

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

ИНСТИТУТ КРИСТАЛЛОГРАФИИ ИМ. А.В. ШУБНИКОВА РАН

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»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук
Лашков Александр Александрович

Москва 2017

Содержание

СОДЕРЖАНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
I.1. Роль ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗЫ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА	12
I.2. Роль ТР в ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ	13
I.3. УЧАСТИЕ ТР В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ НЕВРОГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНОЙ ЭНЦЕФАЛОМИОПАТИИ.....	15
I.4. ТР ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ	17
I.5. СТРУКТУРА ТР	19
I.5.1. Общие сведения	19
I.5.2. Активный центр.....	23
I.5.2.1. Сайт связывания фосфат-аниона	23
I.5.2.2. Сайт связывания нуклеозида.....	25
I.5.3. Химико-кинетические исследования ТР.....	26
I.5.4. Компьютерное моделирование ТР	29
I.6. ИНГИБИТОРЫ ТР	32
I.6.1. Производные тимидина	35
I.6.2. Производные пурина.....	36
I.6.3. Ингибиторы ТР ненуклеозидной природы	37
I.7. ТР ВО ФТОРОПИРИМИДИНОВОЙ ХИМИОТЕРАПИИ	38
I.7.1. 5-фторурацил	38
I.7.2. Пролекарства на основе 5ФУ.....	40
I.8. ВЛИЯНИЕ РYNP В БАКТЕРИЯХ РОДА MYCOPLASMA НА ФТОРПИРИМИДИНОВУЮ ХИМИОТЕРАПИЮ.....	42
ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	45
II.1. ХИМИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ	45
II.2. ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ	45
II.3. ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ БЕЛКОВ	46
II.3.1. Клонирование и экспрессия гена тимидинфосфорилазы <i>deoA</i> из <i>Salmonella typhimurium</i>	46
II.3.2. Клонирование и экспрессия гена РyNP из <i>Bacillus subtilis</i>	48
II.3.3. Клонирование гена уридинфосфорилазы <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	49
II.3.4. Выделение и очистка StТР.....	50
II.3.5. Выделение и очистка VsРyNP	51
II.3.6. Выделение и очистка YptUP	52
II.4. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ	53
II.5. ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НАБОРА ИНТЕНСИВНОСТЕЙ	56
II.6. ОБРАБОТКА РЕНТГЕНОДИФРАКЦИОННЫХ ДАННЫХ	56
II.7. РЕШЕНИЕ И УТОЧНЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР	59

II.8. Молекулярный докинг	62
II.8.1. Виртуальный скриннинг лигандов – специфичных ингибиторов РyNP	63
II.9. Молекулярно-динамическое моделирование	65
II.9.1. Термодинамическое интегрирование.....	67
II.10. Квантово-механическое/молекулярно-механическое моделирование	68
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	70
III.1. Кристаллическая упаковка StTP.....	70
III.2. Пространственная структура StTP	75
III.2. Пространственная структура BsPyNP и ее сравнение с StTP	79
III.3. Влияние междоменных взаимодействий РyNP и TP на их субстратную специфичность.....	82
III.4. Активный центр	84
III.4.1. Фосфат-связывающий сайт	84
III.4.2. Влияние различий пространственной организации фосфатсвязывающего сайта РyNP и TP на их субстратную специфичность.	86
III.4.3. Нуклеозид -связывающий сайт	87
III.5. Молекулярное моделирование потенциальных ингибиторов РyNP.	91
III.6. Буферизирующий сайт связывания тимидина и уридина	93
III.7. Комплекс StTP с цитидином.....	97
III.8. Компьютерное моделирование взаимодействия StTP с аналогами неконкурентного ингибитора TP KIN59	98
III.9. Компьютерное моделирование взаимодействия StTP с ТРИМЕТОПРИМОМ	105
III.10. Пространственная структура уридинфосфоорилазы из YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS.	107
III.10.1. Пространственная организация активного центра YrtUP.....	108
III.11. Компьютерное моделирование взаимодействия YrtUP с ТРИМЕТОПРИМОМ	109
III.12. Комплекс YrtUP с модифицированным ТРИМЕТОПРИМОМ 53I.....	110
ВЫВОДЫ	114
БЛАГОДАРНОСТИ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	119

Список сокращений

6A5BU – 6-амино-5-бромоурацил
6AT – 6-аминотимин
7-DX – 7 - дезаксантин
BsPyNP – пиримидин нуклеозидфосфорилаза из *Bacillus subtilis*
CTN - цитидин
DESY - Deutsches Elektronen-Synchrotron – немецкий электронный синхротрон
EC – enzyme classification; классификация ферментов
EcTP – тимидинфосфорилаза из *Escherichia coli*
EcUP – уридинфосфорилаза из *Escherichia coli*
FDA – Food and Drug Agency - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
GsPyNP – пиримидин нуклеозидфосфорилаза из *Geobacillus stearothermophilus*
hTP – тимидинфосфорилаза человека
KIN59 – 5'-О-триптилинозин
PDB – Protein Data Bank – банк данных белковых структур
PD-ECGF – тромбоцитарный эндотелиальный фактор роста
PMSF – фенилметансульфонил фтора
PyNP – пиримидин нуклеозидфосфорилаза
SaPyNP - пиримидин нуклеозидфосфорилаза из *Staphylococcus aureus*
SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – гель-электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия
StTP – тимидинфосфорилаза из *Salmonella typhimurium*
StUP – уридинфосфорилаза из *Salmonella typhimurium*
ТНМ - тимидин
TLS – translation-libration-screw – трансляция – либрация - поворот
ТОР – триметоприм
TP – тимидинфосфорилаза
TP124 – 1-(5'-О-тримитил-β-D-рибофуранозил)-тимина
TP65 – (9-(8-фосфоноктил)-7-дезаксантин)
TPI – thymidine phosphorylase inhibitor – ингибитор тимидинфосфорилазы
TiPyNP – пиримидин нуклеозидфосфорилаза из *Thermus thermophilus*
UP – уридинфосфорилаза
URI – уридин
XP – extra precision – повышенная точность
YptUP – уридинфосфорилаза из *Yersinia pseudotuberculosis*
2дР1Ф – 2-дезоксирибозо-1-фосфат
5-ФУ – 5- фторурацил
а.о. – аминокислотные остатки
а.ц. – активный центр
ВЭФР - васкулярный эндотелиальный фактор роста
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
дНСС – дополнительный нуклеозид-связывающий сайт

ДПД - дигидропиримидин дегидрогеназа
ИПТГ - изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
КМ/ММ – квантовая механика / молекулярная механика
МАО – опухоль-ассоциированные макрофаги
МД – молекулярная динамика
МНГИЭ - митохондриальная неврогастроинтестинальная энцефалопатия
о/о – объем к объему
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭГ – полиэтилен гликоль
РА – ревматоидный артрит
ЭДТА - динатриевая соль этилендиамина-тетрауксусной кислоты

Введение

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-N гликозидной связи между ароматической и фуранозной составляющей нуклеозида при участии иона фосфата-аниона с образованием свободного основания и фураноза-1'-фосфата. Обратимость этой реакции поддерживает нуклеозидный гомеостаз в тканях организма. По субстратной специфичности нуклеозидфосфорилазы, прежде всего, подразделяются на пиримидин-специфичные и пурин-специфичные. Пиримидин-специфичные нуклеозидфосфорилазы подразделяются на тимидин- и уридин- специфичные нуклеозидфосфорилазы, а также широкоспецифичные пиримидин нуклеозидфосфорилазы (PyNP). 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 катализирует переход тимидина и 2'-дезоксиридина в соответствующие азотистые основания (тимин и урацил) и 2- α -D-дезоксирибозо-1-фосфат (2дР1Ф) (Рис.1). Известно, что ТР также обладает активностью дезоксирибозилтрансферазы, т.е. способствует переходу дезоксирибозильной части от одного пиримидинового нуклеозида к другому

[2]. TP присутствует в клетках всех эукариот, за исключением некоторых видов простейших и рыб, и большинства прокариот [3]. У бактерий класса бацилл (*Bacilli*) вместо TP присутствует широко-специфичная пиримидин нуклеозидфосфорилаза (PuNP), с равной каталитической активностью способствующая расщеплению как тимидина, так и уридина и его аналогов.

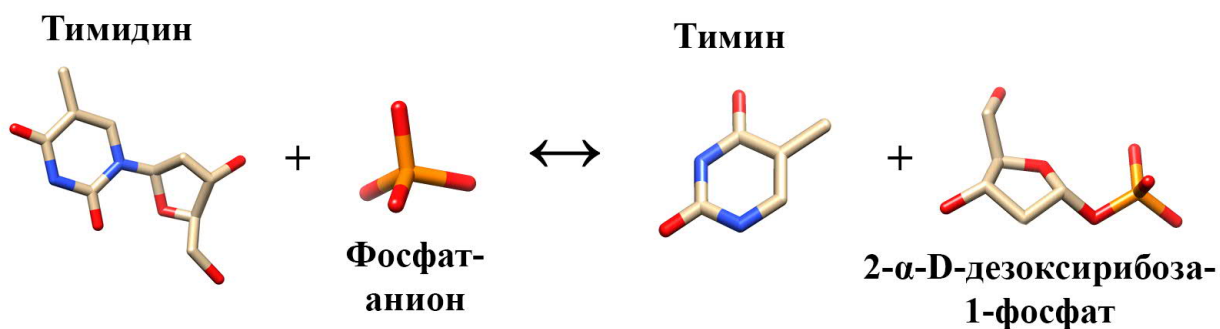


Рисунок 1. Реакция фосфоролиза тимидина, катализируемая тимидинфосфорилазой.

В начале 90-х годов XX века обнаружено, что TP характеризуется ангиогенезной активностью. Первичная структура тромбоцитарного эндотелиального фактора роста (PD-ECGF), считавшегося до этого момента отдельным белком, оказалась идентична первичной структуре TP человека [4]. TP также является и глиостатином, ингибирующим рост глиальных клеток и обеспечивающим таким образом пролиферацию нервной ткани [5].

Высокое содержание TP обнаружено во многих раковых клетках, что предполагает использование ее в качестве активатора противоопухолевых препаратов [6-8]. Разработка таких соединений в качестве химиотерапевтических агентов актуальна и сейчас, а TP является одним из ключевых ферментов их активации и регуляции их концентрации и активности [9-12]. Разрабатывались и ингибиторы TP, носящие антиангиогенный характер или же препятствующие расщеплению противоопухолевых препаратов тимидинфосфорилазой [13-16]. Лишь одно соединение – ингибитор TP (Tpirasil 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 ТР и структурных особенностей ее специфичности к различным нуклеозидам и их производным.

У бактерий класса бацилл (*Bacilli*) вместо ТР присутствует широко-специфичная пиримидин нуклеозидфосфорилаза, 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 фармакинетике фторпиримидинов. Это объясняется активностью фермента PyNP в этих бактериях, распознающего, например, 5-фтор-2'-дезоксиуридин, 5-трифтортимидин, 5-фтор-5'-дезоксиуридин [17, 18]. Препятствование PyNP из *M. hyorhinis* фторпиримидиновой терапии обуславливает необходимость разработки ингибиторов специфичных к PyNP, но неспособных связаться с ТР. Такая разработка в свою очередь предполагает знание различий в пространственной организации ТР 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 необходимо решить следующие задачи:

- определение пространственных структур ТР 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 *StTP* в закрытую/открытую конформацию и поиск дополнительных сайтов связывания *StTP*
- разработка потенциальных ингибиторов пириимидинфосфорилаз методами компьютерного моделирования

Научная новизна

- 1) Впервые выращены кристаллы тимидинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* в нелигандированном состоянии, в комплексах с сульфат-анионом, с тимидином, уридином, цитидином; кристаллы пириимидинфосфорилазы из *Bacillus subtilis* с сульфат-анионом; кристаллы уридинфосфорилазы из *Yersinia pseudotuberculosis*.
- 2) Впервые определена пространственная структура этих комплексов. Выявлено, что наличие 2'-гидроксильной группы уридина приводит к связыванию его с подвижной петлей из аминокислотных остатков (а.о.) 115-125 в *StTP*, препятствуя фосфолизу.
- 3) Выявлено, что в *BsPyNP* в связывании фосфат-аниона принимает участие остаток Lys108, которому в тимидинфосфорилазе соответствует Met111. Различие в окружении фосфат-аниона выражается в меньшем частичном заряде одного из кислородных атомов фосфат-аниона в TP в сравнении с PyNP и 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 дНСС2 может являться сайтом неконкурентного ингибирования (посредством ингибитора KIN59 (5'-О-триптинозин)).
- 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) Проведен виртуальный скрининг потенциального ингибитора (противоопухолевого препарата) широко специфичной пиримидинфосфорилазы, не связывающегося с тимидинфосфорилазой. Найденное соединение, 2-пиримидин-2-ил-1H-имидазол-4-карбоновая кислота, по данным молекулярной динамики устойчиво связывается с активным центром пиримидинфосфорилазы.

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 NP-II семейства.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Пространственные структуры *StTP* в нелигандированном состоянии, в комплексе с ионом сульфата, с тимидином, уридином и цитидином; структура *VsPuNP* в комплексе с ионом сульфата; структура *YptUP* в комплексе с ионом сульфата по результатам рентгеноструктурного анализа
- 2) Структурные особенности сайта связывания *StTP*, препятствующие фосфоролизу уридина

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

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

Глава I. Литературный обзор

I.1. Роль тимидинфосфорилазы в организме человека

Тимидинфосфорилаза (ЕС 2.4.2.4.) впервые выделена в 1987 г. из тромбоцитов человека [19]. ТР стимулирует рост эндотелиальных клеток, т.к. в [20] показано, что увеличение её концентрации приводило к увеличению потребления тимидина эндотелиальными клетками. Учитывая это, первоначально ТР назван тромбоцитарным эндотелиальным фактором роста. В [21] отмечалось, что PD-ECGF усиливает миграцию эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo*. Несколькими годами позже обнаружено, что PD-ECGF обладает тимидинфосфорилазной активностью [22, 23]. Более того аминокислотные последовательности PD-ECGF и ТР идентичны [24]. Это привело к заключению, что наблюдаемое увеличение в потреблении тимидина вызвано тимидинфосфорилазной активностью PD-ECGF. Таким образом, доказано, что ТР или PD-ECGF не является гуморальным фактором роста, как изначально предполагалось, хотя и обладает ангиогенезной активностью.

Кроме того, ТР является глиостатином [25]. В 1992, глиостатин выделен как отдельный белок из нейрофибромы человека [26]. Показано, что этот белок замедляет рост астроцитов и опухолевых клеток из нейроглии. Глиостатин обеспечивает рост аксонов кортикальных нейронов головного мозга [27]. В [27] показано, что ТР, PD-ECGF и глиостатин являются одним и тем же белком.

ТР можно обнаружить во многих здоровых тканях и клетках человека, при этом содержание этого белка велико относительно среднего уровня в быстро делящихся клетках. Это макрофаги, клетки стромы, глиальные клетки, ретикулоциты. Содержание ТР превышает среднее значение в клетках эпителия пищевода и прямой кишки, слюнных железах, головном мозге, мочевом пузыре, селезенке, лимфе и легких [9, 28, 29]. ТР присутствует как в цитоплазме клеток, так и в их ядре [9]. Тромбоциты являются одним из богатейших источников ТР, что указывает на то, что фермент принимает участие в заживлении ран.

Высокая активность TR также отмечается в плазме и сыворотке крови, где ее присутствие чаще всего вызвано повреждением клеток крови или онкологическим заболеванием [30].

Показано, что TR играет важную роль в репродуктивных процессах у женщин [31, 32]. Огромные количества TR обнаружены в плаценте [21] и в эндометрии, обширный ангиогенез которого происходит в каждый менструальный цикл [33]. Во время первого триместра беременности, высокие концентрации TR и васкулярного эндотелиального фактора роста (ВЭФР) обнаруживаются в трофобласте, что говорит о том, что оба белка принимают активное участие в физиологических процессах беременности [19].

Повышенное содержание TR в некоторых тканях может быть базисом для активации этим ферментов пролекарств в необходимых для соответствующей терапии клетках.

1.2. Роль TR в воспалительных процессах

Изменение содержания TR в клетке наблюдается при широком круге хронических инфекционных и воспалительных заболеваний (Таблица 1). Это можно объяснить тем, что:

- 1) Клетки, ответственные за воспалительные процессы, как, например, макрофаги содержат много TR
- 2) Цитокины, ответственные за воспалительные процессы (такие как интерлейкин-1 и фактор некроза опухолей α), усиливают экспрессию TR.

Таблица 1. Регистрируемые взаимосвязи оверэкспрессии TR и различных заболеваний.

Тип патологии	Локализация	Ссылки на литературные источники
Воспалительные заболевания	Ревматоидный артрит	[34-37]
	Атеросклероз	[38]
	Псориаз	[39, 40]
	Энтериты и колиты	[41, 42]

	Хронический гломерулонефрит	[43]
Генетические заболевания	Митохондриальная неврогастроинтестинальная энцефаломиопатия	[44-47]
Онкологические заболевания	Молочной железы	[23, 48, 49]
	Мочевого пузыря	[50, 51]
	Желудка	[52-56]
	Прямой кишки	[21, 22, 57, 58]
	Легких	[59, 60]
	Пищевода	[61, 62]
	Шейки матки	[63]
	Печени	[4, 64]
	Желчных протоков	[64]
Щитовидной железы	[64]	

В [35, 37] показано, что содержание ТР увеличивается при псориазе и может достигать 20-кратного увеличения [40].

