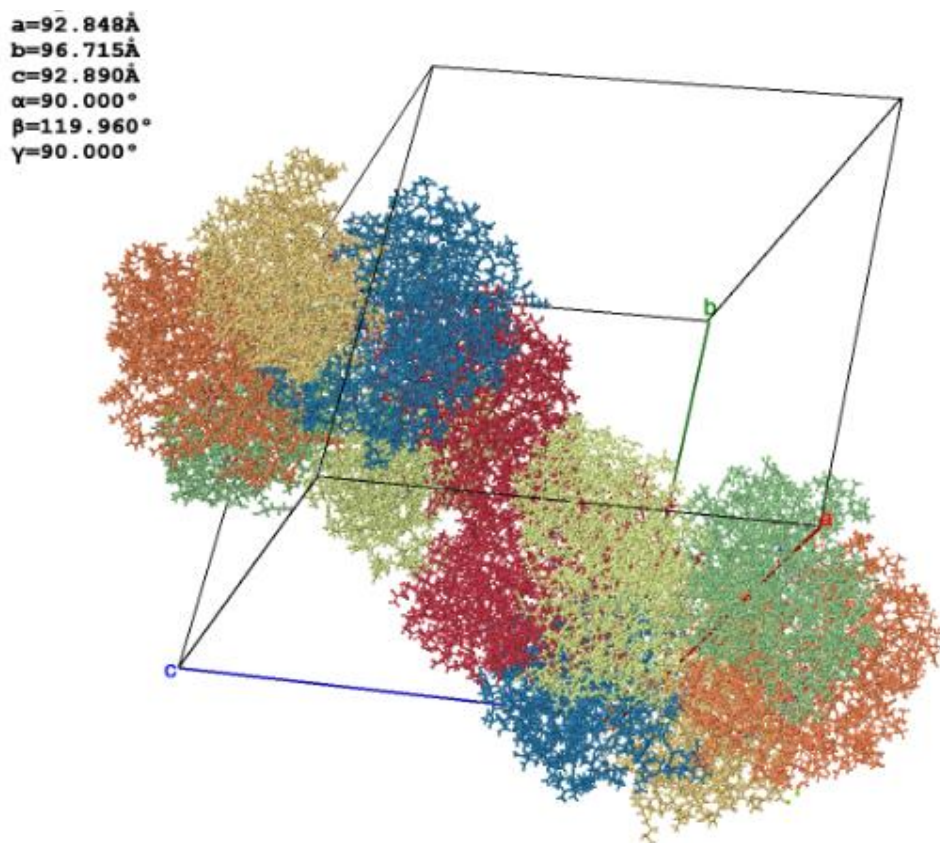


Рисунок 13. Схематическое изображение кристаллической упаковки гексамера комплексов уридинфосфорилазы с цитозином в элементарной ячейке (ID PDB: 5ERU). Пространственная группа $P2_1$.

3.2 Описание структурной организации *VchUPh*.

3.2.1 Четвертичная структура молекулы фермента *VchUPh*

Четвертичная структура всех рассмотренных в этой работе комплексов *VchUPh* с лигандами представляет собой гексамер (см. рис. 14). Он сформирован шестью

гомологичными субъединицами. Наружный диаметр тороидального гексамера составляет приблизительно 106 Å.

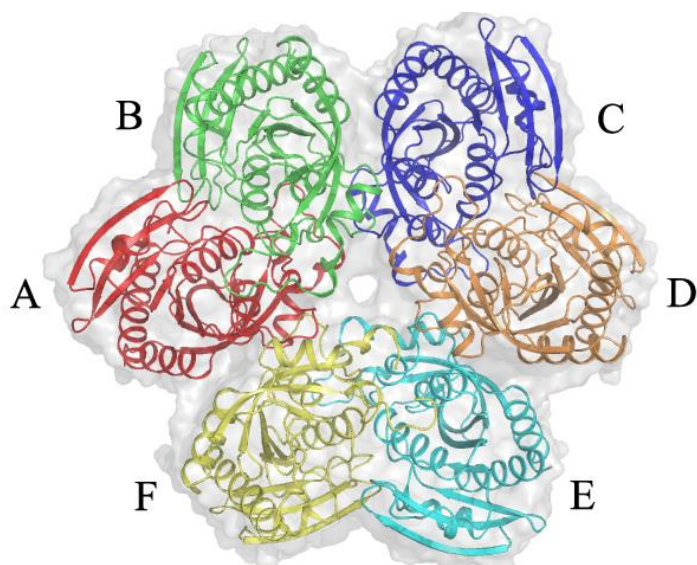


Рисунок 14. Четвертичная структура молекулы фермента *VchUPh*.

Гексамерная структура молекулы комплексов *VchUPh* с лигандами стабилизируется вандерваальсовым, гидрофобным взаимодействием и водородными связями между аминокислотными остатками смежных гомодимеров. Например, интерфейс между В и С субъединицами в комплексе *VchUPh* с тимидином представлен:

а) Вандерваальсовыми взаимодействиями: O_Thr110/B– 3,03 Å– CG2_Val130/C, O_Arg114/B – 3,14 Å– CG_Glu126/C, CB_Glu126/B – 3,19 Å– O_Arg114/C, CG_Glu126/B – 3,09 Å– O_Arg114/C, CG1_Val130/B– 2,41 Å– CG1_Val130/C, CG2_Val130/B– 3,02 Å– O_Thr110/C, CA_Val113/B– 3,24 Å– O_Glu126/C, O_Arg114/B – 3,23 Å– CB_Glu126/C, O_Glu126/B – 3,32 Å– CA_Val113/C, O_Glu126/B – 3,20 Å– CA_Val113/C, CA_Met189/B– 3,40 Å– O_Ser207/C, CA_Met189/B– 3,34 Å– CA_Ser207/C, O_Ser207/B– 3,34 Å– CA_Met189/C.

б) водородными связями: N_ Arg114/B– 2,86 Å– O_ Glu126/C; O_ Glu126/B– 2,79 Å– N_ Arg114/C; O_ Met189/B– 2,99 Å– O_ Ala206/C; O_ Ala206/B– 3,05 Å– O_ Met189/C.

Гидрофобные аминокислоты формируют большинство контактов между димерами, образуя скелет гексамера. Помимо межгомодимерных контактов между соседними субъединицами, в молекуле энзима присутствуют водородные связи между субъединицами связанными осью симметрии третьего порядка.

Для субъединиц AC: NH2_Arg174/A - 2,95 Å – O_Asp188/C, NE_Arg177/A - 3,42 Å – OE1_Glu185/C, NE_Arg177/A - 2,80 Å – OE2_Glu185/C, NH1_Arg177/A – 3,08 Å – O_Arg177/C, NH1_Arg177/A – 3,47 Å – O_Arg178/C, NH1_Arg174/A - 3,50 Å – O_Asp188/C, NH2_Arg177/A – 3,35 Å – O_Arg178/C, NH2_Arg177/A – 2,83 Å – O_Gln180/C, NH2_Arg177/A – 2,55 Å – OE1_Glu180/C, NH2_Arg177/A – 3,19 Å – OE2_Glu180/C;

для субъединиц BD: O_Arg177/B - 3,00 Å – NH1_Arg177/D, O_Arg178/B - 3,36 Å – NH1_Arg177/D, O_Arg178/B - 3,42 Å – NH2_Arg177/D, O_Gln180/B - 3,55 Å – NH1_Arg177/D, O_Gln180/B - 2,78 Å – NH2_Arg177/D, OE1_Glu185/B - 3,51 Å – NE_Arg177/D, OE1_Glu185/B - 2,53 Å – NH2_Arg177/D, OE1_Glu185/B - 2,78 Å – NE_Arg177/D, OE2_Glu185/B - 3,19 Å – NH2_Arg177/D, OE2_Glu185/B - 2,79 Å – NE_Arg177/D, O_Asp188/B - 3,09 Å – NH2_Arg174/D.

Площадь межгомодимерного взаимодействия в молекуле *VchUPh* равна 1017 Å², свободная энергия сольватации равна -20,4 ккал/моль (PDBePISA [176]).

Каждый гомодимер молекул комплексов *VchUPh* с лигандами формируется за счет вандерваальсового, гидрофобного взаимодействия и водородных и ионных связей.

а) Вандерваальсовы взаимодействия

CA_Pro71/B– 3,09 Å– O_Asp159/A, CB_Pro71/B– 3,03 Å– O_Asp159/A, OE2_Glu78/B– 3,19 Å– CA_Thr170/A, OE2_Glu78/B– 3,19 Å– CB_Thr170/A, O_Leu115/B– 3,14 Å– CE1_His121/A, CA_Gly117/B– 3,09 Å– OD_Asp159/A, CE1_His121/B– 3,18 Å – O_Leu115/A, CE1_His121/B– 3,16 Å – OG_Ser158/A, OG_Ser158/B– 3,18 Å – CE1_His121/A, O_Asp159/B– 3,06 Å – CA_Pro71/A, O_Asp159/B– 3,03 Å – CB_Pro71/A, OD2_Asp159/B– 3,08 Å– CA_Gly117/A, CG_Pro71/B– 3,33 Å– O_Asp159/A, CG_Glu79/B– 3,37 Å– OH_Tyr162/A, CD_Glu79/B– 3,29 Å– OH_Tyr162/A, CZ_Arg86/B– 3,28 Å–CE1_Phe171/A, C_Gly117/B– 3,34 Å– OD2_Asp159/A, O_His121/B– 3,36 Å– CB_Pro163/A, O_His121/B– 3,30 Å– CG_Pro163/A, O_His121/B– 3,39 Å–CG1_Val176/A, CR1_His121/B– 3,31 Å– N_Asp159/A, N_Asp159/B – 3,40 Å– CE1_His121/A, N_Asp159/B – 3,38 Å– CG_Pro71/A, OD2_Asp159/B – 3,31 Å– C_Gly117/A, OH_Tyr162/B– 3,38 Å– CG_Glu79/A, OH_Tyr162/B– 3,29 Å– CD_Glu79/A, OH_Tyr162/B– 3,40 Å– CD2_Phe6/A, CB_Pro163/B– 3,34 Å– O_His121/A, CG_Pro163/B– 3,30 Å– O_His121/A, CA_Gly117/B– 3,37 Å– ND1_His121/A, OE2_Glu78/A– 3,23 Å– CA_Thr170/B, OE2_Glu78/A– 3,20 Å– CB_Thr170/B, CZ_Arg86/A– 3,31 Å–CE1_Phe171/B, O_Ser208/A– 3,29 Å–CE2_Phe171/B, O_Ser208/B– 3,24 Å–CE2_Phe171/A.

б) водородные связи

OE2_Glu48/B– 2,74 Å– N_Ile68/A, N_Ile68/B– 2,71 Å–OE2_Glu48/A, OE2_Glu78/B– 2,72 Å– N_Phe171/A, OE2_Glu79/B– 2,50 Å– N_Tyr162/A, O_Leu115/B– 2,92 Å– NE2_His121/A, NE2_His121/B– 2,98 Å– O_Leu115/A, ND1_His121/B– 2,67 Å– OG1_Thr160/A, OD2_Asp159/B– 3,18 Å– OD2_Asp159/A, OG1_Thr160/B– 2,72 Å– ND1_His121/A, OH_Tyr162/B– 2,53 Å– OE1_Glu79/A, N_Phe171/B– 2,71 Å– OE2_Glu78/A, NH2_Arg174/B– 3,08 Å– O_Ser207/A, NH2_Arg174/B– 2,63 Å– O_Ser207/A, O_Ser207/B – 2,78 Å– O_NH2_Arg174/A.

в) ионные связи, опосредованные через Na⁺ между субъединицами (подробнее см. в пункте 3.2.3)

$\text{Na}^+-2,80 \text{ \AA} - \text{OE2_Glu48/B}$, $\text{Na}^+-2,95 \text{ \AA} - \text{O_Ple68/B}$, $\text{Na}^+-2,88 \text{ \AA} - \text{OG_Ser72/B}$,
 $\text{Na}^+-2,79 \text{ \AA} - \text{OE2_Glu48/A}$, $\text{Na}^+-2,98 \text{ \AA} - \text{O_Ple68/A}$, $\text{Na}^+-2,90 \text{ \AA} - \text{OG_Ser72/A}$.

Площадь межсубъединичного взаимодействия с учетом ионом натрия равная 1905 \AA^2 , значение свободной энергии сольватации равно $-20,2$ ккал/моль по данным PDBеPISA [176]. Это значение больше по модулю значения для ранее исследованных в [126, 127] уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* (StUPh) (ID PDB: 3DPS) равное $-15,6$ ккал/моль.

3.2.2 Третичная, вторичная и первичная структуры молекулы комплексов *VchUPh*.

Укладка элементов вторичной структуры в субъединице соответствует трехслойной сэндвич-архитектуре - $\alpha\beta$ по классификации Россмана [139]. Мономер молекулы состоит из восьми β -стрендов, которые образуют три β -листа (антипараллельный, состоящий из β -стрендов S1 и S2; параллельный, состоящий из β -стрендов S4 и S1; параллельный, состоящий из β -стрендов S5 и S8;), в окружении семи h-спиралей.

По данным программы DSSP [177] структура молекулы *VchUPh* на 32% состоит из h-спиралей и на 28 % из β -стрендов (см. рис. 15). 253 аминокислотных остатка формируют субъединицу гексамерной молекулы *VchUPh* молекулярной массой 27,5 кДа. [140]. Гидрофобные аминокислотные остатки распределяются по всей субъединице и играют определяющую роль в формировании структурного остова молекулы.

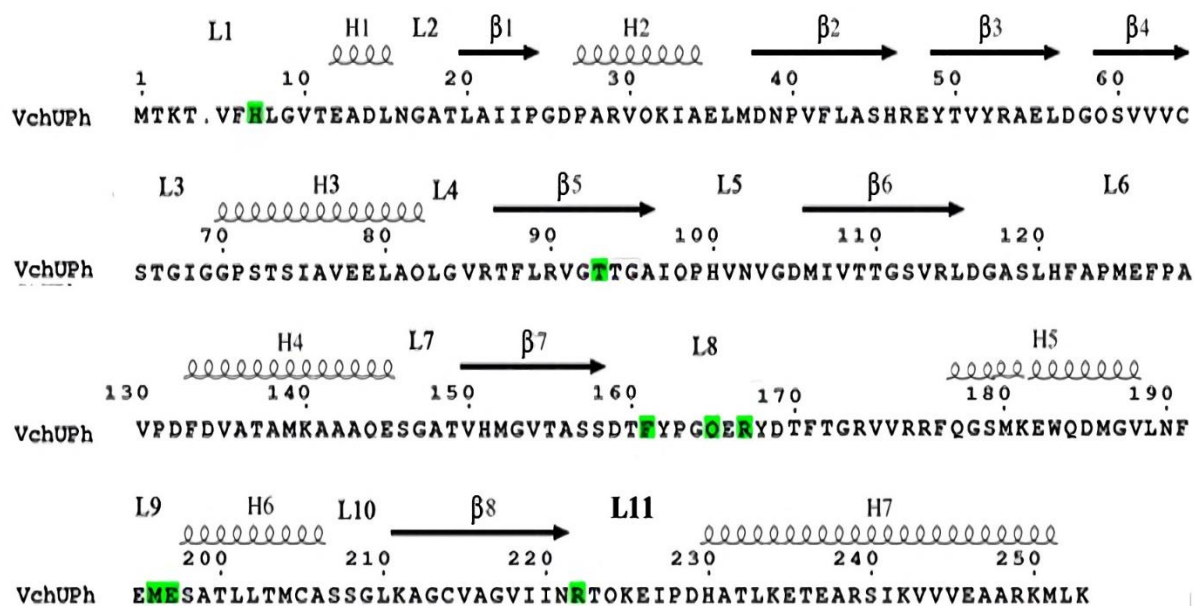


Рисунок 15. Первичная последовательность аминокислотных остатков и элементов вторичной структуры *VchUPh*. Аминокислотные остатки, входящие в активный центр фермента выделены зеленым.

3.2.3 Ион Na^+

В межмономерной области каждого гомодимера гексамерной молекулы локализован ион Na^+ (см. рис. 16). Его координируют атомы боковых цепей аминокислотных остатков Glu48, Ser7, карбонильный кислород Пе68 одной субъединицы *VchUPh* и симметричные (L_2) им одноименные аминокислотные остатки соседней субъединицы гомодимера. Связывающие Na^+ атомы кислорода аминокислотных остатков расположены в вершинах искаженного октаэдра.

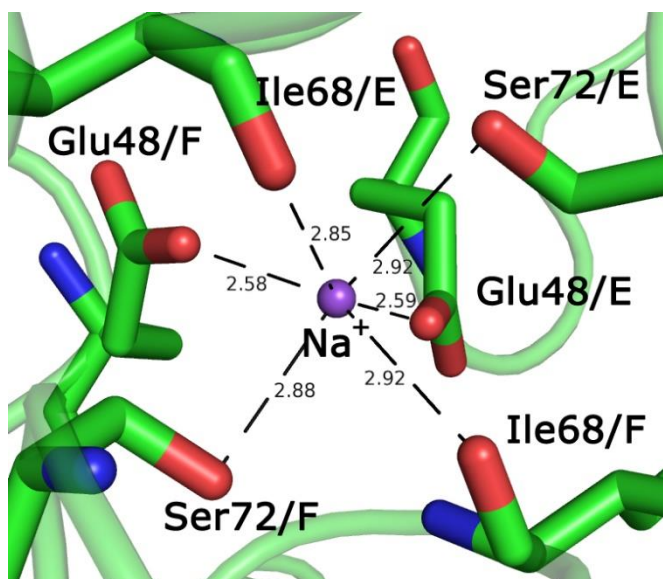


Рисунок 16. Ион натрия в окружении аминокислотных остатков *VchUPh*.

Расстояния от иона Na^+ до атомов а.о. (для димера АВ) в структуре комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW): Na^+ –2,59 Å – OE2_ Glu48/E, Na^+ –2,85 Å – O_ Ile68/E, Na^+ –2,92 Å – OG_ Ser72/E, Na^+ –2,58 Å – OE2_ Glu48/F, Na^+ –2,92 Å – O_ Ile68/F, Na^+ –2,88 Å – OG_ Ser72/F. Идентичные контакты ион натрия образует с атомами а.о. в структурах комплексов *VchUPh* с урацилом, уридином, фосфат-анионом, тиминном, 6-метилурацилом и цитозином.

В статьях [5, 127] описаны структуры бактериальных уридинфосфорилаз содержащие ион K^+ в описываемой межмономерной области. Для сравнения положений ионов Na^+ и K^+ в структурах и влияния их на конформацию а.о. фермента проведена суперпозиция структур комплексов *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином (ID PDB: 3FWP (Cruickshank DPI = 0,15 Å) [127] и *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW). А.о., связывающие ион Na^+ , полностью идентичны а.о., связывающим ион K^+ . Расстояние между ионом K^+ и Na^+ при суперпозиции структур (ID PDB: 3FWP и 4LZW) равно 0,180 Å, а среднеквадратичное отклонение между координатами атомов аминокислотных остатков, с которыми взаимодействуют ионы (Glu48/E, Glu48/F, Ser72/E, Ser72/F, Ile68/E, Ile68/F в комплексе *VchUPh* с тимидином и соответствующие им в *StUPh*), равно 0,484 Å.

Как видно из приведенного сравнения, пространственное расположение а.о. ферментов вблизи ионов (Na^+ или K^+) аналогично.

3.2.4 Сайты связывания *VchUPh*.

На каждый гомодимер молекулы *VchUPh* приходится два одинаковых энзиматических центра, расположенных в каньонах межмономерного интерфейса гомодимера энзима (см. рис. 17).

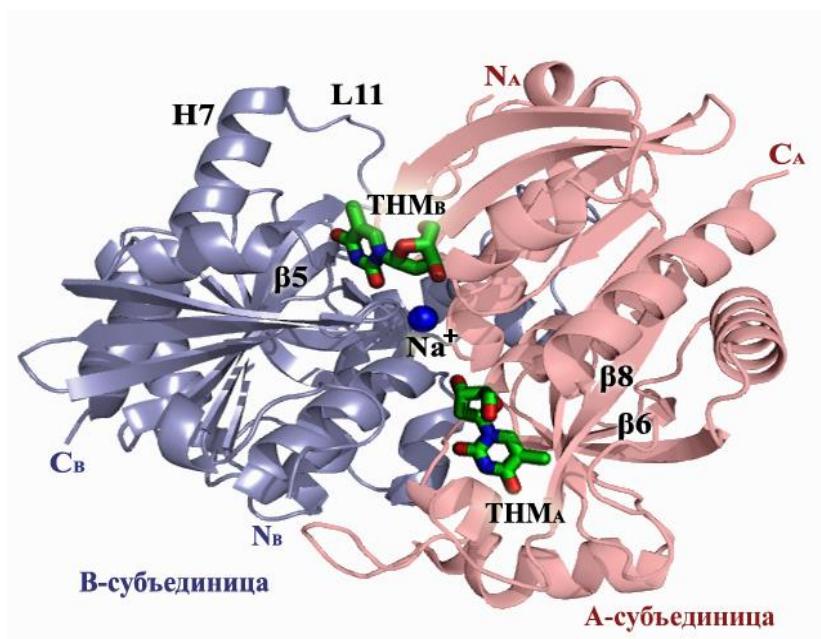


Рисунок 17. Пространственная организация АВ-гомомера комплекса *VchUPh* с тимидином (ТНМ) в ферментативных сайтах и ионом натрия (Na^+) в межсубъединичной области. N – конец и С – конец обозначены буквами N и С соответственно. На рисунке обозначены элементы вторичной структуры, упоминаемые в дальнейшем в тексте.

Входы в активные центры смежных субъединиц в гомодимере находятся на противоположных сторонах экваториальной плоскости гексамера и удалены друг от друга на 20 Å аналогично другим бактериальным УФ. Энзиматический центр состоит из фосфат-связывающего и нуклеозид-связывающего сайтов, последний из которых, в свою очередь, делится на урацил- и рибозо-связывающую части. Сайты

связывания субстратов формируются аминокислотными остатками обеих субъединиц гомодимера (см. рис. 17). Аминокислотные остатки, формирующие энзиматический сайт *VchUPh*, высококонсервативны среди всех бактериальных УФ и аналогичны тем, которые рассмотрены на примере *EcUPh* в пункте 1.6.1 литературного обзора. Сайт связывания будем далее обозначать литерой той субъединицы гомодимера, которая делегирует в него большее количество аминокислотных остатков. Более детально сайты связывания *VchUPh* описаны в параграфах посвященных субстратной специфичности.

3.3 Конформационные изменения структуры *VchUPh* при связывании с лигандом.

3.3.1 *Петля-шлагбаум в структурах комплексов *VchUPh*.*

В статьях [5, 124, 127] описывается, что петля бактериальных уридинфосфорилаз (L11 для *VchUPh*), (см. рис. 15, 17) играет роль “шлагбаума”, который регулирует доступ нуклеозидных субстратов в активный центр энзима [5, 124, 127]. В этих публикациях авторы приходят к выводу, что петля может находиться в трёх функциональных состояниях: открытом, закрытом и промежуточном [5, 124, 127]. При открытой конформации петля экспонирована в растворитель и, тем самым, не препятствует доступу молекул субстрата в активный сайт. Находясь в закрытой конформации, петля посредством взаимодействия с а.о. поверхности белка (Tyr168 и Asp169) перекрывает доступ молекул субстрата в активный центр. Петля-шлагбаум L11 (см. рис. 17) участвует в процессе прохождения молекул субстратов в активный центр *VchUPh* и включает а.о. с 222 до 230 (см. рис. 15). Отметим, что следующие за L11 а.о. с 231 по 233 конформационно лабильны и для этого участка невозможно идентифицировать определенную вторичную структуру: она становятся либо продолжением петли L11, либо началом h7-спирали. В статье [5], обращается внимание на согласованное движение петли-шлагбаума с движением

β 5-стренда (87-96 а.о. по нумерации *VchUPh*) и параллельного ему β 8-стренда (211-221 а.о.) (см. рис. 15, 17).

