

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»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении "Федеральный научно-исследовательский центр "Кристаллография и фотоника" Российской академии наук"

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук, доцент
А.М. Михайлов, ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН

Официальные оппоненты: Шенкарёв Захар Олегович, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, отдел структурной биологии, Институт биоорганической химии РАН.

Качалова Галина Сергеевна, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт".

Ведущая организация: Институт математических проблем биологии РАН - филиал Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша Российской академии наук»

Защита диссертации 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 пр. 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.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 002.114.01

кандидат физико-математических наук

К.В. Фролов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности. 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 – 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, тимидином; 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'-гидроксигруппой 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 к нуклеозиду присоединён гидрофобный радикал в 6-ом положении пиримидинового кольца, на примере 6-метилурацила. Отталкивание гидрофобной метильной группой 6-метилурацила гидрофильной гидроксигруппы аминокислотного остатка 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.

Практическая значимость работы заключается в установлении влияния модификаций 2'-гидроксильной группы фуранозной компоненты, 6-, 5-метильных групп и 4-гидроксигруппы 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 - многообещающий биотехнологически значимый фермент.

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 высокосовершенные кристаллы.

2. Пространственные структуры атомного разрешения уридинфосфорилазы из патогенной бактерии *Vibrio cholerae* в комплексах с фосфат-анионом, уридином, урацилом, тимидином, тиминном, цитозином и 6-метиурацилом 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-метиурацилу 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, а также научном конкурсе ИК РАН в 2012 году. 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 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех основных глав, выводов, списка цитированной литературы. Она изложена на 142 страницах, содержит 41 рисунок и 9 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение.

Во введении дана краткая биохимическая характеристика пиримидинфосфорилаз; обоснована актуальность темы и необходимость исследования структурных аспектов специфичности уридинфосфорилазы 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

В первых двух разделах приводятся общие сведения о пиримидинфосфорилазах и история открытия нуклеозидфосфорилаз. В третьем разделе излагаются критерии разделения нуклеозидфосфорилаз на два семейства. В четвертом разделе описывается роль уридинфосфорилазы (УФ) в биологии и медицине. В пятом разделе приводится биохимическая характеристика уридинфосфорилаз. Рассматривается специфичность уридинфосфорилазы по результатам методов химической кинетики, по отношению к различным молекулярным соединениям. В шестом разделе дается общее описание структуры бактериальных уридинфосфорилаз. В седьмом разделе приводятся разобщенные результаты немногочисленных публикаций по исследованиям структурного аспекта субстратной специфичности уридинфосфорилаз. В восьмом разделе обобщаются сведения предыдущих разделов и приводится постановка задачи.

Глава 2. Материалы и методы

Во второй главе описываются примененные в работе методики получения и анализа структур комплексов уридинфосфорилазы холерного вибриона (*VchUPh*).

В первом разделе главы приводится описание методики клонирования и экспрессии гена, выделения и очистки *VchUPh*, которые проводились в Государственном научно-исследовательском Институте Генетики и Селекции Промышленных Микроорганизмов.

Во втором разделе приводятся сведения о выращивании кристаллов белков. 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 фирмы Cartesian Technologies. Кристаллизацию комплексов проводили методом диффузии паров в варианте «висящей капли» при температуре 291 К. Фотографии некоторых кристаллов приведены на рисунке 1.

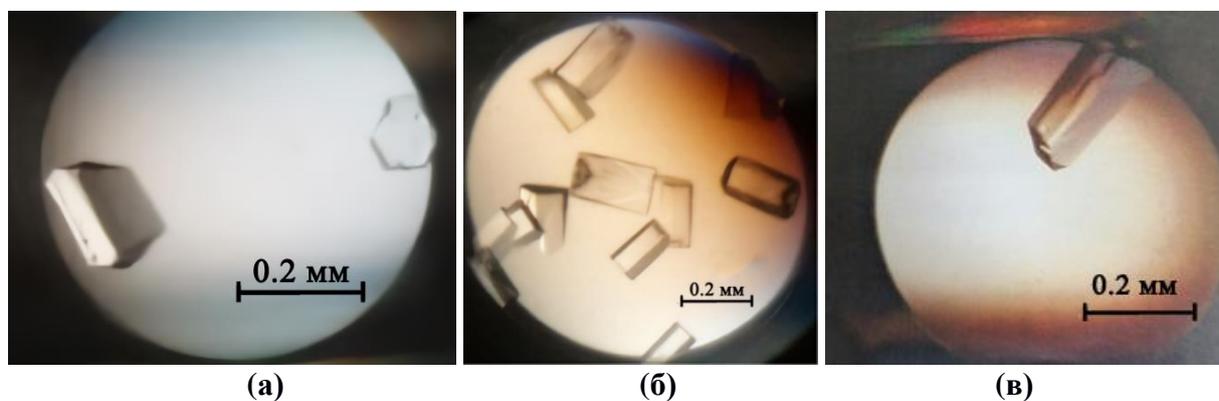


Рисунок 1. Фотографии кристаллов комплексов *VchUPh* а) с уридином, б) с тимидином, в) с урацилом.

Таблица 1. Статистические характеристики решения и уточнения пространственных структур.

Комплекс <i>VchUPh</i> с	уридином	урацилом	тимидином	тимином	анионом фосфата	6-метил-урацилом	цитозином
Диапазон разрешения (Å)	44.46– 1.03 (1.04–1.03)*	32.03– 1.28 (1.30–1.28)*	19.89– 1.29 (1.30–1.29)*	7.99– 1.25 (1.26–1.25)*	18.93– 1.29 (1.31–1.29)*	40.28– 1.17 (1.19–1.17)*	46.46– 1.06 (1.09–1.06)*
Пространственная группа	<i>P1</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁	<i>P1</i>	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁
Мозаичность (°)	0.06	0.13	0.19	0.09	0.14	0.15	0.10
<i>R</i> _{work} ¹	0.117 (0.248)*	0.133 (0.269)*	0.178 (0.255)*	0.115 (0.200)*	0.172 (0.431)*	0.108 (0.155)*	0.105 (0.239)*
<i>R</i> _{free} ¹	0.137 (0.262)*	0.169 (0.306)*	0.211 (0.285)*	0.147 (0.240)*	0.200 (0.482)*	0.128 (0.170)*	0.122 (0.240)*
Cruickshank DPI (Å)	0.03	0.05	0.06	0.04	0.06	0.04	0.02
Число уточняемых неводородных атомов							
Белка	11531	11711	11192	11243	11257	11480	11743
Лигандов	170	128	131	134	81	129	154
Воды	1761	1912	1967	2169	1998	2482	2207
R.m.s.d. от «идеальной» геометрии							
Длин валентных связей (Å)	0.016	0.014	0.014	0.008	0.008	0.016	0.009
Валентных углов (°)	1.355	1.327	1.324	1.273	1.216	1.185	1.504
Среднее значение <i>B</i> фактора для атомов (Å ²)							
Белка	14.5	13.9	10.1	15.6	9.6	11.3	12.5
Лигандов	20.5	21.5	12.0	22.4	28.1	15.3	17.2
Воды	33.7	28.4	24.7	31.7	23.6	30.7	24.9
Статистика Рамачандрана							
Число а.о. в наиболее благоприятных зонах (%)	99.01	98.52	98.79	98.46	98.79	98.59	98.05
Число а.о. в разрешённых областях (%)	0.58	1.12	1.44	1.19	0.81	1.01	1.60
ID PDB	5M2T	5MIW	4LZW	4OGL	4IP0	4K6O	5EPU

* В скобках приведены значения для последней зоны высокого разрешения

¹В общем случае:

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}, \text{ где } |F_{obs}|, |F_{calc}| - \text{модули экспериментальной и расчетной структурной амплитуды соответственно [23].}$$

В третьем разделе описывается процедура сбора и обработки экспериментальных наборов интенсивностей рентгеновского излучения. Наборы рентгенодифракционных интенсивностей для комплексов *VchUPh* с лигандами собраны на белковых станциях P11 синхротрона PETRA III (DESY, Гамбург, Германия), X13, синхротрона DORIS (DESY/EMBL, Гамбург, Германия), 14.1 синхротрона BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Берлин, Германия). Обработка наборов рентгенодифракционных интенсивностей осуществлена в программе XDS [24]. В четвертом разделе приведены методы и результаты решения и уточнения структур *VchUPh* с лигандами (табл.1).