При колитах увеличивается экспрессия ТР, особенно в макрофагах и фибробластах воспаленной слизистой толстой кишки, и увеличение экспрессии совпадает с прогрессированием воспаления [36, 65]. Кроме того, активность ТР выше среднего обнаруживается в клетках эндотелия воспаленной слизистой толстой кишки [41, 42].

В [66] отмечается увеличение содержания ТР в клетках почки при хроническом гломерулонефрите, что приводит к прогрессированию интерстициального фиброза и ухудшению клинического состояния больного. Также, ТР усиленно экспрессируется при атеросклерозе [67] в макрофагах, пенистых и гигантских клетках атеросклеротических бляшек аорты и коронарных артерий. Это, по мнению авторов [38], указывает на роль ТР в патогенезе атеросклероза.

ТР принимает участие также и в патогенезе ревматоидного артрита (РА) [46, 68, 69], поскольку патологически высокое содержание ТР по сравнению с пациентами с остеоартритом или здоровыми индивидами обнаруживалось в синовиальной жидкости пораженных суставов и сыворотке крови пациентов с

РА. ТР сыворотки крови, таким образом, является полезным маркером РА. При внутрисуставной инъекции рекомбинантной ТР в коленный сустав кролика усиливаются симптомы ревматоидного артрита [70]. Интересно отметить, что этот эффект можно было вызвать при инъекции нативной ТР и ее мутанта (K115E), не обладающего энзиматической активностью, что говорит о том, что не энзиматическая активность ТР участвует в патологии РА [65]. Дальнейшие исследования позволили выявить, что присутствие ТР увеличивает собственную экспрессию посредством аутокринного механизма в фибробластоподобных синовиоцитах [45]. Кроме того, ТР усиливает внеклеточную секрецию матричной металлопротеиназы-1 и матричной металлопротеиназы-3, являющихся основными пусковыми факторами процесса дегенерации хрящей [36, 71], и регулирует как концентрацию ВЭФР, так и мРНК. Авторы [72] предполагают, что оба фактора имеют синергетические эффекты на ангиогенез при РА.

ТР, таким образом, может являться маркером некоторых воспалительных заболеваний. Более того, способность ингибировать этот фермент в клетках, участвующих в воспалительном процессе, необходима для успешной регуляции иммунного ответа, что особенно важно при аутоиммунных заболеваниях (в частности, при ревматоидном артрите).

1.3. Участие ТР в митохондриальной неврогастроинтестинальной энцефаломии

Митохондриальная неврогастроинтестинальная энцефаломия (МНГИЭ) является аутосомно-рецессивным заболеванием, заключающимся в появлении многочисленных делеций в ДНК митохондрий клеток скелетных мышц [46]. Это заболевание характеризуется в клинике прогрессирующей внешней офтальмоплегией, нарушением моторики желудочно-кишечного тракта, худощавостью, периферической невропатией, миопатией, лейкоэнцефалопатией и молочно-кислым ацидозом.

Возможной причиной этого заболевания являются мутации гена TP приводящие к потере этим ферментом активности [68, 69]. Известно, что при МНГИЭ сильно ослабленная активность фермента TP приводит к увеличению концентрации тимидина и 2-дезоксимуридина в плазме крови и в мышечной ткани [35, 45, 70]. Это ведет к дисбалансу концентраций нуклеозидов и нуклеотидов в митохондриях, что приводит к нарушению механизмов репликации и репарации митохондриальной ДНК. Таким образом, перспективной является терапия, направленная на увеличение содержания TP у пациентов с МНГИЭ [35]. Роль TP при МНГИЭ пытались выяснить в [71]. Для этого авторы выращивали мышей, нокаутированных по генам TP и уридинфосфорилазы (UP), так как UP также может расщеплять тимидин. У этих мышей, полностью отсутствовала тимидинфосфорилазная активность, что привело к 5-кратному увеличению концентрации тимидина в плазме по сравнению с диким типом. Важно отметить, что никаких замен в митохондриальной ДНК или патологических изменений в мускулах этой мышцы не наблюдалось [66, 72]. Лишь в мозгу можно было обнаружить патологические изменения: истощение митохондриальной ДНК, дефицит дыхательной цепи митохондрий, и гистологические нарушения [66]. Факт наличия патологии у мышцы лишь в мозге может быть связан с относительно слабым увеличением концентрации тимидина или 2-дезоксимуридина у мутантной мышцы при МНГИЭ. Так у человека, например, концентрация тимидина при МНГИЭ возрастает в 100 раз, а не в 5, как в этом эксперименте. Другим возможным объяснением авторы [47] считают короткий жизненный цикл мышцы по сравнению с человеком, т.к. у людей средний период проявления симптомов МНГИЭ равен 18,7 годам.

Однако, в других исследованиях показано, что функциональные мутации гена TP слабо усиливают проявления МНГИЭ [44, 73]. Например, Kumagai с соавт. постулируют, что мутации гена TP не является первичной причиной

митохондриального заболевания, т.к. мутации TP встречаются и у здоровых индивидов [68].

1.4. TP при онкологических заболеваниях

Увеличение экспрессии TP в раковых тканях в сравнении со здоровой тканью обнаружено при онкологических заболеваниях молочной железы [49], мочевого пузыря [50, 51], желудка [10, 52, 56], легких [59, 64], пищевода [44, 61], шейки матки [44, 74], толстой кишке [10, 44] и отсутствовало в печени, основных желчных протоках и щитовидной железе [44].

Экспрессия TP повышается в лимфатических узлах у пациентов с классической лимфомой Ходжкина, при которой концентрация TP увеличивается по ходу прогрессирования заболевания [75]. Недавно обнаружено, что опухолево-реактивные T-лимфоциты, у пациента с рецидивирующей множественной миеломой, действуют напрямую против клеток, экспрессирующих TP [76]. Эти данные указывают на то, что TP потенциально может являться мишенью при иммунотерапии гематологических опухолей.

В многочисленных исследованиях пациентов с онкологическими заболеваниями изучалась взаимосвязь экспрессии TP со степенью развития опухоли, стадией онкологического заболевания, плотностью микрососудов, наличием и количеством метастазов, прогнозом течения болезни. Для измерения показателей экспрессии и активности TP использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией, иммуногистохимический анализ и анализ активности фермента [23, 45, 47, 49, 71, 72]. В общем случае, экспрессия TP коррелирует с повышением плотности микрососудов внутри опухоли, стадией опухоли и более выраженным образованием метастазов (Таблица 2). В большинстве исследований, повышение экспрессии TP ассоциируется с плохим прогнозом течения заболевания, хотя для некоторых раковых заболеваний результаты варьируются.

Тем не менее, нужно понимать, что опухоли представляют собой гетерогенные ткани, состоящие из композиций опухолевых, стромальных и инфильтрационных клеток, соотношение которых в каждом случае может различаться. Помимо опухолевых клеток, еще и эндотелиальные клетки, фибробласты, лимфоциты и, в особенности, опухоль-ассоциированные макрофаги (МАО) экспрессируют TR [60]. Считается, что МАО играют ключевую роль в стимуляции роста опухоли и образовании метастазов посредством продуцирования различных факторов роста, протеиназ, хемокинов и цитокинов [77]. Многие авторы отмечали патологически высокое содержание TR в МАО меланом [78], рака желудка [53, 54], глиобластомы [79], груди [48, 80], толстой кишки [57, 58], астроцитов [81], эндометрия матки [82], и простаты [83]. При аденокарциноме желудка [60], онкологии астроцитов [57], груди [54] и эндометрия матки [58] степень экспрессии TR в макрофагах коррелирует с плотностью микрососудов и, скорее всего, играет важную роль в инвазивности опухоли, т.е. в способности опухоли прорасти в соседние здоровые ткани.

У пациентов с онкологическими заболеваниями повышенное содержание TR обнаруживаются не только в опухолевой ткани, но также и в плазме крови [84, 85]. Уже в 1977 году, Pauly с соавт. продемонстрировали, что у онкобольных активность TR в плазме крови в 2 раза выше, чем у здоровых людей [86]. В другой его работе также отмечалось, что у больных онкологической патологией экспериментальных животных содержание TR в асцитных жидкостях и плазме крови повышено (для некоторых видов опухоли повышение в 15 раз), по сравнению со здоровыми животными [87].

Последние данные указывают на то, что концентрация TR в плазме у пациентов с раком имеют прогностическое значение. При раке шейки матки повышенное содержание TR в сыворотке крови коррелируют с клинической стадией, размером опухоли, образованием метастазов в лимфоузлах и крайне плохим прогнозом [88]. Высокое содержание TR в крови также ассоциированы

со степенью инвазивности опухоли и заведомо плохой реакцией на лечение у пациентов с карциномой стенки пищевода [89].

Использование тесной связи ТР и некоторых видов опухоли, таким образом, возможно в трех направлениях:

- 1) ТР в качестве маркера наличия опухоли, ангиогенеза в ней и появление метастазов;
- 2) ТР в качестве локального активатора противоопухолевых препаратов;
- 3) ТР в качестве белка-мишени при терапии, направленной на прекращение ангиогенеза опухоли.

Таблица 2. Регистрируемые взаимосвязи содержания ТР в клетке и параметрами онкологических заболеваний [90].

	Число работ указывающих на положительную корреляцию содержания ТР в клетках опухоли с:				
Локализация опухоли	Плотностью микрососудов	Стадией развития опухоли	Степенью развития опухоли	Числом метастазов	Плохим прогнозом
Мочевого пузыря	-	8	10	-	5
Грудь	6	1	2	-	3
Шейка матки	6	3	3	7	4
Толстый кишечник	7	4	-	3	7
Эндо метрий	7	3	1	-	2
Пищевод	5	3	-	4	4
Желудок	13	4	3	7	9
Легкие	3	2	-	-	2

1.5. Структура ТР

1.5.1. Общие сведения

В середине 1970-х годов ТР выделена и очищена как из *Echerichia coli* (*EcTR*) [91], так и из *Salmonella typhimurium* [92]. Несколькими годами позже выделена ТР человека из клеток амниохориона [93]. Оказалось, что аминокислотная последовательность ТР оставалась высоко консервативной в ходе эволюции. ТР человека (*hTR*) на 39% идентична по последовательности с ТР *E.coli* [94].

ТР функционирует, как гомодимер состоящий из двух идентичных субъединиц (Рис.2), при этом молекулярная масса димера варьируется от 90 кДа в *E.coli* до 110 кДа у млекопитающих [95, 96]. Структурная информация по ТР впервые дана в 1990 Walter с коллегами [97], которые решили кристаллическую структуру ТР *E.coli* (PDB ID: 1TPT, 2,80 Å). Некоторые параметры этой структуры и других структур ТР, присутствующих в международном банке данных белковых структур (PDB), приведены в таблице 3. При анализе авторы [97] выявили, что каждая субъединица содержит большой смешанный домен, содержащий α -спиральные фрагменты и β -тяжи (α/β домен), отделенный от меньшего α -спирального домена (α -домена) большим каньоном. Активный центр (а.ц.) состоит из тимидин-связывающего сайта на поверхности α -домена и фосфат-связывающего сайта в α/β домене.

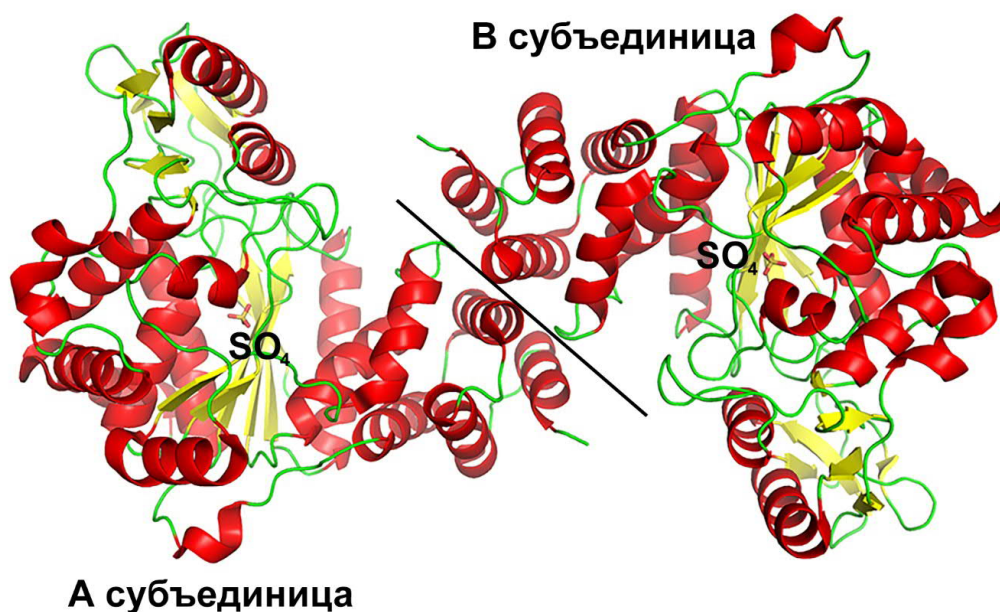


Рисунок 2. Гомодимер тимидинфосфорилазы из *Escherichia coli* (PDB код 4EAF).

Множество попыток получить хорошо диффрагирующие кристаллы hTP не увенчались успехом. Spraggon с соавт. писали о кристаллах ТР человека диффрагирующих лишь до 3,5 Å, несмотря на использование синхротрона в качестве источника рентгеновского излучения [98]. Наконец, в 2004 году, Norman с соавт. успешно решили структуру с разрешением 2,1 Å (PDB ID:

1UOU) в комплексе с TPI (Thymidine Phosphorylase Inhibitor, см. ниже) [99]. Тем не менее, при выделении и очистке фермента использовался протеолиз с трипсином, приводивший к тому, что в структуре отсутствовали а.о. 409 и 410, а петля, формируемая а.о. 405-416, была разупорядочена. На независимую часть элементарной ячейки приходился димер TP, в котором каждый мономер пребывал в активной закрытой конформации доменов, а TPI занимал сайт связывания тимидина. Эта работа впервые дала информацию о связывании ингибитора в активном центре пиримидин нуклеозидфосфорилаз, и, в частности, TP.

В 2006 году El Omari с соавт. попытались определить структуру непротеолизированной человеческой TP при 2,3 Å (PDB ID: 2J0F) с помощью ингибитора KIN59 [100], внедрение которого способствовало получению качественных диффрактирующих кристаллов, хотя на карте электронной плотности его локализовать не удалось. На независимую часть элементарной ячейки приходилось два димера TP, в каждом из которых присутствовали одинаковые межсубъединичные контакты, которые наблюдались и в предыдущей структуре. Кроме этого удалось полностью локализовать положение а.о. петли 405-416.

В 1998 Pugmire с соавт. исследовали пространственную структуру гомолога TP - широкоспецифичной пиримидин нуклеозидфосфорилазы из *Geobacillus stearothermophilus*, одна из субъединиц которой находится в полностью закрытой конформации.

Таблица 3. Структуры ТР в международном банке данных белковых структур PDB.

Источник	Лиганд	Разрешение, Å	ПГ	R _{factor}	СКО связей, Å	СКО углов, град	PDB код
Escherichia coli	TDR+SO ₄	2,8	P4 ₃ 2 ₁ 2	0,28	0,011	1,5	1TPT
Escherichia coli	-	2,8	I222	0,25	0,007	1,2	1OTP
Escherichia coli	-	3,0	P12 ₁ 1	0,28	0,009	1,4	1AZY
Escherichia coli	SO ₄	2,6	P4 ₃ 2 ₁ 2	0,25	0,007	1,2	2TPT
Homo sapiens	TPI	2,1	C121	0,26	-	-	1UOU
Homo sapiens	TDR	2,3	P12 ₁ 1	0,29	0,009	1,2	2J0F
Homo sapiens	GOL	3,0	P12 ₁ 1	0,29	0,007	1,4	2WK5
Homo sapiens	5IU	2,5	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	0,28	0,007	1,3	2WK6
Escherichia coli	ONP+SO ₄ +GOL	1,5	P4 ₃ 2 ₁ 2	0,19	0,008	1,4	4EAD
Escherichia coli	SO ₄ +GOL	1,6	P4 ₃ 2 ₁ 2	0,21	0,006	1,1	4EAF
Escherichia coli	AZZ+SO ₄ +GOL	1,5	P4 ₃ 2 ₁ 2	0,20	0,008	1,3	4LHM

TDR – тимин, SO₄ – сульфат-анион, GOL – глицерол, 5IU – 5-йодурацил, ONP - 3'-азидо-2'-фтор-дидезоксиуридин, AZZ - 3'-азидо-3'-дезокситимидин

1.5.2. Активный центр

Несмотря на то, что все классы нуклеозидфосфорилаз связывают фосфат-анион и нуклеозид и осуществляют фосфорилизную реакцию, способ связывания субстрата этими ферментами сильно различается, что может помочь объяснить различия в их субстратной специфичности.

1.5.2.1. Сайт связывания фосфат-аниона

К настоящему моменту в RCSB PDB отсутствуют координаты структур TP с ионом фосфата, в результате чего организация фосфат-связывающего сайта описывалась на основании нескольких структур с его аналогом - ионом сульфата: PDB ID 1TPT, 2TPT, 4EAF.