Отметим, что зависимости между положением петли L11 и энергией сольватации межсубъединичного интерфейса для рассмотренных в этой диссертации молекул комплексов *VchUPh* не обнаружено, в отличие от молекулы уридинфосфорилазы из *Shewanella oneidensis* [132]. Наши выводы базируются, на основе структуры комплекса *VchUPh* с урацилом: АВ - субъединицы (А - открыта, В - закрыта) – 24,0 ккал/моль. CD - субъединицы (обе открыты) - 19,4 ккал/моль. EF субъединицы (Е - закрыта, F – открыта) соответственно – 20,0 ккал/моль. Подобные результаты были получены и для других рассмотренных в диссертации структур комплексов *VchUPh*.

3.3.2 Петля L11 молекулы *VchUPh* в нелигандированном состоянии.

Петля L11 всегда открыта в случае отсутствия молекул лигандов в сайтах связывания энзима (нелигандированная *VchUPh* (ID PDB: 3O6V); нелигандированные субъединицы С, D комплекса *VchUPh* с урацилом, (ID PDB: 4OEH); нелигандированные субъединицы А, D комплекса *VchUPh* с фосфат-анионом (ID PDB: 4IP0). Пе220, входящий в β 8-стренд препятствует закрыванию петли L11 в апоформе *VchUPh* посредством вандерваальсового взаимодействия с Са атомом Pro228 петли L11, характеризующегося расстоянием между взаимодействующими атомами менее 3 Å. Следует отметить, что Val221 в уридинфосфорилазах из *Escherichia coli* (ID PDB:1RXS и 1RXU), *Salmonella typhimurium* (ID PDB: 3FWP), *Homo sapiens* (hUPP1, hUPP2) (ID PDB:2XRF, 3EUE), и *Shewanella oneidensis* MR-1 (ID PDB:4R2W), находящийся на месте Пе220 в *VchUPh*, из за меньшего объема боковой группы (3 алкильных атома углерода против 4-х) не препятствует закрытию петли в нелигандированном состоянии.

3.3.3 Конформация петли L11 VchUPh при наличии субстратов прямой/обратной реакции в активном сайте энзима.

Конформация петли-шлагбаума L11 закрыта в В-, F-субъединицах структуры комплекса VchUPh с уридином, (ID PDB: 5C80); В-, E-субъединицах структуры комплекса VchUPh с уридином (ID PDB: 5M2T); А-, F-субъединицах структуры комплекса VchUPh с тимидином (ID PDB: 4LZW); В-, E-субъединицах структур комплексов VchUPh с урацилом, (ID PDB: 4OEH, 5MIW); А-, F-субъединицах структуры комплекса VchUPh с тиминном (ID PDB: 4OGL), В- и С-субъединицах структуры комплекса VchUPh с 6-метилурацилом (ID PDB: 4K6O), В- и С-субъединицах структуры комплекса VchUPh с цитозином (ID PDB: 5EPU), А-, D-субъединицах структуры комплекса VchUPh с цитидином и цитозином (ID PDB: 5LOK). В частности, в В-субъединице структуры комплекса VchUPh с урацилом (ID PDB: 4OEH) петля L11 контактирует посредством водородных связей с поверхностью той же субъединицы: NE_Arg167/В - 2,93 Å – O_Glu226/В; NH2_Arg167/В - 2,73 Å - O_Glu227/В; N_Tyr168/В - 2,79 Å - OE2_Glu226/В и N_Asp169/В - 2,95 Å - OE1_Glu226/В. В остальных случаях закрытой конформации петли L11 водородные связи между а.о. аналогичны

В-фактор атомов петли в закрытой конформации в полтора раза выше среднего по структуре. Так, в структуре комплекса VchUPh с урацилом средняя изотропная компонента температурного фактора основной цепи а.о. петли L11 в закрытой конформации в В субъединице - 23,90 Å², в открытой конформации в субъединице С - 37,72 Å², а атомов основной цепи всей структуры равен 17,18 Å². В открытой конформации атомы петли L11 характеризуются значением изотропной компоненты В-фактора в 2-4 раза выше по сравнению со средним по структуре во всех рассматриваемых комплексах. Причем, максимальные значения изотропной компоненты температурного фактора приходятся на атомы 228-231 а.о. (средняя изотропная компонента температурного фактора для основной цепи этого

диапазона а.о. равен $49,52 \text{ \AA}^2$). Изменение В-факторов а.о. L11 при изменении конформации петли согласуется с ранее описанными в [5, 124, 127].

В структуре комплекса *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T) в субъединице E, благодаря атомному разрешению $1,03 \text{ \AA}$, впервые обнаружено двойное положение а.о. фрагментов петли L11 и прилегающей к ней h7-спирали: с 228 номера а.о. по 237 (см. рис. 18). При этом петля находится в закрытой конформации в обоих случаях двойного положения, т.к. Glu226/E имеет характерные водородные связи с Arg167/E, Tyr168/E и Asp169/E (см. выше), что говорит о том, что даже в закрытом состоянии эти фрагменты петли и h7-спирали обладают большой конформационной подвижностью. Заселенность атомов двойных положений равна 0,58 и 0,42. Отметим, что водородные связи петли L11/E с соседними молекулами отсутствуют. Причиной двойного положения этого участка фермента послужило образование водородной связи His230/E с Phe6/F: NE2_His230/E – $2,79 \text{ \AA}$ – O_Phe6/F. При таком положении основная цепь петли смещена до $\sim 2,6 \text{ \AA}$ ближе к сайту связывания по сравнению с другим двойным положением, характеризующее традиционное закрытое положение петли, которое описывалось выше.

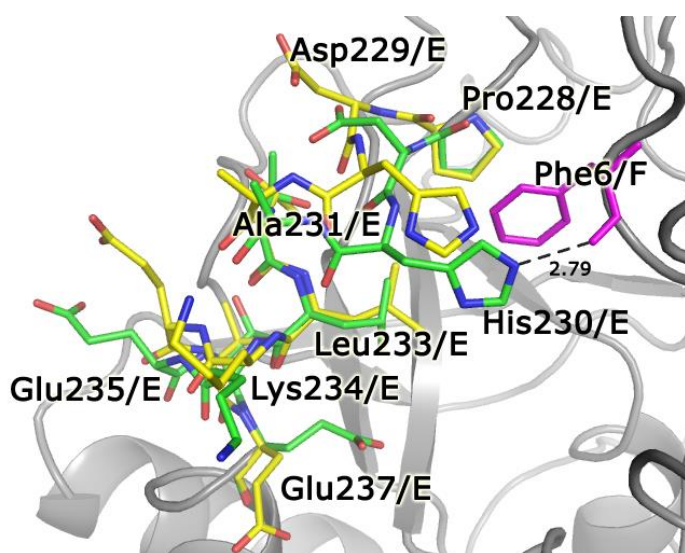


Рисунок 18. Двойное положение а.о. фрагментов петли L11 и прилегающей к ней h7-спирали: с 228 номера а.о. по 237. Желтым цветом выделены углероды

традиционного положения третичной структуры при закрытой конформации петли L11, зеленым – новое.

В то же время, в В-субъединице структуры комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW); в А- и F-субъединицах структуры комплекса *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 4OEH); в А- и D-субъединицах структурах комплексов *VchUPh* с 6-метилурацилом и цитозином (ID PDB: 4K6O, 5EPU); в В, С, Е, F субъединицах структуры комплекса *VchUPh* с цитидином и цитозином (ID PDB: 5ЛОК), в А, С, D, F субъединицах структур комплексов *VchUPh* с уридином и урацилом (ID PDB: 5M2Т, 4OEH), а также в комплексе *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5С80) в А, С, D, Е субъединицах петля находится в открытой конформации, не смотря на связывание фермента с пиримидиновыми лигандами (см. рис. 19). Таким образом, в исследуемых структурах, не смотря на наличие лиганда в нуклеозид связывающем сайте, присутствуют как закрытые, так и открытые конформации петли.

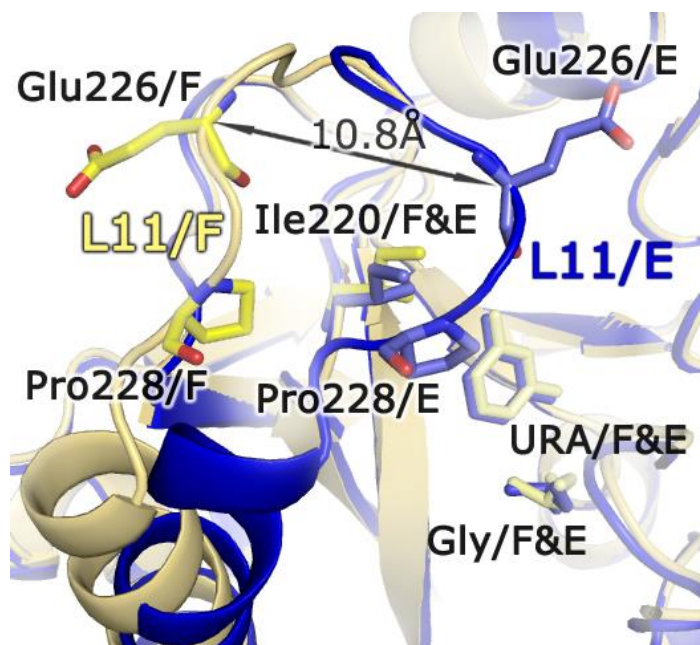


Рисунок 19. Суперпозиция пространственных структур F и E субъединиц комплекса *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 4OEH). Положение петель соответствует

открытой (L11/F) и закрытой конформации (L11/E). Стрелкой показано расстояние между C α -атомами Glu226 открытой и закрытой конформации петли.

Таким образом, нахождение молекулы пиримидинового (URA, TDR, 6MU, CYT) либо нуклеозидного (URI, THM) субстрата в нуклеозид связывающем сайте является необходимым, но недостаточным условием закрытого состояния петли L11, при свободном состоянии фосфат связывающего сайта. При этом, в структурах комплексов УФ с анионом фосфата петля L11 всегда находится в закрытом положении в присутствии аниона фосфата в сайте связывания.

3.3.4 Фосфат-связывающий сайт. Влияние фосфат-аниона на конформацию аминокислотных остатков сайта связывания

Фосфат-связывающий F-сайт EF-гомодимера молекулы *VchUPh* формируется гидрофильными аминокислотными остатками, четыре из которых относятся к F-субъединице (Thr93/F, Gly25/F Arg29/F, Arg90/F) и Arg47/E – к E-субъединице (см. рис. 20а). Взаимодействие фосфат-аниона с атомами фосфат-связывающего F-сайта (см. рис. 20а) комплекса *VchUPh* с фосфат-анионом (ID PDB: 4IP0) осуществляется посредством водородных связей: O3_PO4/F-2,76Å- NH2_Arg90/F; O4_PO4/F- 2,99 Å -NH1_Arg90/F; O2_PO4/F-2,67Å -OG1_Thr93/F; O3_PO4/F-2,88Å-N_Thr93/F; O3_PO4/F-3,17Å- OG1_Thr93/F; O2_PO4/F-2,84Å-NH2_Arg47/E; O1_PO4/F-2,86Å– NH1_Arg47/E; O2_PO4/F -2,71Å–NH2_Arg29/F; O4_PO4/F 2,79 Å–NH1_Arg29/F; O4_PO4/F-2,82Å–N_Gly25/F.

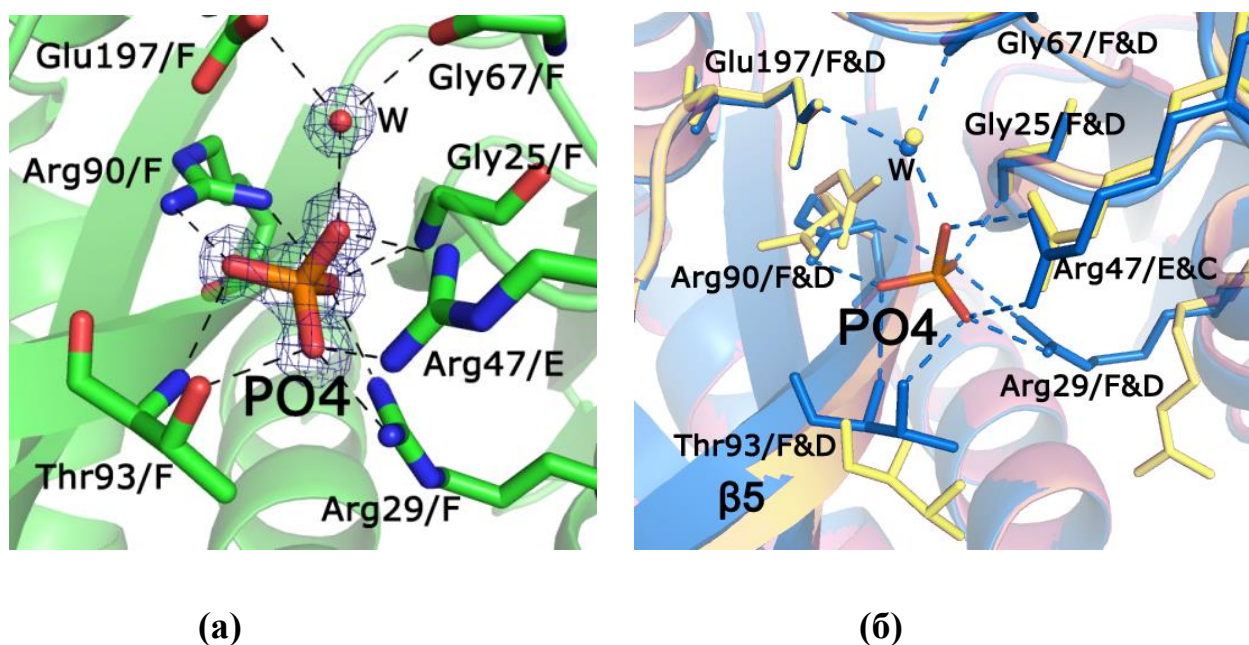


Рисунок 20. Пространственная организация фосфат связывающего сайта активного центра комплекса *VchUPh* с фосфат-анионом (ID PDB: 4IP0). Карта электронной плотности с коэффициентами $2mF_o - DF_c$ изображена при уровне срезки $1,5\sigma$. (а). Суперпозиция а.о. фосфат-связывающего сайта и $\beta 5$ -стренда в свободном состоянии (желтый) и лигандированным (синий) анионом фосфата (PO4) (б).

Кроме того, фосфат-анион через молекулу структурированной воды связан водородными связями как с Gly67/F, так и с Glu197/F: O1_PO4/F - 2,58 Å - H₂O - 2,84 Å - O_Gly67/F; O1_PO4/F - 2,58 Å - H₂O - 2,83 Å - OE2_Glu197/F (Рисунок 4а). Фосфат-связывающие сайты субъединиц А, D и E структуры комплекса *VchUPh* с фосфат-анионом (ID PDB: 4IP0) не лигандированы, либо заняты неспецифичными лигандами - молекулами глицерина, либо трис(гидроксиметил)аминометана.

В фосфат-связывающих сайтах субъединиц В, С, и F комплекса *VchUPh* локализован фосфат-анион, имеющий полную заселенность. В активном центре E-субъединицы этой структуры локализован сульфат-анион, а фосфат-связывающие сайты А- и D-субъединиц этой структуры находятся в нелигандированном состоянии.

R.m.s.d. координат атомов аминокислотных остатков, формирующих фосфат-связывающий сайт *VchUPh*, лигандированного ионом фосфата в субъединице F и в свободном состоянии в субъединице D равно 1,6 Å. Максимальное среднеквадратичное отклонение координат атомов фосфат-связывающего сайта наблюдается у боковой группы Arg29/D равно 4,1 Å. В нелигандированном ионе фосфата сайте связывания Arg29/D образует водородную связь с карбоксилем основной цепи Glu237/D: O_Glu237/D - 2,92 Å –NH₂_Arg29/D. Конформация боковой группы Arg29/D претерпевает существенные изменения при связывании фермента с фосфат-анионом. Боковые группы Arg47/D и Arg90/D также подвергаются конформационным изменениям (см. рис. 20б). R.m.s.d. координат атомов боковых групп Arg47/F и Arg47/D равно 0,7 Å, а боковых групп Arg90/F и Arg90/D - 1,5 Å.

R.m.s.d. координат C α -атомов а.о. фосфат-связывающего сайта *VchUPh* лигандированного анионом фосфата (F) и в свободном состоянии (D) равно 0,6 Å. При связывании с фосфат-анионом Thr93 смещается на 1,3 Å вглубь активного сайта вместе со смежными ему Gly92, Thr94, Gly95 аминокислотными остатками, образующими подвижный β 5-стренд (см. рис. 15, 17, 20б). Среднеквадратичное отклонение между координатами C α атомов а.о. Gly92, Thr94, Gly95 *VchUPh* лигандированного ионом фосфата (F) и в свободном состоянии (D) равно 1,3 Å, 0,9 Å, 0,8 Å соответственно.

Среднеквадратичное отклонение координат атомов боковых групп а.о. Arg29, Arg90 и Arg29 смежной субъединицы гомодимера в нелигандированных фосфатом сайтах субъединицах A и D равно 1,6 Å. В то время как r.m.s.d. координат атомов боковых групп аналогичных а.о. в лигандированных фосфатом в субъединицах F и C равно 0,7 Å. Таким образом, в нелигандированном состоянии сайта-связывания фосфата молекулы энзима конформация Arg29, Arg90, Thr93 и Arg47 варьируется от субъединицы к субъединице, но не совпадает с их конформацией в связанном

состоянии. Фосфат-анион же, стабилизирует подвижные а.о. фосфат-связывающего сайта в одной конформации в разных субъединицах.

3.3.5 Состояние активного центра и конформация петли L11 в случае связывания фосфат-аниона.

Для установления последовательности конформационных изменений активного центра фермента проанализированы лигандированные и нелигандированные состояния фрагментов $\beta 5$ -, $\beta 8$ - стрендов и петель L5 и L11 структуры комплекса *VchUPh* с анионом фосфата.

Arg90 и Thr93 (а с этими а.о. и участок $\beta 5$ -стренда с номерами а.о. 92-96) изменяют конформацию по сравнению с нелигандированным ферментом (см. рис. 20б) и смещаются в сторону лиганда (см. пункт 3.3.4). Изменение конформации $\beta 5$ -стренда приводит к смещению параллельного ему участка $\beta 8$ -стренда (а.о. 216-221) в сторону сайта связывания (r.m.s.d. между координатами C α атомов а.о. Ala216, Gly217, Val218, Ile219, Ile220, Asn221 *VchUPh* лигандированного анионом фосфата и в свободном состоянии равно 0,6 Å, 0,9 Å, 0,7 Å, 1,0 Å, 0,8 Å, 0,5 Å соответственно), а за этим аналогично фрагментов петли L5 и $\beta 6$ -стренда (а.о. 101-106) (r.m.s.d. между координатами C α атомов а.о. Val101, Asn102, Val103, Gly104, Asp105, Met106, *VchUPh* лигандированного анионом фосфата и в свободном состоянии равно 0,5 Å, 0,5 Å, 0,6 Å, 1,0 Å, 0,8 Å, 0,6 Å соответственно) (см. рис. 20б). Смещение фрагмента $\beta 8$ -стренда в свою очередь изменяет конформацию начального участка петли L11 (а.о. Arg222), фиксируя её в закрытом состоянии. При этом, как отмечено в пункте 3.3.3, установлено, что при связывании фосфат-аниона с а.о. активного центра (субъединицы В, С, F комплекса *VchUPh* с фосфат-анионом (ID PDB: 4IP0)) (см. рис. 20а) наблюдается только закрытая конформация петли L11.

Сохранение $\beta 5$ -стренда и петли L11 в закрытом состоянии фосфат-анионом происходит за счёт одновременного связывания фосфат-аниона, как с Arg90 и

Thr93 β 5-стренда, так и с Gly25 β 1-стренда (см. рис. 20). В отличие от фосфат-аниона рибозная компонента нуклеозидов, связывается лишь с Thr93 β 5-стренда [5], тем самым, положение β 5-стренда относительно β 1-стренда не постоянно и, как следствие, петля L11 может находиться не только в закрытой конформации (см. рис. 15, 17, 19).

Таким образом, именно фосфат-анион является вторым по счету субстратом, входящим в активный центр в случае прямой реакции, катализируемой уридинфосфорилазой, т.к. при его связывании а.о. фосфат-связывающего сайта петля L11 фиксируется в закрытой конформации, тем самым доступ нуклеозидов в сайт связывания становится невозможен. Кроме того, при связывании фосфат-аниона, сужается область активного центра между стрендами β 5 и β 1, что способствует протеканию ферментативной реакции (см. рис. 15, 17, 20б). Схема последовательности конформационных изменений фермента, инициированных связыванием субстратов прямой реакции, приведена на рисунке 21.



Рисунок 21. Схема последовательности конформационных изменений фермента, инициализированных связыванием субстратов прямой реакции.

3.3.6 Влияние кристаллической упаковки на конформацию петли L11.

В промежуточной конформации петля L11 C-субъединицы структуры комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW) не экспонирована в растворитель и формирует водородные связи с а.о. смежной гексамерной молекулы: NE2_Gln224/C-3,08 Å - O_Gly173/F*, OD1_Asp229/C-3,26 Å - O_Arg222/F*, N_His230/C-2,85 Å -O_Thr223/F*, N_Ala231/C-2,84 Å -O_Gln224/F* (*-аминокислотные остатки и субъединицы смежной молекулы гексамера) (см. рис. 22). Петля L11 C-субъединицы комплекса *VchUPh* с тимидином не формируют характерные для закрытого состояния водородные связи Glu226/C с Asp169/C и Tyr168/C; Glu227/C с Asp169/C, но образует водородные связи с другим а.о. той же

субъединицы: NE_Arg167/C - 2,77 Å – OE1_Glu226/C; NE_Arg167/C – 3,03 Å – NH2_Glu226/C. Петля L11 в F*-субъединице находится в закрытой конформации.

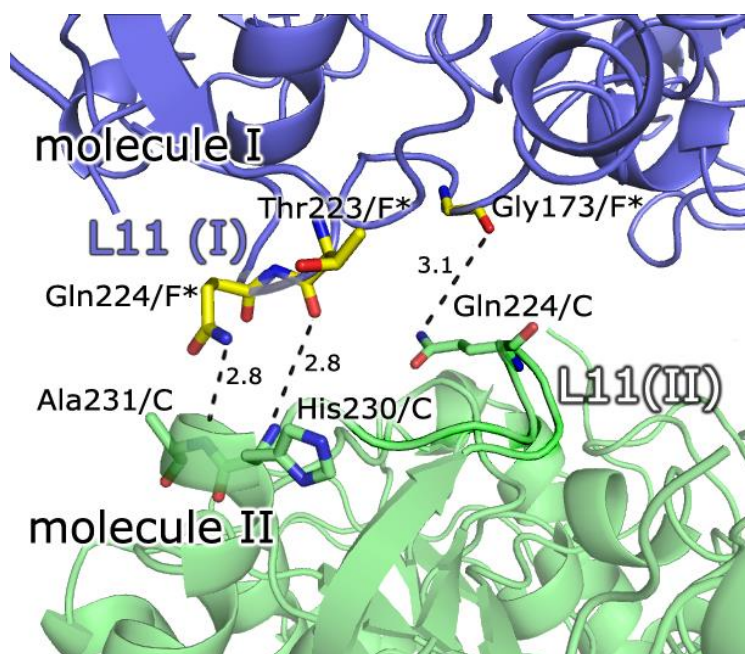


Рисунок 22. Аминокислотные остатки фрагмента С-субъединицы (molecule II) структуры комплекса *VchUPh* с тимидином, которые образуют водородные связи с субъединицей F* соседней гексамерной молекулы (molecule I). Участок петля L11 С субъединицы обозначен L11 (II), а F* субъединицы – L11 (I) (б)

Наибольшее влияние на положение петли оказывают описанные выше водородные связи между атомами основной цепи соседних молекул (С- и F*-субъединица). Наличие этих водородных связей меняет конформацию участка а.о. 228-231 петли L11 С-субъединицы (r.m.s.d. координат C α атомов а.о. Pro228, Asp229, His230, Ala231 промежуточной конформации петли в сравнении с закрытой равно 3,8 Å, 4,1 Å, 4,0 Å, 4,2 Å соответственно).