Наборы начальных фазовых компонент структурных факторов (при решении пространственных структур комплексов *VchUPh* с лигандами) получены методом молекулярного замещения в программах Molrep [25] и Phaser [26]. Уточнение структур комплексов *VchUPh* с лигандами проводили в программах *phenix.refine* [27] и Refmac5 [28]. Ручная правка структур комплексов проводилась в программе Coot [29, 30]. Структуры депонированы в RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>). Их характеристики приведены в таблице 1. В пятом разделе описывается протокол расчёта частичных электрических зарядов атомов лигандов. Этот расчёт проводился в программе Jaguar 7.9 [31] с учетом водного окружения методом Хартри-Фока при использовании набора базисных функций 3-21G. В шестом разделе приведен протокол расчёта энергии конформаций молекул лигандов в растворе и в связанном с *VchUPh* состоянии. При этом использовалась программа MacroModel [32]. Для расчетов использовался набор силовых полей OPLS-2005 [33]. В седьмом разделе описываются протокол молекулярного докинга с использованием программного пакета "Maestro" [34] и программы Glide [35]. Для ранжирования результатов докинга использовалась оценочная функция "XP Glide Score" [35]. Оценку свободной энергии связывания цитозина в комплексе с *VchUPh* проводили в программе SeeSAR, в которой аффинность лиганда определяется алгоритмом HYDE [36].

Глава 3. Результаты и обсуждение

Эта глава посвящена результатам рентгеноструктурного анализа комплексов структур *VchUPh* с лигандами и компьютерного моделирования и их обсуждению.

В первом разделе описывается кристаллическая упаковка молекул *VchUPh*. Пространственная группа симметрии кристаллов комплексов уридинфосфорилазы с анионом фосфата, уридином, урацилом соответствует P1; с тимидином, тиминном, цитозином и 6-метилурацилом соответствует P2₁.

Во втором разделе описывается структурная организация *VchUPh*. Четвертичная структура комплексов фермента *VchUPh* представляет собой гексамер. Он сформирован шестью гомологичными субъединицами. Наружный диаметр тороидального гексамера составляет приблизительно 106 Å. Укладка элементов вторичной структуры субъединицы соответствует трехслойной сэндвич-архитектуре αβ по классификации Россмана [37]. 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 α-спиралей. По данным программы DSSP [38] структура молекулы *VchUPh* на 32% состоит из α-спиралей и на 28 % из β-стрендов. 253 аминокислотных остатка формируют субъединицу *VchUPh* молекулярной массы 27.5 кДа. [39]. В межмономерной области каждого гомодимера гексамерной молекулы локализован ион Na⁺. Связывающие Na⁺ атомы кислорода аминокислотных остатков расположены в вершинах искаженного октаэдра.

На гомодимер молекулы *VchUPh* приходится два одинаковых энзиматических центра, удаленных на 20 Å друг от друга и расположенных в каньонах межмономерного интерфейса гомодимера энзима. Энзиматический центр состоит из фосфат-связывающего и нуклеозид-связывающего сайтов, последний из которых делится на урацил- и рибозо-связывающую части. Сайты связывания субстратов формируются аминокислотными остатками обеих субъединиц гомодимера. Сайт связывания обозначим литерой той субъединицы гомодимера, которая делегирует в него большее количество аминокислотных остатков.

Во втором разделе анализируются конформационные изменения структуры *VchUPh* при связывании с лигандом и влияние кристаллической упаковки на конформацию петли L11. В первых трех и шестом подразделах описывается функционально значимая петля L11 фермента *VchUPh*. В статьях [5, 40, 41] показано, что L11 бактериальных уридинфосфорилаз играет роль “шлагбаума”, который регулирует доступ нуклеозидных субстратов в активный центр энзима. Петля может находиться в трёх функциональных состояниях: открытом, закрытом и промежуточном. При открытой конформации L11 экспонирована в растворитель и не препятствует доступу молекул субстрата в активный сайт. Находясь в закрытой конформации, петля посредством взаимодействия с аминокислотными остатками (а.о.) поверхности белка (Tyr168 и Asp169), перекрывает доступ молекул субстрата в активный центр. Петля-шлагбаум L11 включает а.о. с 222 до 230 (рис. 2а). Следующие за L11 а.о. с 231 по 233 конформационно лабильны, и данному участку невозможно приписать определенную вторичную структуру: она становятся либо продолжением петли L11, либо началом α 7-спирали.

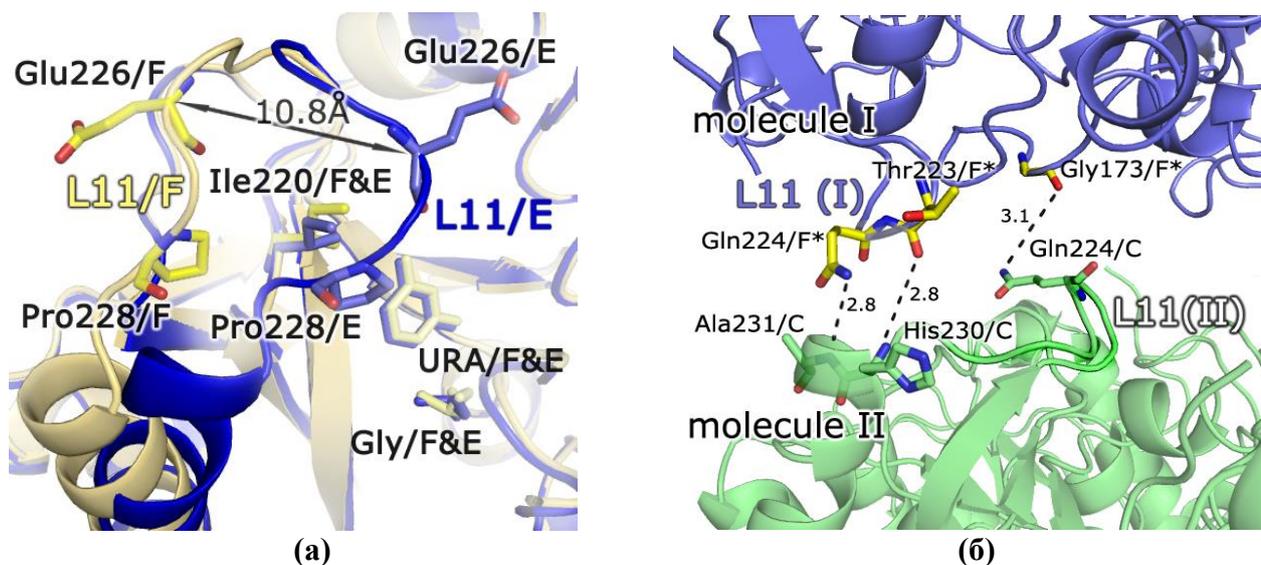


Рисунок 2. Суперпозиция пространственных структур субъединиц F и E комплекса *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 4OEH). Положение петель соответствует открытой (L11/F) и закрытой (L11/E) конформации. Стрелкой показано расстояние между α -атомами Glu226 открытой и закрытой конформации петли (а); аминокислотные остатки фрагмента С-субъединицы (molecule II), которые образуют водородные связи с субъединицей F* соседней гексамерной молекулы (molecule I). Участок петли L11 С субъединицы обозначен L11 (II), а F* субъединицы – L11 (I) (б).

Согласно полученным результатам, петля L11 всегда открыта в случае отсутствия молекул лигандов в сайтах связывания энзима. Конформация петли-шлагбаума L11 закрыта в субъединицах структур со следующими идентификационными номерами ID PDB: 5C80, 5M2T, 4LZW, 4OEH, 5MIW, 4OGL, 4K6O, 5EPU, 5LOK. К примеру, в В-субъединице структуры комплекса *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 4OEH) петля L11 контактирует посредством водородных связей с поверхностью той же субъединицы: NE_Arg167/B - 2.93 Å – O_Glu226/B; NH2_Arg167/B - 2.73 Å - O_Glu227/B; N_Tyr168/B - 2.79 Å - OE2_Glu226/B и N_Asp169/B - 2.95 Å - OE1_Glu226/B. В остальных случаях закрытой конформации петли L11 водородные связи между а.о. аналогичны.

В промежуточной конформации петля L11 С-субъединицы структуры комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW) не экспонирована в растворитель и формирует водородные связи с а.о. смежной гексамерной молекулы (рис. 2б). А.о. петли L11 С-субъединицы комплекса *VchUPh* с тимидином не формируют характерные для закрытого состояния водородные связи (см. выше), 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 (*- соседняя молекула) находится в закрытой конформации. Наличие этих водородных связей меняет конформацию участка а.о. 228-231 петли L11 С-субъединицы (r.m.s.d. (среднеквадратичное отклонение) координат Ca атомов а.о. Pro228, Asp229, His230, Ala231 промежуточной конформации петли в сравнении с закрытой составляет 3.8 Å, 4.1 Å, 4.0 Å, 4.2 Å соответственно).

Аналогичная ситуация с промежуточной конформацией петли L11 наблюдается для D-субъединицы структуры комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4OGL); для субъединиц С и D структуры комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4OGL); для субъединиц Е 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). Таким образом, выявление одной из промежуточных конформаций петли L11 в *VchUPh* является следствием взаимодействия соседних молекул фермента в кристаллическом состоянии.

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, В, С, Е, F 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: 5M2T, 4OEH), а также в комплексе *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5C80) в А, С, D, Е субъединицах петля находится в открытой конформации, не смотря на связывание фермента с пиримидиновыми лигандами (рис. 2а). Следовательно, в исследуемых структурах, несмотря на наличие лиганда, в нуклеозид-связывающем сайте присутствуют как закрытые, так и открытые конформации петли.