Walter с соавт. впервые описали пространственную структуру *Ec*TP с сульфат-анионом (PDB код 1TPT) [97]. Они отмечали, что сульфат-анион располагался на С-конце центрального β -листа между S1 и S2 β -тяжами. Сульфат-анион расположен вблизи середины этой петли на конце β -тяжа S1, формируемой аминокислотными остатками 87-91 (Thr-Gly-Gly-Val-Gly), за которой следует α -спираль H5 (а.о. 95-105). Небольшой туннель диаметром 6 Å соединяет сульфат-связывающий карман с «каньоном» между доменами. Авторы утверждали, что при определении поверхности доступной для растворителя в субъединице TP, выявлено, что вода и сам сульфат-анион могут проникать в фосфат-связывающий сайт лишь через этот туннель

В публикации 1998 года Pugmire с соавт. предположили, что ион фосфата (сульфата) оказывает влияние на междоменные взаимодействия за счет стабилизации петли из а.о. 115-120, приводя к переходу субъединицы в частично закрытую конформацию [101]. Стабилизация и междоменные взаимодействия по мнению авторов происходят благодаря водородной связи His119– Gly208 (рис.3). El Omari с соавт. тем не менее оспаривают этот факт. В их работе четыре субъединицы, занимают закрытую конформацию, при том, что во всех отсутствует фосфат-анион или сульфат-анион [102]. Водородная

связь His119-Gly208 присутствует лишь в двух из четырех субъединиц. Опровергают необходимость этой водородной связи для катализа и Mitsiki с соавторами, которые наблюдали обе субъединицы димера hTP в закрытой конформации, при этом лишь в одной из них эта связь присутствовала [103].

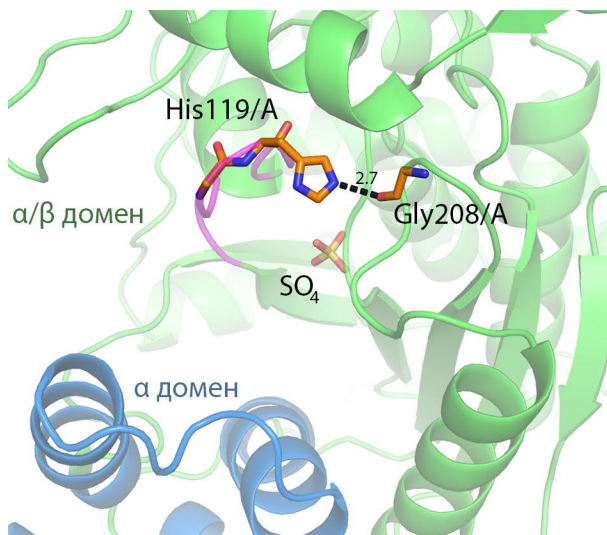


Рисунок 3. Водородная связь His119-Gly208, приводящая к стабилизации петли из а.о. 115-125 (показана фиолетовым) и к сближению доменов (α-домен окрашен синим, α/β – домен зеленым).

В 1998 Pugmire с соавт. исследовали пространственную структуру гомолога TP - широкоспецифичной пиримидин нуклеозидфосфорилазы из *Bacillus steraothermophilus*, одна из субъединиц которой находится в полностью закрытой конформации [104]. Это первая и единственная структура нуклеозидфосфорилаз NP-II семейства с фосфат-анионом. Авторы отметили, что в PyNP с фосфат-анионом взаимодействует Lys108, которому по первичной структуре в TP соответствует Met111. Эта особенность, по их мнению, влияет на положение фосфат-аниона и отвечает за различную специфичность этих ферментов к 2'-гидроксильной группе нуклеозида. В остальном связывание фосфат-аниона в активном центре PyNP соответствовало связыванию иона сульфата в TP.

Pugmire с соавт. также предположили участие а.о. фосфат-связывающего сайта в прохождении реакции: 1) положительно заряженные а.о. Lys ориентируют фосфат-анион, 2) His85 регулирует степень нуклеофильности фосфат-аниона, 3) отрицательно заряженные а.о. Thr, Ser играют роль доноров

электронной пары и могут, таким образом усиливать нуклеофильные свойства фосфата.

I.5.2.2. Сайт связывания нуклеозида

В первом структурном исследовании *EcTP* Walter с соавт. описывают три комплекса с лигандами: тиминном, тимидином и 5-йодурацилом [97]. Однако лишь одна из перечисленных структур (с тиминном, разрешение 2,8 Å) была депонирована в PDB и содержала лишь C_α атомы. Авторам удалось локализовать все три лиганда, которые располагались вблизи спиралей H8 и H9. А.о. взаимодействующие с тиминном Arg171, Ser186 и Lys190, расположенные на этих двух α-спиралях. C5 атом пиримидинового кольца лигандов при этом располагался в направлении гидрофобного кармана, образуемого петлями из а.о. 115-123 и 206-212. Атомы C2 и N3 пиримидиновой группы расположены в направлении α-спиралей 8 и 9. Авторы отмечают, что положение 5-йодурацила отличается от положения тимина смещением координат атомов на ~1 Å, в направлении от описываемого гидрофобного кармана.

Интересно отметить, что авторами обнаружены дополнительные сайты связывания. 5-йодурацил локализован между петлями, образованными а.о. 66-79 и 155-162. В структуре комплекса TP *E. coli* (*EcTP*) с тиминном лиганд в этом месте отсутствовал, но локализован на промежуточных этапах уточнения вблизи а.о. 263-268, хотя в дальнейшем в этой области не уточнялся [97].

Следующей структурой нуклеозидфосфорилазы из NP-II семейства, решенной и уточненной с нуклеозидом или азотистым основанием была пространственная структура PyNP из *Geobacillus stearothermophilus* [104]. В результате анализа этого комплекса определено, что в связывании нуклеозида принимает участие и Tyr165 (Tyr168 в *EcTP*) посредством стекинг - взаимодействия с ароматическим кольцом лиганда. Nogman с соавт. описывали похожее взаимодействие с лигандом в комплексе hTP с ингибитором TP1 [99]. Интересно отметить, что N1 атом, не формирующий в TP1 гликозидной связи,

находился на расстоянии водородной связи от NH атома His116 (His85 в *EcTP*) (рис.4), что подтвердилось в исследовании Mitsiki с соавт. при анализе комплекса hTP с 5-йодурацилом [103]. El Omari с соавт. провели последующее структурное исследование hTP в комплексе с тимидином [102], хотя на картах электронной плотности им удалось локализовать лишь пиримидиновую компоненту лиганда - тимин. В их исследовании тимин также взаимодействовал с His85 (His116 в hTP).

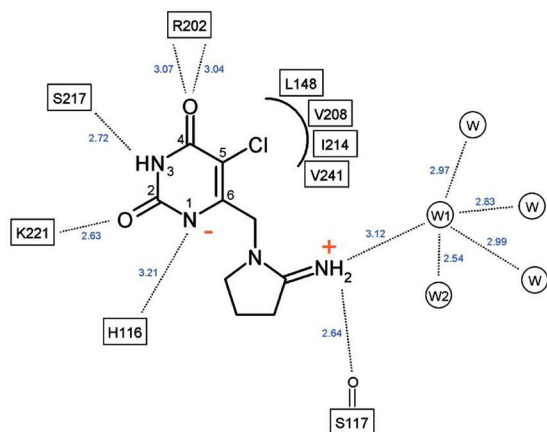


Рисунок 4. Связывание ингибитора TP1 в активном центре hTP. [99]

1.5.3. Химико-кинетические исследования TP

TP катализирует фосфоролитическое расщепление тимидина в широком диапазоне значений pH. Панова с соавт. анализировали зависимость константы Михаэлиса (K_m) и скорости реакции фосфоролитического расщепления тимидина, катализируемой TP от pH [105]. Авторы отмечают максимум при значении 6,5 с перегибами в 6,1 и 6,8. При повышении pH от 7,0 до 8,5 K_m меняется незначительно. Появление перегиба авторы связывают с участием ионизированной группы His85 активного центра в образовании водородной связи, что дает основание предполагать, что His85 может принимать непосредственное участие в связывании молекулы тимидина. Также авторы [105] провели широкий химико-кинетический анализ по исследованию специфичности TP *E.coli* к различным аналогам пиримидиновых нуклеозидов (Таблица 4).

Таблица 4. Кинетические параметры для ферментативного фосфоролита ТР тимидина и его производных, измеренные спектрофотометрически (50 мМ калий-фосфатный буфер, рН 6,5, температура 25°C. Значения K_p измерены в 50 мМ Трис-буфере, рН 8,2, температура 4°C, соотношение нуклеозид:фосфат 1:10) [105]

Субстрат	K_p ($1/K_p$)	K_m (K_i), мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ с ⁻¹
тимидин	0,07 (14,3)	300	198	0,66
2'-дезоксисуридин	0,04 (25)	320	35	0,18
4-тиотимидин	0,07(14,3)	280	63	0,25
5'-дезокситимидин	0,05 (20)	400	260	0,64
5'-хлор-5'-дезокситимидин	0,07 (14,3)	300	1,7	0,006
5'-бром-5'-дезокситимидин	-	(400)	-	-
5'-йод-5'-дезокситимидин	-	400	-	-
5'-азидо-5'-дезокситимидин	-	-	-	-
5'-С-метил (D-алло)тимидин	0,14(7,0)	330	0,1	0,0003
5'-С-метил (D-тало)тимидин	0,1 (10)	350	0,45	0,0013
5'-гомотимидин	0,068 (14,6)	300	0,06	0,0018
3'-дезокситимидин	-	(850)	-	-
3'-амино-3'-дезокситимидин (при рН)	-	(600)	-	-
3'-амино-3'-дезокситимидин (при рН)	-	400	1,1	0,0027
2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидин	-	350	0,4	0,0011
уридин	-	(60)	-	-
β -D-арабинофуранозилурацил	-	(1000)	-	-
5-метуридин	-	(100)	-	-
2-тиоуридин	-	(800)	-	-

В первую очередь авторы подтвердили, что ТР является наиболее специфичным ферментом из пиримидиновых нуклеозидфосфорилаз, т.к. катализирует лишь фосфоролиз тимидина и 2'-дезоксинуридина и не катализирует фосфоролиз других природных нуклеозидов: уридина, цитидина, аденозина, инозина, ксантозина и гуанозина. Уридин же способен ингибировать ТР. 4-Тиотимидин и 2'-дезоксинуридин являлись хорошими субстратами ТР.

Замена гидроксильной группы в 5'-положении углеводной компоненты субстрата на объемный заместитель не препятствовала связыванию нуклеозида с ТР, также, как и ее отсутствие (Таблица 4). Авторами [105] однако отмечалось снижение скорости реакции при увеличении Ван-дер-Ваальсова радиуса заместителя в этом положении. Так, 5'-бром-5'-дезокситимидин связывался с ферментом, но не подвергался фосфоролизу, а связывание 5'-азидо-5'-дезокситимидина практически не регистрировалось. При введении в 5'-положение тимидина метильной группы или дополнительного метиленового звена наблюдался аналогичный эффект: константа связывания оставалась без изменений, а скорость фосфоролиза существенно уменьшалась. Замена 5'-гидроксильной на аминогруппу не приводила к изменению афинности лиганда по сравнению с тимидином.

Ключевой для прохождения реакции оказалась гидроксильная группа в 3' положении нуклеозида. Отсутствие этой группы или изменение ее конфигурации приводило к невозможности реакции, однако авторы отмечают, что при этом K_m соответствующих соединений близка к K_m тимидина.

Miyadera с соавт. [106] и затем Mitsiki с соавт. [103] провели работы по точечному мутагенезу hTP. По данным их исследований замена Arg202 (Arg171 в EcTP) на Glu, которая меняет, таким образом, заряд этого а.о. на отрицательный, приводит к потере активности ТР (активный центр hTP приведен на рис. 5). Замена Ser117 (Ser86 в EcTP) на Gly также приводит к потере ферментативных свойств. По мнению Mitsiki с соавт., замена этих а.о. прежде всего приводит к неспособности фермента связывать субстрат [103].

Замена Ile214 (Ile183 в *EcTP*) на Ala, приводит к уменьшению активности TP в 1,5 раза. Это указывает на важность гидрофобных взаимодействий TP с тимидином в области метильной группы в 5-ом положении.

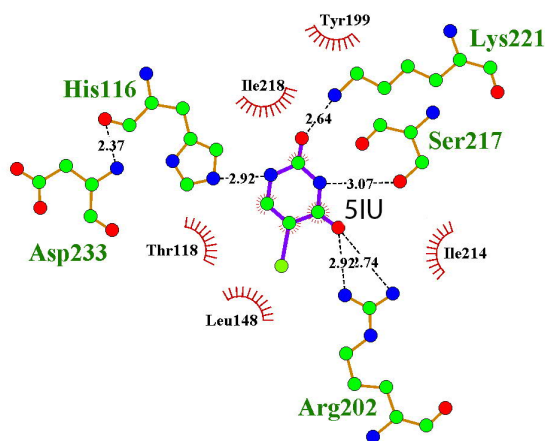


Рисунок 5. Активный центр комплекса hTP с 5-йодурацилом (5IU).

1.5.4. Компьютерное моделирование TP

Исследования пространственной структуры TP с самого начала указывали на необходимость закрытия субъединицы TP для осуществления фосфорилиза. Pugmire с соавт. [101] и Rick с соавт. [107] описывали компьютерные эксперименты, целью которых являлось моделирование закрытой конформации субъединицы TP *E.coli*. Для достижения этой цели Pugmire с соавт. использовали «жесткие» ограничения на расстояния между донором и акцептором (от 1,9 до 2,5 Å) и на взаимное расположение тимидина и сульфата.

Rick с соавт. описывают попытку получить исследовать структуру *EcTP* в закрытой конформации с использованием классической молекулярной динамики без каких-либо ограничений. Тем не менее, при траектории длиной 200 пс фермент не принял закрытой конформации [107]. В результате для получения закрытой конформации Rick с соавт. осуществляли расчет методом классической молекулярной динамики при фиксации каждого домена по отдельности. Каждые 0,5 пс авторы проводили суперпозицию обеих структур, в

итоге получая одну структуру из двух доменов, полученных при двух параллельных расчетах.

Решение, таким образом, было найдено в обоих экспериментах. Однако, молекулярная динамика при этом проводилась с использованием дополнительных ограничений. Решение, найденное таким образом, может соответствовать локальному минимуму в реальности недостижимому при ненулевой температуре в физиологических условиях.

В своей работе Rick с соавт. представили также результаты квантовых расчетов реакции фосфоролиза тимидина [107]. По мнению авторов расщепление тимидина проходит в два этапа (рис.6). На первом этапе происходит нуклеофильная атака фосфат-аниона на C1' атом тимидина, а на втором происходит фосфорилирование рибозного кольца. Кроме того, авторы предполагают роль Arg171, Lys190 и His85 в катализе. Arg171 является донором водородной связи стабилизирующей отрицательный заряд тимина, после расщепления гликозидной связи. Атом водорода амино-группы Lys190 переходит к His85, благодаря чему His85 формирует водородную связь с фосфат-анионом. Один из водородов также переходит от Lys190 к фосфат-аниону. Кроме того, авторы утверждают, что сеть водородных связей между O2 атомом тимидина, Lys190, His85 и фосфат-анионом поддерживает взаимное расположение субстратов необходимое для катализа.

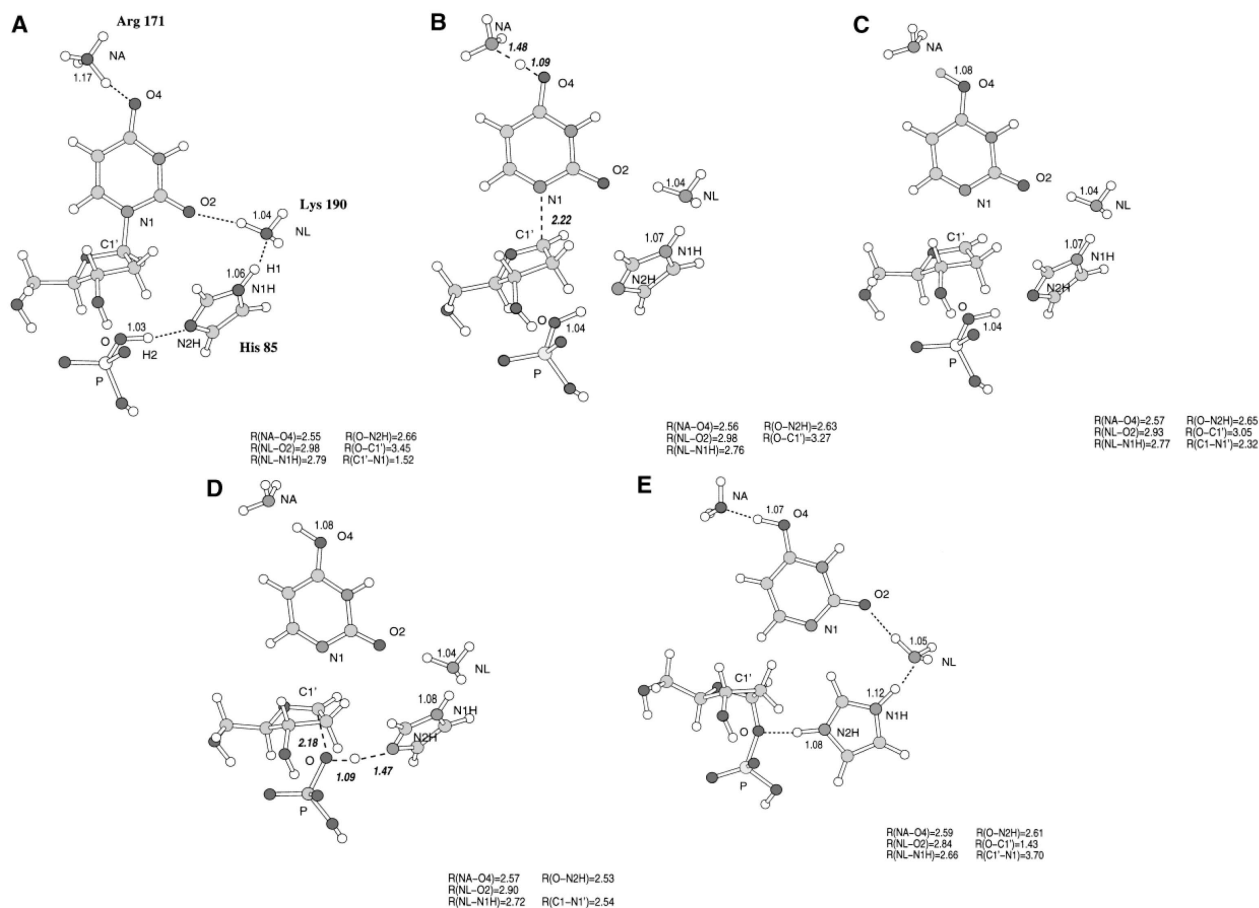


Рисунок 6. Прохождение реакции фосфоролита в *EcTP* по данным [107].

