

На правах рукописи

Балаев Владислав Викторович

**Субстратная специфичность нуклеозидфосфорилаз NR-
II семейства по результатам рентгеноструктурного
анализа и компьютерного моделирования**

Специальность 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2017

Работа выполнена в Институте кристаллографии им. А.В. Шубникова
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

**Научный
руководитель:** Лашков Александр Александрович, кандидат
физико-математических наук, ФНИЦ
«Кристаллография и фотоника» РАН

**Официальные
оппоненты:** Тищенко Светлана Викторовна, доктор
биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории структурных исследований аппарата
трансляции Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института белка
РАН

Новоселецкий Валерий Николаевич, кандидат
физико-математических наук, доцент кафедры
биоинженерии биологического факультета
Московского Государственного Университета
имени М.В. Ломоносова

**Ведущая
организация:** Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук

Защита состоится «__» _____ 2017 г. в __ ч. __ мин. на заседании
диссертационного совета Д 002.114.01 при ФНИЦ «Кристаллография и
фотоника» РАН по адресу 119333, г. Москва, Ленинский проспект, д.
59, конференц-зал

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФНИЦ
«Кристаллография и фотоника» РАН <http://crys.ras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д 002.114.01
кандидат физико-математических наук

К.В. Фролов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Нуклеозидфосфорилазы и, в частности, тимидинспецифичная нуклеозидфосфорилаза – белки-ферменты, играющие важную роль в синтезе нуклеозидов и азотистых оснований. Нуклеозидфосфорилазы катализируют фосфоролитическое расщепление пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов. Этот биохимический процесс заключается в расщеплении С-Н гликозидной связи между ароматической и фуранозной составляющей нуклеозида при участии фосфата-аниона с образованием свободного основания и фураноза-1'-фосфата. Обратимость этой реакции поддерживает нуклеозидный гомеостаз в тканях организма. По пространственной организации нуклеозидфосфорилазы делятся на представителей NP-I и NP-II семейств. Четвертичная структура представителей первого семейства представляет собой тример, либо гексамер, а активный центр включает аминокислотные остатки двух соседних субъединиц. У представителей второго семейства четвертичная структура – гомодимер, субъединицы которого имеют двудоменную структуру, а активный центр расположен в каньоне между доменами.

Тимидинфосфорилаза впервые открыта в 1954 году и является ключевым ферментом, катализирующим расщепление нуклеозидов (образующихся при распаде ДНК и РНК) при котором восстанавливаются свободные азотистые основания на основе тимидина [1]. ТР характеризуется ангиогенезной активностью, т.е. способствует прорастанию сосудов в ткани, и является глиостатином, ингибирующим рост глиальных клеток и обеспечивающим, таким образом, пролиферацию нервной ткани [2]. Высокое содержание ТР обнаружено во многих раковых клетках, что предполагает использование ее в качестве активатора противоопухолевых препаратов [3-5]. Разработка таких соединений в качестве химиотерапевтических агентов актуальна и сейчас, а ТР является одним из ключевых ферментов их активации и регуляции их концентрации и активности. Разрабатывались и ингибиторы ТР, носящие антиангиогенный характер или же препятствующие расщеплению противоопухолевых препаратов тимидинфосфорилазой. Лишь одно соединение – ингибитор ТР (Tpiracil в составе TAS-102) применяется в клинической практике на настоящий момент, но его применение сопровождается различными побочными эффектами.

Для разработки менее токсичных соединений, способных регулировать активность ТР, необходимы исследования

пространственной структуры TP и структурных особенностей ее специфичности к различным нуклеозидам и их производным.

У некоторых классов прокариот вместо TP присутствует широко-специфичная пиримидин нуклеозидфосфорилаза (PyNP), с равной каталитической активностью способствующая расщеплению как тимидина, так и уридина. При этом оба фермента являются единственными представителями NP-II семейства нуклеозидфосфорилаз. Показано, что инфицирование клеток некоторых тканей бактериями *Mycoplasma hyorhinis* препятствует нормальной фармакокинетике фторпиримидинов. Это объясняется активностью фермента PyNP в этих бактериях, распознающего, например, 5-фтор-2'-деоксиуридин, 5-трифтортимидин, 5-фтор-5'-деоксиуридин [6, 7]. Препятствование PyNP из *M. hyorhinis* фторпиримидиновой терапии обуславливает необходимость разработки ингибиторов специфичных к PyNP, но неспособных связаться с TP. Такая разработка в свою очередь предполагает знание различий в пространственной организации TP и PyNP.

Цель и задачи работы. Целью данной работы было установление структурных особенностей субстратной специфичности пиримидинфосфорилаз NP-II семейства методами рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования и компьютерное моделирование потенциальных ингибиторов этих пиримидинфосфорилаз.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- определение пространственных структур TP из *Salmonella typhimurium*; PyNP из *Bacillus subtilis* (BsPyNP); уридинфосфорилазы (UP) из *Yersinia pseudotuberculosis* (YptUP) в нелигандированном состоянии и в комплексах с субстратами и псевдосубстратами методом рентгеноструктурного анализа биомакромолекул

- исследование методами компьютерного моделирования механизмов перехода SfTP в закрытую/открытую конформацию и дополнительных сайтов связывания SfTP

- разработка потенциальных ингибиторов пиримидинфосфорилаз методами компьютерного моделирования

Научная новизна.

1) Впервые получены кристаллы тимидинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* в нелигандированном состоянии, в комплексах с сульфат-анионом, с тимидином, уридином, цитидином; пиримидинфосфорилазы из *Bacillus subtilis* с сульфат-анионом; уридинфосфорилазы из *Yersinia pseudotuberculosis*.

2) Впервые определены пространственные структуры ферментов и их комплексов. Установлено, что неспособность TP катализировать расщепление уридина связана с образованием водородной связи, формируемой 2'-гидроксильной группой уридина с Leu117 TP.

3) Выявлено, что в связывании *Bs*PuNP с фосфат-анионом принимает участие Lys108, которому в тимидинфосфорилазе соответствует Met111. Различие в окружении фосфат-аниона в этих ферментах выражается в меньшем частичном заряде одного из кислородных атомов фосфат-аниона в TP в сравнении с PuNP, что способствует прохождению катализа в TP по пути S_N2 нуклеофильного замещения.