Таким образом, нахождение молекулы пиримидинового (URA, TDR, 6MU, CYT) либо нуклеозидного (URI, THM) лиганда 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.

В четвертом и пятом подразделе описывается фосфат-связывающий сайт и его конформационные изменения при связывании с анионом фосфата. При рассмотрении фосфат-связывающих сайтов субъединиц В, С, и F структуры комплекса *VchUPh* (ID PDB: 4IP0) локализован фосфат-анион. Фосфат-связывающие сайты субъединиц А, D и Е структуры комплекса *VchUPh* с фосфат-анионом (ID PDB: 4IP0) не лигандированы, либо заняты неспецифичными лигандами.

Взаимодействие фосфат-аниона с атомами фосфат-связывающего F-сайта (рис. 3а) 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.

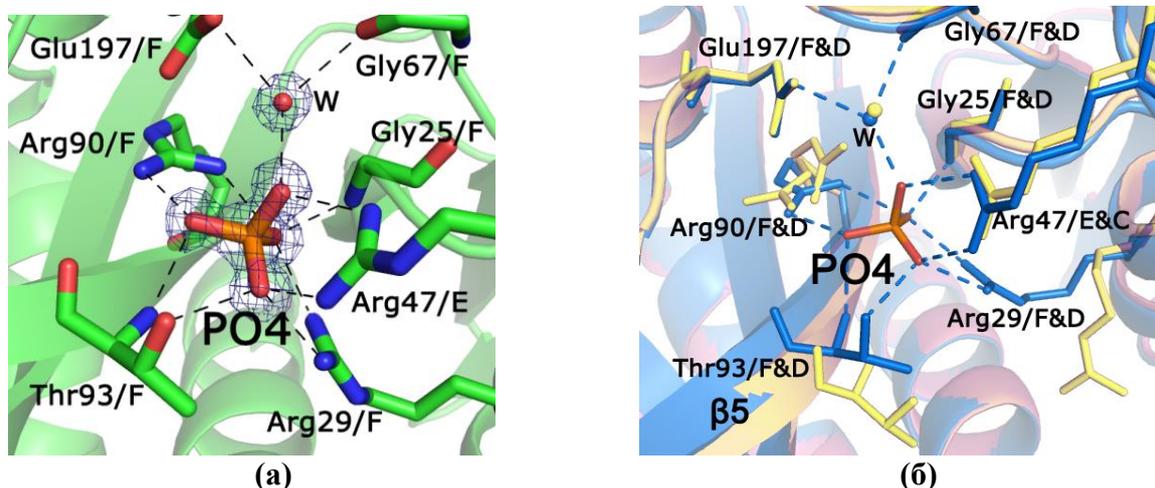


Рисунок 3. Пространственная организация фосфат-связывающего сайта активного центра комплекса *VchUPh* с фосфат-анионом (ID PDB: 4IP0). Карта электронной плотности с коэффициентами $2mFo-DFc$ изображена при уровне срезки 1.5σ (а). Суперпозиция а.о. фосфат-связывающего сайта и $\beta 5$ -стренда в свободном состоянии (желтый) и лигандированном (синий) анионом фосфата (PO4) (б).

Среднеквадратичное отклонение (r.m.s.d.) координат атомов боковых групп а.о. Arg29, Arg90 и Arg29 смежной субъединицы гомодимера в нелигандированных фосфатом сайтах субъединицах А и D равно 1.6 \AA . При этом r.m.s.d. координат атомов боковых групп аналогичных а.о. в лигандированных фосфатом в субъединицах F и C равно 0.7 \AA (рис. 3б). Таким образом, в нелигандированном состоянии сайта-связывания фосфата молекулы энзима конформации Arg29, Arg90, Thr93 и Arg47 варьируются от субъединицы к субъединице, но не совпадают с их конформациями в связанном состоянии. В то же время фосфат-анион стабилизирует подвижные а.о. фосфат-связывающего сайта в одной конформации в разных субъединицах. Отметим, что при связывании с фосфат-анионом Thr93 ($\beta 5$ -стренд) смещается на 1.3 \AA вглубь активного сайта вместе со смежными ему аминокислотными остатками Gly92, Thr94 и Gly95, и образующими подвижный $\beta 5$ -стренд (рис. 3б). Среднеквадратичное отклонение между координатами Ca атомов а.о. Gly92, Thr94, Gly95 *VchUPh* лигандированного иона фосфата (F) и в свободном состоянии (D) равно 1.3 \AA , 0.9 \AA , 0.8 \AA соответственно.

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

Arg90 и Thr93, а с ними и участок $\beta 5$ -стренда изменяют конформацию по сравнению с нелигандированным ферментом (рис. 3б), и смещаются в сторону лиганда. Изменение конформации $\beta 5$ -стренда приводит к смещению параллельного ему участка $\beta 8$ -стренда с номерами а.о. 216-221 в сторону сайта связывания (r.m.s.d. между координатами Ca атомов а.о. Ala216, Gly217, Val218, Ile219, Ile220, Asn221 *VchUPh* лигандированного анионом фосфата и в свободном состоянии равно 0.6 \AA , 0.9 \AA , 0.7 \AA , 1.0 \AA , 0.8 \AA , 0.5 \AA соответственно). А вслед за этим аналогично - участка цепи с номерами а.о. 101-106 - участка петли L5 и $\beta 6$ -стренда (r.m.s.d. между координатами Ca атомов а.о. Val101, Asn102, Val103, Gly104, Asp105, Met106, *VchUPh* лигандированного анионом фосфата и в свободном состоянии равно 0.5 \AA , 0.5 \AA , 0.6 \AA , 1.0 \AA , 0.8 \AA , 0.6 \AA соответственно). Смещение $\beta 8$ -стренда, в свою очередь, изменяет конформацию начального участка петли L11 (Arg222, Thr223), фиксируя её в закрытом состоянии. При этом, как отмечалось ранее, установлено, что наблюдается только закрытая конформация петли L11 при связывании фосфат-аниона а.о. активного центра (B-, C-, F-субъединица комплекса *VchUPh* с фосфат-анионом (ID PDB: 4IP0)) (рис. 3а). Сохранение $\beta 5$ -стренда и петли L11 в закрытом состоянии фосфат-анионом

происходит за счёт одновременного связывания фосфат-аниона как с Arg90 и Thr93 β5-стренда, так и с Gly25 β1-стренда.

Таким образом, именно фосфат-анион является вторым субстратом, входящим в активный центр в случае прямой реакции, катализируемой уридинфосфорилазой, т.к. при его связывании активным центром петля L11 фиксируется в закрытой конформации, тем самым доступ нуклеозидов в сайт связывания становится невозможен.

В седьмом подразделе описываются двойные положения фрагментов 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 (рис. 4а, б). На примере структуры комплекса *VchUPh* с цитозином проведено попарное сравнение каждого из двойных положений фрагментов а), б) и в) с аналогичными участками структуры нелигандированной *VchUPh* (ID PDB: 3O6V). Обнаружено, 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 равно 0.193 Å, а между вторым двойным положением *VchUPh*+CYT и нелигандированным ферментом – 1.516 Å (рис. 5а); **(б)** для фрагментов структур с номерами а.о. 217-221, r.m.s.d. координат атомов а.о. между одним двойным положением и нелигандированной структурой *VchUPh* равно 0.233 Å, а между вторым – 1.047 Å; **(в)** для фрагментов структур с номерами 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) и в) структуры комплекса *VchUPh*+CYT нет структурных отличий в сравнении со структурой нелигандированной *VchUPh*. При сравнении каждого из двойных положений фрагментов структуры комплекса *VchUPh* с цитозином с аналогичными участками Е субъединицы структуры, лигандированной уридином *VchUPh* (ID PDB: 5M2T), обнаружено, что у структуры комплекса *VchUPh*+CYT нет структурных отличий в сравнении со структурой *VchUPh* лигандированной уридином.