Деформации подвергается наиболее подвижный участок петли L11 (см. пункт 3.3.3). Петля L11 в F* субъединице соседней молекулы не деформирована и находится в полностью закрытой конформации из-за того, что взаимодействует малоподвижным участком (а.о. 222-228) с более подвижным участком петли (а.о. 229-231) в С субъединице. Таким образом, начало петли L11 одной субъединицы,

формируя контакты с концом петли другой субъединицы смежной молекулы, не позволяет Glu226 связаться с Tyr168 и Asp169. Таким образом, взаимодействие а.о. Ala231/C, His230/C петли L11 с а.о. Arg222/F*, Gln224/F* соседней молекулы не позволяет установить водородные Glu226/C с Tyr168/C и Asp169/C, характерные для закрытой конформации петли L11. L11 C-субъединицы, тем самым, пребывает в промежуточной конформации (см. рис. 22).

Аналогичная ситуация с промежуточной конформацией петли L11 наблюдается для D-субъединицы структуры комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4OGL); для субъединиц C и D структуры комплекса *VchUPh* с тиминном (ID PDB: 4OGL); для субъединиц E и F структур комплексов *VchUPh* с 6-метилурацилом (ID PDB: 4K6O) и цитозином (ID PDB: 5EPU), для уридинфосфорилаз из *Salmonella typhimurium* (ID PDB: 3FWP) и *Shewanella oneidensis* MR-1 (ID PDB:4R2W).

В процессе симуляции молекулярной динамики (МД) зафиксирован набор промежуточных состояний петли L11 отдельной молекулы *VchUPh* в растворе, однако время пребывания в таких состояниях было несоизмеримо меньшим по сравнению с временем нахождения петли в закрытой или в открытой конформации. Таким образом, экспериментальное выявление одной из промежуточных конформация петли L11 в *VchUPh* явилось следствием взаимодействия соседних молекул фермента в кристаллическом состоянии.

3.3.7 Двойные положения β -стрендов S5, S8 и петли L5

В некоторых рассмотренных структурах комплексов с нуклеозидами и их производными в определенных субъединицах локализованы лиганды с частичной заселенностью и в этих же субъединицах наблюдается двойное положение элементов вторичной структуры, прилежащих к активному центру. Рассмотрим их более подробно на примере структуры комплекса *VchUPh* с цитозином, имеющую

наиболее высокое разрешение среди структур, в которых локализованы все три участка элементов вторичной структуры, имеющие двойное положение.

Попарно сравнивая каждое из двойных положений фрагментов а) б) в) структуры комплекса *VchUPh* с цитозином с аналогичными участками структуры нелигандированной *VchUPh* (ID PDB: 3O6V) обнаружено (см. табл. 9), что **(а)** r.m.s.d. координат атомов а.о. 92-96 А-субъединицы между одним двойным положением участка структуры комплекса *VchUPh*+CYT (ID PDB: 5EPU) и аналогичным участком нелигандированного фермента *VchUPh* (ID PDB: 3O6V) - 0,193 Å, а между вторым двойным положением *VchUPh*+CYT и нелигандированным ферментом – 1,516 Å (рис); **(б)** для фрагментов структур с а.о. 217-221, r.m.s.d. координат атомов а.о. между одним из двойных положений *VchUPh*+CYT и нелигандированной структурой *VchUPh* равно - 0,233 Å, а между вторым – 1,047 Å; **(в)** для фрагментов структур с а.о. 101-105 среднеквадратичное отклонение координат атомов а.о. равно - 0,124 Å, а для другого двойного положения - 0,891 Å. Нумерация а.о. соответствует структуре комплекса *VchUPh* с цитозином. Таким образом, у одного из двойных положений каждого из фрагментов, а) б) в) структуры комплекса *VchUPh*+CYT нет структурных отличий в сравнении со структурой нелигандированной *VchUPh*.

Таблица 9. R.m.s.d. координат атомов а.о. двойных положений фрагментов β5- и β8-стрендов и петли L5 структур комплексов *VchUPh* с уридином, тимидином, урацилом, тиминном, цитозином, цитидином+цитозином и 6-метилурацилом (по столбцам) в сравнении с аналогичными участками структур *VchUPh*+URI (ID PDB: 5MIW) и нелигандированной *VchUPh* (ID PDB: 3O6V) (по строкам). При сравнении брались субъединицы структур комплексов, имеющие наибольшее количество участков вторичной структуры с двойным положением.

Фрагмент структуры Дв. положение структуры	нелигандированной, β5-стренд	нелигандированной, β8-стренд	нелигандированной, петля L5	<i>VchUPh</i> +URI, β5-стренд	<i>VchUPh</i> +URI, β5-стренд	<i>VchUPh</i> +URI, петля L5

<i>VchUPh</i> +CYT, отвечающее нелигандирован ному состоянию	0,19 Å	0,23 Å	0,12 Å	1,58 Å	1,27 Å	0,88 Å
<i>VchUPh</i> + CYT, отвечающее лигандированно му состоянию	1,52 Å	1,05 Å	0,89 Å	0,38 Å	0,44 Å	0,28 Å
<i>VchUPh</i> +URI, отвечающее нелигандирован ному состоянию	0,17 Å	0,19 Å	-	1,47 Å	0,87 Å	-
<i>VchUPh</i> +URI, отвечающее лигандированно му состоянию	1,50 Å	0,71 Å	-	0,33 Å	0,29 Å	-
<i>VchUPh</i> +URA, отвечающее нелигандирован ному состоянию	0,15 Å	0,22 Å	0,20 Å	1,62 Å	1,21 Å	0,68 Å
<i>VchUPh</i> +URA, отвечающее лигандированно му состоянию	1,47 Å	1,06 Å	0,69 Å	0,28 Å	0,38 Å	0,30 Å
<i>VchUPh</i> +THM, отвечающее нелигандирован ному состоянию	0,67 Å	-	-	0,43 Å	-	-
<i>VchUPh</i> +THM, отвечающее лигандированно му состоянию	1,21 Å	-	-	0,17 Å	-	-
<i>VchUPh</i> +TDR, отвечающее нелигандирован ному состоянию	0,25 Å	-	-	1,41 Å	-	-
<i>VchUPh</i> +TDR, отвечающее лигандированно му состоянию	1,32 Å	-	-	0,14 Å	-	-
<i>VchUPh</i> +CYT+ CTD, отвечающее нелигандирован ному состоянию	0,48 Å	0,39 Å	0,25 Å	0,88 Å	0,80 Å	0,68 Å
<i>VchUPh</i> +CYT+ CTD, отвечающее лигандированно му состоянию	1,07 Å	0,79 Å	0,65 Å	0,35 Å	0,39 Å	0,21 Å
<i>VchUPh</i> +6MU, отвечающее нелигандирован ному состоянию	0,14 Å	0,28 Å	-	0,88 Å	0,75 Å	-

<i>VchUPh</i> +6MU, отвечающее лигандированно му состоянию	1,43 Å	0,74 Å	-	0,21 Å	0,29 Å	-
---	--------	--------	---	--------	--------	---

Подобным образом, сравнивая каждое из двойных положений фрагментов а) б) в) структуры комплекса *VchUPh* с цитозином с аналогичными участками E субъединицы структуры лигандированной уридином *VchUPh* (ID PDB: 5M2T), обнаружено, что **(а)** г.м.с.д. координат атомов а.о. 92-96 A-субъединицы между одним двойным положением участка структуры комплекса *VchUPh*+CYT (ID PDB: 5ERU) и аналогичным участком лигандированного фермента - 1,580 Å, а между вторым двойным положением *VchUPh*+CYT и лигандированным уридином ферментом – 0,377 Å (см. рис. 23); **(б)** для фрагментов структур с номерами а.о. 217-221, г.м.с.д. координат атомов а.о. между одним двойным положением и лигандированным уридином *VchUPh* равно - 1,265 Å, а между вторым – 0,445 Å; **(в)** для фрагментов структур с номерами а.о. 101-105 среднее квадратичное отклонение координат атомов а.о. равно - 0,878 Å, а для другого двойного положения - 0,281 Å. Таким образом, у одного из двойных положений каждого из фрагментов а) б) в) структуры комплекса *VchUPh*+CYT нет структурных отличий в сравнении со структурой лигандированной уридином *VchUPh*.

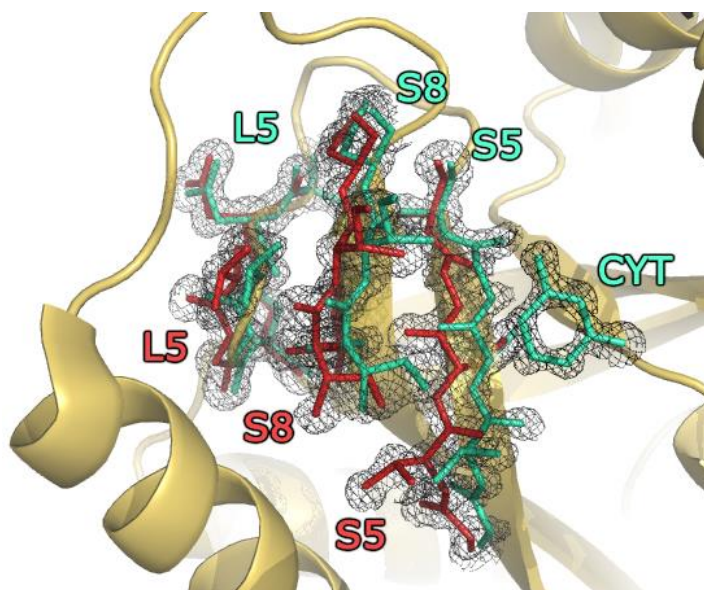
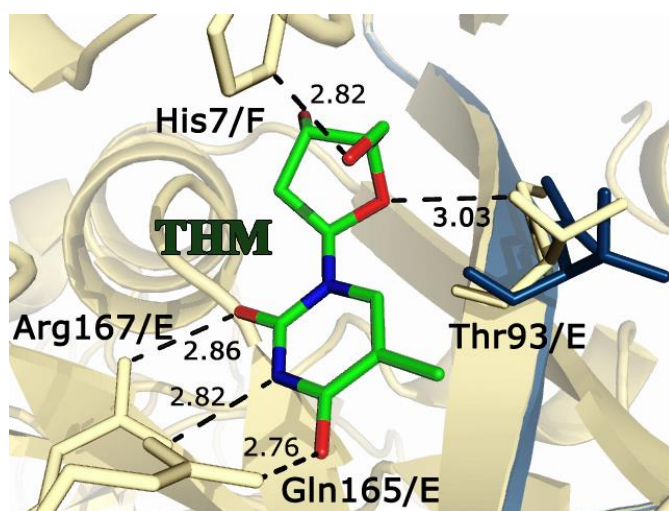


Рисунок 23. Двойные положения фрагментов $\beta 5$ -стренда, $\beta 8$ -стренда и петли L5 в А-субъединице структуры комплекса *VchUPh* с цитозином СУТ. Положение фрагментов структуры, отвечающих лигандированному состоянию обозначено сиреневым цветом, нелигандированному – красным.

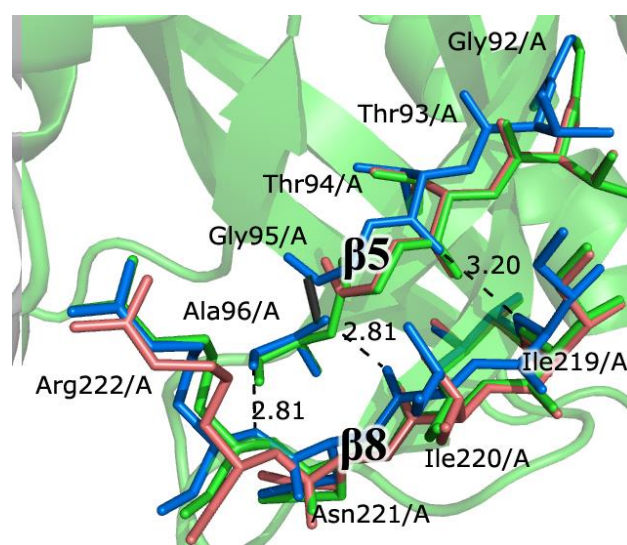
Отметим, что в структуре комплекса *VchUPh* с цитозином заселенность атомов а.о. одного из положений фрагментов равна 0,62 для $\beta 5$ -стренда (92-96 а.о. для А субъединицы), 0,51 для $\beta 8$ -стренда (217-222 а.о. для А субъединицы), 0,66 для участка петли L5 (101-105 а.о. для А субъединицы), что соответствует половинной заселенности молекулы цитозина в сайте связывания. Аналогичные наблюдения проведены и для других структур комплексов, рассматриваемых в настоящей диссертации. В А, С и D субъединицах уридин структуры комплекса *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T) имеет частичную заселенность 0,75, 0,78 и 0,72 соответственно. В этих же субъединицах наблюдается двойное положение аминокислотных остатков с 92 по 96 (в субъединице А) и с 92 по 95 (в субъединицах С и D), входящих в $\beta 5$ -стренд, который образует стенку активного центра фермента. Кроме того, в С субъединице имеется двойное положение участка $\beta 8$ -стренда (а.о. с 217 по 219), параллельного $\beta 5$ -стренду. В активных центрах С- и Е-субъединиц комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW) заселенность молекулы тимидина равна 0,75 и 0,79 соответственно. В этих же субъединицах наблюдается двойное положение аминокислотных остатков с 92 по 93, входящих в $\beta 5$ -стренд. Для Е-субъединицы смещение положения $S\alpha$ -атома альтернативных конформаций Thr93/Е равно 0,57 Å, для $S\beta$ -атома - 1,13 Å. Смещение координат $S\alpha$ -атома альтернативных конформаций Gly92/Е - 0,27 Å, $S\beta$ -атома - 0,90 Å. В субъединицах С и D структуры комплекса *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW) наблюдается двойное положение, прилежащих к активному центру фермента, участков $\beta 5$ - и $\beta 8$ -стрендов а.о. 92-95, 217-220 и 92-96, 216-221 соответственно. В субъединице F наблюдается двойное положение участков $\beta 5$ -, $\beta 8$ -стрендов и L5 петли а.о. 90-96, 217-221 и 103-106 соответственно. Наибольшее расстояние между координатами атомов а.о. альтернативных конформаций наблюдается у Thr93/F -

$C\alpha$ -атома на 1,88 Å, $C\beta$ -атома на 2,70 Å. В обоих активных центрах В-, и Е-субъединиц комплекса *VchUPh* с тимином (ID PDB: 4OGL) заселенность молекулы тимина равна 0,73. В этих же субъединицах (В, и Е), наблюдается двойное положение а.о. с 92 по 96. Наибольшее смещение координат атомов а.о. наблюдается между альтернативными конформациями Thr93/В (для $C\alpha$ -атома на 1,57 Å, $C\beta$ -атома на 2,32 Å). Таким образом, наблюдается не только параллельное смещение Thr93, но и его вращение на $\sim 30^\circ$ вокруг $C\alpha$ -атома. Локализованные в активном центре А- и D-субъединиц молекулы 6-метилурацила структуры комплекса *VchUPh* с 6-метилурацилом (ID PDB: 4K6O) также характеризуются неполной заселенностью. В А-субъединице заселенность лиганда составляет 0,70. В то же время в А- и D-субъединицах наблюдается двойное положение участка стренда $\beta 5$ (92-95 а.о. А-субъединицы), формирующего стенку активного центра и параллельного ему участка $\beta 8$ -стренда (218-221 для А субъединицы).

R.m.s.d. координат атомов а.о. двойных положений фрагментов $\beta 5$ - и $\beta 8$ -стрендов и петли L5 структур комплексов *VchUPh* рассматриваемых в настоящей диссертации суммированы в таблице 9, а также приведены иллюстрации в случае смещения только одного $\beta 5$ -стренда и только двух $\beta 5$ - и $\beta 8$ -стрендов (см. рис. 24а, 24б).



(а)



(б)

Рисунок 24. Альтернативные конформации Thr93 в структуре комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW) (а) Суперпозиция функционально-значимых альтернативных конформаций участков цепи β 5-стренда (92-95 а.о.) и β 8-стренда (218-221 а.о.) в структуре комплекса *VchUPh* с 6-метилурацилом (синий и зеленый цвета), с нелигандированной структурой *VchUPh* (оранжевый цвет) (ID PDB: 3O6V). Суперпозиция проведена с использованием опции «SSM superimpose» программы Coot [160, 161]. (б)

На основе сравнения элементов структур нелигандированной (ID PDB: 3O6V) и лигандированной урацилом *VchUPh* (ID PDB: 5MIW) можно сделать вывод, что в виде двойных положений β 5- и β 8-стрендов и петли L5 мы наблюдаем положения динамики структурных элементов *VchUPh* при его связывании с лигандом, то есть одно из двойных положений фрагментов структур соответствует лигандированному состоянию, а второе – нелигандированному.

Отметим, что двойное положение фрагментов элементов вторичной структуры может фиксироваться, по всей видимости, только в структурах атомного разрешения. Так в структурах комплексов *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5C80, разрешение - 2,24 Å) и урацилом (ID PDB: 4OEH, разрешение - 1,91 Å), кристаллы которых выращены в тех же условиях, двойных положений фрагментов элементов вторичной структуры не наблюдается.

В нелигандированном положении фрагментов вторичной структуры комплекса *VchUPh* с цитозином (ID PDB: 5EPU) между рассматриваемыми, а) б) и в) фрагментами образуются следующие водородные связи: между а.о. β 5- и β 8-стренда - OD1_Asn221 – 2,99 Å – O_Ala96, O_Ile220 – 3,10 Å – N_Ala96, N_Ile219 – 2,91 Å – O_Thr94, O_Gly217 – 2,92 Å – N_Thr94, N_Gly217 – 3,03 Å – O_Gly92; между а.о. β 8-стрендом и петлей L5 - N_Val218 – 2,73 Å – O_Asp105, O_Val218 – 2,72 Å – N_Gly104, ND1_Asn221 – 2,72 Å – O_Val101.

В лигандированном положении фрагментов вторичной структуры фермента между этими же фрагментами образуются сходные водородные связи: между а.о. β 5- и β 8-стренда - O_Phe220 – 2,87 Å – N_Ala96, N_Arg222 – 2,86 Å – O_Ala96, N_Phe219 – 3,14 Å – O_Thr94; между а.о. β 8-стренда и петли L5 - N_Val218 – 3.12 Å – O_Asp105, O_Val218 – 2.81 Å – N_Gly104, ND1_Asn221 – 2.81 Å – O_Val101. Сходные водородные связи формируются и в остальных структурах комплексов, рассмотренных в диссертации.

Благодаря тому, что в структуре комплекса *VchUPh* с цитозином реализуется как лигандированное состояние фермента, так и нелигандированное, появляется возможность сравнить среднюю изотропную компоненту температурного фактора подвижных элементов структуры а) б) и в). Средняя изотропная компонента температурного фактора неводородных атомов фрагментов а) б) и в) двойного положения структуры, отвечающего лигандированному состоянию фермента, равен $9,6 \pm 3,0 \text{ \AA}^2$, $12,9 \pm 3,6 \text{ \AA}^2$, $12,3 \pm 1,7 \text{ \AA}^2$ соответственно. Наибольшим средней изотропной компонентой температурного фактора в сравнении со средним в этих фрагментах обладают атомы а.о. Gly92, Thr93 и Phe220. Именно они вносят наибольший разброс в значение стандартного отклонения. Средняя изотропная компонента температурного фактора неводородных атомов аналогичных фрагментов двойного положения структуры, отвечающего нелигандированному состоянию, равен $7,8 \pm 1,4 \text{ \AA}^2$, $8,6 \pm 2,3 \text{ \AA}^2$, $11,4 \pm 1,9 \text{ \AA}^2$. Обладая большим количеством водородных связей (см. выше), фрагменты β 5- и β 8-стрендов и петли L5 в нелигандированном состоянии в среднем обладают более низким температурным фактором в сравнении с этими же фрагментами в лигандированном состоянии, и являются конформационно более стабильными. Аналогичная ситуация наблюдается и в остальных структурах комплексов *VchUPh*.

При связывании фермента с субстратом, как остаются водородные связи, которые характерны для нелигандированного состояния фермента, так и образуются новые. Стоит отметить, что в том случае, когда лиганд представляет

собой азотистое основание (т.е. урацил, тимин, цитозин, 6-метилурацил), то альтернативная конформация участка $\beta 5$ -стренда (см. рис. 23) обусловлена не только связыванием лиганда с частичной заселенностью молекулой энзима, но и связыванием глицерола или ТРИС с а.о. рибозо-связывающего сайта. Так, молекула ТРИС (TRS) в структуре комплекса *VchUPh* с цитозином образует водородные связи с ключевыми остатками рибозо-связывающего сайта включая Thr93 (OG1_Thr93/B – 2,72Å – O1_TRS; NE2_His7/A – 3,09Å – O2_TRS; N_Met196/B – 3,13Å – O3_TRS; OE1_Glu197/B – 2,68Å – O3_TRS: OE2_Glu197/B – 2,80Å – N_TRS. Аналогичная ситуация наблюдается и в активных центрах субъединиц, а.о. которого связаны с молекулой глицерола. Тем самым, как глицерол, так и ТРИС за счет гидроксигрупп имитируют фуранозную компоненту рибонуклеозидов (уридина, тимидина или цитозина), вследствие чего происходят изменения конфигурации $\beta 5$ -стренда.

Таким образом, при связывании *VchUPh* с лигандом, каскадом происходит в первую очередь смещение участка $\beta 5$ -стренда в сторону лиганда, что приводит к изменению минимума энергии конформации близлежащего $\beta 8$ -стренда и его смещению в сторону сайта связывания за $\beta 5$ -стрендом, который в свою очередь аналогичным образом влияет на изменение конформации фрагмента петли L5, которая также смещается в сторону сайта связывания, ближе к $\beta 8$ -стренду (см. рис. 21, 23). Эти деформации происходят благодаря тому, что рассматриваемый фрагмент петли L5 находится на поверхности фермента и не образует водородных связей с другими элементами, кроме $\beta 8$ -стренда.

3.4 Структурные аспекты специфичности *VchUPh* к субстратам прямой реакции

3.4.1 *Нуклеозид-связывающий сайт в структуре комплекса VchUPh с уридином*

Уридин (URI), связываясь с молекулой *VchUPh*, занимает весь нуклеозид-связывающий сайт (см. рис. 25а, б). Взаимодействие уридина с нуклеозид-связывающим сайтом в структуре комплекса *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T) осуществляется посредством водородных связей: OE1_Gln165/E - 2,91 Å - N3_URI; NE2_Gln165/E - 2,94 Å - O2_URI; NH2_Arg167/E - 2,98 Å - O4_URI; NH2_Arg222/E - 2,89 Å - H2O - 2,82 Å - O4_URI; NE2_His7/F - 2,68 Å - O5' URI; OE2_Glu197/E - 2,67 Å - O3' URI; OE1_Glu197/E - 3,16 Å - O3' URI; OE1_Glu197/E - 2,68 Å - O2' URI; N_Met196/E - 3,23 Å - O2' URI; OG1_Thr93/E - 2,99 Å - H2O - 2,94 Å - O5' URI. Таким образом, ключевыми аминокислотными остатками *VchUPh* во взаимодействии с пиримидиновым компонентом лиганда являются Gln165, Arg167 и Arg222. Основными аминокислотными остатками, связывающими фуранозный компонент тимидина и уридина являются Glu197, Thr93, а также His7 соседней субъединицы (см. рис. 25а, б).