Помимо работы Pugmire с соавт. в 1998 структуру PuNP также исследовали Gao с соавт. в 2006. Для получения пространственной структуры PuNP из *Bacillus subtilis* авторы использовали моделирование по гомологии, а в качестве шаблона использовали структуру PuNP из *Bacillus stearotherophilus* (1BRW; Pugmire с соавт.). Конечная пространственная структура была получена авторами в результате классической молекулярной динамики с длиной траектории 1 нс. Авторами проведен докинг уридина, предварительно оптимизированного с использованием расчетов в рамках квантовой механики, в структуру PuNP из *Bacillus subtilis*. Полученная структура фермент-субстратного комплекса подвергалась расчетам квантово-механической / молекулярно-механической динамики и классической молекулярной динамики параллельно. В результате расчетов авторы утверждают, что наибольший вклад во взаимодействие с субстратом вносят Lys188 (Lys190 в *EcTP*), Arg169

(Arg171 в EcTP) и His82 (His85 в EcTP) (см. рис.7). Они стабилизируют пиримидиновую компоненту лиганда, у которого при этом увеличивается длина C-N гликозидной связи, и идет отток электронов от C к N.

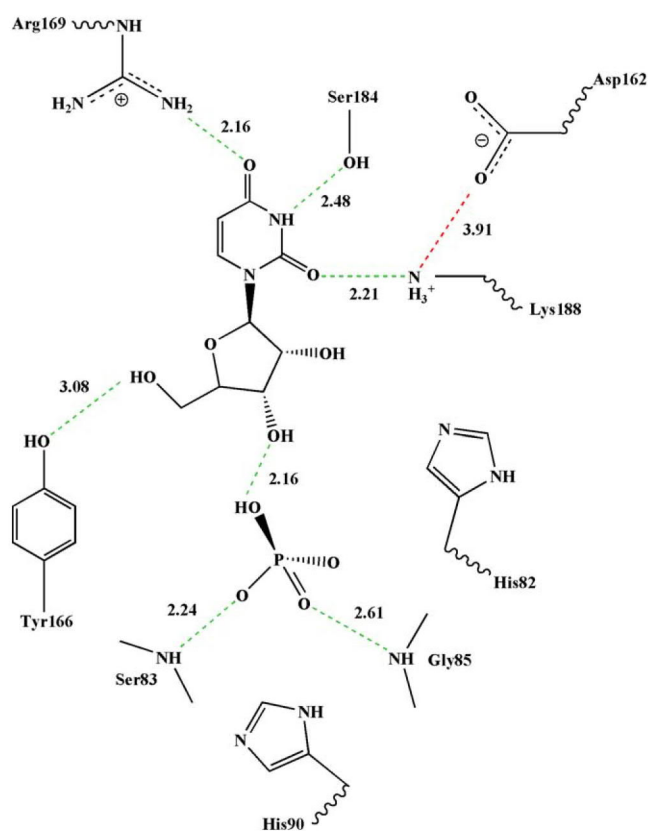


Рисунок 7. Схематичное изображение активного центра EcTP [107].

1.6. Ингибиторы TP

Folkman в 1971 постулировал, что рост опухоли зависит от ангиогенеза и, что развитие опухоли и образование метастазов может быть устранено посредством блокирования доступа крови к опухоли [108]. На настоящий момент анти-ангиогенные препараты такие, как например бевацизумаб – моноклональные антиVEGF антитела (Avastin, Genentech/Roche, Basel Switzerland) и ингибиторы киназ: сорафениб (Nexavar, Bayer, Leverkusen, Germany), сунитиниб (Sutent, Pfizer, New York, NY), эверолимус повсеместно применяются для лечения онкологических заболеваний, а десятки других анти-ангиогенных лекарств проходят клинические испытания [109, 110]. Однако, преимущества этих анти-ангиогенных терапий, в лучшем случае, временные и, в основном, сопровождаются развитием у опухоли резистентности. Хотя,

резистентность опухоли может быть вызвана различными механизмами, как, например, слабая фармакинетика, ограниченный прием лекарства, повышенное высвобождение лекарства и мутации белков мишеней, она также может быть вызвана формированием обходного пути вокруг анти-ангиогенной блокады посредством активации и регуляции дополнительных про-ангиогенных путей внутри опухоли [85, 111]. Например, в результате исследования глиобластомы пациентов, проходящих курс лечения ингибитором рецептора ВЭФР цединарибом (Recentin, Astra Zeneca, London, UK), показано, что опухоли уклоняются от анти-ангиогенной терапии за счет повышения секреции ангиогенного фактора роста-2 фибробластов и фактора-1 α стромальных клеток [112]. Таким образом, крайне необходимо разрабатывать анти-ангиогенные лекарства, активность которых направлена на цели, принимающие участие в ангиогенезе. Т.к. TP играет фундаментальную роль в ангиогенезе опухолей, многие лаборатории пытались синтезировать ингибиторы TP [113]. Наиболее известные ингибиторы TP рассматриваются далее и их формулы приведены на рисунке 8.

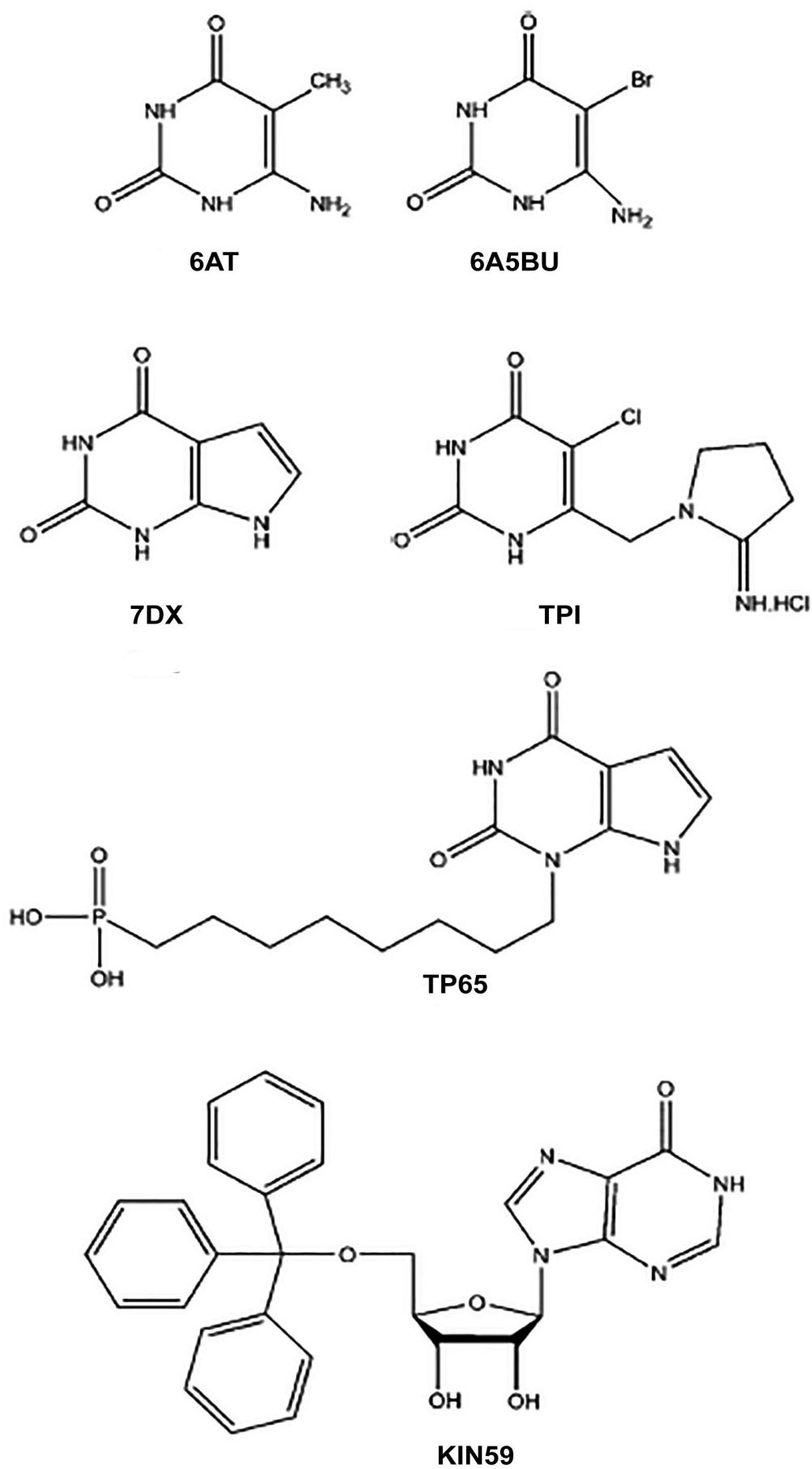


Рисунок 8. Структурные формулы наиболее известных ингибиторов TP.

1.6.1. Производные пиримидина

В течении более 30 лет единственными известными соединениями, ингибирующими TP были производные урацила, как например 6-аминотимин (6AT) и 6-амино-5-бромouraцил (6A5BU) [114]. Значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) этих соединений находятся в субмикромольном диапазоне. Когда стало известно, что TP является не только ферментом, принимающим участие в расщеплении нуклеозидов, но также и в ангиогенезе, многие лаборатории поставили своей целью синтезировать более эффективные ингибиторы TP.

В 2000 году Fukushima с соавт. синтезировали 5-хлор-6-[1-(2-иминопирролодинил)метил]урацилгидрохлорид (TP1), один из самых сильных ингибиторов TP, IC_{50} TP1 равна 35 нМ [115]. Показано, что эта молекула блокирует некоторые биологические проявления TP. Например, в [62] выявлено, что TP1 ингибирует TP-индуцированный ангиогенез. Препарат снижает скорость роста опухоли и плотность микрососудов [98]. Кроме того, при пероральном введении TP1 подавляются макроскопические метастазы опухоли в печени и уменьшается концентрация человеческого β -глобина, молекулярного маркера микрометастаз [116]. На настоящий момент TP1 в комбинации с цитотоксином – 3-фторуридином, одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для лечения метастазов рака прямой кишки. Тем не менее применение этого комплексного препарата (TP1+3-фторуридин), именуемого Lonsurf, сопровождается побочными эффектами: миелосупрессией, анемией и нейтропенией. Таким образом, разработка новых ингибиторов TP до сих пор остается актуальной задачей. Успех TP1 вдохновил некоторых исследователей на создание схожих ингибиторов, в особенности опираясь на их цвиттерионную природу [117, 118]. В результате было синтезировано несколько успешных ингибиторов: 5-фтор-6-имидазол-1-илметил-урацил ($K_i = 51$ нМ для $EcTP$; [118]) и 5-фтор-6-[(2-аминоимидазол-1-ил)метил]урацил ($K_i = 11$ нМ для $EcTP$ и 17 нМ для hTP ; [117]).

1.6.2. Производные пурина

В 1998 году, Balzarini с соавт. синтезировали 7-деазаксантин (7-DX), первое пуриновое производное с ингибирующей активностью по отношению к пиримидин нуклеозидфосфорилазам (например, TP) [13]. Для рационального дизайна 7-DX использовалась трехмерная структура TP *E.coli* (PDB ID 2TPT). В [93] показано, что этот лиганд не только эффективно ингибирует ферментативную активность TP, но и способен предотвращать образование новых сосудов.

Доступность структуры TP *E.coli*, решенной методом рентгеноструктурного анализа, также повлекла за собой рациональный дизайн соединений, которые взаимодействуют как с тимин-, так и с фосфат-связывающим сайтами одновременно, т.е. мультисайтовых ингибиторов TP. Эти типы молекул состоят из основания, взаимодействующего с сайтом связывания нуклеозида, и фосфоната, способного связываться с фосфат-связывающим сайтом. Расстояние между тимин- и фосфат-связывающими сайтами субъединицы TP кишечной палочки в открытой конформации оценивается примерно в 10 Å. Из этого следует, что тиминовые и фосфатные фрагменты этих новых ингибиторов связаны друг с другом цепочкой из 6-9 метиленовых групп [14, 15]. Эти соединения взаимодействуют с обоими сайтами связывания субстрата, и, таким образом, «замораживают» фермент в открытой, неактивной конформации. Одним из таких соединений является TP65 (9-(8-фосфоноктил)-7-деазаксантин), содержащий алкильную фосфонатную группу, ковалентно связанную с 7-DX. Значение IC₅₀ этого соединения находится в микромолярном диапазоне. Эта молекула способна также блокировать биологическую активность TP, выражающуюся, например, в ангиогенезе или в формировании микроваскулярных проростаний из агрегатов эндотелиальных клеток в фибриновом геле [16].

Другим известным пуриновым производным, ингибирующим TP, является 5-О-триптилинозин (KIN59). KIN59 состоит из пуринового основания (гипоксантин), рибозной компоненты и трипильной группы в 5'-положении

рибозы. KIN59 не только предотвращает формирование новых кровеносных сосудов, но и способствует деградации уже существующих. Оказалось, что этот эффект не является следствием неспецифической токсичности на клетки сосудов. Более того, в отличие от ранее описанных ингибиторов TP, эта молекула не конкурирует с природными субстратами за связывание с нуклеозид или фосфат-связывающими сайтами TP, а взаимодействует с новым, ранее неизвестным аллостерическим сайтом фермента неконкурентным образом [119]. В [119, 120] доказывалась также необходимость трифенилметильной группы KIN59 для ингибирования TP и для блокирования ангиогенеза. В [120] также описываются аналоги KIN59, для которых рассчитываются константы ингибирования TP. В результате авторами обнаружено, что замена гипоксантиновой группы KIN59 на тимин приводит к увеличению ингибирующей способности лиганда. Тем не менее, неконкурентный механизм ингибирования авторы подтверждают лишь для одного лиганда: 1-(5'-О-третил-β-D-рибофуранозил)-тимина (TP124).

I.6.3. Ингибиторы TP нуклеозидной природы

В последнее время некоторыми группами предпринимались попытки создать ингибиторы TP нуклеозидной природы. Для этого выбирались схожие с нуклеозидами соединения, применяемые в клинике. Как правило в качестве референта при этом использовались 7-DX. Khan с соавт. в 2009 провели химический скрининг 19 соединений производных 3-формилхромола. Одно из этих соединений в итоге обладало IC₅₀ меньшей, чем у 7-DX (19,8 в сравнении с 39,3 мкМ)[121]. В статье 2013 года этими же авторами предпринята попытка поиска ингибитора на основе 1,3,4-оксадиазолей [122]. Тем не менее, среди 16 соединений этого типа, лишь для одного значение IC₅₀ соответствовало в пределах погрешности IC₅₀ для 7-DX. В 2015 году этой же исследовательской группой описывается химический скрининг 25 соединений на основе 2-арилхиназолина-4(3H)-она. В результате IC₅₀ одного из соединений соответствовало в пределах погрешности IC₅₀ для 7-DX. Помимо этого, в 2013

году вышло несколько работ по разработке соединений на основе триазинов и их пиразольных и триазольных аналогов [123-125]. Отдельно стоит отметить данные [126] о возникновении тимидинфосфорилазной активности, возникающей при добавлении бактериостатического препарата триметоприма к клеткам бактерии *Yersinia pestis*. Эта активность может носить защитный по отношению к препарату характер, а сходство триметоприма с нуклеозидами свидетельствует о возможности связывания триметоприма посредством ТР.

1.7. ТР во фторопиримидиновой химиотерапии

1.7.1. 5-фторурацил

В 1957 году Heidelberger с соавт. обнаружили противоопухолевую активность у 5-фторурацила (5-ФУ) [127]. В настоящий момент 5-ФУ широко используется при лечении колоректальных раковых заболеваний. Возможные метаболические пути 5-ФУ приведены на рис. 9.