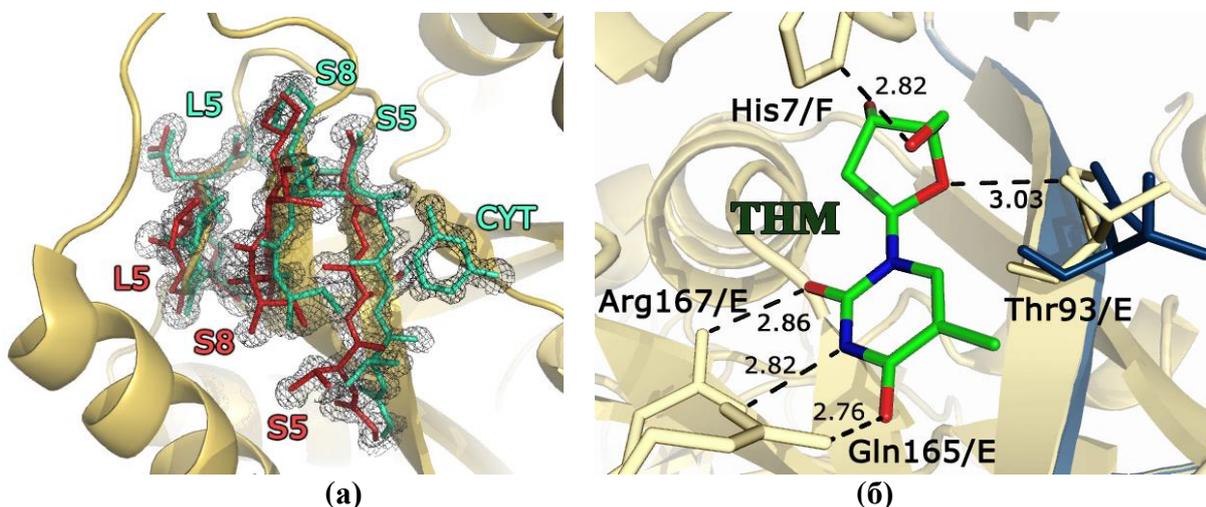


Рисунок 4. Двойные положения фрагментов β5-стренда, β8-стренда и петли L5 в А-субъединице структуры комплекса *VchUPh* с цитозином CYT (ID PDB: 5EPU). Положение фрагментов структуры, отвечающих лигандированному состоянию обозначено сиреневым цветом, нелигандированному – красным (а); альтернативные конформации Thr93 в структуре комплекса *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW) (б)

Сравнивая элементы структур нелигандированной (ID PDB: 3O6V) и лигандированной урацилом *VchUPh* (ID PDB: 5MIW), можно сделать вывод, что в виде двойных положений β5- и β8-стрендов и петли L5 мы наблюдаем крайние положения динамики структурных

элементов *VchUPh* при его связывании с лигандом, то есть одно из двойных положений фрагментов структур соответствует лигандированному состоянию, а второе – нелигандированному. Таким образом, при связывании *VchUPh* с лигандом, происходит поочередное смещение сначала участка β 5-стренда в сторону лиганда, что приводит к изменению минимума энергии конформации близлежащего β 8-стренда и его смещению в сторону сайта связывания за β 5-стрендом, что, в свою очередь, аналогичным образом влияет на изменение конформации фрагмента петли L5, причем она также смещается в сторону сайта связывания, ближе к β 8-стренду (рис. 4а, б).

В третьем разделе описываются структурные аспекты специфичности *VchUPh* к субстратам прямой реакции. В первых двух подразделах описываются сайты связывания структур комплексов *VchUPh* с прямыми субстратами.

Уридин (URI), связываясь с молекулой *VchUPh*, занимает весь нуклеозид-связывающий сайт (рис. 5а). Взаимодействие уридина с нуклеозид-связывающим сайтом в структуре комплекса *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T) осуществляется посредством водородных связей, изображенных на рисунке 5а. Ключевыми аминокислотными остатками *VchUPh* во взаимодействии с пиримидиновым компонентом лиганда являются Gln165, Arg167 и Arg222 (рис. 5а). Аминокислотными остатками, связывающими фуранозный компонент тимидина и уридина являются Glu197, Thr93, а также His7 соседней субъединицы. Фенильный радикал Phe161 сайта связывания расположен перпендикулярно ароматическому гетероциклу уридина, тимидина, урацила, тимина; и взаимодействует с ним посредством π -стекинга. Около атома углерода C5 ароматического гетероцикла уридина находится гидрофобный карман, образованный остатками Ile220, Ile221, Pro228, а также Phe8, принадлежащий соседней субъединице.

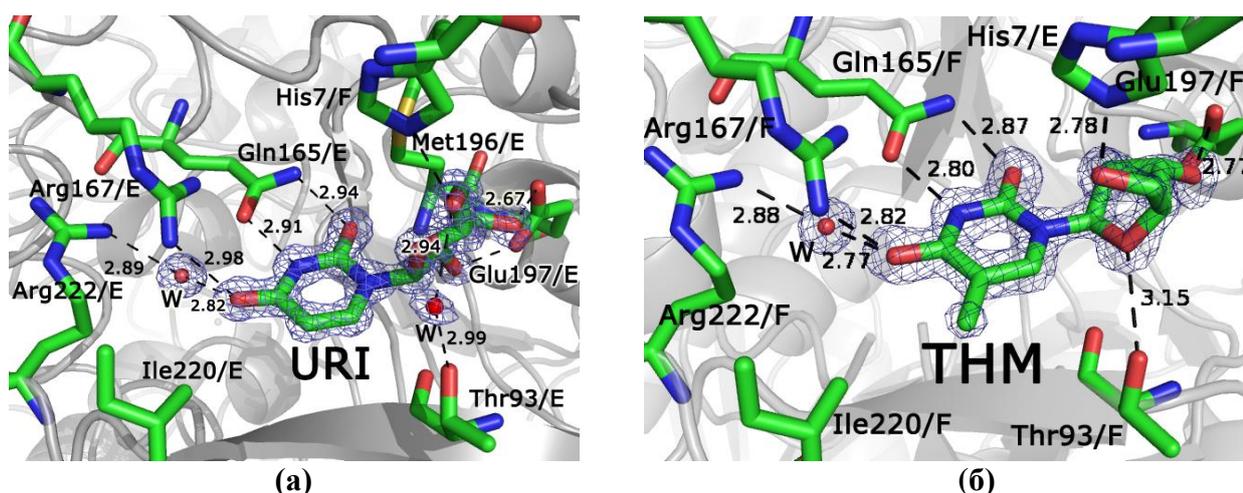


Рисунок 5. Активный центр комплекса *VchUPh* с уридином URI (ID PDB: 5M2T). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mF_o - DFC$) отображена при уровне срезки 1.5σ (а); активный центр комплекса *VchUPh* с тимидином THM (ID PDB: 4LZW). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mF_o - DFC$) отображена при уровне срезки 1.5σ (б).

Тимидин (THM) находится во всех шести активных центрах структуры комплекса *VchUPh* (ID PDB: 4LZW). В активном центре субъединиц А, В, D, F заселенность молекулы лиганда полная, в остальных (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, изображенных на рисунке 5б.

Согласно результатам химической кинетики сродство бактериальных уридинфосфорилаз NP-1 семейства к урдину на порядок выше, чем к тимидину [1, 2, 20]. В последующих подразделах рассмотрен структурный аспект субстратной специфичности УФ к субстратам прямой реакции и влияние химических групп лиганда на его аффинность.

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. Таким образом, рассматриваемые сайты связывания комплексов *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T) и *VchUPh* с тимидином (ID PDB: 4LZW) структурно идентичны (рис. 6а).

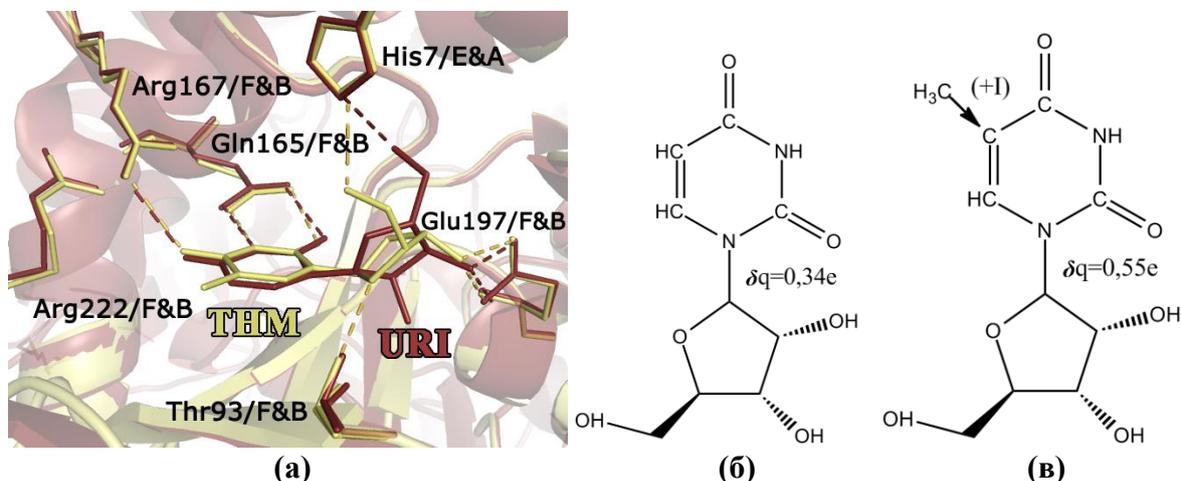


Рисунок 6. Суперпозиция структур комплексов *VchUPh* с уридином (ID PDB: 5M2T; URI) и тимидином ((ID PDB: 4LZW); THM) (а); разность частичных электрических зарядов (δq) (здесь e – заряд электрона) между атомами β -N1-гликозидной связи уридина (б) и 5-метилуридина (в).

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 (рис. 6а). 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.