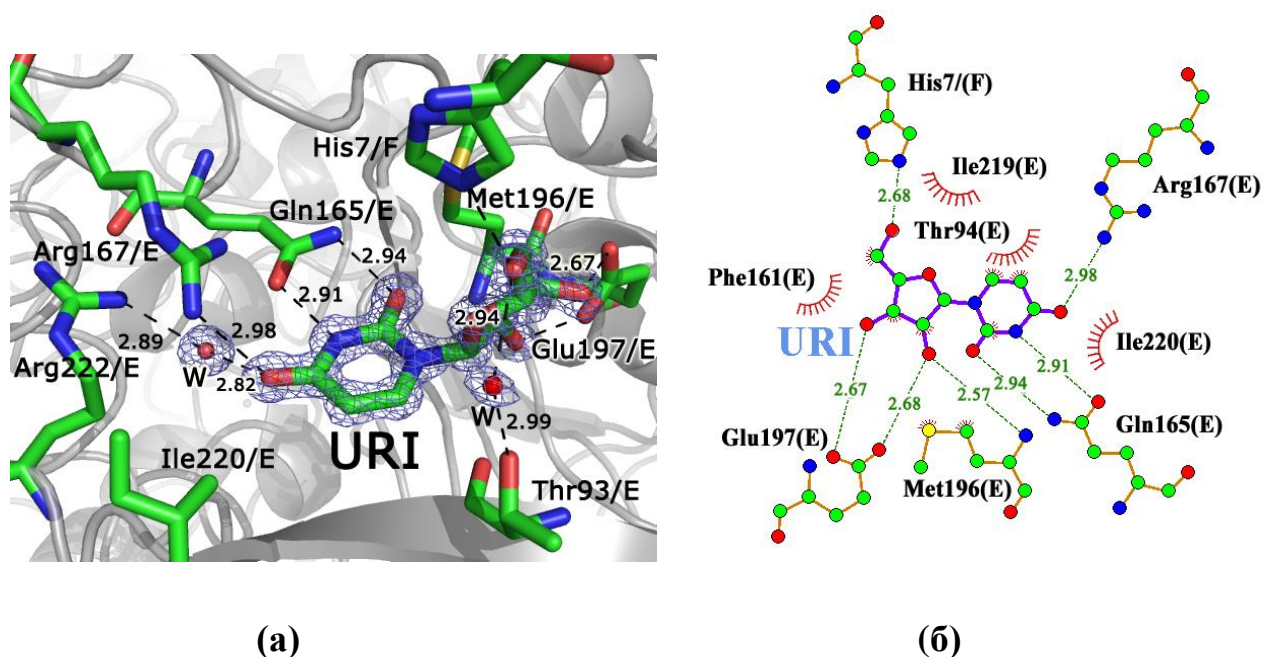


Рисунок 25. Активный центр комплекса *VchUPh* с уридином URI (ID PDB: 5M2T). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mF_o - DF_c$) отображена при уровне срезки $1,5 \sigma$ (а); Схематическая диаграмма взаимодействия фермента с субстратом для структуры комплекса *VchUPh* с уридином URI (ID PDB: 5M2T) (б)

Фенильный радикал Phe161 сайта связывания расположен перпендикулярно ароматическому гетероциклу уридина, тимидина, урацила, тимина и взаимодействует с ним посредством π -стекинга (Рисунок 9). Около C5 атома углерода ароматического гетероцикла уридина находится гидрофобный карман, образованный остатками Ile220, Ile221, Pro228, а также Phe8, принадлежащий соседней субъединице.

R.m.s.d. координат атомов а.о. сайтов связывания F-субъединицы комплекса *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T) и C-субъединицы комплекса *VchUPh* лигандированной урацилом (ID PDB: 5MIW) за исключением а.о. Glu197 и His7 равно 0,10 Å, что свидетельствует о высоком конформационном сходстве рассматриваемых а.о. сайтов связывания. При включении координат атомов а.о. Glu197 и His7 в расчет среднеквадратичного отклонения, оно становится равно 0,39 Å. Тем самым показано, что рибозная компонента молекулы уридина меняет конфигурацию а.о. Glu197 и His7 сайта связывания, стягивая их внутрь кармана сайта связывания.

3.4.2 Нуклеозид-связывающий сайт в структуре комплекса *VchUPh* с тимидином

Тимидин (THM) находится во всех шести активных центрах структуры комплекса *VchUPh* (ID PDB: 4LZW) (см. рис. 26а, б) [178]. В активном центре субъединиц А, В, D, F заселенность молекулы лиганда полная, в С, Е - частичная. THM (ID PDB: 4LZW) аналогично URI в структуре комплекса *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T) взаимодействует с нуклеозид-связывающим сайтом биологической молекулы *VchUPh* (на примере F-сайта димера EF, ID PDB: 4LZW) посредством водородных связей: O5' _THM –2,78Å– NE2_His7/E; O4' _THM –3,54 Å– O_Thr93/F; O4' _THM – 3,15 Å –OG1_Thr93/F; OE1_Gln165/F –2,80Å– N3_THM; OE1_Gln165/F –3,51 Å– O2_THM; NE2_Gln165/F –2,87Å– O2_THM; NH2_Arg167/F

-2,82Å- O4_ THM; OE2_Glu197/F -2,77Å- O3'_ THM; OE1_Glu197/F -3,13Å- O3'_ THM.

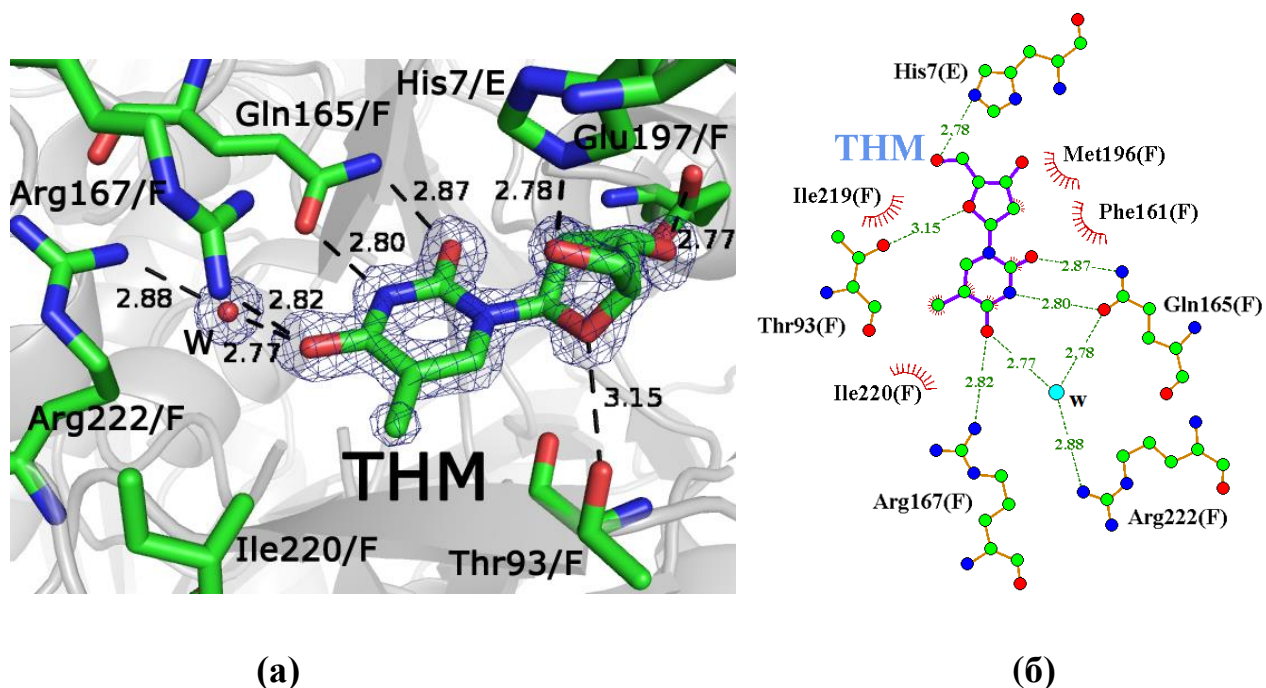


Рисунок 26. Активный центр комплекса *VchUPh* с тимидином THM (ID PDB: 4LZW). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mFo-DFc$) отображена при уровне срезки $1,5\sigma$ (а); Схематическая диаграмма взаимодействия фермента с субстратом для структуры комплекса *VchUPh* с тимидином THM (ID PDB: 4LZW) (б)

3.4.3 Механизмы узнавания нуклеозидов молекулой *VchUPh* и разрыва β -N1-гликозидной связи в молекулах субстратов прямой реакции.

Основное участие в узнавании и связывания гетероциклической компоненты субстрата принимает боковая группа консервативного для бактериальных уридинфосфорилаз Gln165 в *VchUPh*, Gln166 в *StUPh* и *EcUPh* [5, 127, 179]. Этот а.о. ориентирован во всех перечисленных выше структурах таким образом, что положительно заряженная его амидная группа образует водородную связь с отрицательно заряженным атомом O2 исследуемых субстратов как прямой (пиримидиновые нуклеозиды – уридин, тимидин), так и обратной (пиримидиновые

основания – урацил, тимин) реакции. А именно, для *VchUPh*: NE2_Gln165/F/*VchUPh*-2,87Å-O2_THM; NE2_Gln165/F/*VchUPh*- 2,90Å- O2_TDR; NE2_Gln165/E/*VchUPh* – 2,94 Å – O2_URI, NE2_Gln165/B/*VchUPh* –2,95 Å– O2_URA (см. рис. 25, 26). В свою очередь, отрицательно заряженная карбонильная группа Gln165 молекула энзима *VchUPh* образует водородную связь с положительно заряженным N3 атомом пиримидинового гетероцикла лиганда: OE1_Gln165/F/*VchUPh* – 2,80Å– N3_THM; OE1_Gln165/F/ *VchUPh*- 2,79Å – N3_TDR; OE1_Gln165/B/ *VchUPh*- 2,87Å -N3_URA; OE1_Gln165/E/*VchUPh*- 2,91Å -N3_URI (см. рис. 25, 26). Аналогичные водородные связи имеют место и в структурах комплексов с лигандами *StUPh* и *EcUPh* [5, 127, 179]. Таким образом, функциональные группы, содержащие атомы O2 и N3, присутствуют как в молекуле уридина, так и тимидина, что способствует узнаванию и связыванию этих двух лигандов уридинфосфорилазами. Однако, на основании результатов химической кинетики сродство бактериальных уридинфосфорилаз NP-1 семейства к уридину выше в 2,5 раза, чем к тимидину [1, 2, 20].

Рассмотрим основные структурно-функциональные аспекты разрыва β-N1-гликозидной связи в субстрате уридинфосфорилаз NP-1 семейства. Во-первых, под влиянием электростатических взаимодействий аминокислотных остатков активного центра происходит перераспределение электронов в молекуле нуклеозида с уменьшением разности электрического заряда между N1 и C1' атомами лигандов [5, 20, 138]. Это процесс приводит к ослаблению β-N1-гликозидной связи. Во-вторых, рибозная компонента субстратов прямой реакции бактериальных уридинфосфорилаз *VchUPh* как уридина, так и тимидина (ID PDB: 5C80, 5M2T, 4LZW) и *EcUPh* [5, 20, 138] связывается с а.о. активного центра (Thr93, Met196, Asp197 в *VchUPh*) в напряжённой, высокоэнергетической конформации (Рисунок 5, 6). Так выявлено что, конформация молекулы уридина в активном центре *VchUPh* (ID PDB: 5M2T) и *EcUPh* [5, 20, 138] отличается от наблюдаемой в растворе [180] син-положением пиримидинового кольца лиганда по отношению к

его фуранозному компоненту и планарному расположению атомов (C1'-C2'-C3'-C4'-O4') фуранозного кольца субстрата.

Связывание субстратов в высокоэнергетических конформациях вызывает перекрывание электронных орбиталей между связями C1'-N1 и C2'-N2' молекулы лигандов, что приводит к ослаблению β -N1-гликозидной связи. Описанные процессы уменьшают величину потенциального барьера энергии разрыва β -N1-гликозидной связи и нуклеофильной атаки её фосфат-анионом и приводят к ферментативной реакции [5, 20, 138]. Учитывая высокую структурную гомологию энзиматического центра бактериальных уридинфосфорилаз, предложенный механизм реакции одинаков для всех ферментов этой группы, включая *VchUPh*.

3.4.4 Структурный аспект влияния 2-гидроксигруппы рибозной компоненты нуклеозидов на скорость ферментативной реакции.

R.m.s.d. между координатами C α -атомов а.о. входящих в активный центр структур комплексов *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T; гомодимер BA) и *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW; гомодимер FE) равно 0,139 Å, между координатами всех атомов а.о. активного центра - 0,172 Å и между боковыми группам а.о. – 0,181 Å. Тем самым, рассматриваемые сайты связывания комплексов *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T) и *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW) структурно идентичны.

Среднеквадратичное отклонение между координатами атомов молекул уридина и тимидина в комплексах *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T) и тимидином (ID PDB: 4LZW) равно 0,70 Å (см. рис. 27). R.m.s.d. между координатами атомов пиримидиновых компонент уридина и тимидина равно 0,29 Å. Параллельного смещения в плоскости пиримидиновых колец уридина и тимидина относительно друг друга не наблюдается. (см. рис. 27).

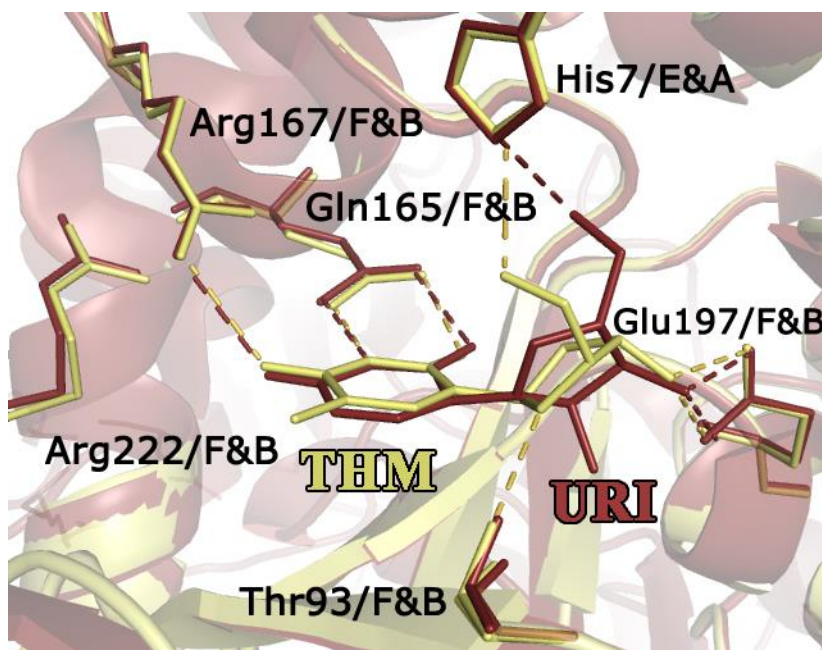


Рисунок 27. Суперпозиция структур комплексов *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T; URI) и тимидином ((ID PDB: 4LZW); THM)

Рассчитанная энергия конформации для основного состояния уридина в растворе $E'_{\text{water}} = 100,11 \pm 0,02$ кДж/моль, а в связанном с активным центром *VchUPh* в кристаллическом состоянии - $E'_{\text{UPh}} = 186,91 \pm 0,02$ кДж/моль (ID PDB: 5M2T). Для тимидина $E'_{\text{water}} = 107,23 \pm 0,02$ кДж/моль и $E'_{\text{UPh}} = 165,34 \pm 0,02$ кДж/моль (ID PDB: 4LZW). Разницы энергий между конформациями лигандов в активном центре комплексов *VchUPh* в кристаллическом состоянии и в водном растворе равны $86,80 \pm 0,02$ кДж/моль и $58,13 \pm 0,02$ кДж/моль, соответственно для уридина и тимидина. Тем самым образование двух дополнительных водородных связей ($N_{\text{Met196/A}} - 3,14 \text{ \AA} - O2'_{\text{URI}}$; $O_{E1_Glu197/A} - 2,56 \text{ \AA} - O2'_{\text{URI}}$) с 2'-гидроксигруппой уридина (см. рис. 25 а, б), приводит не только к увеличению энергии связывания, как было отмечено ранее и для комплекса *EcUPh*+URI [5], но и к изменению конформации лиганда на более напряжённую твист-конформацию C1'-endo/O4'-exo(T_0) молекулы уридина по сравнению с C1'-endo(E) конформацией молекулы тимидина (см. рис. 27) [178].

Увеличенная на 28,7 кДж/моль; разница энергий E'_{water} и E'_{UPh} молекулы уридина в активном центре *VchUPh* в сравнении с молекулой тимидина способствует более лёгкому разрыву β -N1-гликозидной связи между пиримидиновой и рибозной компонентами уридина и увеличению скорости реакции с ним.

Таким образом, определяющее значение в различии сродства уридинфосфорилаз к урину и тимидину играет взаимодействие 2'-гидроксигруппы уридина с атомами Met196 и Glu197 активного центра *VchUPh*, что согласуется с работами [1, 5, 20]. Однако, это взаимодействие приводит не только к увеличению энергии связывания уридина а.о. активного центра, как позано и в [1, 5, 20], но и к изменению конформации рибозной компоненты уридина по сравнению с тимидином на более высокоэнергетическую (C1'-endo/O4'-exo('T_o)) и, тем самым, более реакционно-способную (см. рис. 27).

3.4.5 Структурный и квантовохимический аспекты влияния 5-метилгруппы пиримидиновой компоненты нуклеозидов на скорость ферментативной реакции.

5-метильная группа тимидина располагается вблизи остатков гидрофобного окружения лиганда: CG2_Le220/F – 3,68Å– CM5_TNM; CD1_Le219/F– 3,60Å– CM5_TNM; CG1_Le219/F - 3,55Å– CM5_TNM (Рисунок 6). Стерических ограничений, препятствующих связыванию тимидина в активном центре нет, так как расстояния между атомами углерода метильных групп аминокислотных остатков и CM5-тимидина >3,4 Å. Тем самым, 5-метильная группа тимидина не может препятствовать его связыванию с активным центром бактериальных уридинфосфорилаз и в частности *VchUPh* (см. рис. 27, 28).

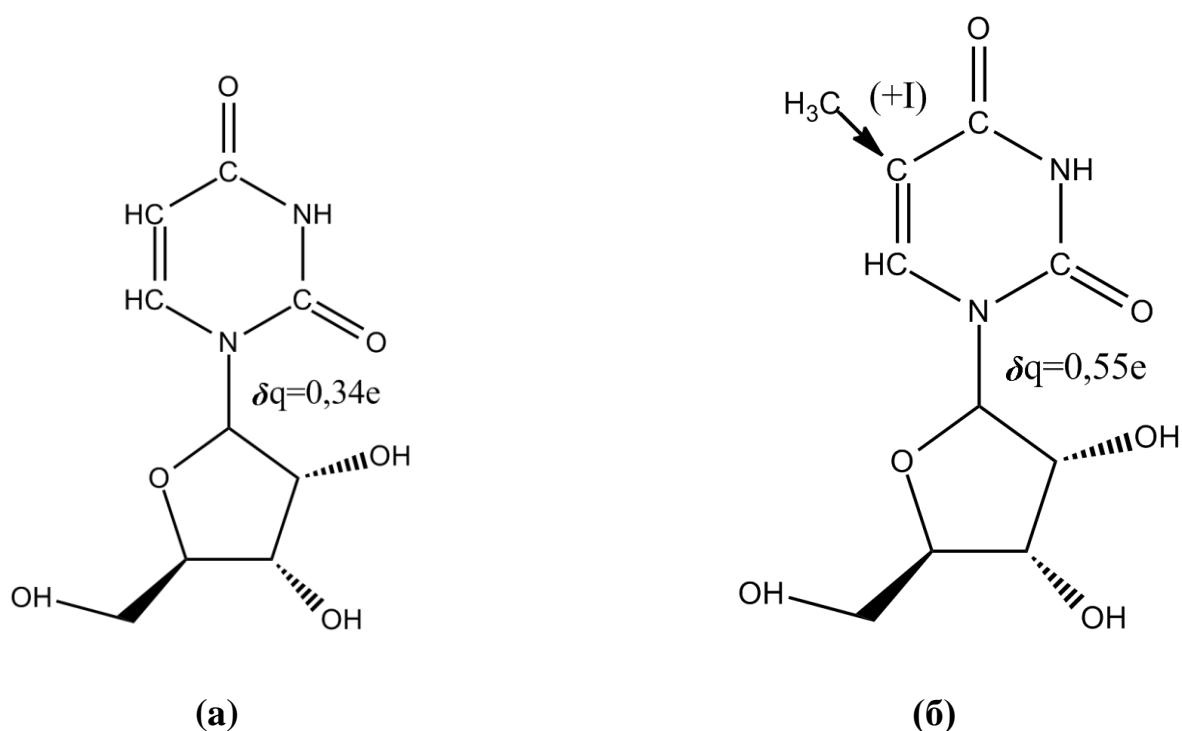


Рисунок 28. Разность частичных электрических зарядов атомов (e) между атомами β -N1-гликозидной связи уридина (а) и 5-метилуридина (б).

Не смотря на это, в литературе показано на примере аналога тимидина – 5-метилуридина, что наличие метильной группы, присоединенной в пятом положении пиримидинового гетероцикла лиганда уменьшает скорость ферментативной реакции [1, 2, 20]. 5-метилуридин отличается от уридина наличием присоединённой в пятом положении гетероцикла метильной группы (как в молекуле тимидина), а строение фуранозной компоненты этих лигандов одинаково. На основании наших экспериментальных и расчетных данных этот факт объясняется влиянием метильной группы субстрата прямой реакции на его электронное строение. Так разница частичных зарядов атомов N1-C1' в молекуле 5-метилуридина, аналога тимидина, $\delta q=0,55e$, а у уридина - $\delta q=0,34e$, что связано с положительным индуктивным эффектом (I+) 5-метильной группы на ароматическое кольцо (см. рис. 28а, б). Большая по сравнению с уридином разница частичных зарядов между атомами β -N1-гликозидной связи приводит к её стабилизации в молекуле 5-метилуридина и, по аналогии, в молекуле тимидина и замедлению реакции фосфоролитического расщепления тимидина и 5-

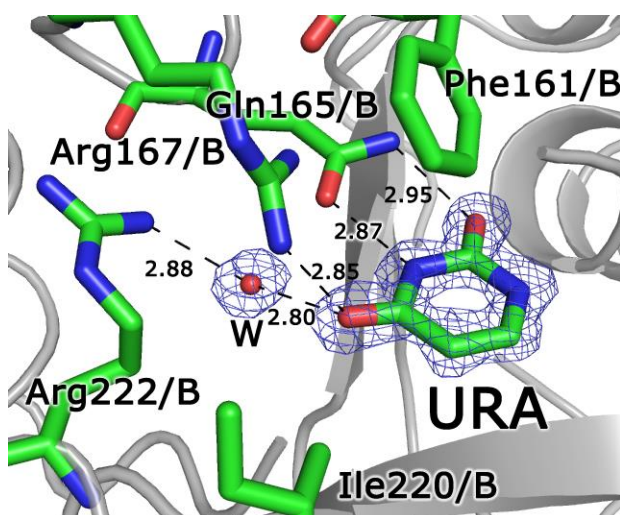
метилуридина по сравнению с уридином. Этот вывод согласуется с биохимическими результатами [20] о том, что сродство уридинфосфорилазы из *E.coli* полностью гомологичной по а.о. сайта связывания к уридину выше, чем к 5-метилуридину.