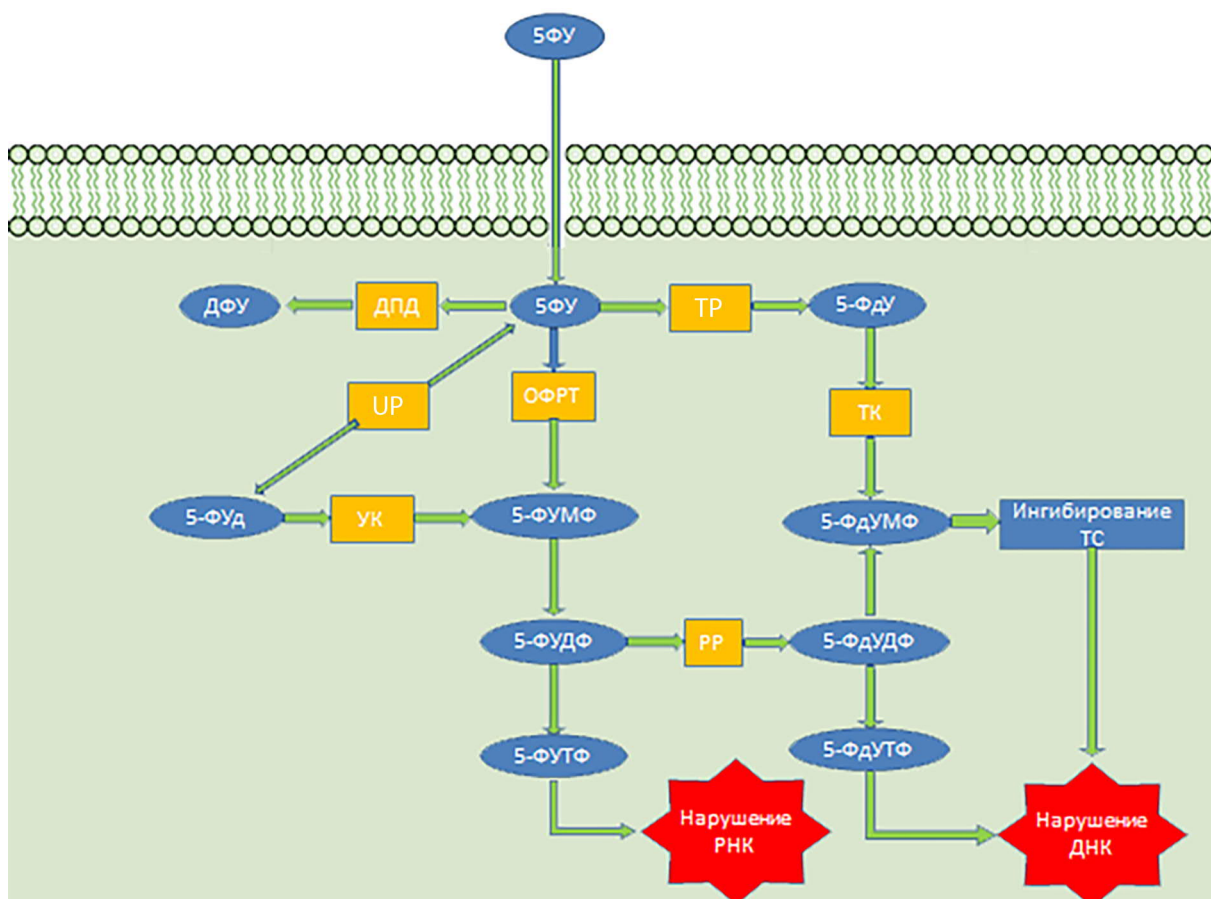


Рисунок 9. Основные пути метаболизма 5-фторурацила (5-ФУ) в клетке. ТР – тимидинфосфорилаза, ДПД – дигидропиримидин дегидрогеназа, ОФРТ – оротат фосфорибозилтрансфераза, УР – уридинфосфорилаза, УК – уридин киназа, РР-рибонуклеотид редуктаза, ТС - тимидилатсинтаза. 5-ФдУ – 5-

фтордезоксисуридин, 5-ФУд – 5-фторуридин, 5-Ф(д)УМ(Д/Т)Ф – 5-фтор(дезоксид)уридинмоно(ди/три)фосфат, ДФУ – дегидрофторурацил

Противоопухолевая активность 5-ФУ осуществляется за счет ингибирования тимидилатсинтазы, отвечающей за *de novo* производство тимидилатных продуктов, что препятствует участию фермента в синтезе ДНК [128]. Однако до этого, 5-ФУ должен быть преобразован тимидинфосфорилазой в 5-фтор-2'-дезоксисуридин (5-ФдУд). 5-ФдУд далее конвертируется тимидинкиназой в 5-фтор-2'-дезоксисуридин-5'-монофосфат (5-ФдУМФ). 5-ФдУМФ может быть также получен из 5-ФдУДФ образуемого посредством редуکتивного синтеза 5-фторуридин-5'-дифосфата, реакцией, катализируемой рибонуклеотид редуктазой. 5-ФдУМФ также может дополнительно фосфорилироваться в 5-ФдУТФ, которые в последствии включаются в ДНК. Кроме того, 5-ФУ, может быть непосредственно или опосредованно преобразован в 5-фторуридин-5'-монофосфат (5-ФУМФ), который может быть включен в РНК (после преобразования к его 5'-трифосфатной производной), в результате приводя к ингибированию синтеза белка. Прямое преобразование 5-ФУ в 5-ФУМФ с помощью оротат фосфорибозилтрансферазы считается наиболее важным путем для активации 5-ФУ. Цитотоксичность 5-ФУ зависит не только от вышеописанных анаболических путей, но также от его катаболизма, поскольку 5-ФУ разлагается под воздействием дигидропиримидиндегидрогеназы (ДПД), которая в избытке находится в печени. Эта реакция настолько быстра, что период полураспада 5-ФУ в плазме составляет лишь 6-20 мин, то есть более 80% от введенной 5-ФУ катаболизируется посредством ДПД [129].

Разрабатывались и тестировались различные стратегии, целью которых являлось увеличение противораковой активности 5-ФУ. Одной из таких стратегий является повышение связывания 5-ФдУМФ с ТС, что увеличивает цитотоксичность 5-ФУ. Другой подход, направленный на увеличение биодоступности 5-ФУ является ингибирование ДПД, фермента, приводящего к

быстрому разрушению фторированных нуклеиновых производных. Применение ингибиторов ДПД позволяет использовать 5-ФУ перорально, потому что такой подход почти полностью препятствует деградации 5-ФУ в желудочно-кишечном тракте. 5-хлор-2,4-дигидропиримидин представляет собой один из наиболее часто используемых ингибиторов ДПД [130], но известны также и другие ингибиторы ДПД, такие как (Е) -5- (2-бромвинил) урацил и 5-этинилурацил (энилурацил) [131, 132].

1.7.2. Пролекарства на основе 5ФУ

Поскольку 5-ФУ обладает низкой пероральной биодоступностью и быстро деградируется посредством ДПД, 5-ФУ должен приниматься болюсовыми инъекциями или продолжительным курсом внутривенно. Поскольку такие стратегии приема 5-ФУ являются дорогостоящими, трудоемкими и неудобными для пациентов, многими фармкомпаниями прилагались большие усилия для разработки эффективных аналогов 5-ФУ, подходящих для перорального введения. Одним из первых препаратов такого рода был фторафур. В клинике этот лиганд используется в нескольких комбинациях для улучшения его биодоступности [133]. Например, UFT, комбинация 4:1 урацила и фторафура, приводит к более высокому содержанию циркулирующего в клетках 5-ФУ путем насыщения ДПД природным субстратом урацилом. UFT используется во всем мире и одобрен для лечения пациентов с колоректальным раком [134]. Усовершенствованным аналогом UFT является S-1, представляющий собой сочетание Фторафура, 5-хлор-2,4-дигидропиримидина (CDHP) и оксоната калия (ОХО) в молярном соотношении 1:0,4:1. CDHP является мощным и обратимым ингибитором ДПД. ОХО уменьшает токсичность 5-ФУ в желудочно-кишечном тракте, ингибируя ОФРТ, активирующую 5-ФУ в пищеварительном тракте [120]. ОХО специально накапливается в желудочно-кишечном тракте, тем самым предотвращая

активацию 5-ФУ в здоровых клетках слизистой оболочки, а не в ткани опухоли [135].

Другим разрабатывавшимся пролекарством 5-ФУ являлся доксифлуридин (5'-дезоксидеокси-5-фторуридин), одноступенчато преобразуемый посредством ТР в 5-ФУ [136]. Т.к. в желудочно-кишечном тракте экспрессия ТР высока, терапия с использованием доксифлуридина приводила к побочным эффектам, что неизбежно ограничивало возможную дозу его приема [132, 137].

Капецитабин (Кселода, N4-пентилоксикарбонильную-5'-дезоксидеокси-5-фторцитидин, рис.10), оральное пролекарство 5-ФУ, разрабатывалось с целью избежать токсичность доксифлуридина в желудочно-кишечном тракте. Также разрабатываемое вещество должно преобразовываться в 5-ФУ преимущественно в области опухоли [138]. Превращение капецитабина в 5ФУ проходит в три этапа. После прохождения капецитабином кишечника в интактном виде, он гидролизуется в 5'-дезоксидеокси-5-фторцитидин посредством карбоксилэстеразы в печени. На втором этапе происходит дальнейшее преобразование в 5'-дезоксидеокси-5-фторуридин цитидиндезаминазой, также находящейся в печени и в различных типах опухолей. Наконец, 5'-дезоксидеокси-5-фторуридин может быть преобразован в 5-ФУ в опухоли посредством ТР [133]. Оверэкспрессия ТР в опухолевой ткани способствует целевому внутриопухолевому высвобождению 5-ФУ из молекулы пролекарства. Это в итоге сводит к минимуму системную токсичность препарата [139].

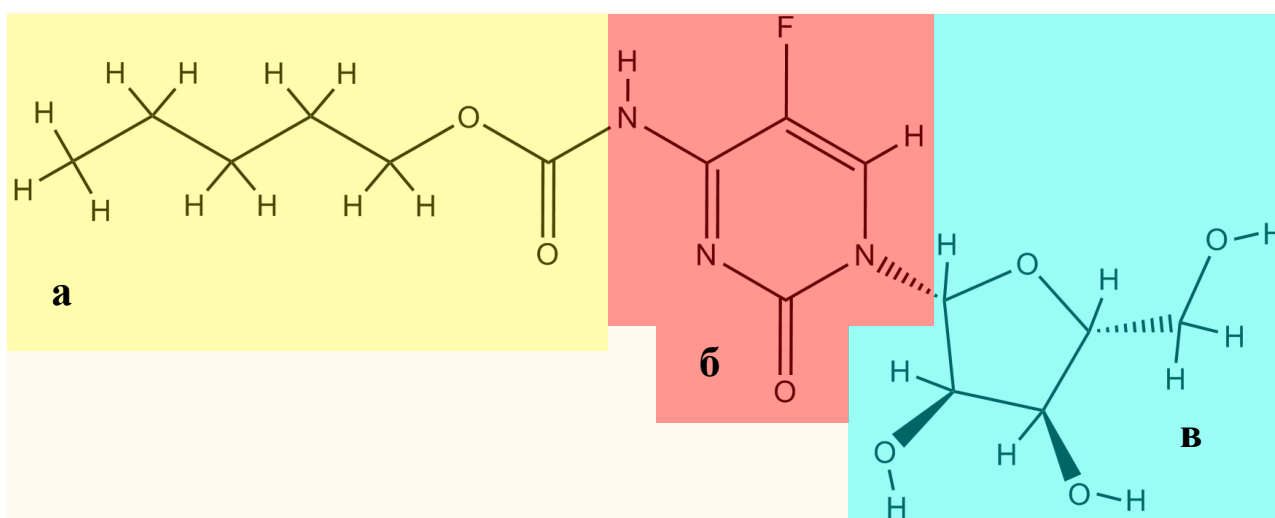


Рисунок 10. Структурная формула капецитабина (N⁴-(пентилоксикарбамил)-5'-дезоксидеокси-5-флуороцитидина): а – карбаматная модификация, б – флуороцитозиновая часть, в – рибозная часть.

1.8. Влияние PyNP в бактериях рода *Mycoplasma* на фторпиримидиновую химиотерапию

Бактерии рода *Mycoplasma* являются самыми маленькими самовоспроизводящимися бактериями, которые могут вызывать респираторные и урогенитальные заболевания [140]. Большинство микоплазменных инфекций остаются, однако, неизвестными, потому что многие люди могут быть хронически инфицированы, а видимые клинические проявления при этом отсутствуют. Микоплазмы могут также играть роль в раковых заболеваниях [141]. Микоплазмальные инфекции связаны с лейкемией и раком яичников и шейки матки [142, 143]. В частности, представители *M. hyorhina* часто встречается в тканях желудка, толстой кишки, пищевода, легких и молочной железы, но не в аналогичной не онкогенной ткани [144]. Хроническое инфицирование микоплазмами влияет на многие биологические характеристики клеток млекопитающих и даже может приводить к злокачественным новообразованиям [145, 146]. В [147-149] показано, что белок p37 из *M. hyorhina* меняет экспрессию генов, рост и миграционный потенциал линий раковых клеток простаты *in vitro*.

У разных видов бактерий семейства *Mycoplasma* была обнаружена активность нуклеозидфосфорилазы, препятствующая нормальной фармакокинетики аналогов нуклеозидов. Изначально считалось, что это ТР со специфичными свойствами [150, 151]. Свойства эти заключались в том, что нуклеозидфосфорилаза из *M. hyorhina* не только катализировала превращение тимидина в тимин, но и эффективно распознавала 5-ФдУд, 5-тФУд, и 5-дФУ [17, 18]. В результате цитостатическая активности 5-тФУд и 5-ФдУд значительно уменьшалась (в 33 и 140 раз соответственно) в клетках карциномы молочной железы (MCF-7), инфицированных *M. hyorhina* по сравнению с

контрольными MCF-7 клетками. Добавление ингибитора ТР ТРІ или микоплазма-направленных плазмоциновых антибиотиков восстанавливает цитостатическую активность. Также было показано, что НСТ116 клетки рака толстой кишки, инфицированные микоплазмой в 5 и в 100 раз более устойчивы к 5-ФУ и 5-ФдУд, соответственно, чем родительские неинфицированные клетки.

В дальнейшем показано, что ТР из *M. hyorhina* являлась широкоспецифичной РvNP [152], что объясняло ее способность к деактивации фторпиримидинов и ингибирование ее посредством ТРІ. В работе 2014 года продемонстрировано и уменьшение (в 5-100 раз) противовирусной активности фторпиримидинов: 5-хлор-2'-дезоксинуридина, 5-бром- 2'-дезоксинуридина, и 5-йод-2'-дезоксинуридина по отношению к вирусу коровьей оспы и герпеса первого и второго типа в клетках инфицированных *M. hyorhina* по сравнению с контрольными клетками.

Препятствование РvNP из *M. hyorhina* фторпиримидиновой терапии обуславливает необходимость разработки ингибиторов специфичных к РvNP, но неспособных связаться с ТР. Такая разработка в свою очередь предполагает знание различий в пространственной организации ТР и РvNP.

Вовлеченность тимидинфосфорилазы во многие физиологические и патологические процессы, обсуждаемая в этом обзоре, обосновывает необходимость структурных исследований специфичности пиримидинфосфорилаз NP-II семейства к нуклеозидам. Кроме того, разработка потенциальных конкурентных и неконкурентных ингибиторов тимидинфосфорилазы актуальна в настоящий момент, и значение структурных аспектов афинности пиримидинфосфорилаз NP-II семейства к различным функциональным группам необходимо для рациональной разработки таких соединений. Тем не менее, сложности кристаллизации тимидинфосфорилаз человека, описанные в литературе, указывают на необходимость использования бактериального фермента в качестве модели, что является правомерным в связи

с идентичностью их активных центров. Это же обуславливает необходимость использования методов компьютерного моделирования для исследования специфичности пиримидинфосфорилаз NP-II семейства.

Глава II. Экспериментальная часть

II.1. Химические материалы

Следующие химические реагенты применяли в процессе работы: сульфат аммония, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), акриламид, динатриевая соль этилендиамин-тетрауксусной кислоты (ЭДТА), додецисульфат натрия (SDS), Трис (((гидроксиметил)-аминометан))-HCl, бис-трис (бис-(2-гидроксиэтил)-имино-трис(гидроксиметил)-метан) пропан, фенилметансульфонил фтора, трис ((гидроксиметил)-аминометан), дитиотреитол (DTT) (Sigma), хлористый калий, хлористый натрий, хлористый кальций, β -меркаптоэтанол, полиэтиленимин, тиоцианат калия, 2-(бис(2-гидроксиэтил)амино)ацетоновая кислота (Bicine), цитрат, ацетат натрия, полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ-6000), полиэтиленгликоль 4000 (ПЭГ-4000), полиэтиленгликоль 3350 (ПЭГ-3350) полиэтиленгликоль 400 (ПЭГ-400) (Sigma), глицерол, тимидин, уридин, цитидин.

II.2. Программное обеспечение

Список специализированного программного обеспечения, использовавшегося в работе, с указанием версий программных продуктов и основной публикации приведён в таблице 5.

Таблица 5. Использованное программное обеспечения.