4) По результатам рентгеноструктурного анализа обнаружено два дополнительных сайта связывания нуклеозидов (дНСС1 и дНСС2).

5) Методами компьютерного моделирования показано, что дНСС1 может являться сайтом неконкурентного ингибирования (посредством ингибитора KIN59 (5'-О-триптилинозин)).

6) Показано, что дНСС2 способствует связыванию бактериостатического антибиотика триметоприма. При этом активные центры тимидинфосфорилазы и уридинфосфорилазы также способны связывать препарат, но конкурировать с субстратом триметоприм не может.

7) По данным молекулярной динамики определено соединение (2-пиримидин-2-ил-1H-имидазол-4-карбоновая кислота) устойчиво связывающееся с активным центром пиримидинфосфорилазы, но не аффинное к активному центру тимидинфосфорилазы

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты данной работы имеют фундаментальное значение и вносят существенный вклад в понимание структурных особенностей функционирования пиримидинфосфорилаз NP-II семейства. Практическая значимость работы заключается в создании базы для разработки лекарственных препаратов – конкурентных и неконкурентных ингибиторов пиримидинфосфорилаз.

Положения, выносимые на защиту.

1) Пространственные структуры *Sf*TP в нелигандированном состоянии, в комплексе с ионом сульфата, с тимидином, уридином и цитидином; *Bs*PuNP в комплексе с ионом сульфата; *Yri*UP в комплексе с ионом сульфата

2) Структурные особенности сайта связывания *Sf*TP, препятствующие фосфоролиту уридина

- 3) Отличия тимидинфосфорилазы *SfTP* от широкоспецифичной пиримидин нуклеозидфосфорилазы *BsPyNP* в механизме реакции и доменном движении
- 4) Место и характер связывания нуклеозидов в дополнительных сайтах связывания нуклеозидов в *SfTP*
- 5) Место и характер связывания неконкурентного ингибитора KIN59 на основании компьютерного моделирования
- 6) Место и характер связывания бактериостатического антибиотика триметоприма с *SfTP* и *YptUP* на основании компьютерного моделирования
- 7) Структура ингибитора *BsPyNP*, неафинного к *SfTP*

Апробация работы и публикации. Основные результаты работы неоднократно докладывались на международных и национальных конференциях, на научных конкурсах ИК РАН 2014 и 2015 гг. По материалам диссертационной работы опубликовано 14 печатных работ, из которых 4 статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех основных глав, выводов, списка цитированной литературы. Она изложена на 134 страницах, содержит 36 рисунков и 15 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении дана краткая биохимическая характеристика пиримидинфосфорилаз, обоснована актуальность темы и необходимость исследования структурных аспектов специфичности тимидинфосфорилазы методами рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования, сформулированы цель и задачи работы, показана научная новизна, научно-практическая значимость, приведены положения, выносимые на защиту, и сведения об апробации диссертации.

Глава 1. Литературный обзор

Литературный обзор состоит из восьми разделов. В первом разделе описывается участие тимидинфосфорилазы в физиологических процессах. Во втором, третьем и четвертом разделах описывается участие TP в воспалительных, генетических и онкологических заболеваниях, соответственно.

В пятом разделе обзора приведена ранее уже опубликованная структурная информация по пиримидинфосфорилазам. Приводится информация по пространственной организации активного центра, а также информация по механизму функционирования ферментов на основании химико-кинетического анализа и компьютерного моделирования.

Шестой раздел посвящён известным ингибиторам тимидинфосфорилаз – аналогам пурина, пиримидина и соединениям нуклеозидной природы. Приведены биохимические и биологические свойства известных ингибиторов тимидинфосфорилаз.

В седьмом разделе описывается использование TP в качестве активатора для химиотерапевтических агентов - фторпиримидинов. В частности, обосновывается необходимость ингибирования фермента в некоторых стратегиях лечения.

В восьмом разделе приводится информация по влиянию широко-специфичных пиримидин нуклеозидфосфорилаз в человеческих тканях, зараженных бактериями рода *Mycoplasma*, на фторпиримидиновую химиотерапию.

Глава 2. Экспериментальная и расчетная часть

В первом разделе главы приводятся химические и биологические материалы, использованные для выделения, очистки и кристаллизации ферментов, а также программное обеспечение, использованное при обработке наборов экспериментальных интенсивностей, при решении и уточнении структур и для компьютерного моделирования.

Во втором разделе описана методика по выделению и очистке *SfTP*, *BsPyNP* и *YptUP*. Выделение и очистка проводились в Государственном научно-исследовательском Институте Генетики и Селекции Промышленных Микроорганизмов.

В третьем разделе главы приводится информация по выращиванию кристаллов белков. Для белков *SfTP*, *BsPyNP* и *YptUP* скрининг условий кристаллизации проведен с использованием кристаллизационных китов PACT, PhClear Suite, Stura, Morpheus, JCSG, MbClass и MbClassII (Qiagen, Germany). Для скрининга использовалась роботизированная установка Cartesian Dispensing System (Ирвин, Калифорния, США). Выращивание кристаллов проводилось диффузией в парах в вариантах висячей или сидячей капли. Фотографии кристаллов приведены на рис.1.