Для анализа энергии конформаций лигандов использовалась величина E' , рассчитываемая в соответствии с:

$$E' = E_{\text{stretch}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{non_bonded}},$$

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

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

E_{bend} – энергия деформации сгибания валентных связей,

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

E_{torsion} – энергия торсионных углов,

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

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

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

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

K_r , K_θ , A_{ij} , C_{ij} – эмпирические константы, r_0 , θ_0 – идеальные длина и угол валентной связи для пары атомов, V_{1-4} – фурье коэффициенты торсионных углов [33].

Разности энергий между конформациями лигандов в активном центре комплексов *VchUPh* в кристаллическом состоянии и в водном растворе для уридина и тимидина равны 86.80 ± 0.02 кДж/моль и 58.13 ± 0.02 кДж/моль соответственно. Таким образом, образование двух дополнительных водородных связей ($N_Met196/A-3.14\text{\AA}-O2'_URI$; $Oe1_Glu197/A-2.56\text{\AA}-O2'_URI$) с 2'-гидоксигруппой уридина (рис. 6а), приводит не только к увеличению энергии связывания, как было отмечено ранее и для комплекса *EcUPh*+URI [5], но также и к изменению конформации лиганда на более напряжённую твист-конформацию C1'-endo/O4'-exo(¹T₀) молекулы уридина по сравнению с C1'-endo(¹E) конформацией молекулы тимидина (рис. 6а).

Разность 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 к увеличению скорости реакции с ним.

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

5-метильная группа тимидина располагается вблизи остатков гидрофобного окружения лиганда: $CG2_Pe220/F-3.68\text{\AA}-CM5_Tm$; $CD1_Pe219/F-3.60\text{\AA}-CM5_Tm$; $CG1_Pe219/F-3.55\text{\AA}-CM5_Tm$ (рис. 6). Стерических ограничений, препятствующих связыванию тимидина в активном центре нет, так как расстояния между атомами углерода метильных групп аминокислотных остатков и CM5-тимидина $>3.4\text{\AA}$. Тем самым, 5-метильная группа тимидина не может препятствовать его связыванию с активным центром бактериальных уридинфосфорилаз и, в частности, *VchUPh* (рис. 5б). Несмотря на это, в литературе на примере аналога тимидина – 5-метилуридина показано, что наличие метильной группы, присоединенной в пятом положении пиримидинового гетероцикла лиганда уменьшает скорость ферментативной реакции [1, 2, 20].

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 в урине равна $\delta q = 0.34e$, что связано с положительным индуктивным эффектом (I+) 5-метильной группы на ароматическое кольцо (рис. 6б, в).

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 урину выше, чем к 5-метилуридину.

Таким образом, предложен механизм негативного влияния присутствия метильной группы CM5 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.

В четвертом разделе описываются структурные и квантовохимические аспекты специфичности *VchUPh* к субстратам обратной реакции. В первых двух подразделах описываются сайты связывания структур комплексов *VchUPh* с обратными субстратами.

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 (рис. 7а). В субъединицах С, D и F – частичную заселенность 0.81, 0.71 и 0.78 соответственно.

Взаимодействие урацила с нуклеозид-связывающим сайтом в структуре комплекса *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW) осуществляется посредством водородных связей, представленных на рисунке 7а. Фенильный радикал Phe161/В расположен перпендикулярно к ароматическому гетероциклу урацила и взаимодействует с ним посредством π-стекинга ёлочного типа.

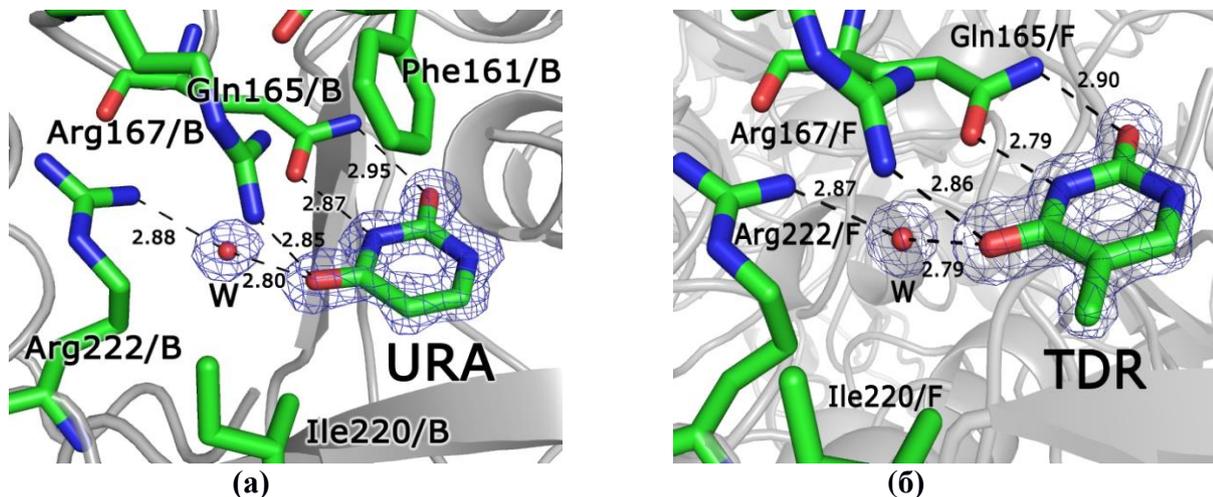


Рисунок 7. Активный центр комплекса *VchUPh* с урацилом (URA, ID PDB: 5MIW). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mF_o - DF_c$) отображена при уровне срезы 1.5σ (а); активный центр комплекса *VchUPh* с тиминном (TDR, ID PDB: 4OGL). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mF_o - DF_c$) отображена при уровне срезы 1.5σ (б).

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, аналогично молекуле урацила (рис. 7б). TDR локализован во всех шести активных центрах структуры комплекса *VchUPh* с TDR (ID PDB: 4OGL).

В последующих четырех подразделах рассмотрен структурный аспект субстратной специфичности УФ к субстратам обратной реакции.

Сравнение структур комплексов *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW) и с тиминном (ID PDB: 4OGL) показало, что конформация и положение аминокислотных остатков сайтов связывания и гидрофобного окружения и положение субстратов сходны (рис. 8а).

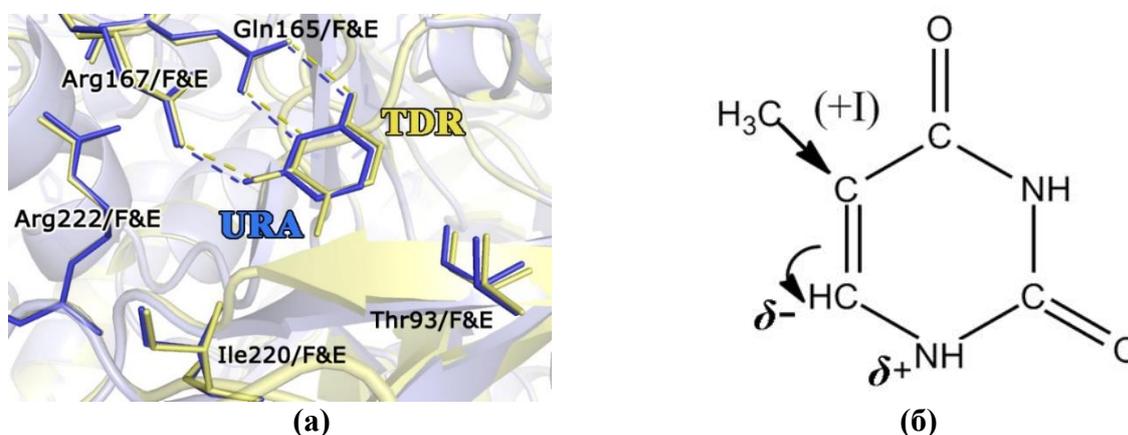


Рисунок 8. Суперпозиция а.о. фрагмента сайта связывания структур комплексов *VchUPh* с тиминном (TDR) и урацилом (URA) (а); электронные эффекты заместителей в 5 – ом положении тимина (б).

Среднеквадратичное отклонение между координатами атомов а.о. активного центра комплексов *VchUPh* с урацилом (EF-гомономер - (ID PDB: 5MIW) и тиминном - FE-гомономер - (ID PDB: 4OGL)) равно 0.13 \AA , а между координатами атомов боковых групп а.о. активного центра – 0.14 \AA . Среднеквадратичное отклонение между координатами атомов урацила (ID PDB: 5MIW) и тимина (ID PDB: 4OGL), связанных с а.о. сайта связывания, равно 0.189 \AA (рис. 8а). Однако, метильная группа тимина, являясь ориентантом первого рода, наводит частичный положительный заряд на атом N1 гетероциклического кольца тимина (рис. 8б). Таким образом, уменьшается величина модуля отрицательного

69.22±0.02 кДж/моль, а для молекулы 2-деоксирибозо-1-фосфата равна 37.82±0.02 кДж/моль. Различие в энергиях объясняется образованной сетью водородных связей 2-гидроксигруппы рибозо-1-фосфата (R1P) с остатком рибозо-связывающего сайта *VchUPh* (рис. 9а). Более высокоэнергетическая конформация второго субстрата (рибозо-1-фосфата) приводит к увеличению скорости химической реакции в сравнении с 2-деоксирибозо-1-фосфатом.