Решаемая задача	Программный продукт	Версии	Литературная ссылка
Обработка дифракционных данных	XDS	January 10, 2014 - May 1, 2016	[153]
Решение структур методом молекулярного замещения	Phaser	2.6.0	[154, 155]
Уточнение структур	Refmac	5.7	[156]
	Phenix	1.7 – 1.10	[157]
Визуальное отображение моделей и правка	Coot/WinCoot	0.6.3 – 0.8.7	[158]

Проверка достоверности структур и рентгено-дифракционных наборов	SFCheck	CCP4 6 и 7 версии	[159]
	Procheck	CCP4 6 и 7 версии	[160]
	MolProbity	4.1-4.3	[161]
Классическая молекулярная динамика	GROMACS	4.6 – GROMACS2016	[162]
Молекулярный докинг	Glide	5.5	[163, 164]
	AutoDock	1.5.6.	[165]
Оценка аффинности лиганда к белку	NNScore	1.0	[166]
	DSX	0.88	[167]
Оптимизация геометрии лигандов	PRODRG WEB		[168]
Оптимизация геометрии белковых молекул	GROMACS	4.6 – GROMACS2016	[162]
	Protein preparation wizard (Maestro)	8.0	[169]
Визуализация структурных данных	PyMol	1.6-1.8	[170]
Комплекс программ белковой кристаллографии	CCP4	6.1.3. – 7.0	[171]
Комплекс программ молекулярного моделирования	Maestro	8.0	[169]

II.3. Получение препаратов белков

II.3.1. Клонирование и экспрессия гена тимидинфосфорилазы *deoA* из *Salmonella typhimurium*

Аmplификацию структурной области гена *deoA* производили с хромосомы штамма *Salmonella typhimurium* LT2 с помощью праймеров Trp1: 5'-CGCCATATGTTTCTCGCACAAGAAATTATTC-3' и Trp2: 5'-CGCCTCGAGCTATTCAGTAATTTCGACGATAGA-3'. Первый олигонуклеотид комплементарен проксимальной, а второй – дистальной области гена *deoA*.

ПЦР проводили в амплификаторе MyCycler фирмы «BioRad» по следующей схеме: сначала денатурировали ДНК при 95° С в течение 3 мин, затем проводили 25 циклов амплификации, которые включали денатурацию ДНК при 95° в течение 30 с, отжиг праймеров при 60° С в течение 30 с и достройку ДНК при 72° С в течение 30 с. На последнем этапе проводили достройку ДНК при 72° С в течение 2 мин. В результате амплификации был синтезирован фрагмент длиной 1321 п.н., содержащий структурную область гена *deoA*, фланкированную сайтами узнавания рестриктаз *NdeI* (выделены курсивом и полужирным шрифтом) и *XhoI* (подчеркнута). После электрофоретического разделения продуктов ПЦР, искомым фрагмент ДНК элюировали из геля с помощью набора «GeneClean» фирмы (Fermentas). Клонирование гена *deoA* осуществляли в мультикопийный экспрессионный вектор pET15b, содержащий ИПТГ-индуцибельный промотор фага Т7, по сайтам эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *XhoI*. Вектор pET15b содержит маркер устойчивости к ампициллину (Amp^R), последовательность His-Tag перед сайтом узнавания рестриктазы *NdeI*, а также сайт-мишень для тромбина. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E.coli* TG1. Отбор трансформантов проводили на агаризованной среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) в качестве селективного маркера. Скрининг рекомбинантных клонов проводили методом ПЦР с использованием плазмидных праймеров pT7P: 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАGГГГ-3' и pT7T: 5'-GСТАGТТАТТGСТCAGCGGT-3'. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и проводили рестрикционный анализ гибридных плазмид на наличие вставки. Полученными плазмидами, обозначенными как pET15b/*deoA*, трансформировали клетки штамма *E.coli* BL21(DE3), содержащего индуцибельный ген РНК-полимеразы бактериофага Т7.

Индукцию экспрессии гена *deoA* проводили путем добавления в ростовую среду ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ. Анализ экспрессии гена *deoA* определяли методом электрофоретического разделения общего белка клеток

E. coli BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b/*deoA*, в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)). На электрофоретической картине в дорожках соответствующих штаммам, содержащим конструкции с функциональным геном *deoA*, наблюдается дополнительная фракция мономера белка с молекулярной массой приблизительно в 48 кДа. Это согласуется с молекулярной массой 47 кДа, вычисленной по последовательности гена *deoA*.

II.3.2. Клонирование и экспрессия гена PyNP из *Bacillus subtilis*

Аmplификацию структурной области гена, кодирующего *BsPyNP*, – *pdp* – проводили с хромосомы штамма *Bacillus subtilis*168 с помощью праймеров *Pdp4* (5'-CGCCATATGAGAATGGTAGATATCATCATC-3') и *Pdp2* (5'-CGCCTCGAGTTATTCTGTAATTAACGTATGAATC-3'). Первый праймер комплементарен проксимальной области гена *pdp*, а второй дистальной. В результате амплификации был синтезирован фрагмент гена *pdp* длиной 1301 пар оснований, несущий на 5'- и 3'-концах сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI для последующего клонирования (подчеркнуты на последовательности нуклеотидов праймеров). В качестве экспрессионного вектора выбрана плаزمида pET15b, позволяющая получить рекомбинантный белок с His-Tag-фрагментом на N-конце и включающая в себя сайт рестрикции для тромбина. Клонирование гена *pdp* в мультикопийный вектор pET15b осуществляли по сайтам рестрикции NdeI и XhoI. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* TG1. Скрининг трансформантов осуществляли методом полимеразной цепной реакции с помощью плазмидных праймеров pT7P (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАGGGG-3') и pT7T (5'-GСТАGTTATTGСТCAGCGGT-3'). Отобранные трансформанты проверяли на наличие мутаций методом секвенирования, после чего полученными конструкциями, содержащими полноразмерную структурную часть гена *pdp*, трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3).

Индукцию экспрессии гена *pdp* проводили путем добавления в ростовую среду ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ. Наличие экспрессии гена *pdp* определяли методом SDS-PAGE электрофореза общего белка клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET15b/*pdp*. В качестве контроля использовали лизат клеток штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b без вставки.

В клеточном лизате штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b/*pdp*, после ИПТГ-опосредованной индукции наблюдалась дополнительная фракция белка с приблизительной молекулярной массой 46 кДа, что согласуется с расчетной молекулярной массой белка BsPyNP 46,2 кДа.

II.3.3. Клонирование гена уридинфосфорилазы *Yersinia pseudotuberculosis*

В качестве матрицы для клонирования гена уридинфосфорилазы (*udp*) использовали геномную ДНК *Y. pseudotuberculosis*. ПЦР-амплификацию фрагмента проводили с участием специфических праймеров Y01 (5'-GGGGAATTCGTTGGCGCGATTCATGCCTCGG-3') и Y02 (5'-GCGGGATCCGGATTACAGCAGATGACGAGCGG-3'), содержащих сайты узнавания для рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* (соответственно (подчеркнуты)). Полученный в результате ПЦР-амплификации фрагмент размером 1007 пар оснований, содержащий полноразмерный ген *udp*, обрабатывали рестриктазами *EcoRI* и *BamHI* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, <http://www.sigmaaldrich.com>) и далее клонировали в вектор pUC19, обработанный теми же рестриктазами. После лигирования плазмиду трансформировали в культуру клеток *E. coli* штамма AM2009 с генотипом (*F⁻ thi1 thr1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 Δ(lac-proAB) Δ(metE-udp)*). Штамм культивировали на минимальной среде с ампициллином (100 мкг/мл) и уридином (0,2%) в качестве единственного источника углерода с целью отбора трансформантов, экспрессирующих ген *udp* [172]. В итоге получили плазмиду pMZ18, несущую ген *udp* из *Y. pseudotuberculosis*.

II.3.4. Выделение и очистка *StTP*

Культуры клеток штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b/deoA разводили в 100 раз и подращивали в термостатированном шейкере 2 часа при 37 °С, после чего в среду добавляли ИПТГ и инкубировали еще 4 часа при 30°С. Биомассу собирали центрифугированием в течение 3 мин при 5000 об/мин из общего объема культуры 1,2 л. Клеточный осадок суспендировали в связывающем буфере следующего состава: 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 500 мМ KCl, 30 мМ имидазола. Разрушение клеток проводили ультразвуком, с использованием дезинтегратора-550 (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Дебрис осаждали центрифугированием при 13000 об/мин. в течение 30 минут при 4°С.

Хроматографическую очистку проводили на системе ÄKTA prime plus (GE Healthcare, GB). Полученный суммарный белок наносили на колонку HisTrap FF 1 мл (упакована сорбентом Ni Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare), уравновешенную связывающим буфером и промывали 3-мя объемами того же буфера. Элюцию проводили буфером, содержащим 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 500 мМ KCl, 300 мМ имидазола. В результате была выделена фракция HisTag-меченного белка *StTP*.

Диализ выделенной фракции белка *StTP* осуществляли против буфера 20 мМ Tris-HCl, pH 8,4, 150 мМ KCl, 2,5 мМ CaCl₂ в течение ночи при 4°С. Обработку тромбином для отщипления His-Tag фрагмента проводили в том же буфере в течение 4 часов при комнатной температуре. Тромбин добавляли из расчета 1 единица активности фермента на 1 мг белка.

На втором этапе очистки белок наносили на колонку HiLoad™ 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) для гель-фильтрации, уравновешенную буфером 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 20 мМ KCl. Фракции белка *StTP* анализировали с помощью SDS-PAGE электрофореза.

II.3.5. Выделение и очистка *BsPyNP*

Ночную культуру штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pET15b/*pdf*, разводили в 100 раз и подращивали в термостатированном шейкере 2 ч при 37°C, после чего в среду добавляли ИПТГ в концентрации 1 мМ и инкубировали еще 4 ч при 30°C. Биомассу собирали центрифугированием в течении 3 мин при 5000 об./мин из общего объема культуры 1,2 л. Клеточный осадок суспендировали в связывающем буфере следующего состава: 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 500 мМ КСl, 2 М (NH₄)₂SO₄, 30 мМ имидазола. Клетки разрушали ультразвуком 3 раза по 20 секунд. Неразрушенные клетки осаждали центрифугированием 30 мин при 13000 об/мин и 4°C. Хроматографическую очистку проводили на системе ÄKTA primeplus (GE Healthcare). Полученный суммарный белок наносили на колонку HisTrap FF 1мл (упакована сорбентом NiSepharose 6 FastFlow, GE Healthcare), уравновешенную связывающим буфером, и промывали тремя объемами того же буфера. Элюцию проводили буфером, содержащим 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 500 мМ КСl, 300 мМ имидазола. В результате выделена фракция His-Tag-меченного белка *BsPyNP*.

Диализ выделенной фракции белка *BsPyNP* осуществляли против буфера 20 мМ Трис-НСl, рН 8,4, 150 мМ КСl, 2,5 мМ СаСl₂ (для дальнейшей обработки тромбином) в течение ночи при 4°C.

Обработку тромбином (Novagen, США) для гидролиза сайта рестрикции His-Tag-метки проводили в буфере 20 мМ Трис-НСl, рН 8,4, 150 мМ КСl, 2,5 мМ СаСl₂ в течение 4 ч при комнатной температуре. Тромбин добавляли из расчета 1 единица фермента на 1 мг белка.

На втором этапе очистки белок наносили на колонку HiLoad™ 16/60 Superdex 200 pg (GEHealthcare) для гель-фильтрации, уравновешенную буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 20 мМ КСl. Время выхода белка с колонки соответствует молекулярной массе ~94 кДа, в качестве маркера для определения молекулярной массы наносили BSA (64 кДа). Фракции белка *BsPyNP* анализировали с помощью SDS-PAGE. Определение гомогенности

препарата белка *BsPyNP* проводили методом белкового электрофореза в нативных условиях при pH 7,5.

II.3.6. Выделение и очистка *YptUP*

Отобранные клетки штамма *E.coli* AM2009, содержащие плазмиду pMZ18, выращивали в течение 16 ч на полноценной среде Луриа [173] с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием (10000 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в 50 мМ трис-HCl-буфере при pH 6,8, содержащем 5 мМ меркаптоэтанола, 0,3 мМ фенилметансульфонил фтора (PMSF) и 5% глицерина. Разрушение клеток проводили ультразвуком, с использованием дезинтегратора-550 (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). После центрифугирования (13000 об/мин, 10 мин) к надосадочной жидкости добавляли 10% (о/о) раствор полиэтиленимина (Polymix P) при pH 6,0 и инкубировали с перемешиванием в течение 12 ч при 30°C [172].

Осветленную центрифугированием (13000 об/мин, 10 мин) белковую фракцию ресуспендировали в 50 мМ трис-HCl-буфер pH 7,5, содержащий 2 М сульфата аммония, 5 мМ меркаптоэтанола, 0,3 мМ PMSF, и инкубировали 12 ч. Полученный осадок концентрировали при 10000 об/мин, ресуспендировали в 50 мМ трис-HCl-буфер при pH 7,5, содержащий 2 М сульфата аммония, и очищали методом гельфильтрации на колонке с наполнителем бутил-сефарозой (Amersham Pharmacia Biotech), уравновешенным тем же буфером. Белок элюировали градиентом сульфата аммония (от 2 до 0 М) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Отобранные фракции анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях на полиакриламидном геле SDS-PAGE [174, 175]. На втором этапе очистки энзима *YptUP* в качестве носителя использовали Q-сефарозу (Amersham Pharmacia Biotech), уравновешенную 50 мМ трис-HCl-буфера pH 7,5, содержащего 20 мМ хлорида натрия. С колонки с Q-сефарозой белок элюировали с использованием градиента NaCl (от 20 мМ до 1 М) со скоростью потока 1 мл/мин. Отобранные фракции диализовали против 20 мМ

трис-НС1-буфера при рН 7,5, содержащего 20 мМ хлорида натрия, и концентрировали до ~15 мг/мл в том же буфере. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [176] с использованием набора химических реактивов для исследований оптической плотности (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Чистоту и молекулярную массу субъединицы *YptUP* определяли методом SDS-PAGE электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Маркерным белком служила UP из *Vibrio cholerae*, молекулярная масса субъединицы которой равна 27,5 кДа.

II.4. Кристаллизация

Для белков *SfTP*, *BsPyNP* и *YptUP* скрининг условий кристаллизации проведен с использованием наборов для кристаллизации PACT, PhClear Suite, Stura, Morpheus, JCSG, MbClass и MbClassII (Qiagen, Germany). Для скрининга использовалась роботизированная установка Cartesian Dispensing System. Скрининг проводился в плашках с 96 ячейками методом диффузии паров в варианте «сидячей» капли. Для каждого фермента было выбрано несколько условий, в которых проводилось дальнейшее выращивание кристаллов в отдельных плашках методом диффузии паров в варианте «висящей» капли при температуре 19°C. Состав кристаллизационных растворов и противорастворов приведены в Таблице 6. Пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы *YptUP* выросли в течение недели, а кристаллы *SfTP* и *BsPyNP* в течение месяца. Кристаллы комплексов с тимидином и уридином получены методом вымачивания кристаллов в 0,1 М водного раствора соответствующего лиганда. Фотографии кристаллов представлены на Рис.11.