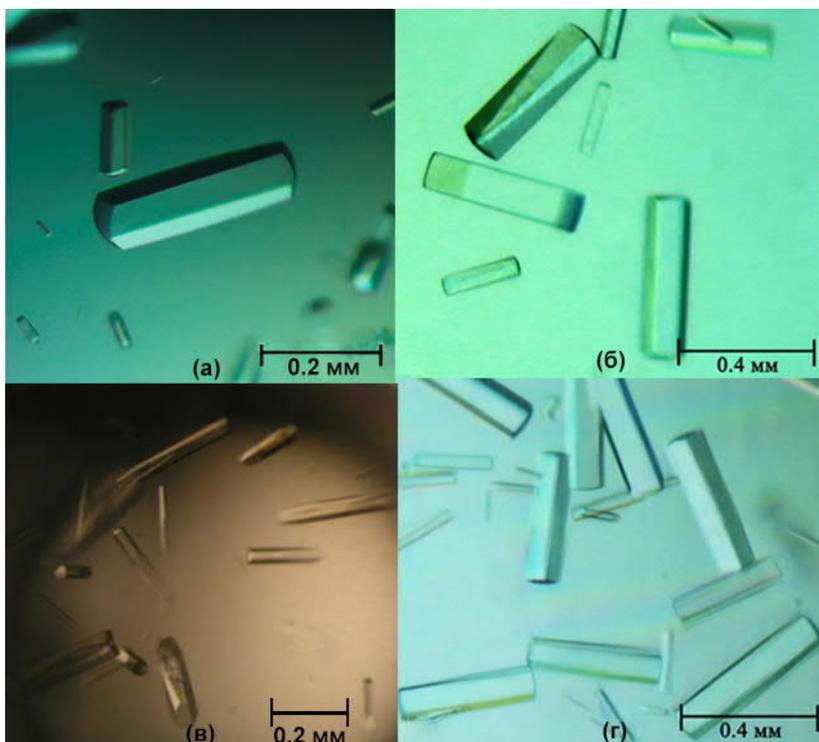


Рисунок 1. Кристаллы молекулы *SfTP* с пространственной группой $P2_12_12$ (а) и $I4$ (б), *YptUP* (в) и *BsPyNP* (г)

В четвертом разделе описывается процедура получения экспериментальных наборов интенсивностей рентгеновского излучения. Экспериментальные наборы интенсивностей дифрагированных кристаллами *SfTP* и её комплексов, комплекса *BsPyNP* с сульфат-анионом и *YptUP* в комплексе с сульфат-анионом, получены при 100 К на станциях 14.1 синхротрона BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Берлин, Германия) и P11 синхротрона PETRA III (DESY, Гамбург, Германия).

В пятом разделе описывается первичная обработка экспериментальных наборов интенсивностей и получение наборов структурных амплитуд, осуществленная в комплексе программ "XDS" [8].

В шестом разделе описывается решение и уточнение структур *SfTP*, *BsPyNP* и *YptUP*. Получение стартовых наборов фазовой

составляющей структурных факторов проведено методом молекулярного замещения в комплексе программ Phaser [9]. Уточнение пространственных структур проводилось в программных пакетах Phenix [10, 11] и Refmac5 [12]. Результирующие координаты биомакромолекул и соответствующие им наборы структурных факторов были приняты Международным банком белковых структур [<http://deposit.pdb.org/validate>].

Таблица 1. Статистические характеристики уточнения кристаллических структур.

Комплекс	StTP нелиг.	StTP+SO ₄	StTP+THM	StTP+URI	StTP+CTN	BsPyNP+SO ₄	YptUP
PDB код	4XR5	4X46	4YEK	4YYY	5EY3	5EP8	4OF4
Диапазон разрешения (Å)	47,72–2,05 (2,09–2,05)*	47,87–2,20 (2,26–2,20)*	39,02–2,55 (2,59–2,55)*	48,05–2,43 (2,48–2,43)	48,29–1,91 (1,93–1,91)*	70,22–2,66 (2,73–2,66) *	75,47–1,40 (1,44–1,40)*
Пространственная группа	P2 ₁ 2 ₁ 2	I4	I4	I4	I4	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	I3
Мозаичность(°)	0,23	0,14	0,11	0,16	0,20	0,21	0,15
R _{work}	22,1 (33,6)*	18,3 (28,3)*	17,6 (36,2)*	20,4 (35,6)*	20,0 (56,6) *	21,5 (38,0) *	15,2 (25,4)*
R _{free}	24,7 (38,6)*	22,4 (33,0)*	21,5 (43,6)*	27,2 (44,8)*	23,8 (58,8) *	29,3 (39,8) *	18,4 (27,9)*
Cruickshank DPI, Å	0,17	0,21	0,25	0,28	0,14	0,41	0,08
R.m.s.d. от «идеальной» геометрии							
Длин связей(Å)	0,009	0,008	0,010	0,008	0,006	0,007	0,007
Валентных углов (°)	1,275	1,234	1,325	1,157	0,785	1,125	1,165
Среднее значение B фактора (Å ²)							
Белка	51,9	54,0	67,4	74,0	35,7	76,1	17,6
Лиганда	61,3	75,7	93,9	81,0	43,2	120,2	34,2
Статистика Рамачандрана							
В фаворитной зоне (%)	97,83	97,70	96,58	96,01	97,60	95,90	98,30
В допустимое зоне (%)	0,11	0,11	0,00	0,00	2,30	3,90	1,32

В седьмом разделе описывается протокол молекулярного докинга неконкурентного ингибитора KIN59 и его аналогов [13] в сайты связывания молекулы *SfTP*, триметоприма и его аналога 53I в сайты связывания *SfTP* и *YptUP*. Также описываются и процедуры по виртуальному скринингу ингибиторов PyNP. Молекулярный докинг и виртуальный скрининг проведены с использованием программного пакета "Maestro" [14] (Schrodinger Suite).

В восьмом разделе описывается протокол классической молекулярной динамики. Молекулярно-динамическое моделирование комплексов как *SfTP*, так и *BsPyNP* с фосфат-анионом и тимидином, а также четырех комплексов *BsPyNP* с соединениями, определенными на этапе виртуального скрининга, проведено в пакете программ GROMACS (версия 5.0) [15]. При этом использован набор полнотомных силовых полей GROMOS [16]. Отдельно описываются процедуры по расчету свободной энергии связывания ингибитора KIN59 с *SfTP*.

В девятом разделе приведен протокол гибридной молекулярной динамики.

Глава 3 посвящена результатам рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования *SfTP*, *BsPyNP* и *YptUP* с лигандами и их обсуждению.