Таким образом, предложен механизм негативного влияния присутствия метильной группы СМ5 на скорость ферментативной реакции, заключающийся в изменении частичного заряда N1-атома тимидина под влиянием положительного индуктивного эффекта 5-метильного радикала, присоединенного к пиримидиновой компоненте этого лиганда. Изменение заряда N1-атома тимидина приводит к дополнительной стабилизации β -N1-гликозидной связи между пиримидиновой и рибозной компонентой тимидина и замедлению ферментативной реакции по сравнению с уридином.

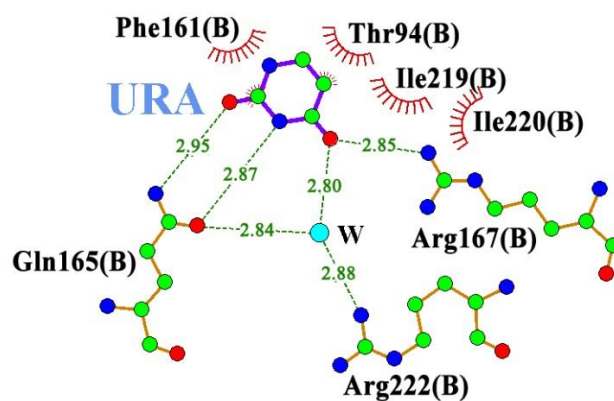
3.5 Структурные и квантово-химические аспекты специфичности *VchUPh* к субстратам обратной реакции

3.5.1 Урацил-связывающий сайт в структуре комплекса *VchUPh* с урацилом

Урацил (URA), связываясь с ферментом *VchUPh* (ID PDB: 5MIW), занимает только урацил-связывающую часть нуклеозид-связывающего сайта и имеет полную заселенность в субъединицах А, В и Е (см. рис. 29 а, б). В субъединицах С, D и F – частичную, 0,81, 0,71 и 0,78 соответственно.



(a)



(б)

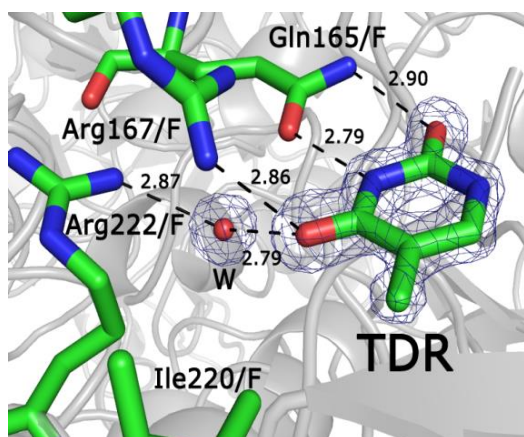
Рисунок 29. Активный центр комплекса *VchUPh* с урацилом (URA, ID PDB: 5MIW). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mF_o - DF_c$) отображена при уровне срезки $1,5\sigma$ (а). Схематическая диаграмма взаимодействия фермента с субстратом для структуры комплекса *VchUPh* с урацилом (URA, ID PDB: 5MIW) (б)

Взаимодействие урацила с нуклеозид-связывающим сайтом в структуре комплекса *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW) осуществляется посредством следующих водородных связей: OE1_Gln165/B-2,87 Å- N3_URA; NE2_Gln165/B – 2,95 Å– O2_URA; NH2_Arg167/B –2,85 Å- O4_URA; O4_URA – 2,80 Å – H2O –2,88 Å– NH2_Arg222/B. Фенильный радикал Phe161/B расположен перпендикулярно к ароматическому гетероциклу урацила и взаимодействует с ним посредством π -стекинга ёлочного типа.

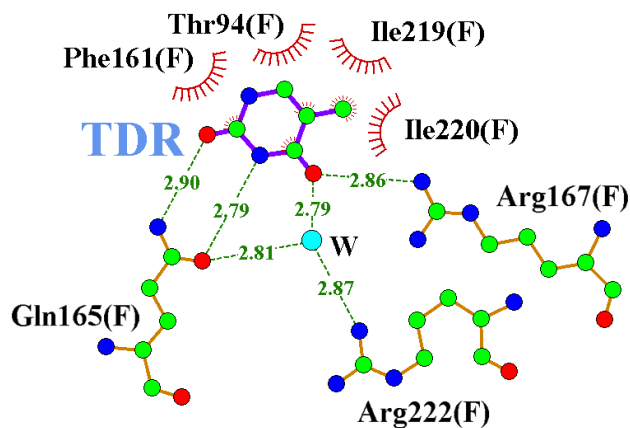
3.5.2 Урацил-связывающий сайт в структуре комплекса *VchUPh* с тиминном

Тимин (TDR) в нуклеозид-связывающем сайте структуры комплекса *VchUPh* с тиминном (ID PDB: 4OGL) взаимодействует при помощи водородных связей, только с а.о. пиримидин-связывающего сайта связывания Gln165, Arg167 и Arg222 (см.

рис. 30), аналогично молекуле урацила. TDR локализован во всех шести активных центрах структуры комплекса *VchUPh* с TDR (ID PDB: 4OGL). Тимин образует с ферментом следующие водородные связи: OE1_Gln165/F – 2,79 Å – N3_TDR; NE2_Gln165/F – 2,90 Å – O2_TDR; NH2_Arg167/F – 2,86 Å – O4_TDR; O4_TDR – 2,79 Å – H2O – 2,87 Å – NH2_Arg222/F и O4_TDR – 2,79 Å – H2O – 2,81 Å – OE1_Gln165/F [178].



(a)



(б)

Рисунок 30. Активный центр комплекса *VchUPh* с тиминем (TDR, ID PDB: 4OGL). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mF_o - DF_c$) отображена при уровне срезки $1,5\sigma$ (а). Схематическая диаграмма взаимодействия фермента с субстратом для структуры комплекса *VchUPh* с тиминем (TDR, ID PDB: 4OGL) (б)

3.5.3 Структурный и квантово-химический аспекты влияния 5-метилгруппы азотистых оснований на скорость обратной ферментативной реакции.

Сравнение структур комплексов *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW) и с тиминем (ID PDB: 4OGL) показало, что конформация и положение аминокислотных остатков сайтов связывания и гидрофобного окружения лиганда одинаковы (см. рис. 31а). Среднеквадратичное отклонение между координатами атомов а.о. активного центра комплексов *VchUPh* с урацилом (EF-гомомер - (ID

PDB: 5MIW) и тимином - FE- гомодимер - (ID PDB: 4OGL) равно 0,13 Å, а между координатами атомов боковых групп а.о. активного центра - 0,14 Å.

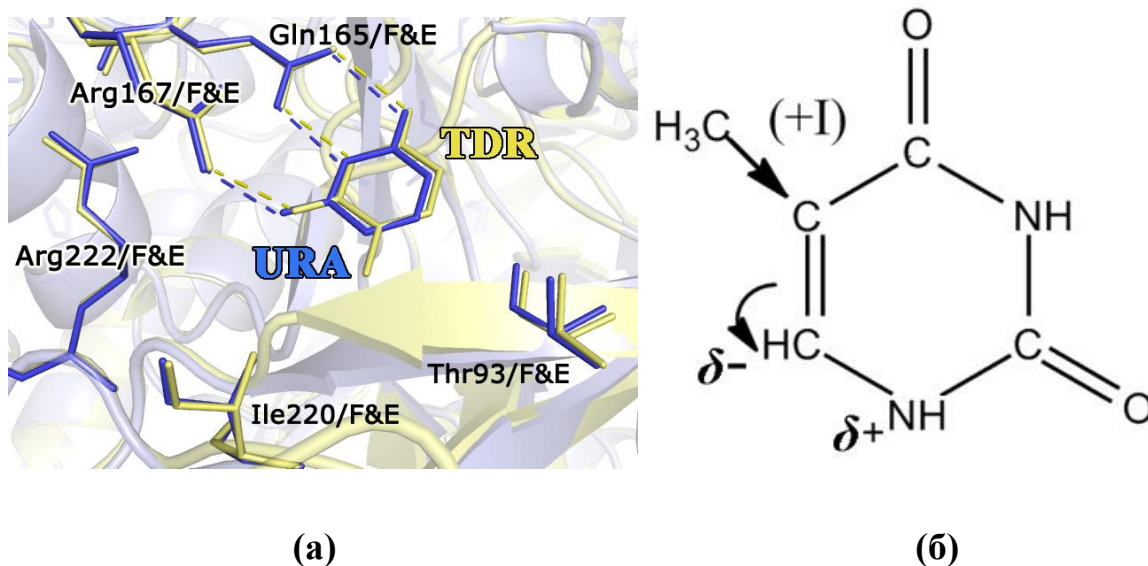


Рисунок 31. Суперпозиция а.о. фрагмента сайта связывания структур комплексов *VchUPh* с тимином (TDR) (желтый) и урацилом (URA) (синий) (а). Электронные эффекты заместителей в 5 – ом положении тимина (б).

Среднеквадратичное отклонение между координатами атомов урацила (ID PDB: 5MIW) и тимина (ID PDB: 4OGL), связанных с а.о. сайта связывания, равно 0,189 Å (см. рис. 31а). Как следует из результатов рентгеноструктурного анализа структур этих комплексов *VchUPh* с URA и комплекса *VchUPh* с TDR, атом C5 тимина удален на 0,3 Å дальше от CG2_Ile220, чем атом C5 урацила (Рисунок 14), что является следствием вандерваальсового взаимодействия между 5-метильной группой тимина и атомов боковой цепи Ile220. Следует отметить, что при таком расположении тимина в активном центре при наличии второго субстрата расстояние между реакционными атомами C1' и N1, формирующими в процессе реакции синтеза нуклеозида β-N1-гликозидную связь между пиримидиновой и рибозной компонентой нуклеозида, меньше чем в случае с урацилом на ~0,3 Å (см. рис. 31а). Это приводит к увеличению скорости обратной реакции с тиминном при химически идентичном втором субстрате (например, в рибозо-1-фосфате). Если

абстрагироваться от результата рентгеноструктурного анализа и предположить, что в структуре молекулы комплекса *VchUPh* с тиминном лиганд занимал бы место урацила, то наблюдался бы clash-контакт (~ 3 Å) между 5-метильной группой тимина и атомом CG2_Pe220/*VchUPh*, что маловероятно.

Метильная группа тимина, являясь ориентантом первого рода, наводит частичный положительный заряд на атом N1 гетероциклического кольца тимина (см. рис. 31б). Тем самым, снижается величина модуля отрицательного электрического заряда на атоме N1 молекулы тимина, что и приводит к снижению нуклеофильной активности тимина по сравнению с урацилом.

3.5.4 Структурный и квантово-химический аспекты влияния атома фтора 5-фторурацила на скорость обратной ферментативной реакции.

Интересно в сравнении с тиминном и урацилом проанализировать положение в сайте связывания молекулы бактериальной уридинфосфорилазы производного урацила - 5-фторурацила (5ФУ), являющемся также субстратом обратной реакции уридинфосфорилаз [65, 70, 72].

При помощи процедуры молекулярного докинга 5-фторурацила в сайт связывания структуры *VchUPh* получена структура *VchUPh* с 5-фторурацилом.

По результатам молекулярного докинга молекула 5-фторурацила (URF) связана с остатками активного центра *VchUPh* следующими водородными связями: O4_URF - 2,7 Å - NH1_Arg167/B; N3_URF - 3,2 Å - OE1_Gln165/B; N3_URF - 3,4 Å - NE2_Gln165/B; O2_URF - 3,1 Å — NE2_Gln165/B (см. рис. 32a). Через молекулу воды атом O4_URF связан с а.о. Arg222: O4_URF - 3,2 Å - H₂O - 3,3 Å - NE_Arg 222/B. Гидрофобное окружение пиримидинового кольца лиганда формируется остатками Pe219 и Val220.

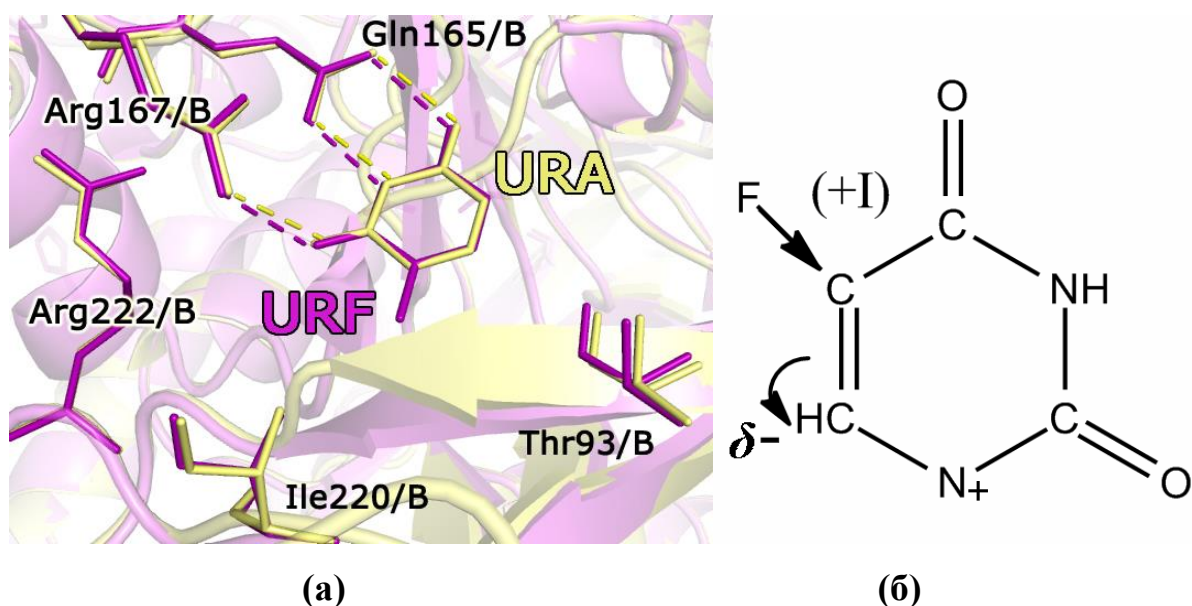


Рисунок 32. Суперпозиция а.о. урацил-связывающего сайта структуры комплекса *VchUPh* с 5-фторурацилом (URF) (розовый), полученной при помощи процедуры молекулярного докинга, и урацилом (URA) (желтый) (а); Электронные эффекты заместителя в 5 –положении 5-фторурацила (б).

При сравнении сайтов связывания структур комплексов *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW) и *VchUPh* с 5-фторурацилом (URF) установлено, что в отличие от положения тимина в *VchUPh* положение 5-фторурацила неотлично от положения урацила в сайте связывания *VchUPh* (ID PDB: 5MIW) (r.m.s.d. координат атомов ароматического кольца лигандов– 0,187 Å) (см. рис. 32а) [126]. Это может быть связано с тем, что ван-дер-ваальсовый радиус фтора (~1,1 Å) молекулы 5-фторурацила меньше ван-дер-ваальсового радиуса метильной группы (~2,0 Å) тимина. Тем самым, атом фтора в комплексе с 5-фторурацилом практически не взаимодействует с гидрофобным окружением сайта связывания уридинфосфорилаз (Ple220, Ple219) в отличие от метильной группы тимина.

Атом фтора так же является ориентантом первого рода, как и метильная группа тимина и так же снижает величину отрицательного электрического заряда на атоме N1 лиганда (см. рис. 32б). Тем самым, наличие в 5-ом положении ароматического

кольца лиганда атома фтора приводит к уменьшению скорости обратной реакции с 5-фторурацилом по сравнению с урацилом.

Помимо этого, атом фтора, являясь самым электроотрицательным заместителем (3,98 единиц по шкале Полинга по сравнению с 2,55 для sp^3 -гибридизованного атома углерода метильной группы тимина) оттягивает электронную плотность с ароматического гетероцикла 5-фторурацила, сильнее снижая скорость обратной реакции, осуществляемой уридинфосфорилазой с 5ФУ, по сравнению с тимином.

3.5.5 Влияние химического строения и конформации фуранозного компонента второго субстрата на скорость обратной ферментативной реакции

На скорость синтеза уридинфосфорилазой уридина из урацила и тимидина из тимина сказывается химическое строение и конформация фуранозного компонента второго субстрата (рибозо-1-фосфат или 2-дезоксирибозо-1-фосфат). Это предположение подтвердилось при помощи процедуры молекулярного докинга вторых субстратов обратной реакции – рибозо-1-фосфата и 2-дезоксирибозо-1-фосфата в активные центры структур комплексов *VchUPh* с урацилом (см. рис. 33а, б). Молекулярный докинг проводился без исключения координат атомов урацила из соответствующей структуры комплекса.

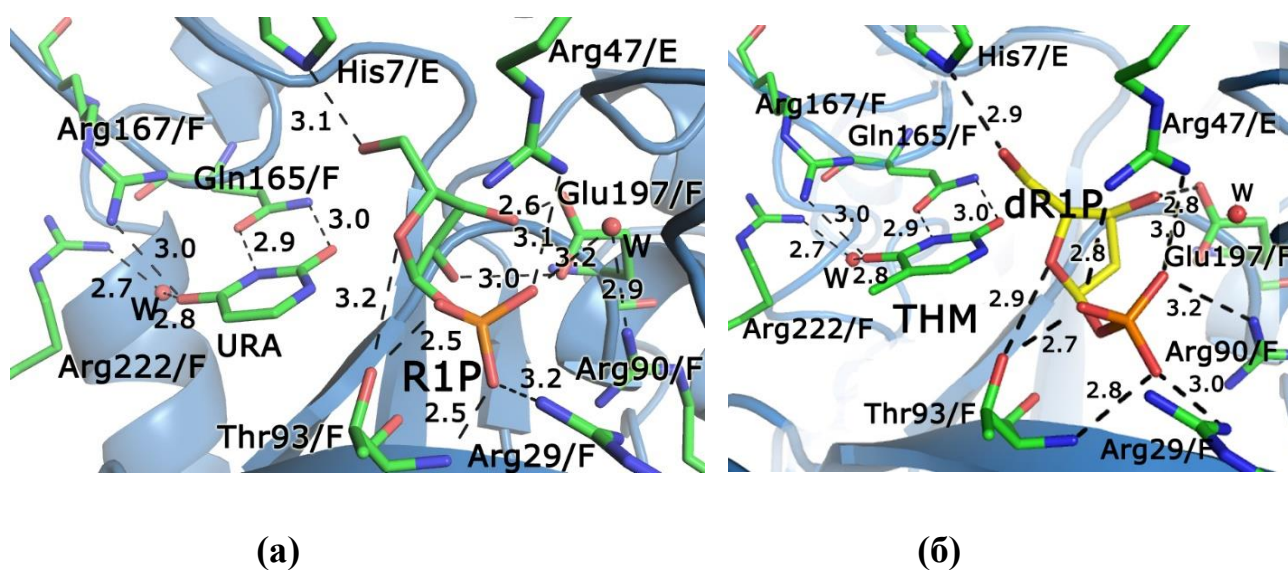


Рисунок 33. Пространственная структура сайтов связывания *VchUPh* в комплексе с рибозо-1-фосфатом (R1P) и урацилом (URA) (а) с урацилом (URA) и 2-дезоксирибозо-1-фосфатом (dR1P) (б)

В результате проведённых вычислительных процедур для рибозо-1-фосфата и 2-дезоксирибозо-1-фосфата получены решения, не отличающиеся положением фосфатной группы, но отличающимися конформацией фуранозного цикла - C1'-endo/O4'-exo('To) для первого и C1'-endo(IE) для второго лиганда. Разность между энергией конформаций в растворе и связанной с ферментом в кристаллическом состоянии для рибозо-1-фосфата = $69,22 \pm 0,02$ кДж/моль, а для молекулы 2-дезоксирибозо-1-фосфата = $37,82 \pm 0,02$ кДж/моль [178]. Различие в энергиях объясняется образованной сетью водородных связей 2-гидроксигруппы рибозо-1-фосфата (R1P) с атомами а.о. рибозо-связывающего сайта *VchUPh*: N_Met196/F – 3,10 Å- O2'_R1P; OE1_Glu197/F – 2,83 Å- O2'_R1P; NH2_Arg90 – 3,07 Å – O2'_R1P (см. рис. 33а). Молекула 2-деоксирибо-1-фосфата же не образует аналогичных связей с аминокислотными остатками энзима ввиду отсутствия в молекуле лиганда 2-гидроксигруппы (см. рис. 33б). Заметим, что разность между энергией конформаций в растворе и связанной с ферментом для рибозо-1-фосфата в структуре комплекса *EcUPh* с урацилом и рибозо-1-фосфатом (ID PDB:1TGY) так же была нами вычислена и равна 75,2 кДж/моль. Это согласуется с результатами оценки энергии комплекса *VchUPh* с рибозо-1-фосфатом и урацилом, исследованным методом молекулярного докинга. Таким образом, более высокоэнергетическая конформация второго субстрата (рибозо-1-фосфата) приводит к увеличению скорости химической реакции в сравнении с 2-дезоксирибозо-1-фосфатом.

3.5.6 *Дополнительные аспекты влияния 5-метилгруппы пиримидиновой компоненты нуклеозидов на напряжение β-N1-гликозидной ковалентной связи.*

При сравнении структуры комплексов *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T; субъединица В) и *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW; субъединица Е), как продуктом прямой реакции фосфолиза, выявлено различие в положении пиримидинового кольца этих лигандов (r.m.s.d. координат атомов - 0,33 Å). (см. рис. 34а). R.m.s.d. между всеми координатами атомов активного центра в кристаллических структурах этих комплексов - 0,13 Å, а между координатами атомов боковых групп а.о. активного центра - 0,15 Å. В структуре комплекса *VchUPh* с уридином центр пиримидиновой компоненты уридина в сравнении с центром пиримидинового кольца урацила находится ближе на 0,5 Å к атому OE2 а.о. Glu197, т.е. ближе к фосфат-связывающему сайту (см. рис. 34а).