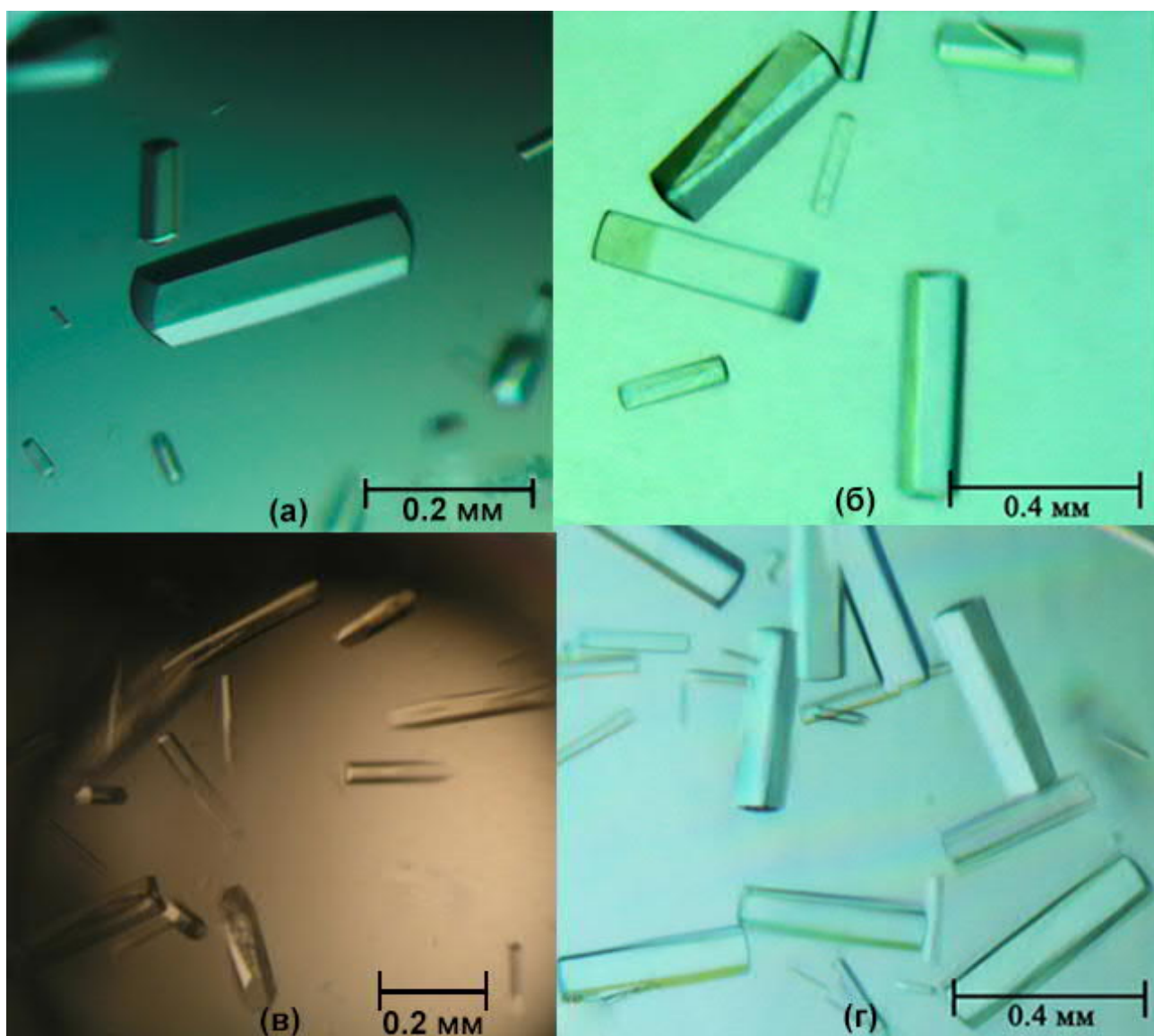


Рисунок 11. Кристаллы молекулы *StTP* с пространственной группой $P2_12_12$ (а) и $I4$ (б), *YptUP* (в) и *BsPyNP* (г)

Таблица 6. Кристаллизация пириимидинфосфорилаз NP-II семейства

Комплекс	StTP нелигандированная	StTP+SO ₄	StTP с тимидином	StTP с уридином	StTP с цитидином	BsPyNP+SO ₄	YptUP
Метод кристаллизации	Диффузия в парах в варианте сидячей капли				Диффузия в парах в варианте висячей капли		
Температура кристаллизации, К	292						298
Концентрация белка, мг /мл	19					17	15
Состав раствора белка	20 мМ NaCl в 20 мМ трис-HCl-буфере (pH _{25°C} 6,5)						
Состав противораствора	0,2 М тиоцианат калия, 0,1 М Бис-Трис пропан, 20% (м/о) ПЭГ 3350, pH 7,5	0,1 М Bicine, 1,6 М сульфата аммония, pH 9,0		0,1 М цитрата, 10% (м/о) ПЭГ 6000, pH 5,0	0,1 М Bicine, 1,6 М сульфата аммония, pH 9,0	0,2 М Ацетат натрия, 20% (м/о) ПЭГ 3350	0,1 М трис-HCl 8, 5% (м/о) полиглутаминавая кислота и 20% (м/о) ПЭГ 2000, pH 7.
Состав кристаллизационной капли	2 мкл белка и 2 мкл противораствора		1,5 мкл белка, 1,5 мкл противораствора, 1 мкл тимидина	1,5 мкл белка, 1,5 мкл противораствора, 1 мкл уридина	1,5 мкл белка, 1,5 мкл противораствора, 1 мкл цитидина	2 мкл белка и 2 мкл противораствора	
Объем противораствора, мкл	400						

II.5. Получение экспериментального набора интенсивностей

Экспериментальные наборы, дифрагированных кристаллами *StTP* и её комплексами, комплекса *BsPuNP* с сульфат-анионом и *YptUP* интенсивностей рентгеновского излучения, получены при 100 К на станциях 14.1 синхротрона BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Берлин, Германия) и P11 синхротрона PETRA III (DESY, Гамбург, Германия).

Обработка экспериментальных наборов интенсивностей дифрагированного излучения осуществлены в программе XDS [153]. Шкалирование интенсивностей и расчет модулей структурных факторов осуществлены в программе “XScale”. Параметры сбора данных и статистические характеристики полученного набора данных приведены в таблице 7.

II.6. Обработка рентгенодифракционных данных

Исходная фазовая составляющая структурных факторов определена методом молекулярного замещения в программе Phaser [154]. В качестве стартовой модели для расчета модельных фаз нелигандированной *StTP* использовалась трехмерная структура TP из *Escherichia coli* (PDB код 4EAF). Для решения структур комплексов *StTP* с уридином (*StTP*+URI) и *StTP* с тимидином (*StTP*+THM) в качестве стартовой модели использована структура нелигандированной *StTP* при разрешении 2,05 Å (PDB код 4XR5). Для решения структуры комплекса *StTP* с сульфат-анионом (*StTP*+SO₄) в качестве стартовой модели использована структура нелигандированной *StTP* при разрешении 2,05 Å (PDB код 4XR5), а для решения структуры комплекса *BsPuNP* с сульфат-анионом использовалась структура PuNP из *Staphylococcus aureus* (PDB код 3H5Q).

В качестве стартовой модели для расчета модельных фаз *YptUP* использовалась трехмерная структура нелигандированной молекулы *YptUP* при разрешении 2,27 Å (ID PDB: 4JP5).

Таблица 7. Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов

Комплекс	<i>SfTP</i> нелигандированная	<i>SfTP</i> +SO ₄	<i>SfTP</i> +THM	<i>SfTP</i> +URI	<i>SfTP</i> +CTN	<i>BsPyNP</i> +SO ₄	<i>YptUP</i>
Источник излучения	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	PETRA III, P11
Длина волны (Å)	0,918	0,918	0,918	0,918	1,00	0,92	1,000
Температура (К)	100	100	100	100	100	100	100
Детектор	PSI Pilatus 6M	PSI Pilatus 6M	PSI Pilatus 6M	PSI Pilatus 6M	PSI Pilatus 6M	PSI Pilatus 6M	PSI Pilatus 6M
Расстояние кристалл- детектор (мм)	350	401	550	526	368,5	550,5	236,7
Шаг сканирования по углу (°)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2
Диапазон сканирования по углу (°)	0-200	0-180	0-120	0-120	0-100	0-120	0-180
Время экспозиции (с)	1	1	1	1	0,6	2	1
Пространственная группа	<i>P2₁2₁2</i>	<i>I4</i>	<i>I4</i>	<i>I4</i>	<i>I4</i>	<i>P2₁2₁2₁</i>	<i>H3</i>

a, b, c (Å)	114,94, 171,21, 45,34	189,93, 189,93, 57,96	190,92, 190,92, 57,72	193,93, 193,93, 57,73	193,40, 193,40, 58,21	80,46, 91,35, 109,80	150,95, 150,95, 46,23
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 120
Мозаичность (°)	0,23	0,14	0,11	0,16	0,20	0,21	0,15
Диапазон разрешения (Å)	47,72–2,05 (2,09–2,05)*	47,87–2,20 (2,33–2,20)*	39,02–2,55 (2,59–2,55)*	48,06–2,43 (2,57–2,43)*	136,75–1,91 (2,01–1,91)*	70,22–2,66 (2,80–2,66)*	75,48– 1,40 (1,48– 1,40)*
Полное число отражений	207489	239083	142010	173860	537407	102504	378866
Число независимых отражений	58911	32249	64691	37930	80208	23783	76922
Полнота набора (%)	95,4 (99,6)*	89,0 (91,1)*	97,4 (94,1)*	92,8 (92,1)*	94,9 (99,5)*	99,5 (99,7)*	99,8 (99,0)*
Повторяемость	6,9 (7,1)*	5,6 (4,6)*	4,5 (4,5)*	4,6 (4,7)*	6,7 (6,8) *	4,3 (4,4)*	4,9 (4,8)*
Среднее значение $I/\sigma(I)$	15,70 (3,30)*	14,30 (1,68)*	15,72 (1,91)	11,97 (1,77)	16,4 (1,00) *	17,7 (1,60) *	14,7 (1,20)*

*В скобках приведены значения для слоя высокого разрешения.

II.7. Решение и уточнение пространственных структур

Уточнение пространственных структур проводилось в программных пакетах Phenix [177, 178] и Refmac5 [156]. Для расчета R_{free} было отобрано случайным образом 5% набора **[F]**. Визуальный контроль уточнения структуры и её ручная правка осуществлялась в программе Coot [158, 179]. Локализация как атомов аминокислотных остатков энзима, так и атомов лигандов проводилась с использованием σ_A -взвешенных карт фурье-синтеза электронной плотности с коэффициентами mF_o-DF_c и $2mF_o-DF_c$. На заключительных этапах уточнения пространственной структуры нелигандированной *S*TP использовалась опция TLS (translation-libration-screw). Корректность результатов уточнения структуры контролировали в программах Coot [158, 179], MolProbity [161] и PDB Validation Server (<http://validate.rcsb.org/>). Итоговые значения параметров уточнённой структуры приведена в таблице 8. Достоверность структур оценивали с использованием программ PROCHECK [160], WHAT_CHECK [180], WEB-сервиса (<https://validate-rcsb-1.wwpdb.org/>) [161].

Результирующие координаты биомакромолекул и соответствующие им наборы структурных факторов были приняты Международным банком белковых структур (Protein Data Bank) (приведены в табл. 8).

Таблица 8. Статистические характеристики уточнения кристаллических структур

Комплекс	StTP нелигандированная	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)*
Число рефлексов в рабочем наборе	51931 (2609)*	45688 (3451)*	61417 (2735)*	36033 (2371)*	76247 (2793)*	22573 (1635)*	76922 (5318)*
Число рефлексов в тестовом наборе	2735 (138)*	1467 (91)*	3274 (138)*	1897 (125)*	3856 (146)*	1171 (96)*	3859 (277)*
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
	Число уточняемых неводородных атомов						
Белка	6582	6580	6580	6580	6581	6466	3770
Ионов	1	60	-	-	45	11	1
Лигандов	37	12	96	83	33	0	19
Воды	89	574	86	44	251	27	434

Итого	6709	7226	6812	6707	6913	6504	4224
	R.m.s.d. от «идеальной» геометрии						
По длинам валентных связей (Å)	0,009	0,008	0,010	0,008	0,006	0,007	0,007
По валентным углам (°)	1,275	1,234	1,325	1,157	0,785	1,125	1,165
	Среднее значение <i>B</i> фактора (Å ²)						
Белка	51,9	54,0	67,4	74,0	35,7	76,1	17,6
Ионов	60,5	78,5	-	-	54,9	-	14,8
Лиганда	61,3	75,7	93,9	81,0	43,2	120,2	34,2
Воды	47,1	59,3	60,1	67,2	35,0	57,4	29,6
	Статистика Рамачандрана						
Число а.о. фаворитной зоны (%)	97,83	97,70	96,58	96,01	97,60	95,90	98,30
Число а.о. допустимой зоны (%)	0,11	0,11	0,00	0,00	2,30	3,90	1,32

*В скобках приведены значения для слоя высокого разрешения.

II.8. Молекулярный докинг

Молекулярный докинг неконкуретного ингибитора KIN59 и его аналогов [120] в сайты связывания молекулы *StTP*, а также триметоприма (ТОР) и его аналога 53I в сайты связывания *StTP* и *YptUP* проведен с использованием программного пакета "Maestro" [169] (Schrodinger Suite). Во всех случаях моделирования проведено по нижеприведенному протоколу.

На первом этапе к модели белка-мишени, полученной методом рентгеноструктурного анализа, добавляются атомы водорода и рассчитываются частичные заряды атомов посредством процедуры «Protein preparation wizard». Проводится оптимизация геометрии моделей лигандов с генерированием допустимых торсионных углов и расстановкой частичных зарядов с помощью WEB-сервиса PRODRG [168].

На втором этапе проводится расчет сетки взаимодействий с белком в области, ограниченной кубом с ребром 20 Å. Местоположение кубической области задавалось по аминокислотным остаткам сайтов связывания (табл. 9). Молекулярный докинг выполнен с использованием модуля Glide программного пакета Maestro с использованием алгоритма повышенной точности (XP) с подвижным лигандом и неподвижной мишенью [163, 164]. Для ранжирования результатов докинга использовали оценочную функцию "Glide Score" [163].

Таблица 9. Параметры ячейки докинга.

Лиганд	Структура	Сайт связывания	Аминокислотные остатки
KIN59	StTP+THM	НСС	Tyr168/B, Arg171/B, Ser186/B, Lys190/B, His85/B
	StTP+THM	дНСС1	Ser248/B, Gln261/B, Tyr267/B
	StTP+CTN	дНСС2(2)*	Asp50/B, Arg56/B, Arg115/A, Glu128/A, Ala373/A
	StTP+CTN	дНСС2(1)	Arg115/A, Glu128/A, Ala373/A
ZINC	StTP+SO ₄	ФСС	Ser113/A, Thr123/A, His85/A
	BsPyNP+SO ₄	ФСС	Ser110/A, Thr120/A, His82/A
TOP	StTP+THM	НСС	Tyr168/B, Arg171/B, Ser186/B, Lys190/B, His85/B
	StTP+THM	дНСС1	Ser248/B, Gln261/B, Tyr267/B
	YptUP	АЦ	Phe162/A, Thr94/A, Arg48/B, Arg223/A
531	YptUP	АЦ	Phe162/A, Thr94/A, Arg48/B, Arg223/A

НСС – нуклеозид-связывающий сайт; дНСС – дополнительный нуклеозид-связывающий сайт; ФСС – фосфат-связывающий сайт; ZINC – все соединения, отобранные для виртуального скрининга из базы данных ZINC; АЦ – активный центр; * - в скобках приведено количество субъединиц комплекса, включенная в модель

II.8.1. Виртуальный скрининг лигандов – специфичных ингибиторов PyNP

Для поиска потенциальных ингибиторов PyNP, не афинных к TP, составлена база данных лигандов на основании базы данных ZINC (<http://zinc.docking.org/>) с применением критериев отбора лекарственно подобных лигандов, приведенных в табл. 10. Такой выбор основан на

предположении, что при закрытии субъединицы ингибитор мог бы связаться и с аминокислотными остатками нуклеозидсвязывающего сайта, фиксируя субъединицу фермента в закрытой конформации. Виртуальный скрининг осуществлялся в модуле Virtual Screening Workflow пакета программ Schrodinger suite (<http://www.schrodinger.com/>). Первым этапом процедуры была подготовка трехмерных структур лигандов в модуле LigPrep, при этом для каждой генерировалось не более четырех стереоизомеров, в результате получено 9031 соединение. На следующем этапе проводился докинг структур полученных соединений в область активного центра *StTP* и *BsPyNP* с использованием высокопроизводительного алгоритма (high-throughout virtual screening; HTVS), в результате которого на основании значения оценочной функции glide docking score отбиралось 10% соединений. Далее проводилась процедура докинга со стандартной точностью (standard-precision; SP) соединений, прошедших отбор на стадии HTVS. После этапа SP докинга также отобрано 10% соединений на основании значения оценочной функции glide docking score. На заключительном этапе докинг проводился с использованием алгоритма повышенной точности (extra-precision; XP), в результате которого было отобрано 20% соединений на основании значения оценочной функции XP Gscore, т.е. по 18 соединений для каждого фермента-мишени. Из них отобраны четыре соединения, афинные к *BsPyNP*, но не связывающиеся, как показали результаты проведенного докинга, с *StTP*.

Таблица 10. Критерии отбора соединений из базы данных ZINC (<http://zinc.docking.org/>)

Критерий	Значение
Молярная масса, г/моль	<500
Число доноров водородной связи	<5
Число акцепторов водородной связи	<10
Число связей, вокруг которых	<10

возможно вращение	
$x \log P^*$	<5
Входящая в состав лиганда химическая группа	Пиримидиновое кольцо

*Коэффициент распределения лиганда в системе октанол–вода.

II.9. Молекулярно-динамическое моделирование.

Молекулярно-динамическое (МД) моделирование комплексов *StTP* и *BsPyNP* с фосфат-анионом и тимидином, четырех комплексов *BsPyNP* с соединениями, определенными на этапе виртуального скрининга, проведено в пакете программ GROMACS (версия 5.0) [181] с использованием набора полно-атомных силовых полей GROMOS [182]. С помощью аналогичной процедуры проведена корректировка пространственных структур комплекса *YptUP* с молекулой триметоприма и *YptUP* с молекулой модифицированного триметоприма 53I.

На первом этапе к модели белка-мишени, полученной методом рентгеноструктурного анализа, были добавлены атомы водорода и рассчитаны частичные заряды атомов в программе *pdb2gmx* программного пакета GROMACS [162]. Параметризацию атомных характеристик и все дальнейшие расчеты проводили с использованием набора силовых полей GROMOS. Далее модели белков помещали в виртуальную ячейку с растворителем. Ячейка представляла собой прямоугольный параллелепипед. Минимальное расстояние между координатами атомов белка и гранью ячейки равнялось 0.9 нм. Сольватацию белка осуществляли в программе *solvate* (GROMACS [162]), используя трёхцентровую модель воды SPC216.

Второй этап заключался в оптимизации атомных параметров моделей с использованием выбранного силового поля в виртуальной ячейке. Инициализацию данного протокола осуществляли в программе *grompp* (GROMACS). Компенсацию полного заряда системы осуществляли

добавлением к моделям одновалентных ионов. Расчет траектории проводили в программе `mdrun` (GROMACS). Использован стандартный протокол оптимизации атомных параметров

Третий этап заключался в приведении атомных параметров моделей к условиям температуры 300 К. Расчет траектории осуществлялся в программе `mdrun` (GROMACS). Используются стандартные опции протокола приведения атомных параметров к температуре системы 300 К. Использовался термостат Берендсена [183].