В первых двух разделах приводятся результаты анализа организации биомакромолекул *SfTP* и *BsPyNP*. Мономер тимидинфосфорилазы бактерии *Salmonella typhimurium* (*SfTP*) состоит из 440 аминокислотных остатков [17]. Субъединица *SfTP*, как и других бактериальных тимидинфосфорилаз [18], состоит из двух доменов, первый включает в себя а.о. 1-65 и 163-193 и состоит целиком из α -спиралей (α -домен), а второй 66-162 и 194-440, включает как α -спирали, так и β -тяжи (α/β – домен) (рис.2). Аминокислотная последовательность широко специфичной пиримидин нуклеозидфосфорилазы из *Bacillus subtilis* включает в себя 433 аминокислотных остатка, а идентичность первичных структур *BsPyNP* и *SfTP* составляет 43.8%. Оба фермента относятся к NP-II-семейству нуклеозидфосфорилаз [21].

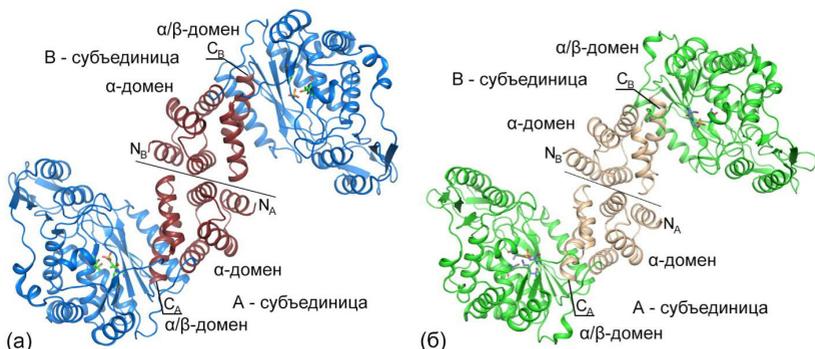


Рисунок 2. Гомодимеры *BsPyNP* (а) и *StTP* (б) в ленточном представлении.

В третьем разделе обсуждается влияние междоменных взаимодействий *StTP* и *BsPyNP* на специфичность к субстратам. С целью определения различий в междоменных взаимодействиях в субъединицах PyNP и TP проведено МД-моделирование. В результате МД-симуляции определено, что *StTP* в течение 50 нс в основном находится в трех конформациях с вероятностями 54 (открытая конформация), 16 (открытая конформация) и 15% (закрытая конформация). Для определения степени закрытости субъединицы рассчитан угол θ , образуемый прямыми, соединяющими центры гидрофобных ядер обоих доменов с общим центром петель (L3, L8 и L10), их связывающих. Значение θ для А субъединицы PyNP из *Geobacillus stearothermophilus* (1BRW [22]), находящейся в закрытой конформации, составляет $46,1^\circ$. Значения θ для трех основных конформаций *StTP* составляют $43,6^\circ$ (закрытая конформация, вероятность 54%), $41,2^\circ$ (закрытая конформация, вероятность 16%) и $48,7^\circ$ (открытая конформация, вероятность 15%). Таким образом, субъединица *StTP* с 70%-ной ($54\% + 16\%$) вероятностью находится в состоянии закрытой конформации. *BsPyNP* в течение 50 нс в основном находится в двух состояниях с вероятностями 55 и 8%. Первому состоянию соответствует угол θ , равный $49,2^\circ$, а второму – $44,7^\circ$. Следовательно, состояние с закрытой конформацией субъединицы присуще *BsPyNP* с вероятностью 8%. Вероятность перехода субъединицы *BsPyNP* в состояние с закрытой конформацией, таким образом, значительно ниже, чем у субъединицы *StTP*.

В четвертом разделе обсуждается активный центр комплексов с сульфат-анионом *StTP* и *BsPyNP*. В обоих ферментах сульфат-анион локализуется в кармане, образованном β -тяжем S1, концами петли L6

и поворотом между S1 и α -спиралью H5. Водородные связи, формируемые сульфатом с а.о. активного центра *SfTP* и *BsPyNP*, приведены на рис. 3.

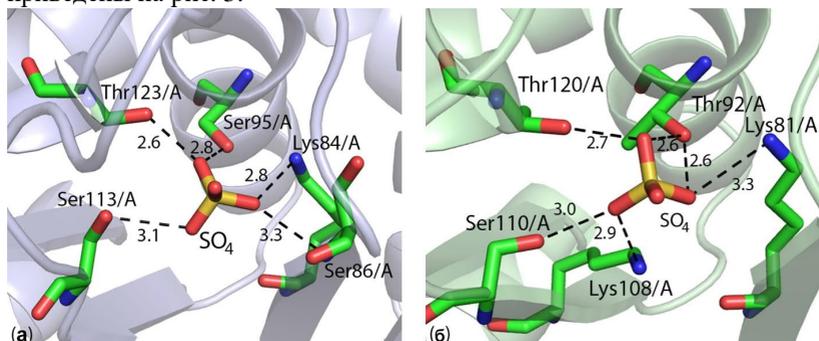


Рисунок 3. Пространственная организация активного центра комплекса с сульфат-анионом *SfTP* (а) и *BsPyNP* (б).

Проведено моделирование комплексов *SfTP*+PO₄, *BsPyNP*+PO₄ и *BsPyNP* (K108M)+PO₄ с использованием квантово-механических / молекулярно-механических расчетов и вычислены частичные заряды атомов фосфатной группы. Установлено, что заряд атома кислорода фосфат-аниона, ориентированного в направлении нуклеозид-связывающего сайта, выше в *BsPyNP*. В *SfTP* его частичный заряд равен $-1,07e$, а в *BsPyNP* $-0,75e$. Большая полярность фосфатной группы в *SfTP* в сравнении с *BsPyNP* необходима для прохождения реакции нуклеофильного замещения в TP по механизму S_N2. При этом реакция такого рода осуществляется лишь для тимидина, а S_N1-механизм в *BsPyNP* приводит к расщеплению как тимидина, так и уридина. Это предположение согласуется с результатами, полученными нами методом классической молекулярной динамики обоих ферментов, поскольку для прохождения реакции по механизму S_N2 необходимо сближение доменов, а для прохождения по пути S_N1 – нет.