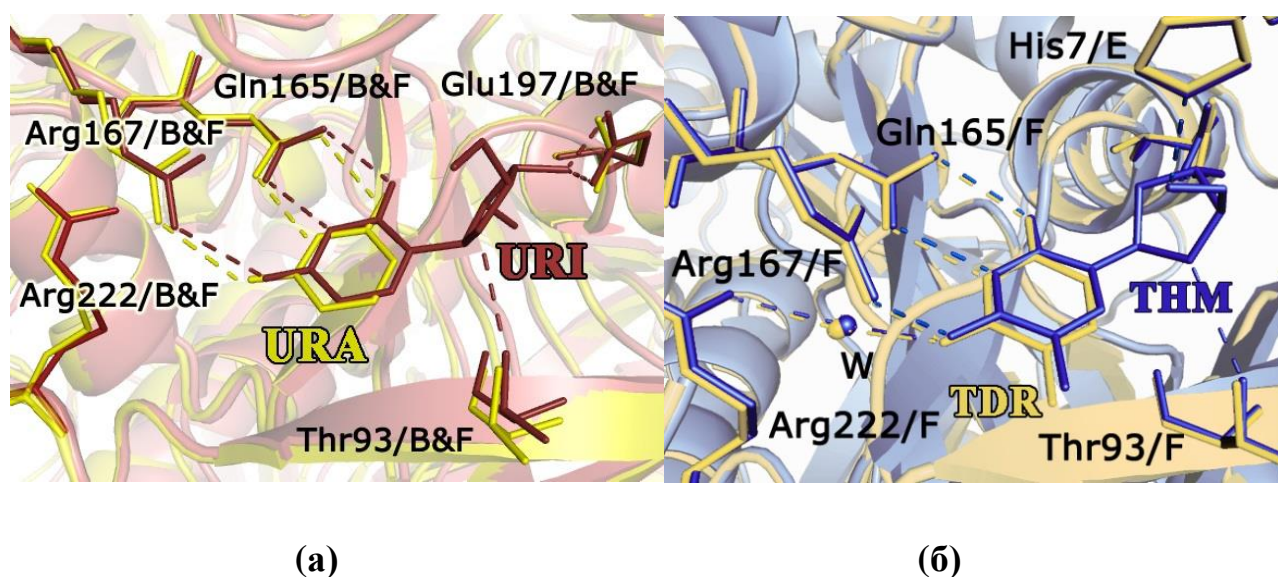


Рисунок 34. Суперпозиция а.о. фрагмента активного центра структур комплексов *VchUPh* с уридином (URI) и урацилом (URA) (а); и структур комплексов *VchUPh* с тиминном (THM) и тимидином (TDR) (б);

Однако, при сравнении пространственных структур комплексов *VchUPh* с тиминном (ID PDB: 4OGL, субъединица F) и *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW субъединица F) не выявлено значимых различий в координатах атомов пиримидиновых колец этих лигандов (r.m.s.d. координат атомов - 0,215 Å) (см. рис. 34б). Этот факт объясняется наличием у молекулы тимина, в отличие от урацила,

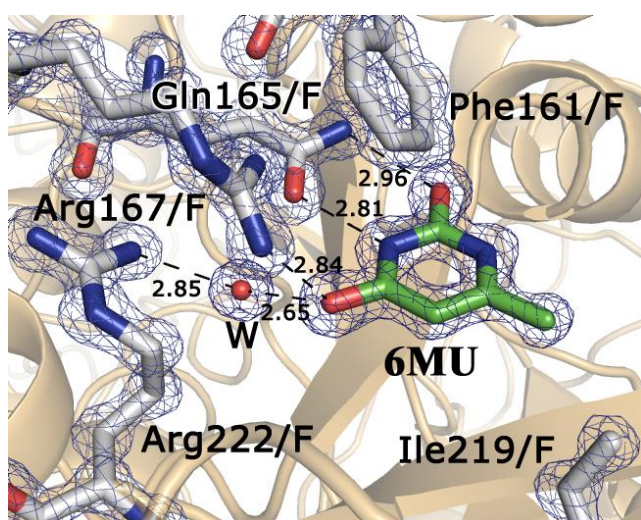
метильной группы, которая препятствует сближению молекулы тимина с Ile220, и соответственно удалению от Glu197 в отличие от молекулы урацила.

Тем самым, в молекуле уридина рибозная компонента посредством ковалентной β -N1-гликозидной связи (см. рис. 34а) смещает центр пиримидинового кольца ближе к рибозо-связывающему сайту по сравнению с центром пиридинового кольца молекулы урацила на 0,5 Å. В связи с этим в молекуле уридина по сравнению с молекулой тимидина возникает дополнительное напряжение β -N1-гликозидной связи, что приводит к её разрыву в процессе химической реакции и, как следствие, увеличению скорости прямой реакции фосфоролиза уридина по сравнению с реакцией фосфоролиза тимидина.

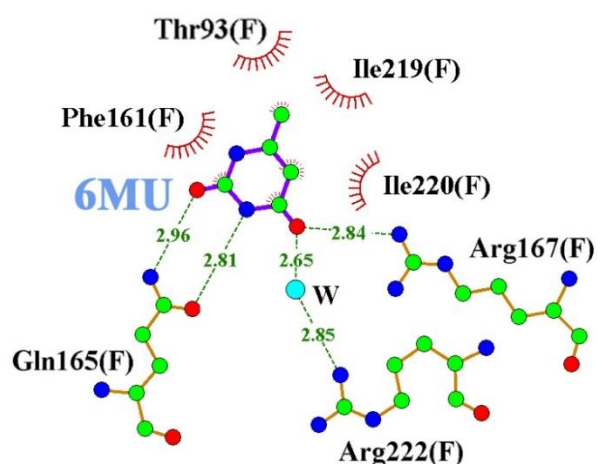
3.6 Структурные и квантово-химические аспекты специфичности VchUPh к псевдосубстратам

3.6.1 Урацил-связывающий сайт в структуре комплекса VchUPh с 6-метилурацилом

6-метилурацил (6МУ) связывается аминокислотными остатками урацил-связывающей сайта молекулы энзима. Водородные связи VchUPh с 6МУ представлены на рисунке 35. Ключевым аминокислотным остатком в урацил-связывающем сайте является Gln165, он консервативен в бактериальных уридинфосфорилазах и определяет узнавание пиримидиновой компоненты лигандов ферментом [5, 124, 127] (см. рис. 35). Кроме того, 6-метилурацил связывается с а.о. фермента опосредовано через молекулу воды - O6_6МУ – 2,65 Å – H₂O – 2,85 Å – NH₂_Arg222/F (см. рис. 35а). Боковая группа остатка Phe161 перпендикулярна плоскости пиримидинового кольца 6МУ, а минимальное расстояние между неводородными атомами ароматического кольца лиганда и Phe161 – 3,62 Å, что приводит к π -стекинг взаимодействию между ними. Гидрофобное окружение лиганда формируется боковыми группами аминокислотных остатков Ile219, Phe161 и Ile220 (см. рис. 35б).



(a)



(б)

Рисунок 35. Пространственная организация энзиматического центра комплекса *VchUPh* с 6-метиурацилом (6MU; ID PDB: 4K6O) с фрагментом карты электронной плотности $2mF_o-DF_c$ (а). Схематическая диаграмма взаимодействия 6-метиурацила с сайтом связывания *VchUPh* (б).

3.6.2 Структурный аспект влияния 6-метилгруппы азотистых оснований на возможность прохождения обратной ферментативной реакции

Для выяснения структурного аспекта влияния 6-метилгруппы 6MU на протекание реакции, произведено сравнение структур комплексов *VchUPh* с 6-метиурацилом и урацилом. Геометрический центр пиримидинового кольца 6-метиурацила (ID PDB: 4K6O) (см. рис. 36) располагается дальше на $\sim 1,3$ Å геометрического центра урацила (ID PDB: 5MIW) от атома кислорода гидроксигруппы Thr93/В (при сравнении В-субъединиц структур это расстояние равно 6,1 Å для 6MU против 4,8 Å для урацила). В тоже время, r.m.s.d. координат атомов Thr93/В в структуре комплекса *VchUPh* с урацилом по сравнению со структурой комплекса энзима с 6MU равно 0,75 Å. Отсюда следует, что взаимное Ван-дер-Ваальсовое отталкивание 6-метильной группы 6MU и гидроксигруппы боковой цепи Thr93 приводит к смещению боковой группы Thr93 (см. рис. 36) в структуре комплекса *VchUPh*+6MU. При этом, среднеквадратичное отклонение

длин водородных связей 6MU с а.о. сайта связывания *VchUPh* в сравнении с длинами водородных связей урацила с а.о. (ID PDB: 5MIW) равно 0,08 Å.

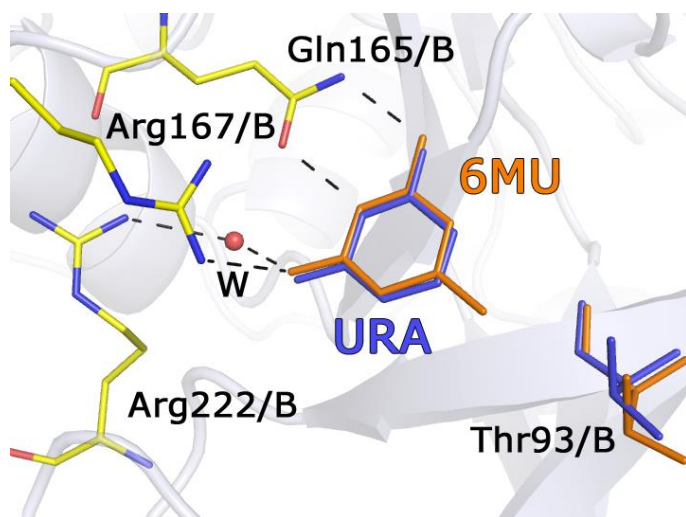


Рисунок 36. Положение урацила и 6-метилурацила в активном центре *VchUPh*.

Для выяснения последствий отталкивания 6-метилгруппы 6MU а.о. гидроксогруппы Thr93, оказываемых на ферментативную реакцию, произведено сравнение структур комплексов *VchUPh* с 6-метилурацилом и *EcUPh* с урацилом и рибозо-1-фосфатом (см. рис. 37). Thr93, как и его аналог - Thr94 в *EcUPh* и *StUPh*, входит в состав как рибозосвязывающего, так и фосфат-связывающего сайта бактериальных уридинфосфорилаз и важен для надёжной фиксации лигандов в этих сайтах связывания [5, 127, 128, 138]. В структуре комплекса гомологичной *EcUPh* с урацилом и рибозо-1-фосфатом (R1P) (ID PDB: 1TGY, В-субъединица) Thr94 образует водородные связи с атомом кислорода O3P фосфатной группы R1P (OG1_Thr94/B – 2,50 Å – O3P_R1P/B), а также с O4' рибозной компоненты R1P (OG1_Thr94/B – 3,04 Å – O4'_R1P/B). R.m.s.d. между координатами атомов боковой группы Thr93/F комплекса *VchUPh* с 6-метилурацилом (ID PDB: 4K6O) и Thr94/B (ID PDB: 1TGY) достигает 1,01 Å, в то время как для атомов других боковых групп а.о. (Gln165, Arg167, Glu197) этих же сайтов связывания r.m.s.d. не превышает 0,25 Å. Отметим, что r.m.s.d. между координатами атомов боковой

группы Thr93/B комплекса *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW) и Thr94/B комплекса *EcUPh* с урацилом и рибозо-1-фосфатом (ID PDB: 1TGY) равно 0,22 Å, а всех координат атомов а.о., входящих в сайт связывания – 0,21 Å.

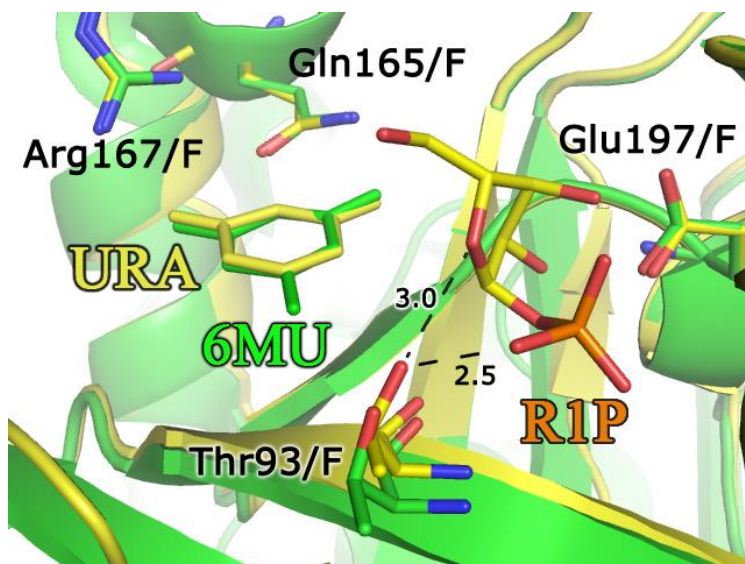
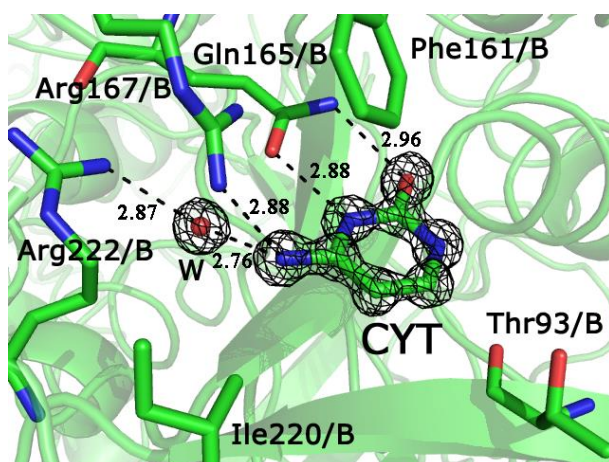


Рисунок 37. Суперпозиция активных центров структур комплексов *VchUPh* с 6-метилурацилом с двойным комплексом с урацилом и рибозо-1-фосфатом.

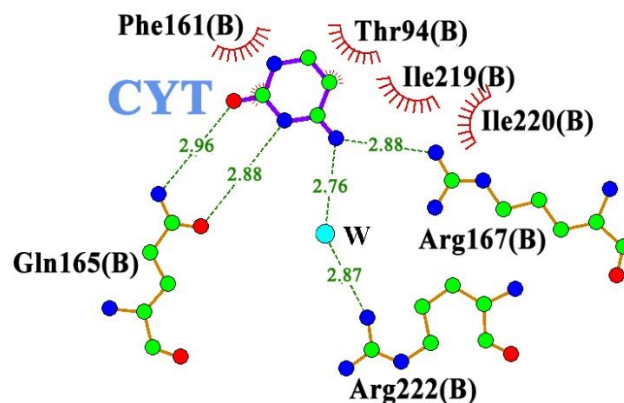
Таким образом наблюдается отталкивание гидрофильной гидроксигруппы а.о. Thr93 активного центра гидрофобной метильной группой 6MU. В результате атом кислорода O4 рибозной компоненты и O3P фосфатной группы рибозо-1-фосфата, не образуют с OG1 Thr93 водородные связи, необходимые для проведения ферментативной реакции [5, 127, 128, 138]. Что делает невозможным проведение энзимом реакции синтеза 6-метилюридина из 6-метилурацила.

3.6.3 Урацил-связывающий сайт в структуре комплекса *VchUPh* с цитозином.

Цитозин (CYT) в нуклеозид-связывающем сайте структуры комплекса *VchUPh* с цитозином (ID PDB: 5EPU) взаимодействует при помощи водородных связей, только с а.о. урацил-связывающего сайта связывания Gln165, Arg167 и Arg222 (см. рис. 38а, б).



(a)



(б)

Рисунок 38. Активный центр комплекса *VchUPh* с цитозином CYT (ID PDB: 5EPU). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mF_o - DF_c$) отображена черным цветом при уровне срезки $1,5\sigma$ (а); Схематическая диаграмма взаимодействия цитозина с сайтом связывания *VchUPh* (б).

В случае комплекса *VchUPh* с цитозином (ID PDB: 5EPU), лиганд связывается только с урацил-связывающим сайтом, образуя следующие водородные связи: OE1_Gln165/B - 2,88 Å – N3_CYT, NE2_Gln165/B - 2,96 Å - O2_CYT, NH2_Arg167/B - 2,88 Å - N4_CYT. Боковая группа а.о. Phe161/B формирует π -стекинг взаимодействие с лигандом, как и в случае природными субстратами (урацилом и тимином). Также положение цитозина фиксируется ферментом опосредовано через молекулу воды - N4_CYT – 2,76 Å – H₂O – 2,87 Å – NH2_Arg222/B. Гидрофобное окружение лиганда формируют аминокислотные остатки Ile219/B, Phe161/B и Ile220/B.

3.6.4 Влияние 4-аминогруппы азотистых оснований на скорость обратной ферментативной реакции

Из публикаций [2] известно, что обратная ферментативная реакция синтеза цитидина из цитозина не проводится уридинфосфорилазой (цитозин+рибозо-1'-фосфат \neq цитидин+фосфат), однако, причины этого обстоятельства не ясны.

При проведении суперпозиции структур комплексов *VchUPh* с цитозином (ID PDB: 5EPU, В-субъединица) и *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW, В-субъединица) определено, что среднеквадратичное отклонение координат всех неводородных атомов а.о. активного центра равно 0,18 Å, а между координатами атомов боковых групп тех же остатков - 0,19Å (см. рис. 39);

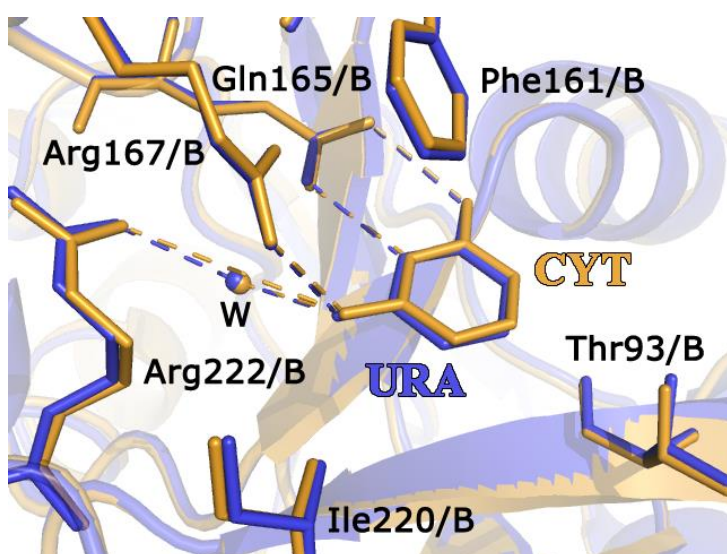


Рисунок 39. Суперпозиция а.о. фрагмента активного центра структур комплексов *VchUPh* с цитозином (оранжевый) и урацилом (синий)

Среднеквадратичное отклонение координат неводородных атомов урацила по отношению к цитозину, при суперпозиции активных центров комплексов равно 0,12 Å (см. рис. 39). Таким образом, структурных отличий в сайтах связывания комплексов *VchUPh* с цитозином и урацилом не выявлено. Следовательно, на скорость синтеза уридинфосфорилазой цитидина из цитозина сказывается химическое строение ароматического кольца субстрата.

Отметим, что таутомером цитозина с наиболее высокой концентрацией в водном растворе при pH равном от 7,5 до 8,5 является лактамная аминная форма таутомера цитозина (I) [181-184] (см. рис. 40). На рисунке также приведены рассчитанные

значения констант диссоциации pK_a этих лигандов. Следующий за ним по уровню концентрации - таутомер цитозина II. Концентрация остальных таутомеров в водном растворе намного ниже, чем I и II и вероятность их обнаружения чрезвычайно мала [182, 183].

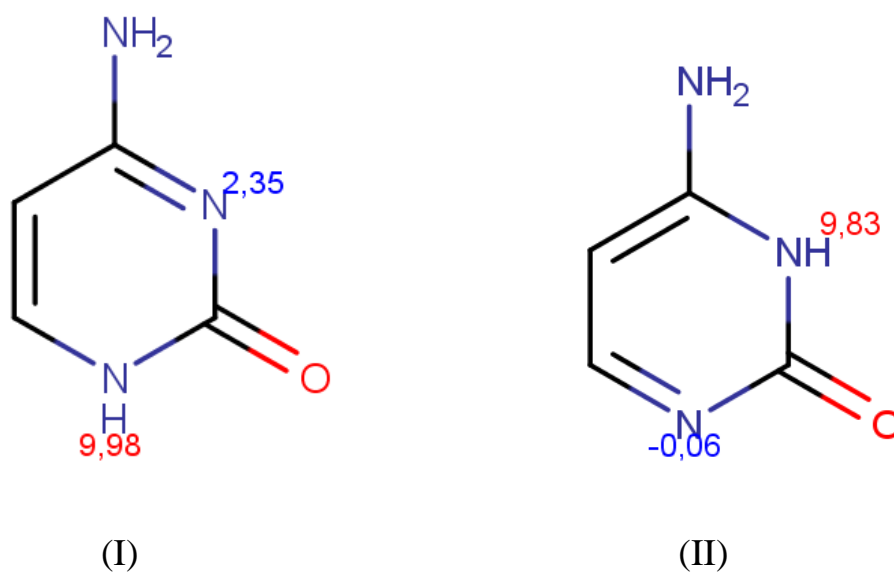


Рисунок 40. Наиболее вероятные таутомеры цитозина в жидкой среде. Приведены рассчитанные значения констант диссоциации pK_a этих лигандов

Анализ карты электронной плотности структуры комплекса *VchUPh* с цитозином атомного разрешения с коэффициентами (2mFo-DFc) отображенной при низком уровне срезки $0,1\sigma$ показал наличие пиков при атоме N3 пиримидинового кольца цитозина и атоме азота боковой группы Gln165, характеризующие направление образования водородных связей цитозина с ферментом (см. рис. 41). Такие водородные связи может образовать только таутомер цитозина II, ввиду наличия у него донора протона при атоме N3.

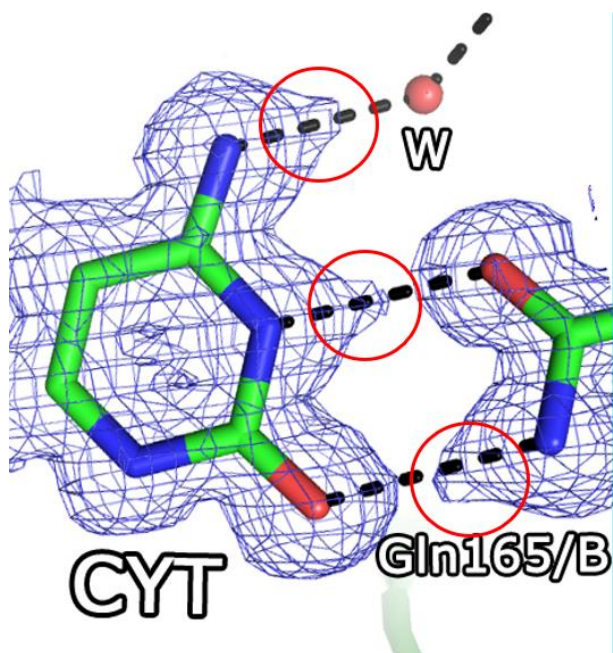


Рисунок 41. Карта электронной плотности структуры комплекса *VchUPh* с цитозином атомного разрешения с коэффициентами ($2mFo-DFc$) отображенной при уровне срезки $0,1\sigma$.

Предположение о влиянии химического строения ароматического кольца лиганда на субстратную специфичность подтвердилось в том числе при помощи оценочного расчета вклада свободной энергии связывания атомов цитозина с ферментом в сравнении с урацилом в программе SeeSAR. Вклад взаимодействия атома N3 пиримидинового кольца цитозина (I) с УФ в свободную энергию связывания при связывании равна $7,6$ кДж/моль, в то время как для атомов N4 и O2 $-1,4$ кДж/моль и $-2,5$ кДж/моль. Для сравнения была также рассчитан вклад свободной энергии связывания для атомов урацила в комплексе с УФ (ID PDB: 5MIW): для атомов N3, O2 и O4: $-4,3$ кДж/моль, $-2,3$ кДж/моль, $-0,3$ кДж/моль соответственно. Таким образом, при расчете вклада свободной энергии связывания атомов цитозина (I) определено, что атом N3 расположен энергетически невыгодно по отношению к гидроксигруппе Gln165. Этот факт объясняется, отсутствием атома водорода связанного с атомом азота N3 - донора водородной связи у рассматриваемого таутомера. Поэтому цитозин (I) не может образовать одну из наиболее значимых водородных связей с атомом кислорода - акцептора протона,

а.о. Gln165 в *VchUPh* (N3_Cyt – OE1_Gln165). Напомним, что а.о. Gln165 в УФ является ключевым в узнавании и стабилизации субстрата [5]. Таким образом, таутомер цитозина (I) не образует стабильный комплекс с ферментом.

Расчет вклада оценочной энергии связывания атомов N3, N4, O4 цитозина (II) равен -4,3 кДж/моль, -0,4 кДж/моль, -1,8 кДж/моль соответственно. Таким образом, именно таутомер цитозина II связывается с *VchUPh* (см. рис. 38, 40, 41), т. к. в нем атом N3 выступает в роли донора протона. Но в таком случае, у N1 атома молекулы цитозина (II) отсутствует протон, необходимый для проведения ферментативной реакции (см. рис. 41).

Тем самым, из всех возможных таутомеров цитозина связывается с ферментом такой таутомер (II), который не способен к нуклеофильной атаке на атом углерода в рибозо-1-фосфате. Этот факт не позволяет цитозину (II) образовать N-С гликозидную связь с рибозо-1-фосфатом. По этой причине прохождение ферментативной реакции цитозина с рибозо-1-фосфатом при участии *VchUPh* невозможно.