В четвертом разделе описываются структурные и квантовохимические аспекты специфичности *VchUPh* к псевдосубстратам – 6-метилурацилу и цитозину. В первом подразделе описывается сайт связывания структуры комплекса *VchUPh* с 6-метилурацилом.

6-Метилурацил (6MU) связывается а.о. урацил-связывающего сайта молекулы энзима. Водородные связи *VchUPh* с 6MU представлены на рисунке 10а. Боковая группа остатка Phe161 перпендикулярна плоскости пиримидинового кольца 6MU, а минимальное расстояние между неводородными атомами ароматического кольца лиганда и Phe161 равно 3.62 Å, что приводит к π-стекинг взаимодействию между ними (рис. 10б). Гидрофобное окружение лиганда формируется боковыми группами аминокислотных остатков Ile219, Phe161 и Ile220

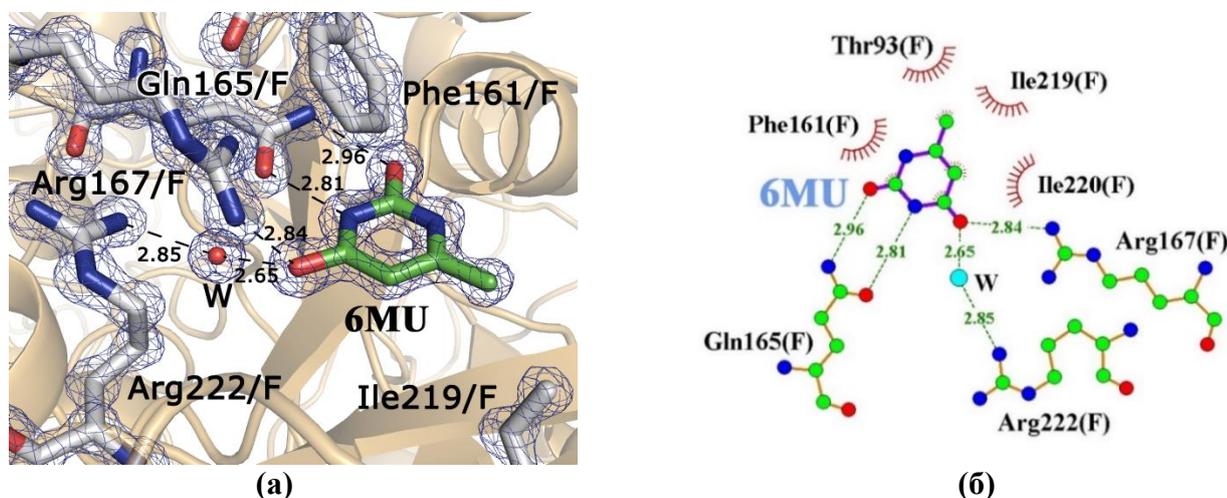


Рисунок 10. Пространственная организация сайта связывания структуры комплекса *VchUPh* с 6-метилурацилом (6MU; ID PDB: 4K6O) с картой электронной плотности 2mF_o-DF_c (а). Схематическая диаграмма взаимодействия 6-метилурацила с сайтом связывания *VchUPh* (б).

Для выяснения структурного аспекта влияния 6-метилгруппы 6MU на прохождение реакции проведено сравнение структур комплексов *VchUPh* с 6-метилурацилом и урацилом. Геометрический центр пиримидинового кольца 6-метилурацила (ID PDB: 4K6O) (рис. 11а) располагается дальше на ~1.3 Å геометрического центра кольца урацила (ID PDB: 5MIW) относительно атома кислорода гидроксигруппы Thr93/В (при сравнении В-субъединиц структур, это расстояние равно 6.1 Å для 6MU и 4.8 Å для урацила). В то же время, г.м.с.д. координат атомов Thr93/В в структуре комплекса *VchUPh* с урацилом по сравнению со структурой комплекса энзима с 6MU равно 0.75 Å, тогда как г.м.с.д. координат атомов всех а.о. сайтов связывания (исключая Thr93) равно 0.19 Å. Отсюда следует, что взаимное вандерваальсовое отталкивание 6-метильной группы 6MU и гидроксигруппы боковой цепи Thr93 приводит к смещению боковой группы Thr93 в структуре комплекса *VchUPh*+6MU.

Для выяснения последствий отталкивания 6-метилгруппы 6MU а.о. гидроксигруппы Thr93, оказываемых на ферментативную реакцию, произведено сравнение структур комплексов *VchUPh* с 6-метилурацилом и *EcUPh* с урацилом и рибозо-1-фосфатом (рис. 11б). 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 (рис. 11б) [5, 41, 45, 46]. В структуре комплекса гомологичной *EcUPh* с урацилом и рибозо-1-фосфатом (R1P) (ID PDB: 1TGY, В-субъединица) Thr94 образует водородные связи с атомом кислорода ОЗР 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 г.м.с.d. не превышает 0.25 Å. Отметим, что г.м.с.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 г.м.с.d. всех координат атомов а.о., входящих в сайт связывания – 0.21 Å.

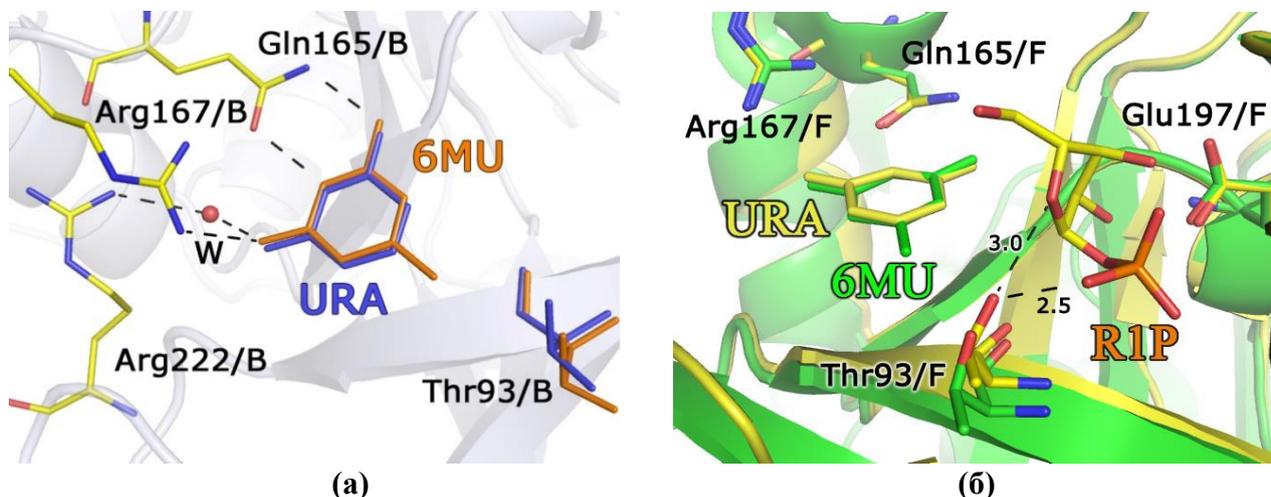


Рисунок 11. Положение урацила и 6-метилурацила в активном центре *VchUPh* (а); суперпозиция сайтов связывания структур комплексов *VchUPh* с 6-метилурацилом с двойным комплексом с урацилом и рибозо-1-фосфатом (б).

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, 41, 45, 46]. По этой причине проведение энзимом реакции синтеза 6-метилиуридина из 6-метилурацила невозможно.

Цитозин (CYT) в структуре комплекса *VchUPh* с цитозином (ID PDB: 5EPU) связывается только с урацил-связывающим сайтом, образуя водородные связи, представленные на рисунке 12а. Боковая группа а.о. Phe161/B формирует π-стекинг взаимодействие с лигандом, как и в случае с природными субстратами (урацилом и тимином). Гидрофобное окружение лиганда формируют аминокислотные остатки Ile219/B, Phe161/B и Ile220/B.