В этом же разделе описывается нуклеозид-связывающий сайт *SfTP* и сравниваются его пространственная организация в комплексах с тимидином и уридином. Положение рибозной компоненты уридина отличается в *SfTP*+URI в сравнении с комплексом *SfTP*+THM. Так, рибозная компонента URI образует две водородные связи с а.о. фермента (с Leu117 и Thr87), а THM лишь одну (с Thr87) (Рис. 4). Среднеквадратичное отклонение (СКО) между координатами атомов фуранозных компонент лигандов равно 4,0 Å. Отличие в положении рибозной компоненты лигандов (уридина и тимидина) в активном

центре TP можно также объяснить тем, что наличие гидроксильной группы в 2' положении у URI приводит к изменению положения гидрофобной боковой группы а.о. Leu117. Рассматриваемая боковая группа поворачивается на $\sim 180^\circ$ вокруг оси проходящей через пептидную группу Leu117. Сдвиг боковой группы Leu117 приводит к смещению его основной цепи в направлении URI и образованию связи с O2' атомом уридина. Leu117 принадлежит петле L6.

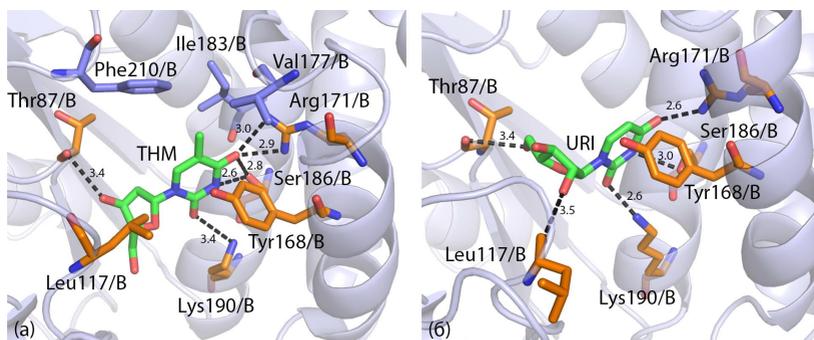


Рисунок 4. Пространственная организация активного центра комплекса *SstTP* с тимидином THM (PDB код: 4YEK) (а) и уридином URI (PDB код: 4YYY) (б).

В пятом разделе третьей главы обсуждаются результаты виртуального скрининга потенциальных ингибиторов PyNP, не аффинных к TP. На этом этапе определено 4 таких соединения. По окончании 30 нс молекулярно-динамической траектории одно из четырех соединений оставалось в области фосфат-связывающего сайта *BsPyNP*. На рис. 5 приведен фрагмент пространственной структуры комплекса *BsPyNP*, где происходит связывание фермента с этим соединением: 2-пиримидин-2-ил-1H-имидазол-4-карбоновой кислотой. Важно отметить, что обнаруженное соединение формирует водородную связь с Lys108, которому в TP соответствует Met111.

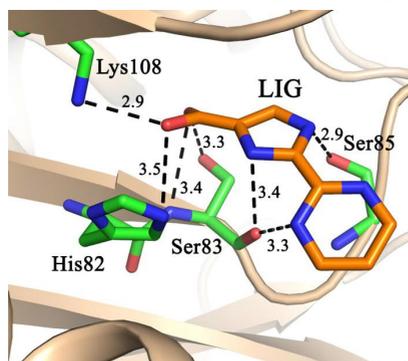


Рисунок 5. Пространственная структура активного центра комплекса *BsPyNP* с 2-пиримидин-2-ил-1H-имидазол-4-карбоновой кислотой (LIG).

В шестом разделе описывается организация сайта связывания нуклеозидов (рис.6), обнаруженного при рентгеноструктурном анализе комплексов *SfTP* с тимидином и уридином (далее дополнительный нуклеозид-связывающий сайт 1 (дНСС1)). Связывание пиримидиновой компоненты обоих нуклеозидов (тимидина и уридина) осуществляется посредством стэкинг взаимодействия с Tyr267.

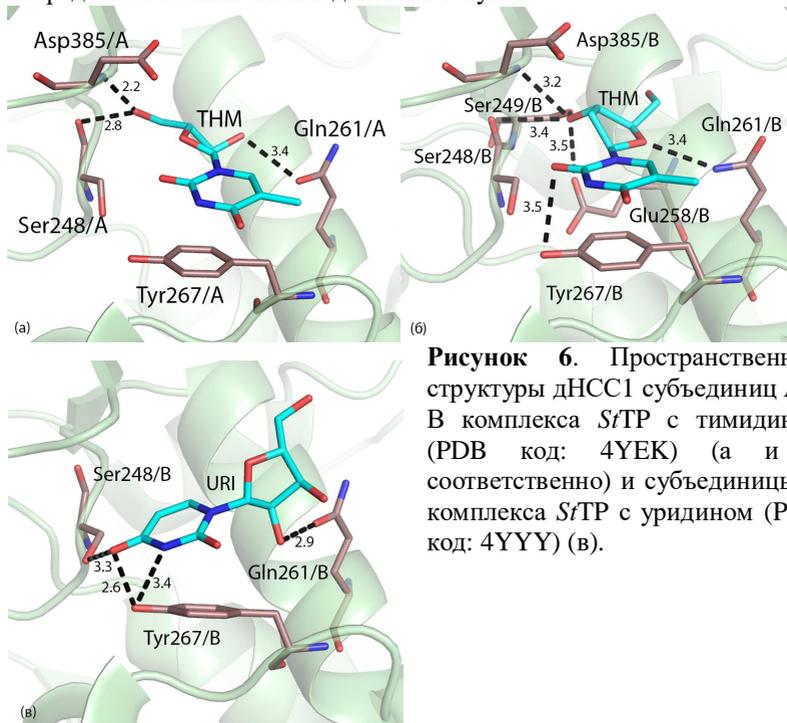


Рисунок 6. Пространственные структуры дНСС1 субъединиц А и В комплекса *SfTP* с тимидином (PDB код: 4YEK) (а и б соответственно) и субъединицы В комплекса *SfTP* с уридином (PDB код: 4YYY) (в).