ВЫВОДЫ

• Методом рентгеноструктурного анализа впервые решены и уточнены с высокой достоверностью пространственные структуры атомного разрешения следующих биомакромолекулярных комплексов *VchUPh* с:

1) анионом-фосфата (субстратом прямой реакции, катализируемой уридинфосфорилазой) при разрешении 1,29 Å ($R_{\text{factor}} = 17,2\%$; $R_{\text{free}} = 20,0\%$, $\text{DPI} = 0,06$ Å, $\text{r.m.s.d.} = 0,008$ Å для длин связей и $\text{r.m.s.d.} = 1,22^\circ$ для валентных углов)

2) уридином (субстратом прямой реакции) при разрешении 1,03 Å ($R_{\text{factor}} = 11,7\%$; $R_{\text{free}} = 13,7\%$, $\text{DPI} = 0,03$ Å, $\text{r.m.s.d.} = 0,016$ Å для длин связей и $\text{r.m.s.d.} = 1,36^\circ$ для валентных углов)

3) тимидином (субстратом прямой реакции) при разрешении 1,29 Å ($R_{\text{factor}} = 17,8\%$; $R_{\text{free}} = 21,1\%$, $\text{DPI} = 0,06$ Å, $\text{r.m.s.d.} = 0,014$ Å для длин связей и $\text{r.m.s.d.} = 1,32^\circ$ для валентных углов)

4) урацилом (субстратом обратной реакции) при разрешении 1,28 Å ($R_{\text{factor}} = 13,3\%$; $R_{\text{free}} = 16,8\%$, $\text{DPI} = 0,09$ Å, $\text{r.m.s.d.} = 0,014$ Å для длин связей и $\text{r.m.s.d.} = 1,32^\circ$ для валентных углов)

5) тиминном (субстратом обратной реакции при разрешении 1,25 Å ($R_{\text{factor}} = 11,5\%$; $R_{\text{free}} = 14,7\%$, $\text{DPI} = 0,04$ Å, $\text{r.m.s.d.} = 0,008$ Å для длин связей и $\text{r.m.s.d.} = 1,27^\circ$ для валентных углов)

6) цитозинном (псевдосубстрат) при разрешении 1,06 Å ($R_{\text{factor}} = 10,5\%$; $R_{\text{free}} = 12,2\%$, $\text{DPI} = 0,03$ Å, $\text{r.m.s.d.} = 0,009$ Å для длин связей и $\text{r.m.s.d.} = 1,50^\circ$ для валентных углов)

7) 6-метилурацилом (псевдосубстрат) при разрешении 1,17 Å ($R_{\text{factor}} = 10,8\%$; $R_{\text{free}} = 12,8\%$, $\text{DPI} = 0,04$ Å, $\text{r.m.s.d.} = 0,016$ Å для длин связей и $\text{r.m.s.d.} = 1,19^\circ$ для валентных углов)

Координаты атомов пространственных структур вышеприведённых 7 макромолекулярных соединений и соответствующие им наборы экспериментальных модулей структурных факторов депонированы в международный банк белковых структур (PDB).

Им присвоены следующие идентификационные номера ID PDB: 4IP0, 5M2T, 5MIW, 4LZW, 4OGL, 5LOK, 4K6O соответственно.

- Взаимодействие фосфат-аниона посредством водородных связей одновременно с аминокислотными остатками Arg90, Thr93 β 5-стренда и Gln25 β 1-стренда, фиксирует функционально-значимую петлю L11 в закрытой конформации, делая активный центр молекулы недоступным для связывания с нуклеозидами – уридином или тимидином. Нахождение же молекулы субстрата в нуклеозид связывающем сайте, является необходимым, но недостаточным условием закрытого состояния петли L11 и подготовки фермента к акту катализа, так как эти лиганды в отличие от фосфат-аниона связываются лишь с Gln25 β 5-стренда.

- Исследован структурный аспект селективности природных бактериальных уридинфосфорилаз к урдину и тимидину. Показано, что образование сети водородных связей 2'-гидроксигруппы уридина с атомами аминокислотных остатков активного центра уридинфосфорилаз, и в частности *VchUPh* (N_Met196/A–2,57Å- O2'_URI; OE1_Glu197/A–2,68 Å- O2'_URI), приводит к изменению конформации рибозной компоненты уридина в сравнении с тимидином на более высокоэнергетическую и, как следствие, более реакционноспособную. Помимо этого, положительный индуктивный эффект 5-метильной группы тимидина на его ароматическое кольцо приводит к стабилизации β -N1-гликозидной связи нуклеозида и уменьшению скорости ферментативной реакции фосфоролиза тимидина по сравнению с уридином.

- Продемонстрировано, что большая избирательность уридинфосфорилаз в отношении рибозо-1-фосфата в сравнении с 2-дезоксирибозо-1-фосфатом обусловлена образованием дополнительных водородных связей фермента с 2-гидроксигруппой лиганда и росту энергии конформации рибозо-1-фосфата.

- Исследован структурный аспект селективности природных бактериальных уридинфосфорилаз к 6-метилурацилу. Отталкивание гидрофобной метильной группой 6-метилурацила гидрофильной гидроксигруппы аминокислотного остатка Thr93 активного центра, приводит к тому, что атом кислорода O4 рибозной

компоненты и ОЗР фосфатной группы рибозо-1-фосфата, не образуют с атомом OG1 Thr93 водородные связи, необходимые для проведения ферментативной реакции. Что делает невозможным проведение *VchUPh* ферментативной реакции синтеза 6-метилюридина из 6-метилурацила.

- Выявлен структурный аспект селективности природных бактериальных уридинфосфорилаз к цитозину. Показано, что образование стабильного комплекса *VchUPh* с цитозином возможно только, если лиганд находится в форме 4-амино-пиримидин-2(3H)-диона. С другой стороны, в таком таутомере цитозина у атома азота N1 пиримидинового кольца отсутствует протон, необходимый для проведения ферментативной реакции. Таким образом, с ферментом способен связаться только такой таутомер цитозина, который не может участвовать в реакции нуклеофильного замещения.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность:

- к.ф.-м.н., доценту А.М. Михайлову за предложенную тему, руководство работой, неоценимую помощь и поддержку.
- сотрудникам Лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения ФНИЦ «Кристаллография фотоника» РАН – к.ф.-м.н. А.А. Лашкову, к.ф.-м.н. А.Г. Габдулхакову, м.н.с. В.В. Балаеву и инж. С.Е. Сотниченко - за помощь и дружескую поддержку, которая в огромной степени способствовала исследованию пространственной организации биомакромолекулярных комплексов уридинфосфорилаз методом рентгеноструктурного анализа;
- д.б.н., профессору А.С. Миронову, к.б.н. Т.А. Серegiной за предоставление препарата *VchUPh* для кристаллизации;
- проф. Х. Бетзелю (Christian Betzel, DESY, Гамбург, Германия) за предоставленную возможность работы на белковых станциях синхротрона DESY (Гамбург, Германия) и кристаллизации комплексов уридинфосфорилаз с лигандами;

Список литературы.

1. Vita A., Amici A., Cacciamani T., Lanciotti M., Magni G. Uridine phosphorylase from *Escherichia coli* B. Enzymatic and molecular properties // *Int J Biochem.* 1986. V. 18. № 5. P. 431-5.
2. Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M. Uridine phosphorylase from *Escherichia coli*. Physical and chemical characterization // *Eur J Biochem.* 1977. V. 75. № 1. P. 217-24.
3. 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. V. 60. № 4. P. 709-711.
4. Brown N.S., Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis // *Biochem J.* 1998. V. 334. № Pt 1. P. 1-8.
5. 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. V. 337. № 2. P. 337-54.
6. Katsumata K., Tomioka H., Sumi T., Yamashita S., Takagi M., Kato F., Nakamura R., Koyanagi Y., Aoki T., Kato K. Correlation between clinicopathologic factors and kinetics of metabolic enzymes for 5-fluorouracil given to patients with colon carcinoma by two different dosage regimens // *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003. V. 51. № 2. P. 155-60.
7. Finan P.J., Koklitis P.A., Chisholm E.M., Giles G.R. Comparative levels of tissue enzymes concerned in the early metabolism of 5-fluorouracil in normal and malignant human colorectal tissue // *Br J Cancer.* 1984. V. 50. № 5. P. 711-5.
8. Leyva A., Kraal I., Lankelma J., Delemarre J.F., Pinedo H.M. High uridine phosphorylase activity in human melanoma tumor // *Anticancer Res.* 1983. V. 3. № 4. P. 227-31.
9. Kanzaki A., Takebayashi Y., Bando H., Eliason J.F., Watanabe Si S., Miyashita H., Fukumoto M., Toi M., Uchida T. Expression of uridine and thymidine phosphorylase genes in human breast carcinoma // *Int J Cancer.* 2002. V. 97. № 5. P. 631-5.
10. Luccioni C., Beaumatin J., Bardot V., Lefrancois D. Pyrimidine nucleotide metabolism in human colon carcinomas: comparison of normal tissues, primary tumors and xenografts // *Int J Cancer.* 1994. V. 58. № 4. P. 517-22.
11. Ishikawa T., Utoh M., Sawada N., Nishida M., Fukase Y., Sekiguchi F., Ishitsuka H. Tumor selective delivery of 5-fluorouracil by capecitabine, a new oral fluoropyrimidine carbamate, in human cancer xenografts // *Biochem Pharmacol.* 1998. V. 55. № 7. P. 1091-7.
12. Reigner B., Blesch K., Weidekamm E. Clinical pharmacokinetics of capecitabine // *Clin Pharmacokinet.* 2001. V. 40. № 2. P. 85-104.
13. Schuller J., Cassidy J., Dumont E., Roos B., Durston S., Banken L., Utoh M., Mori K., Weidekamm E., Reigner B. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients // *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000. V. 45. № 4. P. 291-7.
14. Venturini M. Rational development of capecitabine // *Eur J Cancer.* 2002. V. 38. № Suppl 2. P. 3-9.
15. Sivridis E. Thymidine phosphorylase activity in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium--correlation with intratumoral angiogenesis // *Adv Exp Med Biol.* 2000. V. 476. P. 297-303.

16. *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. V. 9. P. 14.
17. *el Kouni M.H., Naguib F.N., Niedzwicki J.G., Iltzsch M.H., Cha S.* Uridine phosphorylase from *Schistosoma mansoni* // *J Biol Chem.* 1988. V. 263. № 13. P. 6081-6.
18. *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. V. 38. № 21. P. 3785-9.
19. *Lee C.S., Jimenez B.M., O'Sullivan W.J.* Purification and characterization of uridine (thymidine) phosphorylase from *Giardia lamblia* // *Mol Biochem Parasitol.* 1988. V. 30. № 3. P. 271-7.
20. Substrate specificity of *Escherichia coli* nucleosidephosphorylases. / *Alekseev K.S.* – Moscow, 2012. – 132 c.
21. *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. V. 367. № 2. P. 183-7.
22. *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. V. 61. № Pt 4. P. 337-40.
23. *Kim S., Park D.H., Kim T.H., Hwang M., Shim J.* Functional analysis of pyrimidine biosynthesis enzymes using the anticancer drug 5-fluorouracil in *Caenorhabditis elegans* // *FEBS J.* 2009. V. 276. № 17. P. 4715-26.
24. *Pugmire M.J., Ealick S.E.* Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases // *Biochem J.* 2002. V. 361. № Pt 1. P. 1-25.
25. *Pizzorno G., Cao D., Leffert J.J., Russell R.L., Zhang D., Handschumacher R.E.* Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: a biological and clinical update // *Biochim Biophys Acta.* 2002. V. 1587. № 2-3. P. 133-44.
26. *Pizzorno G., Yee L., Burtness B.A., Marsh J.C., Darnowski J.W., Chu M.Y., Chu S.H., Chu E., Leffert J.J., Handschumacher R.E., Calabresi P.* Phase I clinical and pharmacological studies of benzylacyclouridine, a uridine phosphorylase inhibitor // *Clin Cancer Res.* 1998. V. 4. № 5. P. 1165-75.
27. *Schwartz P.M., Moir R.D., Hyde C.M., Turek P.J., Handschumacher R.E.* Role of uridine phosphorylase in the anabolism of 5-fluorouracil // *Biochem Pharmacol.* 1985. V. 34. № 19. P. 3585-9.
28. *LEVENE P.A.T., MEDIGRECEANU F.* ON NUCLEASES. // *The Journal of Biological Chemistry.* 1911. V. 9. P. 65-83.
29. *LEVENE P.A.T., MEDIGRECEANU F.* ON NUCLEASES. SECOND PAPER. // *The Journal of Biological Chemistry.* 1911. V. 9. P. 389-402.
30. *Weber I., Levene P.A.T., Yamagawa M.* On nucleosidases: Ph. D.; Columbia University. – New York, 1924. – 3 p. l., p. 693-720, 1 l. c.
31. *Deutsch W., R. L.* Experimentelle studien uber den nucleinstoffwechsel. XIX. Mitteilung. Zur kermtnis der nucleosidase. Verhalten einer nucleosidase aus rinderknochenmark zu einem splatprodukt der thymusnucleinsaure. // *Z Physiol. Chem.* 1930. V. 186. P. 1-10.

32. Klein W. Experimentelle studien uber den nucleinstoffwechsel. XXXVII. Tiber nucleosidase. // *Z Physiol. Chem.* 1935. V. 231. P. 125-148.
33. Kalckar H.M. The enzymatic synthesis of purine ribosides // *J Biol Chem.* 1947. V. 167. № 2. P. 477-86.
34. Kalckar H.M. Enzymatic reaction in purine metabolism // *Harvey Lect.* 1949. V. Series 45. P. 11-39.
35. Friedkin M., Roberts D. The enzymatic synthesis of nucleosides. I. Thymidine phosphorylase in mammalian tissue // *J Biol Chem.* 1954. V. 207. № 1. P. 245-56.
36. Friedkin M., Roberts D. The enzymatic synthesis of nucleosides. II. Thymidine and related pyrimidine nucleosides // *J Biol Chem.* 1954. V. 207. № 1. P. 257-66.
37. Paege L.M., Schlenk F. Bacterial uracil riboside phosphorylase // *Arch Biochem Biophys.* 1952. V. 40. № 1. P. 42-9.
38. Laster L., Blair A. An Intestinal Phosphorylase for Uric Acid Ribonucleoside // *J Biol Chem.* 1963. V. 238. P. 3348-57.
39. Krenitsky T.A., Mellors J.W., Barclay R.K. Pyrimidine Nucleosidases. Their Classification and Relationship to Uric Acid Ribonucleoside Phosphorylase // *J Biol Chem.* 1965. V. 240. P. 1281-6.
40. Walter M.R., Cook W.J., Cole L.B., Short S.A., Koszalka G.W., Krenitsky T.A., Ealick S.E. Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution // *J Biol Chem.* 1990. V. 265. № 23. P. 14016-22.
41. Balaev V.V., Lashkov A.A., Gabdulkhakov A.G., Dontsova M.V., Seregina T.A., Mironov A.S., Betzel C., Mikhailov A.M. Structural investigation of the thymidine phosphorylase from *Salmonella typhimurium* in the unliganded state and its complexes with thymidine and uridine // *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2016. V. 72. № Pt 3. P. 224-33.
42. Devereux J., Haeberli P., Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX // *Nucleic Acids Res.* 1984. V. 12. № 1 Pt 1. P. 387-95.
43. Walton L., Richards C.A., Elwell L.P. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* uridine phosphorylase (udp) gene // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. № 16. P. 6741.
44. Lewis A.S., Glantz M.D. Bovine brain purine-nucleoside phosphorylase purification, characterization, and catalytic mechanism // *Biochemistry.* 1976. V. 15. № 20. P. 4451-7.
45. Porter D.J. Purine nucleoside phosphorylase. Kinetic mechanism of the enzyme from calf spleen // *J Biol Chem.* 1992. V. 267. № 11. P. 7342-51.
46. Lewis A.S., Glantz M.D. Monomeric purine nucleoside phosphorylase from rabbit liver. Purification and characterization // *J Biol Chem.* 1976. V. 251. № 2. P. 407-13.
47. Milman G., Anton D.L., Weber J.L. Chinese hamster purine-nucleoside phosphorylase: purification, structural, and catalytic properties // *Biochemistry.* 1976. V. 15. № 23. P. 4967-73.
48. Jensen K.F., Nygaard P. Purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Purification and some properties // *Eur J Biochem.* 1975. V. 51. № 1. P. 253-65.
49. Cacciapuoti G., Porcelli M., Bertoldo C., De Rosa M., Zappia V. Purification and characterization of extremely thermophilic and thermostable 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Purine nucleoside phosphorylase activity and evidence for intersubunit disulfide bonds // *J Biol Chem.* 1994. V. 269. № 40. P. 24762-9.
50. Shirae H., Yokozeki K. Purifications and properties of orotidine-phosphorolyzing enzyme and purine nucleoside phosphorylase from *Erwinia carotovora* AJ 2992 // *Agric Biol Chem.* 1991. V. 55. № 7. P. 1849-57.

51. *Gilpin R.W., Sadoff H.L.* Physical and catalytic properties of the purine nucleoside phosphorylases from cells and spores of *Bacillus cereus* T // *J Biol Chem.* 1971. V. 246. № 5. P. 1475-80.
52. *Larson E.T., Mudeppa D.G., Gillespie J.R., Mueller N., Napuli A.J., Arif J.A., Ross J., Arakaki T.L., Lauricella A., Detitta G., Luft J., Zucker F., Verlinde C.L., Fan E., Van Voorhis W.C., Buckner F.S., Rathod P.K., Hol W.G., Merritt E.A.* The crystal structure and activity of a putative trypanosomal nucleoside phosphorylase reveal it to be a homodimeric uridine phosphorylase // *J Mol Biol.* 2010. V. 396. № 5. P. 1244-59.
53. *Watanabe S., Uchida T.* Cloning and expression of human uridine phosphorylase // *Biochem Biophys Res Commun.* 1995. V. 216. № 1. P. 265-72.
54. *Miyashita H., Takebayashi Y., Eliason J.F., Fujimori F., Nitta Y., Sato A., Morikawa H., Ohashi A., Motegi K., Fukumoto M., Mori S., Uchida T.* Uridine phosphorylase is a potential prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma // *Cancer.* 2002. V. 94. № 11. P. 2959-66.
55. *Krenitsky T.A., Barclay M., Jacques J.A.* Specificity of Mouse Uridine Phosphorylase. Chromatography, Purification, and Properties // *J Biol Chem.* 1964. V. 239. P. 805-12.
56. *Liu M., Cao D., Russell R., Handschumacher R.E., Pizzorno G.* Expression, characterization, and detection of human uridine phosphorylase and identification of variant uridine phosphorolytic activity in selected human tumors // *Cancer Res.* 1998. V. 58. № 23. P. 5418-24.
57. *Takebayashi Y., Akiyama S., Akiba S., Yamada K., Miyadera K., Sumizawa T., Yamada Y., Murata F., Aikou T.* Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma // *J Natl Cancer Inst.* 1996. V. 88. № 16. P. 1110-7.
58. *O'Brien T.S., Fox S.B., Dickinson A.J., Turley H., Westwood M., Moghaddam A., Gatter K.C., Bicknell R., Harris A.L.* Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in primary bladder cancers // *Cancer Res.* 1996. V. 56. № 20. P. 4799-804.
59. *Cao D., Nimmakayalu M.A., Wang F., Zhang D., Handschumacher R.E., Bray-Ward P., Pizzorno G.* Genomic structure, chromosomal mapping, and promoter region analysis of murine uridine phosphorylase gene // *Cancer Res.* 1999. V. 59. № 19. P. 4997-5001.
60. *Holguin S., Martinez J., Chow C., Wurtman R.* Dietary uridine enhances the improvement in learning and memory produced by administering DHA to gerbils // *FASEB J.* 2008. V. 22. № 11. P. 3938-46.
61. *Cansev M., Ulus I.H., Wang L., Maher T.J., Wurtman R.J.* Restorative effects of uridine plus docosahexaenoic acid in a rat model of Parkinson's disease // *Neurosci Res.* 2008. V. 62. № 3. P. 206-9.
62. *Johansson M.* Identification of a novel human uridine phosphorylase // *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. V. 307. № 1. P. 41-6.
63. *Malet-Martino M., Martino R.* Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review // *Oncologist.* 2002. V. 7. № 4. P. 288-323.
64. *Lee C.W., Sokoloski J.A., Sartorelli A.C., Handschumacher R.E.* Differentiation of HL-60 cells by dimethylsulfoxide activates a Na(+)-dependent nucleoside transport system // *In Vivo.* 1994. V. 8. № 5. P. 795-801.
65. *van Groeningen C.J., Peters G.J., Pinedo H.M.* Modulation of fluorouracil toxicity with uridine // *Semin Oncol.* 1992. V. 19. № 2 Suppl 3. P. 148-54.

66. Heidelberg C., Chaudhuri N.K., Danneberg P., Mooren D., Griesbach L., Duschinsky R., Schnitzer R.J., Plevin E., Scheiner J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds // *Nature*. 1957. V. 179. № 4561. P. 663-6.
67. Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies // *Nat Rev Cancer*. 2003. V. 3. № 5. P. 330-8.
68. Bose R., Yamada E.W. Uridine phosphorylase, molecular properties and mechanism of catalysis // *Biochemistry*. 1974. V. 13. № 10. P. 2051-6.
69. Im Y.S., Shin H.K., Kim H.R., Jeong S.H., Kim S.R., Kim Y.M., Lee D.H., Jeon S.H., Lee H.W., Choi J.K. Enhanced cytotoxicity of 5-FU by bFGF through up-regulation of uridine phosphorylase 1 // *Mol Cells*. 2009. V. 28. № 2. P. 119-24.
70. Cao D., Russell R.L., Zhang D., Leffert J.J., Pizzorno G. Uridine phosphorylase (-/-) murine embryonic stem cells clarify the key role of this enzyme in the regulation of the pyrimidine salvage pathway and in the activation of fluoropyrimidines // *Cancer Res*. 2002. V. 62. № 8. P. 2313-7.
71. Niedzwicki J.G., Chu S.H., el Kouni M.H., Rowe E.C., Cha S. 5-benzylacyclouridine and 5-benzyloxybenzylacyclouridine, potent inhibitors of uridine phosphorylase // *Biochem Pharmacol*. 1982. V. 31. № 10. P. 1857-61.
72. Iigo M., Nishikata K., Hoshi A. In vivo antitumor effects of fluoropyrimidines on colon adenocarcinoma 38 and enhancement by leucovorin // *Jpn J Cancer Res*. 1992. V. 83. № 4. P. 392-6.
73. Connolly G.P., Duley J.A. Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials // *Trends Pharmacol Sci*. 1999. V. 20. № 5. P. 218-25.
74. Darnowski J.W., Handschumacher R.E. Tissue-specific enhancement of uridine utilization and 5-fluorouracil therapy in mice by benzylacyclouridine // *Cancer Res*. 1985. V. 45. № 11 Pt 1. P. 5364-8.
75. Spiegelman S., Nayak R., Sawyer R., Stolfi R., Martin D. Potentiation of the anti-tumor activity of 5FU by thymidine and its correlation with the formation of (5FU)RNA // *Cancer*. 1980. V. 45. № 5 Suppl. P. 1129-34.
76. Peters G.J., Braakhuis B.J., de Bruijn E.A., Laurensse E.J., van Walsum M., Pinedo H.M. Enhanced therapeutic efficacy of 5'-deoxy-5-fluorouridine in 5-fluorouracil resistant head and neck tumours in relation to 5-fluorouracil metabolising enzymes // *Br J Cancer*. 1989. V. 59. № 3. P. 327-34.
77. Peters G.J., Laurensse E., Leyva A., Lankelma J., Pinedo H.M. Sensitivity of human, murine, and rat cells to 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in relation to drug-metabolizing enzymes // *Cancer Res*. 1986. V. 46. № 1. P. 20-8.
78. Ashour O.M., Naguib F.N., Panzica R.P., Al Safarjalani O.N., el Kouni M.H. Modulation of 5-fluorouracil host toxicity by 5-(benzyloxybenzyl)barbituric acid acyclonucleoside, a uridine phosphorylase inhibitor, and 2',3',5'-tri-O-acetyluridine, a prodrug of uridine // *Biochem Pharmacol*. 2000. V. 60. № 3. P. 427-31.
79. Hiraga T., Hata K., Ikeda F., Kitagaki J., Fujimoto-Ouchi K., Tanaka Y., Yoneda T. Preferential inhibition of bone metastases by 5'-deoxy-5-fluorouridine and capecitabine in the 4T1/luc mouse breast cancer model // *Oncol Rep*. 2005. V. 14. № 3. P. 695-9.
80. 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. V. 25. № 6. P. 695-707.