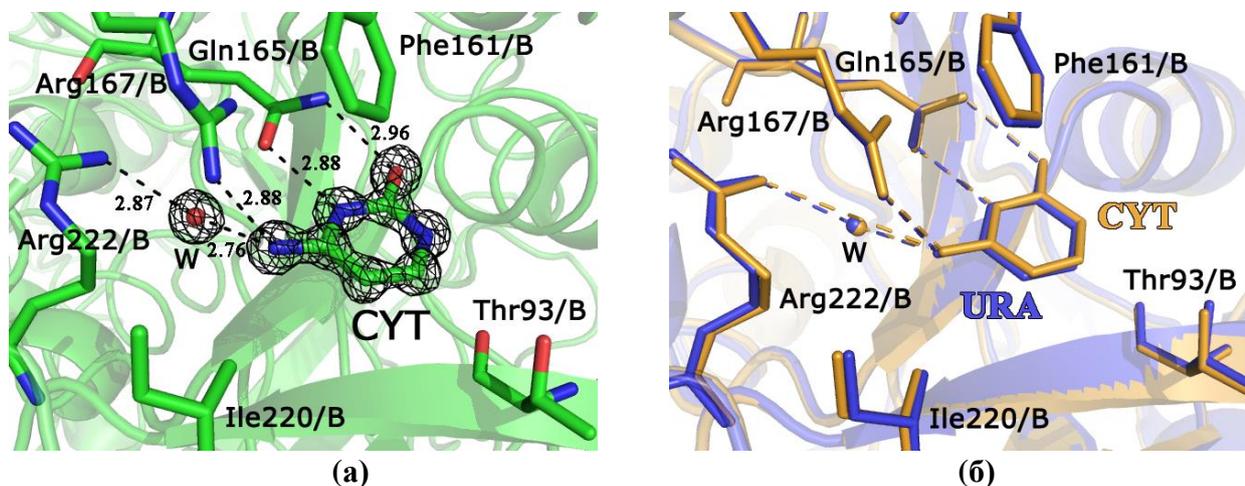


Рисунок 12. Активный центр комплекса *VchUPh* с цитозином CYT (ID PDB: 5EPU). Карта электронной плотности с коэффициентами ($2mF_o - DF_c$) отображена черным цветом при

уровне срезки 1.5σ (а); суперпозиция а.о. фрагмента активного центра структур комплексов *VchUPh* с цитозином (оранжевый) и урацилом (синий) (б).

В публикации [2] сообщается, что ферментативная реакция синтеза цитидина из цитозина не проводится уридинфосфорилазой, однако причины этого обстоятельства не объясняются. При проведении суперпозиции структур комплексов *VchUPh* с цитозином (ID PDB: 5EPU, В-субъединица) и *VchUPh* с урацилом (ID PDB: 5MIW, В-субъединица) и расчете среднеквадратичного отклонения координат всех неводородных атомов а.о. активного центра, нами определено, что структурных отличий в сайтах связывания комплексов *VchUPh* с цитозином и урацилом нет (рис. 126). Следовательно, химическое строение ароматического кольца субстрата оказывает влияние на скорость синтеза уридинфосфорилазой цитидина из цитозина.

Отметим, что таутомером цитозина с наиболее высокой концентрацией в водном растворе при pH от 7,5 до 8,5 является форма таутомера цитозина (I) [47-50] (рис. 13а). 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 [48, 49]. Влияние химического строения лиганда на субстратную специфичность исследовалось в том числе при помощи оценочного расчета вклада свободной энергии связывания атомов цитозина с ферментом в сравнении с урацилом в программе SeeSAR [36]. 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. Тот факт, что атом N3 расположен энергетически невыгодно по отношению к боковой группе Gln165 объясняется отсутствием атома водорода связанного с атомом азота N3 - донора водородной связи у рассматриваемого таутомера (рис. 13а).

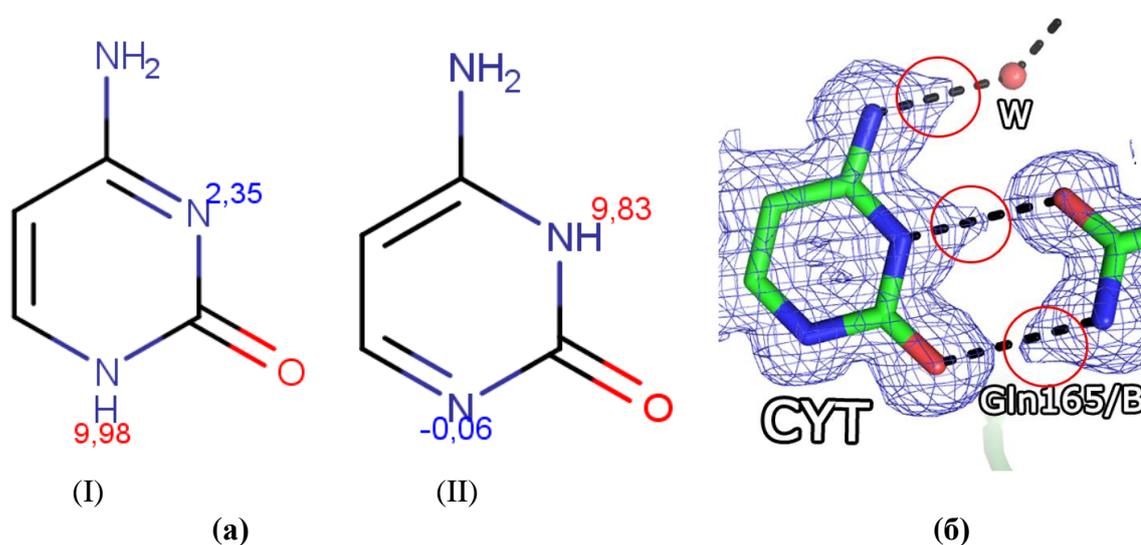


Рисунок 13. Наиболее вероятные таутомеры цитозина в водном растворе. Приведены рассчитанные значения констант диссоциации pK_a этих молекул (а); карта электронной плотности структуры комплекса *VchUPh* с цитозином с коэффициентами ($2mF_o - DF_c$), отображенной при уровне срезки 0.1σ (б).

Поэтому цитозин (I) не может образовывать одну из наиболее значимых водородных связей с атомом кислорода - акцептора протона, а.о. Gln165 в *VchUPh* (N3_Cyt – OE1_Gln165). 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* (рис. 13а). Эти выводы подтверждаются и при анализе карты электронной плотности структуры комплекса *VchUPh* с цитозином атомного разрешения с коэффициентами ($2mF_o-DF_c$) отображенной при уровне срезки 0.1 σ . Обнаружено наличие пиков электронной плотности при атоме N3 пиримидинового кольца цитозина и атоме азота боковой группы Gln165, характеризующие направление образования водородных связей цитозина с ферментом (рис. 13б). Такие водородные связи может образовать только таутомер цитозина II, ввиду наличия у него донора протона при атоме N3. Но в этом случае у атома N1 молекулы цитозина (II) отсутствует протон, необходимый для проведения ферментативной реакции (рис. 13а). Таким образом, 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-C гликозидную связь с рибозо-1-фосфатом. По этой причине прохождение ферментативной реакции комплекса *VchUPh* с цитозином и рибозо-1-фосфатом невозможно.

ВЫВОДЫ

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

- 1) анионом-фосфата при разрешении 1.29 Å ($R_{\text{factor}} = 17.2\%$; $R_{\text{free}} = 20.0\%$, DPI= 0.06 Å, R.M.S.D. = 0.008 Å для длин связей и R.M.S.D. = 1.22° для валентных углов)

- 2) уридином при разрешении 1.03 Å ($R_{\text{factor}} = 11.7\%$; $R_{\text{free}} = 13.7\%$, DPI= 0.03 Å, R.M.S.D. = 0.016 Å для длин связей и R.M.S.D. = 1.36° для валентных углов)

- 3) тимидином при разрешении 1.29 Å ($R_{\text{factor}} = 17.8\%$; $R_{\text{free}} = 21.1\%$, DPI= 0.06 Å, R.M.S.D. = 0.014 Å для длин связей и R.M.S.D. = 1.32° для валентных углов)

- 4) урацилом при разрешении 1.28 Å ($R_{\text{factor}} = 13.3\%$; $R_{\text{free}} = 16.8\%$, DPI= 0.09 Å, R.M.S.D. = 0.014 Å для длин связей и R.M.S.D. = 1.32° для валентных углов)

- 5) тиминном (при разрешении 1.25 Å ($R_{\text{factor}} = 11.5\%$; $R_{\text{free}} = 14.7\%$, DPI= 0.04 Å, R.M.S.D. = 0.008 Å для длин связей и R.M.S.D. = 1.27° для валентных углов)

- 6) цитозином при разрешении 1.06 Å ($R_{\text{factor}} = 10.5\%$; $R_{\text{free}} = 12.2\%$, DPI= 0.03 Å, R.M.S.D. = 0.009 Å для длин связей и R.M.S.D. = 1.50° для валентных углов)

- 7) 6-метилурацилом при разрешении 1.17 Å ($R_{\text{factor}} = 10.8\%$; $R_{\text{free}} = 12.8\%$, DPI= 0.04 Å, R.M.S.D. = 0.016 Å для длин связей и R.M.S.D. = 1.19° 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.

- Выявлено, что 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 O3P 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-метилиуридина 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.