В седьмом разделе третьей главы описывается организация сайт связывания *SfTP* с цитидином на интерфейсе взаимодействия между субъединицами (далее дополнительный нуклеозид-связывающий сайт 2 (дНСС2)).

В восьмом разделе описывается компьютерное моделирование неконкурентного ингибитора KIN59 в активный центр *SfTP* и в два найденных дополнительных сайта связывания. Пространственная организация активного центра и дНСС2 комплексов *SfTP* с KIN59 приведена на рис.7.

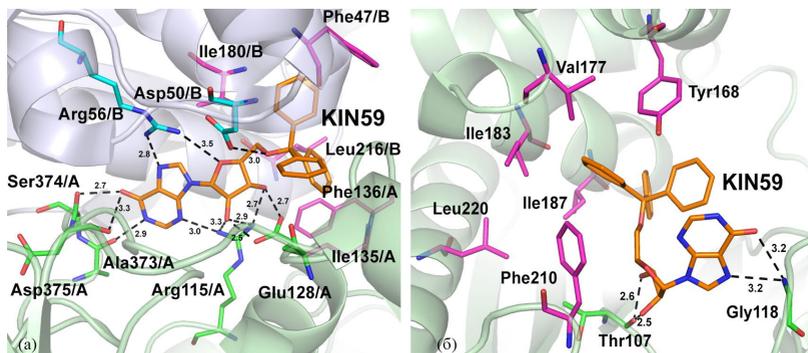


Рисунок 7. Пространственная организация дHCC2 (а) и активного центра (б) *SfiTP* в комплексе с KIN59.

Значение оценочной функции по данным программы Glide [23] для связывания KIN59 в активном центре составляет $-7,71$ ккал/моль, в дHCC1 $-5,30$ ккал/моль, а в дHCC2 $-8,36$ ккал/моль. Кроме того, методом термодинамического интегрирования рассчитаны значения свободной энергии связывания KIN59 в активном центре и в дHCC2. В результате, значения свободной энергии для обоих положений практически совпадали: $-4,3$ ккал/моль для KIN59 в активном центре и $-6,0$ для KIN59 в дHCC2. Однако, зависимость потенциала средней силы от расстояния между центрами масс *SfiTP* и KIN59 значительно различались. При расчете свободной энергии связывания для положения KIN59 в активном центре было обнаружено, что прохождение ингибитора KIN59 внутрь кармана между доменами *SfiTP* ограничено потенциальной ямой. Значение свободной энергии для связывания KIN59 в ней составляло $-6,2$ ккал/моль. Важно также отметить, что из рассмотрения исключалась одна из субъединиц дHCC2. Учет взаимодействия с ней увеличил бы значение свободной энергии связывания KIN59 с *SfiTP* в сайте связывания на интерфейсе взаимодействия между субъединицами. Таким образом, KIN59 с большей вероятностью связывается с дHCC2.

В девятом разделе обсуждается компьютерное моделирование связывания бактериостатического антибиотика триметоприма (TOP) с *SfiTP* в активном центре и двух обнаруженных нами сайтах связывания нуклеозидов. Значения оценочной функции программы Glide также рассчитаны для молекулы тимидина в комплексе *SfiTP* с тимидином (PDB код 4YEK). Значение оценочной функции TOP в активном центре ниже значения для тимидина ($-5,28$ ккал/моль у TOP в сравнении с $-6,18$ ккал/моль у ТНМ), а в дHCC1 выше ($-2,95$ ккал/моль

у TOP в сравнении с -1,95 ккал/моль у ТНМ). Пространственная организация обоих сайтов связывания в комплексе с TOP приведены на рис.8. Полученный результат указывает на то, что триметоприм может связываться с дополнительным сайтом связывания TP и буферизироваться им. Следствием буферизации триметоприма тимидинфосфорилазой, является снижение эффективной концентрации лекарственного препарата внутри бактерии. В результате этого уменьшается число молекул фармпрепарата, ингибирующих бактериальную дигидрофолатредуктазу - фармакологическую мишень этого антибиотика.

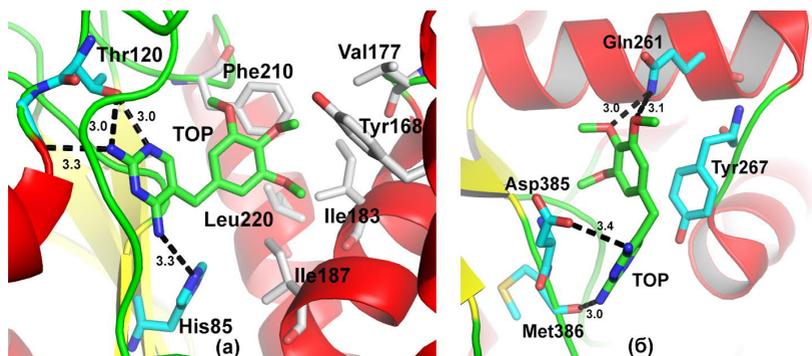


Рисунок 8. Пространственная организация активного центра (а) и дополнительного сайта связывания (б) комплекса *StTP* с триметопримом (TOP).

В десятом разделе приводятся результаты рентгеноструктурного анализа *YptUP*. Расположение мономеров в гексамерной молекуле энзима описывается точечной группой симметрии L_3ZL_2 . Формирование гексамерной молекулы происходит за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий как между а.о. соседних гомодимеров, так и внутри области центрального канала между субъединицами, расположенными по L_3 симметрии. Выявлено, что некоторые а.о. (Lys36, Asn40, His43, Ser135, His251) имеют в *YptUP* дополнительные водородные связи по сравнению с соответствующими а.о. в *StUP* и *EcUP*. Каждая из описанных водородных связей представляет собой взаимодействие внутри элементов вторичной структуры и, таким образом, повышает суммарную конформационную стабильность третичной структуры субъединицы фермента уридинфосфорилазы *YptUP* по сравнению с

StUP и *EcUP*. Приведено также описание активного центра уридинфосфорилаз на основании литературных данных.