81. *Le T.T., Ziemba A., Urasaki Y., Hayes E., Brotman S., Pizzorno G.* Disruption of uridine homeostasis links liver pyrimidine metabolism to lipid accumulation // *J Lipid Res.* 2013. V. 54. № 4. P. 1044-57.
82. *Williams C.D., Stengel J., Asike M.I., Torres D.M., Shaw J., Contreras M., Landt C.L., Harrison S.A.* Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study // *Gastroenterology.* 2011. V. 140. № 1. P. 124-31.
83. *Petersen K.F., Befroy D., Dufour S., Dziura J., Ariyan C., Rothman D.L., DiPietro L., Cline G.W., Shulman G.I.* Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance // *Science.* 2003. V. 300. № 5622. P. 1140-2.
84. *Begriche K., Massart J., Robin M.A., Borgne-Sanchez A., Fromenty B.* Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver // *J Hepatol.* 2011. V. 54. № 4. P. 773-94.
85. *Cohen J.C., Horton J.D., Hobbs H.H.* Human fatty liver disease: old questions and new insights // *Science.* 2011. V. 332. № 6037. P. 1519-23.
86. *Angulo P.* Treatment of nonalcoholic fatty liver disease // *Ann Hepatol.* 2002. V. 1. № 1. P. 12-9.
87. *Roosild T.P., Castronovo S., Villosio A., Ziemba A., Pizzorno G.* A novel structural mechanism for redox regulation of uridine phosphorylase 2 activity // *J Struct Biol.* 2011. V. 176. № 2. P. 229-37.
88. *Kong X., Fan H., Liu X., Wang R., Liang J., Gupta N., Chen Y., Fang F., Chang Y.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha enhances antiproliferative activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine in cancer cells through induction of uridine phosphorylase // *Mol Pharmacol.* 2009. V. 76. № 4. P. 854-60.
89. *Denton J.E., Lui M.S., Aoki T., Sebolt J., Takeda E., Eble J.N., Glover J.L., Weber G.* Enzymology of pyrimidine and carbohydrate metabolism in human colon carcinomas // *Cancer Res.* 1982. V. 42. № 3. P. 1176-83.
90. *Al Safarjalani O.N., Rais R., Shi J., Schinazi R.F., Naguib F.N., el Kouni M.H.* Modulation of 5-fluorouracil host-toxicity and chemotherapeutic efficacy against human colon tumors by 5-(Phenylthio)acyclouridine, a uridine phosphorylase inhibitor // *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006. V. 58. № 5. P. 692-8.
91. *Kawamura K., Takiguchi N., Wada A., Takenobu H., Kimura H., Soda H., Nagata M., Asano T., Tagawa M.* Up-regulated expression of the uridine phosphorylase gene in human gastric tumors is correlated with a favorable prognosis // *Anticancer Res.* 2006. V. 26. № 6C. P. 4647-51.
92. *Klecker R.W., Cysyk R.L., Collins J.M.* Zebularine metabolism by aldehyde oxidase in hepatic cytosol from humans, monkeys, dogs, rats, and mice: influence of sex and inhibitors // *Bioorg Med Chem.* 2006. V. 14. № 1. P. 62-6.
93. *Hammond D.J., Gutteridge W.E.* Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae // *Mol Biochem Parasitol.* 1984. V. 13. № 3. P. 243-61.
94. *Baum K.F., Berens R.L., Marr J.J.* Purine nucleoside and nucleobase cell membrane transport in *Giardia lamblia* // *J Eukaryot Microbiol.* 1993. V. 40. № 5. P. 643-9.
95. *Hassan H.F., Coombs G.H.* A comparative study of the purine- and pyrimidine-metabolising enzymes of a range of trypanosomatids // *Comp Biochem Physiol B.* 1986. V. 84. № 2. P. 219-23.
96. *da Silva Neto A.M., Torini de Souza J.R., Romanello L., Cassago A., Serrao V.H., DeMarco R., Brandao-Neto J., Garratt R.C., Pereira H.D.* Analysis of two *Schistosoma mansoni* uridine

phosphorylases isoforms suggests the emergence of a protein with a non-canonical function // *Biochimie*. 2016. V. 125. P. 12-22.

97. *Kim B.K., Cha S., Parks R.E., Jr.* Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes. I. Purification and properties // *J Biol Chem*. 1968. V. 243. № 8. P. 1763-70.

98. *Kim B.K., Cha S., Parks R.E., Jr.* Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes. II. Kinetic analysis and substrate-binding studies // *J Biol Chem*. 1968. V. 243. № 8. P. 1771-6.

99. *Carlson J.D., Fischer A.G.* Characterization of the active site of homogeneous thyroid purine nucleoside phosphorylase // *Biochim Biophys Acta*. 1979. V. 571. № 1. P. 21-34.

100. *Lewis A.S., Lowy B.A.* Human erythrocyte purine nucleoside phosphorylase: molecular weight and physical properties. A Theorell-Chance catalytic mechanism // *J Biol Chem*. 1979. V. 254. № 19. P. 9927-32.

101. *Erion M.D., Takabayashi K., Smith H.B., Kessi J., Wagner S., Honger S., Shames S.L., Ealick S.E.* Purine nucleoside phosphorylase. 1. Structure-function studies // *Biochemistry*. 1997. V. 36. № 39. P. 11725-34.

102. *Erion M.D., Stoeckler J.D., Guida W.C., Walter R.L., Ealick S.E.* Purine nucleoside phosphorylase. 2. Catalytic mechanism // *Biochemistry*. 1997. V. 36. № 39. P. 11735-48.

103. *Fedorov A., Shi W., Kicska G., Fedorov E., Tyler P.C., Furneaux R.H., Hanson J.C., Gainsford G.J., Larese J.Z., Schramm V.L., Almo S.C.* Transition state structure of purine nucleoside phosphorylase and principles of atomic motion in enzymatic catalysis // *Biochemistry*. 2001. V. 40. № 4. P. 853-60.

104. *Tebbe J., Bzowska A., Wielgus-Kutrowska B., Schroder W., Kazmierczuk Z., Shugar D., Saenger W., Koellner G.* Crystal structure of the purine nucleoside phosphorylase (PNP) from *Cellulomonas* sp. and its implication for the mechanism of trimeric PNPs // *J Mol Biol*. 1999. V. 294. № 5. P. 1239-55.

105. *Krenitsky T.A.* Uridine phosphorylase from *Escherichia coli*. Kinetic properties and mechanism // *Biochim Biophys Acta*. 1976. V. 429. № 2. P. 352-8.

106. *Kraut A., Yamada E.W.* Cytoplasmic uridine phosphorylase of rat liver. Characterization and kinetics // *J Biol Chem*. 1971. V. 246. № 7. P. 2021-30.

107. *Avraham Y., Grossowicz N., Yashphe J.* Purification and characterization of uridine and thymidine phosphorylase from *Lactobacillus casei* // *Biochim Biophys Acta*. 1990. V. 1040. № 2. P. 287-93.

108. *Yamada E.W.* Uridine phosphorylase from rat liver // *Methods Enzymol*. 1978. V. 51. P. 423-31.

109. *Renck D., Ducati R.G., Palma M.S., Santos D.S., Basso L.A.* The kinetic mechanism of human uridine phosphorylase 1: Towards the development of enzyme inhibitors for cancer chemotherapy // *Arch Biochem Biophys*. 2010. V. 497. № 1-2. P. 35-42.

110. *Zhu S., Song D., Gong C., Tang P., Li X., Wang J., Zheng G.* Biosynthesis of nucleoside analogues via thermostable nucleoside phosphorylase // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013. V. 97. № 15. P. 6769-78.

111. *Daniel F.V., Fritha H., Justice R., Brett P., Dean B.* Stabilization of *Escherichia coli* uridine phosphorylase by evolution and immobilization. // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011. V. 68. № 3-4. P. 279-285.

112. *McIvor R.S., Wohlhueter R.M., Plagemann P.P.* Uridine phosphorylase from Novikoff rat hepatoma cells: purification, kinetic properties, and its role in uracil anabolism // *J Cell Physiol*. 1985. V. 122. № 3. P. 397-404.

113. *Yan R., Wan L., Pizzorno G., Cao D.* Uridine phosphorylase in breast cancer: a new prognostic factor? // *Front Biosci*. 2006. V. 11. P. 2759-66.

114. Cui H., Ruda G.F., Carrero-Lerida J., Ruiz-Perez L.M., Gilbert I.H., Gonzalez-Pacanowska D. Exploring new inhibitors of Plasmodium falciparum purine nucleoside phosphorylase // Eur J Med Chem. 2010. V. 45. № 11. P. 5140-9.
115. Watanabe S., Hino A., Wada K., Eliason J.F., Uchida T. Purification, cloning, and expression of murine uridine phosphorylase // J Biol Chem. 1995. V. 270. № 20. P. 12191-6.
116. Naguib F.N., el Kouni M.H., Chu S.H., Cha S. New analogues of benzylacetyluridines, specific and potent inhibitors of uridine phosphorylase from human and mouse livers // Biochem Pharmacol. 1987. V. 36. № 13. P. 2195-201.
117. Drabikowska A.K. Uridine phosphorylase from Hymenolepis diminuta (Cestoda): kinetics and inhibition by pyrimidine nucleoside analogs // Acta Biochim Pol. 1996. V. 43. № 4. P. 733-41.
118. Scocca J.J. Purification and substrate specificity of pyrimidine nucleoside phosphorylase from Haemophilus influenzae // J Biol Chem. 1971. V. 246. № 21. P. 6606-10.
119. Heckert L.L., Butler M.H., Reimers J.M., Albe K.R., Wright B.E. Purification and characterization of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from Dictyostelium discoideum // J Gen Microbiol. 1989. V. 135. № 1. P. 155-61.
120. McIvor R.S., Wohlhueter R.M., Plagemann P.G. Uridine phosphorylase from Acholeplasma laidlawii: purification and kinetic properties // J Bacteriol. 1983. V. 156. № 1. P. 198-204.
121. Alexeev C.S., Sivets G.G., Safonova T.N., Mikhailov S.N. Substrate Specificity of E. Coli Uridine Phosphorylase. Further Evidences of High-syn Conformation of the Substrate in Uridine Phosphorolysis // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2016. 10.1080/15257770.2016.1223306. P. 1-15.
122. Krajewska E., Shugar D. Pyrimidine ribonucleoside phosphorylase activity vs 5- and/or 6-substituted uracil and uridine analogues, including conformational aspects // Biochem Pharmacol. 1982. V. 31. № 6. P. 1097-102.
123. Paul D., O'Leary S.E., Rajashankar K., Bu W., Toms A., Settembre E.C., Sanders J.M., Begley T.P., Ealick S.E. Glycal formation in crystals of uridine phosphorylase // Biochemistry. 2010. V. 49. № 16. P. 3499-509.
124. Bu W., Settembre E.C., el Kouni M.H., Ealick S.E. Structural basis for inhibition of Escherichia coli uridine phosphorylase by 5-substituted acylouridines // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2005. V. 61. № Pt 7. P. 863-72.
125. 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. V. 59. № Pt 1. P. 73-6.
126. Lashkov A.A., Sotnichenko S.E., Prokofiev I.I., Gabdulkhakov A.G., Agapov I.I., Shtil A.A., Betzel C., Mironov A.S., Mikhailov A.b.M. X-ray structure of Salmonella typhimurium uridine phosphorylase complexed with 5-fluorouracil and molecular modelling of the complex of 5-fluorouracil with uridine phosphorylase from Vibrio cholerae // Acta Crystallographica Section D. 2012. V. 68. № 8. P. 968-974.
127. 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. V. 66. № Pt 1. P. 51-60.
128. 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 Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2005. V. 61. № Pt 4. P. 337-40.

129. Lashkov A.A., Gabdoulkhakov A.G., Shtil A.A., Mikhailov A.M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Salmonella typhimurium uridine phosphorylase complexed with 5-fluorouracil // Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2009. V. 65. № Pt 6. P. 601-3.

130. 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. V. 63. № Pt 10. P. 852-4.

131. 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. V. 55. № 1. P. 1183-1199.

132. Safonova T.N., Mordkovich N.N., Veiko V.P., Okorokova N.A., Manuvera V.A., Dorovatovskii P.V., Popov V.O., Polyakov K.M. Concerted action of two subunits of the functional dimer of Shewanella oneidensis MR-1 uridine phosphorylase derived from a comparison of the C212S mutant and the wild-type enzyme // Acta Crystallogr D Struct Biol. 2016. V. 72. № Pt 2. P. 203-10.

133. Safonova T.N., Mikhailov S.N., Veiko V.P., Mordkovich N.N., Manuvera V.A., Alekseev C.S., Kovalchuk M.V., Popov V.O., Polyakov K.M. High-syn conformation of uridine and asymmetry of the hexameric molecule revealed in the high-resolution structures of Shewanella oneidensis MR-1 uridine phosphorylase in the free form and in complex with uridine // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2014. V. 70. № Pt 12. P. 3310-9.

134. Safonova T.N., Mordkovich N.N., Polyakov K.M., Manuvera V.A., Veiko V.P., Popov V.O. Crystallization of uridine phosphorylase from Shewanella oneidensis MR-1 in the laboratory and under microgravity and preliminary X-ray diffraction analysis // Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2012. V. 68. № Pt 11. P. 1387-9.

135. Лашков А.А., Сотниченко С.Е., Михайлов А.М. In silico анализ трехмерной структуры гомодимера уридинфосфорилазы из Yersinia pseudotuberculosis в нелигандированном состоянии и ее комплекса с 5-фторурацилом // Кристаллография. 2013. v. 58. № 2. P. 261-267.

136. Балаев В.В., Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Серегина Т.А., Миронов А.С., Михайлов А.М. Структура комплекса уридинфосфорилазы из Yersinia pseudotuberculosis с модифицированным бактериостатическим антибактериальным препаратом по результатам исследования методами рентгеноструктурного анализа и компьютерного эксперимента // кристаллография. 2015. V. 60. № 2. P. 240-249.

137. Балаев В.В., Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Трехмерная структура уридинфосфорилазы из Yersinia pseudotuberculosis в нелигандированном состоянии при разрешении 1.4 Å и ее комплекса с антибактериальным препаратом. // Кристаллография. 2015. V. 60. № 4. P. 579-585.

138. Tran T.H., Christoffersen S., Allan P.W., Parker W.B., Piskur J., Serra I., Terreni M., Ealick S.E. The crystal structure of Streptococcus pyogenes uridine phosphorylase reveals a distinct subfamily of nucleoside phosphorylases // Biochemistry. 2011. V. 50. № 30. P. 6549-58.

139. Rossmann M.G., Argos P. Protein folding // Annu Rev Biochem. 1981. V. 50. P. 497-532.

140. Zolotukhina M., Ovcharova I., Eremina S., Errais Lopes L., Mironov A.S. Comparison of the structure and regulation of the *udp* gene of *Vibrio cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* // *Res Microbiol.* 2003. V. 154. № 7. P. 510-20.
141. Robert X., Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № Web Server issue. P. W320-4.
142. Kline P.C., Schramm V.L. Purine nucleoside phosphorylase. Catalytic mechanism and transition-state analysis of the arsenolysis reaction // *Biochemistry.* 1993. V. 32. № 48. P. 13212-9.
143. Koellner G., Bzowska A., Wielgus-Kutrowska B., Luic M., Steiner T., Saenger W., Stepinski J. Open and closed conformation of the *E. coli* purine nucleoside phosphorylase active center and implications for the catalytic mechanism // *J Mol Biol.* 2002. V. 315. № 3. P. 351-71.
144. Kline P.C., Schramm V.L. Pre-steady-state transition-state analysis of the hydrolytic reaction catalyzed by purine nucleoside phosphorylase // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 4. P. 1153-62.
145. Kicska G.A., Tyler P.C., Evans G.B., Furneaux R.H., Shi W., Fedorov A., Lewandowicz A., Cahill S.M., Almo S.C., Schramm V.L. Atomic dissection of the hydrogen bond network for transition-state analogue binding to purine nucleoside phosphorylase // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 49. P. 14489-98.
146. Stoeckler J.D., Poirot A.F., Smith R.M., Parks R.E., Jr., Ealick S.E., Takabayashi K., Erion M.D. Purine nucleoside phosphorylase. 3. Reversal of purine base specificity by site-directed mutagenesis // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 39. P. 11749-56.
147. Lehikoinen P.K., Sinnott M.L., Krenitsky T.A. Investigation of alpha-deuterium kinetic isotope effects on the purine nucleoside phosphorylase reaction by the equilibrium-perturbation technique // *Biochem J.* 1989. V. 257. № 2. P. 355-9.
148. Stein R.L., Cordes E.H. Kinetic alpha-deuterium isotope effects for *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase-catalyzed phosphorolysis of adenosine and inosine // *J Biol Chem.* 1981. V. 256. № 2. P. 767-72.
149. 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. V. 26. № 16. P. 1701-1718.
150. 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. V. 47. № 7. P. 1739-49.
151. Halgren T.A., Murphy R.B., Friesner R.A., Beard H.S., Frye L.L., Pollard W.T., Banks J.L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening // *J Med Chem.* 2004. V. 47. № 7. P. 1750-9.
152. контракт Г. № 16.512.11.2235 //.
153. Kabsch W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.* 2010. V. 66. № Pt 2. P. 133-144.
154. Evans P. Scaling and assessment of data quality // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2006. V. 62. № Pt 1. P. 72-82.
155. Vagin A., Teplyakov A. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement // *Journal of Applied Crystallography.* 1997. V. 30. № 6. P. 1022-1025.
156. McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J. Phaser crystallographic software // *J Appl Crystallogr.* 2007. V. 40. № Pt 4. P. 658-674.

157. 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. V. 40. № 4. P. 658-674.
158. 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 Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010. V. 66. № Pt 2. P. 213-21.
159. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1997. V. 53. № Pt 3. P. 240-55.
160. Emsley P., Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics // *Acta Crystallographica Section D*. 2004. V. 60. № 12 Part 1. P. 2126-2132.
161. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and development of Coot // *Acta Crystallographica Section D*. 2010. V. 66. № 4. P. 486-501.
162. 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. V. 26. № 2. P. 283-291.
163. Chen V.B., Arendall W.B., 3rd, Headd J.J., Keedy D.A., Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S., Richardson D.C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010. V. 66. № Pt 1. P. 12-21.
164. Delano W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. – 2002. – URL: <http://www.pymol.org/citeulike-article-id:2816763>.
165. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0 // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. № 21. P. 2947-8.
166. Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M. Derivation of 3D coordinate templates for searching structural databases: application to Ser-His-Asp catalytic triads in the serine proteinases and lipases // *Protein Sci*. 1996. V. 5. № 6. P. 1001-13.
167. Кристаллография белка. / Бландел Т., Джонсон Л. – Москва: "Мир", 1979.
168. Chirlian L.E., Francl M.M. Atomic Charges Derived from Electrostatic Potentials: A Detailed Study // *Journal of Computational Chemistry*. 1987. V. 8. № 6. P. 894-905.
169. Bochevarov A.D., Harder E., Hughes T.F., Greenwood J.R., Braden D.A., Philipp D.M., Rinaldo D., Halls M.D., Zhang J., Friesner R.A. Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences // *International Journal of Quantum Chemistry*. 2013. V. 113. № 18. P. 2110-2142.
170. Guimaraes C.R., Cardozo M. MM-GB/SA rescoring of docking poses in structure-based lead optimization // *J Chem Inf Model*. 2008. V. 48. № 5. P. 958-70.
171. Banks J.L., Beard H.S., Cao Y., Cho A.E., Damm W., Farid R., Felts A.K., Halgren T.A., Mainz D.T., Maple J.R., Murphy R., Philipp D.M., Repasky M.P., Zhang L.Y., Berne B.J., Friesner R.A., Gallicchio E., Levy R.M. Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT) // *J Comput Chem*. 2005. V. 26. № 16. P. 1752-80.
172. Polak E., Ribiere G. Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées // *ESAIM: Mathematical Modelling and Numerical Analysis - Modélisation Mathématique et Analyse Numérique*. 1969. V. 3. P. 35-43.

173. Xie X.Q., Chen J.Z. Data mining a small molecule drug screening representative subset from NIH PubChem // *J Chem Inf Model*. 2008. V. 48. № 3. P. 465-75.
174. Schuttelkopf A.W., van Aalten D.M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004. V. 60. № Pt 8. P. 1355-63.
175. Reulecke I., Lange G., Albrecht J., Klein R., Rarey M. Towards an integrated description of hydrogen bonding and dehydration: decreasing false positives in virtual screening with the HYDE scoring function // *ChemMedChem*. 2008. V. 3. № 6. P. 885-97.
176. Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // *J Mol Biol*. 2007. V. 372. № 3. P. 774-97.
177. Touw W.G., Baakman C., Black J., te Beek T.A., Krieger E., Joosten R.P., Vriend G. A series of PDB-related databanks for everyday needs // *Nucleic Acids Res*. 2015. V. 43. № Database issue. P. D364-8.
178. Прокофьев И.И., Л.А.А., Габдулхаков А.Г., Балаев В.В., Серегина Т.А., Миронов А.С., Бетзель Х., Михайлов А.М. Структуры комплексов уридинфосфорилазы из *Vibrio cholerae* с уридином, тимидином, урацилом, тимином и фосфат-анионом по результатам рентгеноструктурного анализа. Субстратная специфичность бактериальных уридинфосфорилаз // *Кристаллография*. 2016. V. 61. № 6. P. 919-939.
179. Prokofev, I., Lashkov A.A., Gabdulkhakov A.G., Dontsova M.V., Seregina T.A., Mironov A.S., Betzel C., Mikhailov A.M. Crystallization and preliminary X-ray study of *Vibrio cholerae* uridine phosphorylase in complex with 6-methyluracil // *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014. V. 70. № Pt 1. P. 60-3.
180. Miyahara T., Nakatsuji H., Wada T. Circular dichroism spectra of uridine derivatives: ChiraSac study // *J Phys Chem A*. 2014. V. 118. № 16. P. 2931-41.
181. Katritzky A.R., Waring A.J. Tautomeric azines. Part III. The structure of cytosine and its mono-cation // *J. Chem. Soc*. 1963. P. 3046-3051.
182. Scanlan M.J. H.H.I. An ab initio study of tautomerism of uracil, thymine, 5-fluorouracil, and cytosine // *Journal of the American Chemical Society*. 1984. V. 106. P. 3737-3145.
183. R. Czermiński, B. Lesyng, Pohorille A. Tautomerism of pyrimidine bases—uracil, cytosine, isocytosine: Theoretical study with complete optimization of geometry // *International Journal Of Quantum Chemistry*. 1979. V. 16. P. 605-613.
184. Kwiatkowski J.S., Person W.B., Szczepaniak K., Szczesniak M. On tautomerism of the cytosine molecule // *Acta Biochim Pol*. 1987. V. 34. № 2. P. 165-81.