Список публикаций в рецензируемых журналах по теме диссертации:

1. **I.I. Prokofiev**, A.A. Lashkov, A.G. Gabdulkhakov, M.V. Dontsova, T.A. Seregina, A.S. Mironov, C. Betzel and A.M. Mikhailov Crystallization and preliminary X-ray study of *Vibrio cholerae* uridine phosphorylase in complex with 6-methyluracil // *Structural Biology and Crystallization Communications. Acta Cryst.* (2014). F70, 60–63

2. A.A. Lashkov, A.G. Gabdulkhakov, **I.I. Prokofiev**, T.A. Seregina, S.E. Sotnichenko, A.V. Lyashenko, A.A. Shtil, A.S. Mironov, C. Betzel, and A.M. Mikhailov Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray structure analyses of *Vibrio cholerae* uridine phosphorylase in complex with thymidine // *Structural Biology and Crystallization Communications. Acta Cryst.* (2012).F68, 1394-1397

3. A.A. Lashkov, S.E. Sotnichenko, **I.I. Prokofiev**, A.G. Gabdulkhakov, I.I. Agapov, A.A. Shtil, C. Betzel, A.S. Mironov and A.M. Mikhailov 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* // *Structural Biology and Crystallization Communications. Acta Cryst.* (2012). D68, 968–974

4. **И. И. Прокофьев**, А. А. Лашков, А. Г. Габдулхаков, В. В. Балаев, Т. А. Серегина, А. С. Миронов, Х. Бетзель, А. М. Михайлов Структуры комплексов уридинфосфорилаз из *Vibrio cholerae* с уридином, тимидином, урацилом, тиминном и фосфат-анионом по результатам рентгеноструктурного анализа. Субстратная специфичность бактериальных уридинфосфорилаз // *Кристаллография.* – 2016. – Т. 61. - Вып. 6. - С. 919–939.

Список тезисов конференций:

1) **I.I. Prokofev**, A.A. Lashkov, A.G. Gabdulkhakov, A.S. Mironov, C.Betzel, and A.M. Mikhailov X-ray structure of *Vibrio cholerae* uridine phosphorylase in complex with 6-methyuracil at atomic resolution // Международная школа-конференция «Биология-наука 21 века». Пушино, 21-25 апреля 2014г.

2) **I.I. Prokofev**, A.A. Lashkov, V.V. Balaev, A.G. Gabdulkhakov, and A.M. Mikhailov Structure basis of substrate specificity of *V. cholerae* uridine phosphorylase // 23rd International Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCR2014). Canada, 5 August – 12 August 2014

3) A.A. Lashkov, **I.I. Prokofev**, A.G. Gabdulkhakov, C.Betzel, and A.M. Mikhailov Structural investigation of specificity of uridine phosphorylase from *Vibrio cholerae* to pyrimidine nucleosides and nitrogenous bases // 15th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules. Hamburg, Germany, September 17-20, 2014

4) **Прокофьев И.И.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Исследование методом рентгеноструктурного анализа влияния положения метильной группы в пиримидиновых основаниях на их связывания с уридин фосфорилазой из *Vibrio cholera* // Третья школа молодых учёных по физике наноструктурированных и укрсталлических материалов. Нижний Новгород, 15-17 мая 2014г.

5) **Прокофьев И.И.**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Щекотихин А.Е., Бетзель Х., Михайлов А. М. Структура комплекса уридинфосфорилазы из *Vibrio cholerae* с модифицированным лекарственным препаратом 5-фторурацилом // Международная школа-конференция «Биология-наука 21 века». Пушино, 20-24 апреля 2015г.

6) **И. И. Прокофьев**, Лашков А.А., Габдулхаков А.Г., Михайлов А.М. Взаимосвязь между наличием субстрата в сайте связывания и конформацией петли L11 уридинфосфорилазы из *Vibrio cholerae* // VII РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ», Новосибирск, 12-17 июля 2015г.

7) Лашков, А. А., **Прокофьев И. И.**, А. Г. Габдулхаков, В. В. Балаев, А. М. Михайлов Связывание таутомеров модифицированного 5-фторурацила с пиримидинфосфорилазой NP-I семейства // XIV Курчатовская молодежная научная школа (8 - 11 ноября 2016 г.) (устный)

8) Лашков, А. А. **Прокофьев И. И.**, Балаев В. В., Габдулхаков А. Г., Михайлов А. М. Конформационная лабильность элементов трёхмерной структуры и дизайн новых ингибиторов пиримидинфосфорилаз семейств NP-I и NP-II // Сборник тезисов Первого Российского кристаллографического конгресса 21 – 26 ноября 2016 г. – Москва – 2016. – с. 211 (устный)

9) **И. И. Прокофьев**, А. А. Лашков, А. Г. Габдулхаков, А. М. Михайлов Динамика функционально важных элементов молекулы уридинфосфорилазы из *Vibrio cholerae* по результатам рентгеноструктурного анализа при атомном разрешении // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 20-я Международная Пуштинская школа- конференция молодых ученых (Пушино, 18 - 22 апреля 2016 г.). Сборник тезисов. – Пушино - 2016. – с. 65 (стендовый)

10) **И. И. Прокофьев**, А. А. Лашков, В. В. Балаев, А. Г. Габдулхаков, А. М. Михайлов Рентгеноструктурный комплекс уридинфосфорилазы из *Vibrio cholerae* с цитозином разрешением 1.06 Å. Отрицательная избирательность энзима к цитозину // Тезисы докладов Первой российской конференции «Физика — наукам о жизни». — СПб.: ФТИ им. А.Ф. Иоффе, 2016. —с. 63 (стендовый)

Список цитируемой литературы:

1. Vita A., Amici A., Cacciamani T. et al. . 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., Gabdulkhakov A.G. et al. . 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. et al.* . 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. et al.* . 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. et al.* . 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. et al.* . High uridine phosphorylase activity in human melanoma tumor // *Anticancer Res.* 1983. V. 3. № 4. P. 227-31.
9. *Kanzaki A., Takebayashi Y., Bando H. et al.* . 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. et al.* . 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. et al.* . 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. et al.* . 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. et al.* . 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. et al.* . Uridine phosphorylase from *Schistosoma mansoni* // *J Biol Chem.* 1988. V. 263. № 13. P. 6081-6.
18. *Jimenez B.M., Kranz P., Lee C.S. et al.* . 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 с.
21. *Morgunova E., Mikhailov A.M., Popov A.N. 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., Gabdoulkhalov A.G., Molchan O.K. et al.* . 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. Кристаллография белка. / Бландел Т., Джонсон Л. – Москва: "Мир", 1979.
24. *Kabsch W.* Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.* 2010. V. 66. № Pt 2. P. 133-144.
25. *Vagin A., Teplyakov A.* MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement // *Journal of Applied Crystallography.* 1997. V. 30. № 6. P. 1022-1025.
26. *McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D. et al.* . Phaser crystallographic software // *J Appl Crystallogr.* 2007. V. 40. № Pt 4. P. 658-674.
27. *Adams P.D., Afonine P.V., Bunkoczi G. et al.* . PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010. V. 66. № Pt 2. P. 213-21.

28. *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.
29. *Emsley P., Cowtan K.* Coot: model-building tools for molecular graphics // *Acta Crystallographica Section D.* 2004. V. 60. № 12 Part 1. P. 2126-2132.
30. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G. et al.* . Features and development of Coot // *Acta Crystallographica Section D.* 2010. V. 66. № 4. P. 486-501.
31. *Bochevarov A.D., Harder E., Hughes T.F. et al.* . 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.
32. *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.
33. *Banks J.L., Beard H.S., Cao Y. et al.* . Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT) // *J Comput Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1752-80.
34. *Maestro* // Book *Maestro* / Editor. – New York, NY: Schrödinger, LLC, 2009.
35. *Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B. et al.* . 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.
36. *Reulecke I., Lange G., Albrecht J. et al.* . 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.
37. *Rossmann M.G., Argos P.* Protein folding // *Annu Rev Biochem.* 1981. V. 50. P. 497-532.
38. *Touw W.G., Baakman C., Black J. et al.* . A series of PDB-related databanks for everyday needs // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № Database issue. P. D364-8.
39. *Zolotukhina M., Ovcharova I., Eremina S. et al.* . 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.
40. *Bu W., Settembre E.C., el Kouni M.H. et al.* . Structural basis for inhibition of *Escherichia coli* uridine phosphorylase by 5-substituted acyclouridines // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2005. V. 61. № Pt 7. P. 863-72.
41. *Lashkov A.A., Zhukhlistova N.E., Gabdoulkhakov A.H. et al.* . 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.
42. *Cao D., Russell R.L., Zhang D. et al.* . 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.
43. *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.
44. *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.
45. *Dontsova M.V., Gabdoulkhakov A.G., Molchan O.K. et al.* . Preliminary investigation of the three-dimensional structure of *Salmonella typhimurium* uridine phosphorylase in the crystalline state // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2005. V. 61. № Pt 4. P. 337-40.
46. *Tran T.H., Christoffersen S., Allan P.W. et al.* . The crystal structure of *Streptococcus pyogenes* uridine phosphorylase reveals a distinct subfamily of nucleoside phosphorylases // *Biochemistry.* 2011. V. 50. № 30. P. 6549-58.
47. *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.
48. *Scanlan M.J.* 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.
49. *R. Czerwiński, 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.
50. *Kwiatkowski J.S., Person W.B., Szczepaniak K. et al.* . On tautomerism of the cytosine molecule // *Acta Biochim Pol.* 1987. V. 34. № 2. P. 165-81.