В одиннадцатом разделе описываются результаты компьютерного моделирования бактериостатического антибиотика триметоприма в активный центр *YptUP*. Проводится сравнение результатов моделирования для UP и TP.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Методом рентгеноструктурного анализа определены пространственные структуры семи биомакромолекулярных комплексов: тимидинфосфорилазы (TP) из бактерии *Salmonella typhimurium* (*StTP*) в нелигандированном состоянии, с сульфат-анионом, с тимидином и сульфат-анионом, с уридином, с цитидином; пиримидин нуклеозидфосфорилазы из *Bacillus subtilis* (*BsPyNP*) с сульфат-анионом; уридинфосфорилаз из *Yersinia pseudotuberculosis* (*YptUP*) в нелигандированном состоянии. Пространственные структуры перечисленных макромолекулярных соединений депонированы в международный банк данных белковых структур (PDB). Им присвоены следующие идентификационные номера PDB: 4XR5, 4X46, 4YEK, 4YYY, 5EY3, 5EP8, 4OF4 соответственно.
2. Впервые методом рентгеноструктурного анализа определено место и характер связывания тимидина (субстрата прямой реакции, катализируемой TP), уридина (псевдосубстрата), цитидина (псевдосубстрата) и сульфат-аниона (псевдосубстрата) с *StTP*. Установлено, что водородная связь, формируемая 2' – гидроксильной группой уридина с аминокислотным остатком высоко-консервативной петли, приводит к изменению конформации рибозной части уридина, что препятствует его расщеплению тимидинфосфорилазой.
3. На основании сравнения комплексов *BsPyNP* и *StTP* с сульфат-анионом определен аминокислотный остаток, определяющий различия этих ферментов в субстратной специфичности. Lys108 в *BsPyNP* формирует водородную связь с сульфат-анионом, а в TP этому а.о. соответствует Met111. Методом гибридных квантово-механических / молекулярно-механических расчетов показано, что это различие в окружении фосфат-аниона приводит к уменьшению частичного заряда кислорода фосфат-аниона в *StTP*. Методом классической молекулярной динамики установлено, что

субъединица TP с большей вероятностью переходит в закрытую конформацию, чем PyNP. Обнаруженный эффект указывает на то, что для катализа нуклеозида тимидинфосфорилазой необходимо закрытие субъединицы, что в случае уридина не может быть осуществлено в связи с водородной связью, формируемой его 2'-гидроксильной группой.

4. Проведен виртуальный скрининг соединений базы данных ZINC для поиска лигандов, имеющих сродство к фосфат-связывающему сайту PyNP и не способных связаться с TP. В результате проверки результатов скрининга методами молекулярной динамики определено одно соединение (2-пиримидин-2-ил-1H-имидазол-4-карбоновая кислота) стабильно связывающееся с фосфат-связывающим сайтом PyNP по истечении 30 нс.
5. Методом рентгеноструктурного анализа впервые определены два дополнительных нуклеозид связывающих сайта TP. Первый дополнительный нуклеозид-связывающий сайт (дНСС1) обнаружен при структурном исследовании комплексов *SrTP* с тимидином и уридином. Этот сайт связывания находится на поверхности молекулы и включает аминокислотные остатки: Tyr267, Ser248, Ser249, Arg257, Gln261. Второй дополнительный сайт связывания нуклеозидов (дНСС2) обнаружен при структурном исследовании комплекса *SrTP* с цитидином и сульфат-анионом. дНСС2 находится на интерфейсе взаимодействия между субъединицами, входящими в элементарную ячейку *SrTP* в пространственной группе I4, но принадлежащим различным функциональным гомодимерам. Локализован этот сайт связывания вблизи фосфат-связывающего сайта TP.
6. Методом молекулярного докинга установлено, что неконкурентный ингибитор TP KIN59 (5'-О-триптилинозин) связывается с дНСС2. Связывание осуществляется посредством водородных связей, гидрофобных и стэкинг взаимодействий. Его энергия связывания в дНСС2 выше, чем в активном центре.
7. Методом молекулярного докинга выявлено, что бактериостатический антибиотик триметоприм буферизируется TP в дНСС1, что приводит к снижению эффективной концентрации этого препарата внутри клетки. Аналогичное исследование проведено и с представителем NP-

I семейства нуклеозидфосфорилаз, уридинфосфорилазой из бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*. Показано, что триметоприм может буферизироваться активным центром $YptUP$, но конкурировать с нативным субстратом не может. В результате именно активностью тимидинфосфорилазы, а не уридинфосфорилазы, может обуславливаться резистентность бактерии к триметоприму.

Список публикаций в рецензируемых журналах по теме диссертации:

1. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Прокофьев И.И., Габдулхаков А.Г., Серегина Т.А., Миронов А.С., Бетзель Х., Михайлов А.М. Субстратная специфичность пиримидинфосфорилаз семейства NP-II по результатам рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования. // Кристаллография – 2016 – Т. 61 № 5 – С. 797-808.
2. **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 – 72 – 224-33
3. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Серегина Т.А., Донцова М.В., 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 – Т. 60. № 2 – С. 240-249
4. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Донцова М.В., Миронов А.С., Бетзель Х., 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 – Т. 60. № 4 – С. 579-585.

Список тезисов конференций:

1. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Прокофьев И.И., Михайлов А.М. Исследование неконкурентного ингибирования тимидинфосфорилаз методами молекулярного моделирования // XIV Курчатовская молодежная научная школа (8 - 11 ноября 2016 г.)
2. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Прокофьев И.И., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Структурные исследования специфичности бактериальных нуклеозидфосфорилаз NP-II семейства // Сборник тезисов Первого Российского кристаллографического конгресса 21 – 26 ноября 2016 г. – Москва – 2016. – с. 230
3. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Влияние иона металла на специфичность пиримидинфосфорилазы из *Bacillus subtilis* по результатам рентгеноструктурного анализа // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 20-я Международная Пущинская школа- конференция молодых ученых (Пущино, 18 - 22 апреля 2016 г.). Сборник тезисов. – Пущино - 2016. – с. 65

4. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Прокофьев И.И., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Дополнительные сайты связывания нуклеозидов в тимидинфосфорилазе из бактерии *Salmonella typhimurium* по данным рентгеноструктурного анализа // Тезисы докладов Первой российской конференции «Физика — наукам о жизни». — СПб.: ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 2016. — с. 62
5. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Междоменные взаимодействия в структуре тимидинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* // 19-я Международная Пуцзинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», (Пуцзино, 19-24 апреля 2015 г.), - с.84.
6. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Бетзель Х., Михайлов А.М. Структуры комплексов тимидинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* с тимидином и уридином и их сравнительный анализ / / VII РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ», (Новосибирск, 12–17 июля 2015 г.), - с.268.
7. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Исследование пространственной структуры фермента тимидинфосфорилазы из бактерии *Salmonella typhimurium* для биотехнологических и фармакологических целей // V-th Russian-Japan Scientific-Technical Seminar «Modern methods for analysis of materials and their application in material science», (Moscow, October 8-9 2015), - pp.27-30.
8. **Balaev V.V.**, Lashkov A.A., Gabdoulkhakov A.G., Dontsova M.V., Seregina T.A. Structure of uridine phosphorylase from *Yersinia pseudotuberculosis* 1.7 Å resolution and its complex with cytostatic antibiotic / Международная школа-конференция «Биология-наука 21 века» (Пуцзино, 21-25 апреля 2014)
9. **Балаев В.В.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Исследование пространственной организации уридинфосфорилазы *Yersinia pseudotuberculosis* методом рентгеноструктурного анализа на различных экспериментальных установках. Третья школа молодых ученых по физике наноструктурированных и кисталлических материалов, 15-17 мая 2014 г., Нижний Новгород, с.108-109.
10. **Balaev V.V.**, Lashkov A.A., Gabdoulkhakov A.G., Mikhailov A.M., Betzel C. X-ray structure of uridine phosphorylase from *Yersinia pseudotuberculosis* at 1.4 Å resolution. / 15th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules (Hamburg, Germany, September 17-20, 2014)

Список цитируемой литературы:

1. Friedkin, M., Roberts, D. The enzymatic synthesis of nucleosides. I. Thymidine phosphorylase in mammalian tissue // *J Biol Chem.* – 1954. – 207 (1). – 245-56.
2. Asai, K., Hirano, T., Kaneko, S., Moriyama, A., Nakanishi, K., Isobe, I., Eksioglu, Y. Z., Kato, T. A novel glial growth inhibitory factor, gliostatin, derived from neurofibroma // *J Neurochem.* – 1992. – 59 (1). – 307-17.
3. Takebayashi, Y., Yamada, K., Maruyama, I., Fujii, R., Akiyama, S., Aikou, T. The expression of thymidine phosphorylase and thrombomodulin in human colorectal carcinomas // *Cancer Lett.* – 1995. – 92 (1). – 1-7.
4. Toi, M., Hoshina, S., Taniguchi, T., Yamamoto, Y., Ishitsuka, H., Tominaga, T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast cancer // *Int J Cancer.* – 1995. – 64 (2). – 79-82.
5. Fox, S. B., Moghaddam, A., Westwood, M., Turley, H., Bicknell, R., Gatter, K. C., Harris, A. L. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: an immunohistochemical study // *J Pathol.* – 1995. – 176 (2). – 183-90.
6. Liekens, S., Bronckaers, A., Balzarini, J. Improvement of purine and pyrimidine antimetabolite-based anticancer treatment by selective suppression of mycoplasma-encoded catabolic enzymes // *Lancet Oncol.* – 2009. – 10 (6). – 628-35.
7. Bronckaers, A., Balzarini, J., Liekens, S. The cytostatic activity of pyrimidine nucleosides is strongly modulated by *Mycoplasma hyorhinis* infection: Implications for cancer therapy // *Biochem Pharmacol.* – 2008. – 76 (2). – 188-97.
8. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post refinement. XDS. // *International Tables for Crystallography / Rossmann M. G., Arnold E. F.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001.
9. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J. Phaser crystallographic software // *Journal of Applied Crystallography.* – 2007. – 40 (4). – 658-674.
10. 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. – 66 (Pt 2). – 213-21.
11. Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H., Adams, P. D. Towards automated crystallographic structure

- refinement with phenix.refine // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2012. – 68 (Pt 4). – 352-67.
12. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 1997. – 53 (Pt 3). – 240-55.
 13. Liekens, S., Bronckaers, A., Hernandez, A. I., Priego, E. M., Casanova, E., Camarasa, M. J., Perez-Perez, M. J., Balzarini, J. 5'-O-tritylated nucleoside derivatives: inhibition of thymidine phosphorylase and angiogenesis // *Mol Pharmacol.* – 2006. – 70 (2). – 501-9.
 14. Maestro // *Book Maestro / Editor.* – New York, NY: Schrödinger, LLC, 2009.
 15. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C. GROMACS: Fast, flexible, and free // *Journal of Computational Chemistry.* – 2005. – 26 (16). – 1701-1718.
 16. Schlesier, T., Diezemann, G. Performance of different force fields in force probe simulations // *J Phys Chem B.* – 2013. – 117 (6). – 1862-71.
 17. Schwartz, M. Thymidine phosphorylase from *Escherichia coli*. Properties and kinetics // *Eur J Biochem.* – 1971. – 21 (2). – 191-8.
 18. 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. – 265 (23). – 14016-22.
 19. Touw, W. G., Baakman, C., Black, J., te Beek, T. A H., Krieger, E., Joosten, R. P., Vriend, G. A series of PDB-related databanks for everyday needs // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – 43 (Database issue). – D364-D368.
 20. Krissinel, E., Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // *J Mol Biol.* – 2007. – 372 (3). – 774-97.
 21. Pugmire, M. J., Ealick, S. E. Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases // *Biochem J.* – 2002. – 361 (Pt 1). – 1-25.
 22. Pugmire, M. J., Ealick, S. E. The crystal structure of pyrimidine nucleoside phosphorylase in a closed conformation // *Structure.* – 1998. – 6 (11). – 1467-79.
 23. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., Shenkin, P. S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy // *J Med Chem.* – 2004. – 47 (7). – 1739-49.