Последний этап заключался в расчете молекулярной динамики системы при постоянной температуре (термостат “V-rescale”) и изотропном давлении (баростат Берендсена). Длина траектории молекулярной динамики задавалась 30 нс.

Анализ и преобразование форматов термодинамических траекторий осуществляли в программах `gmx trjconv`, `gmx rms`, `gmx hbond`, `gmx cluster` комплекса GROMACS [181]. `Gmx trjconv` позволила поделить траекторию на отдельные фреймы в формате PDB. `Gmx rms` использована для расчета СКО лиганда от первоначального положения. `Gmx hbond` использована для поиска пар атомов белка и лиганда, способных формировать водородные связи.

Молекулярно-динамические траектории комплексов *StTP*+ТНМ+PO₄ и *BsPyNP*+ТНМ+PO₄ делились на отрезки продолжительностью 100 пс. Координаты C_{α} атомов фермента (*StTP* или *BsPyNP*), соответствующие началу каждого промежутка, подвергались кластерному анализу с использованием функции `gmx cluster` пакета программ GROMACS. Для кластеризации использован метод одиночной связи (single linkage). Пространственная структура считалась принадлежащей к кластеру, если значение ее среднеквадратичного отклонения от любой структуры кластера было меньше порогового значения 0,11 нм. Кластеры соответствуют состояниям, в которые фермент переходит с вероятностью, равной отношению числа принадлежащих ему структур к общему количеству отсчетов времени.

II.9.1. Термодинамическое интегрирование

Для подсчета свободной энергии связывания ингибитора KIN59 с *StTP* в активном центре и в дополнительном сайте связывания использовался метод зонтичной выборки (Umbrella sampling). Для этого задавалась координата ξ , вдоль которой возможен переход лиганда из связанного в свободное состояние. Свободная энергия Гиббса для NPT-ансамбля, в таком случае, может быть записана следующим образом:

$$G(\xi) = -kT \ln P(\xi) \quad (1)$$

Молекулярно-динамические расчеты в рассматриваемом подходе делятся на два основных этапа. Оба этапа осуществлялись с использованием пакета программ GROMACS [181]. Первый заключается в выборе отдельных позиций лиганда вдоль направления ξ , позволяющих при дальнейшем моделировании покрыть все конфигурационное пространство системы белок-лиганд. Осуществление этого этапа проводилось с использованием набора функциональных параметров pulling, включенных в стандартные протоколы классической молекулярной динамики, реализуемой в программе GROMACS. Скорость передвижения лиганда задавалась 0,01 нм/пс при максимальной прикладываемой силе 1000 кДж/(моль*нм²). В результате молекулярной динамики с этими параметрами моделировался подвижный гармонический потенциал, градиент которого воздействовал на лиганд в заданном направлении. В результате лиганд постепенно перемещался более чем на 1,3 нм от белка, что превышало порог, заданный параметрами R_{vdw} и $R_{coulomb}$ и вело к прекращению взаимодействия белка с лигандом в рамках модели. Из полученной траектории выбирались положения лиганда, отвечающие различным координатам ξ с шагом 1 Å.

На втором этапе моделировалось взаимодействие белка с лигандом в каждом из выбранных положений в течении 5 нс. Для поддержания лиганда вблизи заданного положения использовался гармонический потенциал:

$$U(\xi, t) = k(\xi - \xi_{ref}(t))^2/2 \quad (2)$$

Если конфигурационное пространство не покрывалось полностью, брались дополнительные положения системы белок-лиганд с шагом в 1 Å. Такая процедура позволила покрыть целиком конфигурационное пространство системы, соответствующее переходу лиганда из связанного состояния в свободное (рис. 12 а,б).

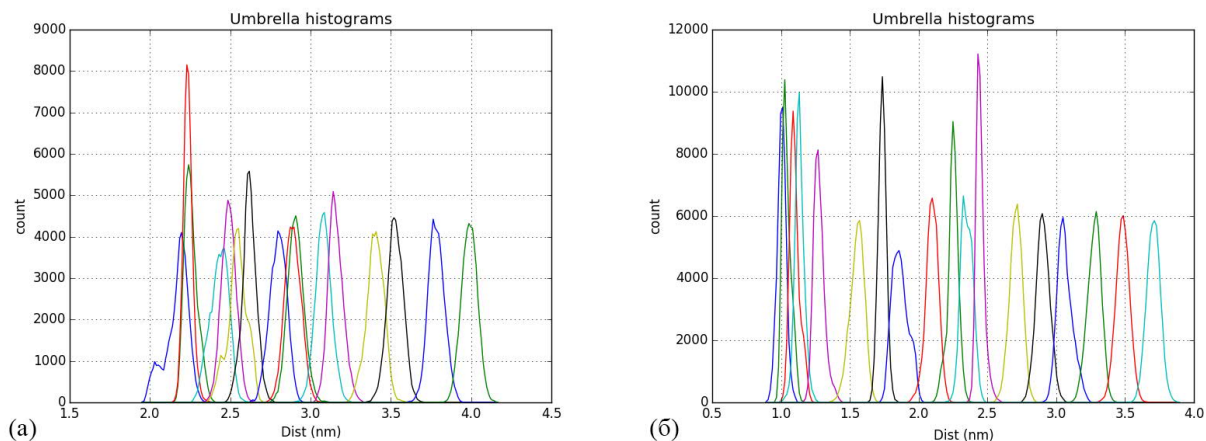


Рисунок 12. Распределение конформаций системы *StTP* – *KIN59* по расстоянию между их центрами масс в дополнительном сайте связывания (а) и в активном центре (б).

Для построения профиля свободной энергии по результатам зонтичной выборки использовался метод взвешенных гистограмм [184]. При этом на основании смещенных (в результате наличия дополнительного потенциала) гистограмм рассчитывается несмещенная плотность вероятности $P(\xi)$

II.10. Квантово-механическое/молекулярно-механическое моделирование.

Для определения частичных зарядов атомов фосфат-аниона в пакете программ NwChem проводился расчет методом квантово-механической/молекулярно-механической динамики (КМ/ММ) комплексов *StTP*+*PO4*, *VsPyNP*+*PO4* и *VsPyNP*+*PO4*, в котором Lys108 заменен на Met. Электронная структура атомов оценивалась в рамках теории функционала плотности. Использовался набор базисных функций 6-31G и обменно-корреляционный функционал B3LYP. Описание классической подсистемы было проведено с использованием силовых полей AMBER99. Для компенсации

свободной валентности, возникающей при разрыве ковалентных связей между атомами классической и квантовой подсистем, добавлялись атомы водорода, ковалентно-связанные с соответствующими атомами квантовой подсистемы. Расстояние от атома водорода до соответствующего атома ММ части задавалось в 6 раз меньше длины изначальной ковалентной связи. Для расчета частичных зарядов по Малликену использовался модуль NwChem Electrostatic Potential. Квантовые подсистемы рассматриваемых комплексов приведены на рис. 13. Система помещалась в кубический бокс, размеры которого ограничивались таким образом, чтобы минимальное расстояние между атомами системы и атомами периодического отображения составляло 1.2 нм. Для моделирования молекул растворителя использовалась сферическая модель воды SPC/E. Температура бокса поддерживалась постоянной на уровне 298.15 К при помощи алгоритма термостата Берендсена, а давление на уровне 1 атм при помощи баростата Берендсена.

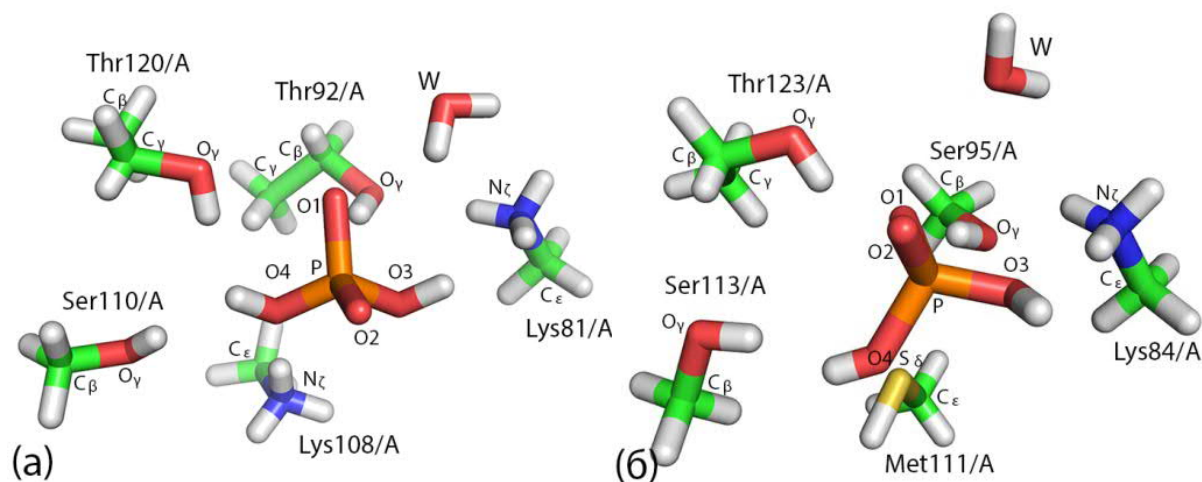


Рисунок 13. Пространственная организация области, описываемой в рамках квантовой механики, при расчете комплексов *BsPyNP+PO4* (а) и *StTP+PO4* (б).

Глава III. Результаты и обсуждение

III.1. Кристаллическая упаковка *StTP*

Пространственная группа симметрии кристаллов нативной тимидинфосфорилаз соответствовала $P2_12_12$ (№18). На независимую часть ячейки приходится димер тимидинфосфорилазы, принимающий характерную для тимидинфосфорилаз “S”-образную форму. Содержание растворителя в ячейке $\approx 47\%$. Коэффициент Мэтьюса - $2,32 \text{ \AA}^3/\text{Да}$. Кристаллографические контакты представлены водородными связями и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. В таблице 11 приведены основные водородные связи между гомодимерами *StTP* (PDB код 4XR5), связанными кристаллографической симметрией. Схематическое изображение кристаллической упаковки нативной *StTP* приведено на рис.14.

Таблица 11. Контакты между молекулами, связанными кристаллографической симметрией, нативной тимидинфосфорилазы (PDB код 4XR5).

Атомы остатков, образующих контакты	Расстояние, Å.	Оператор преобразования симметрии
NZ_Lys10A-O_Asp331A	3,39	X+1/2, -Y+1/2, -Z
OD2_Asp19A-O_Met338A	3,16	X+1/2, -Y+1/2, -Z
NZ_Lys73A-OD2_Asp292B	3,33	-X+1/2, Y+1/2, -Z
NE2_Gln288A-O_Ala298B	2,93	-X+1/2, Y+1/2, -Z
O_Ala298A-OD2_Asp346B	3,19	X+1/2, -Y+1/2, -Z
NZ_Lys299A-O_Asp346B	3,14	X+1/2, -Y+1/2, -Z
ND2_Asn306A-O_Lys418B	3,45	X+1/2, -Y+1/2, -Z
NZ_Lys308A-O_Leu423B	2,89	X+1/2, -Y+1/2, -Z
O_Asp331A-NZ_Lys10A	3,39	X+1/2, -Y+1/2, -Z
N_Ser340A-OD2_Asp19A	2,90	X+1/2, -Y+1/2, -Z
OE1_Gln372A-NZ_Lys426A	2,64	X, Y, Z
O_Leu423A-ND2_Asn78B	2,50	-X, -Y, Z
NZ_Lys426A-OE1_Gln372A	2,64	X, Y, Z
ND2_Asn78B-O_Leu423A	2,50	-X, -Y, Z
O_Pro131B-NH2_Arg436B	3,43	X, Y, Z
N_Gly132B-OE2_Glu222B	3,29	X, Y, Z
OE2_Glu222B-N_Gly132B	3,29	X, Y, Z
OG_Ser248B-NE2_Gln396B	3,37	-X, -Y, Z
OD2_Asp292B-NZ_Lys73A	3,33	-X+1/2, Y+1/2, -Z
O_Ala298B-NE2_Gln288A	2,93	-X+1/2, Y+1/2, -Z
OD2_Asp346B-O_Ala298A	3,19	X+1/2, -Y+1/2, -Z
OD1_Asp385B-OE1_Gln396B	2,84	-X, -Y, Z
NH1_Arg388B-OD2_Asp394B	3,08	-X, -Y, Z
NH2_Arg388B-OD2_Asp394B	2,52	-X, -Y, Z
OD1_Asp391B-NH1_Arg397B	3,00	-X, -Y, Z
OD1_Asp394B-OH_Tyr267B	3,43	-X, -Y, Z
OD2_Asp394B-NH2_Arg388B	2,52	-X, -Y, Z
OE1_Gln396B-OD1_Asp385B	2,84	-X, -Y, Z
NH2_Arg397B-OD2_Asp391B	2,74	-X, -Y, Z
OD2_Asp406B-OG_Ser324A	2,86	X+1/2, -Y+1/2, -Z
O_Lys418B-ND2_Asn306A	3,45	X+1/2, -Y+1/2, -Z
O_Ile421B-ND2_Asn306A	2,96	X+1/2, -Y+1/2, -Z
NH2_Arg436B-O_Pro131B	3,43	X, Y, Z

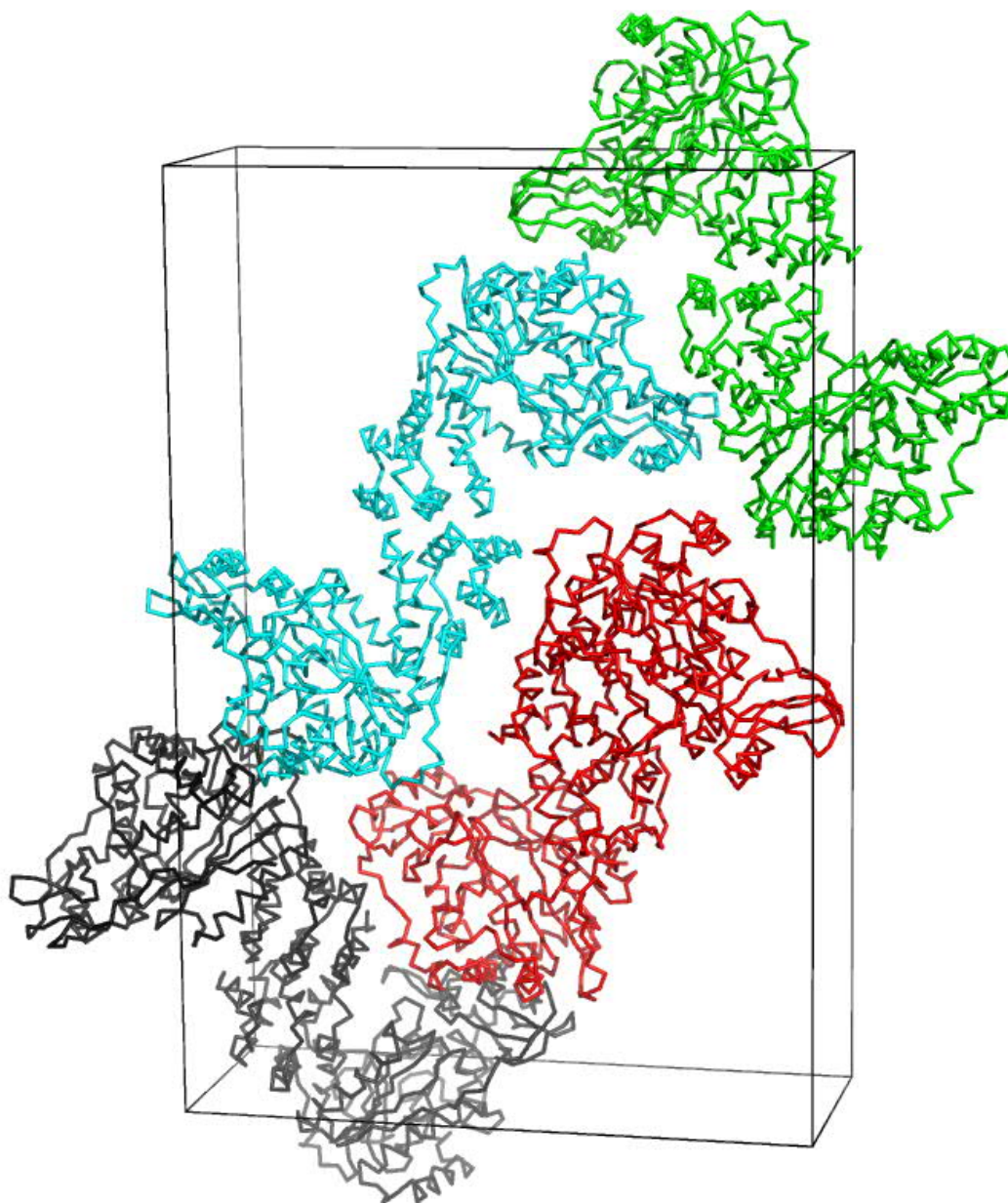


Рисунок 14. Схематическое изображение кристаллической упаковки димеров нативной *StTP* (PDB код: 4XR5). Пространственная группа $P2_12_12$. Димеры обозначены разными цветами.

Пространственная группа кристаллов комплексов *StTP* с лигандами соответствовала $I4$ (№79). Упаковка в этих кристаллах была менее плотная, чем в кристаллах нативной тимидинфосфорилазы. Содержание растворителя в ячейке $\approx 55\%$. Коэффициент Мэтьюса - $2,74 \text{ \AA}^3/\text{Да}$.

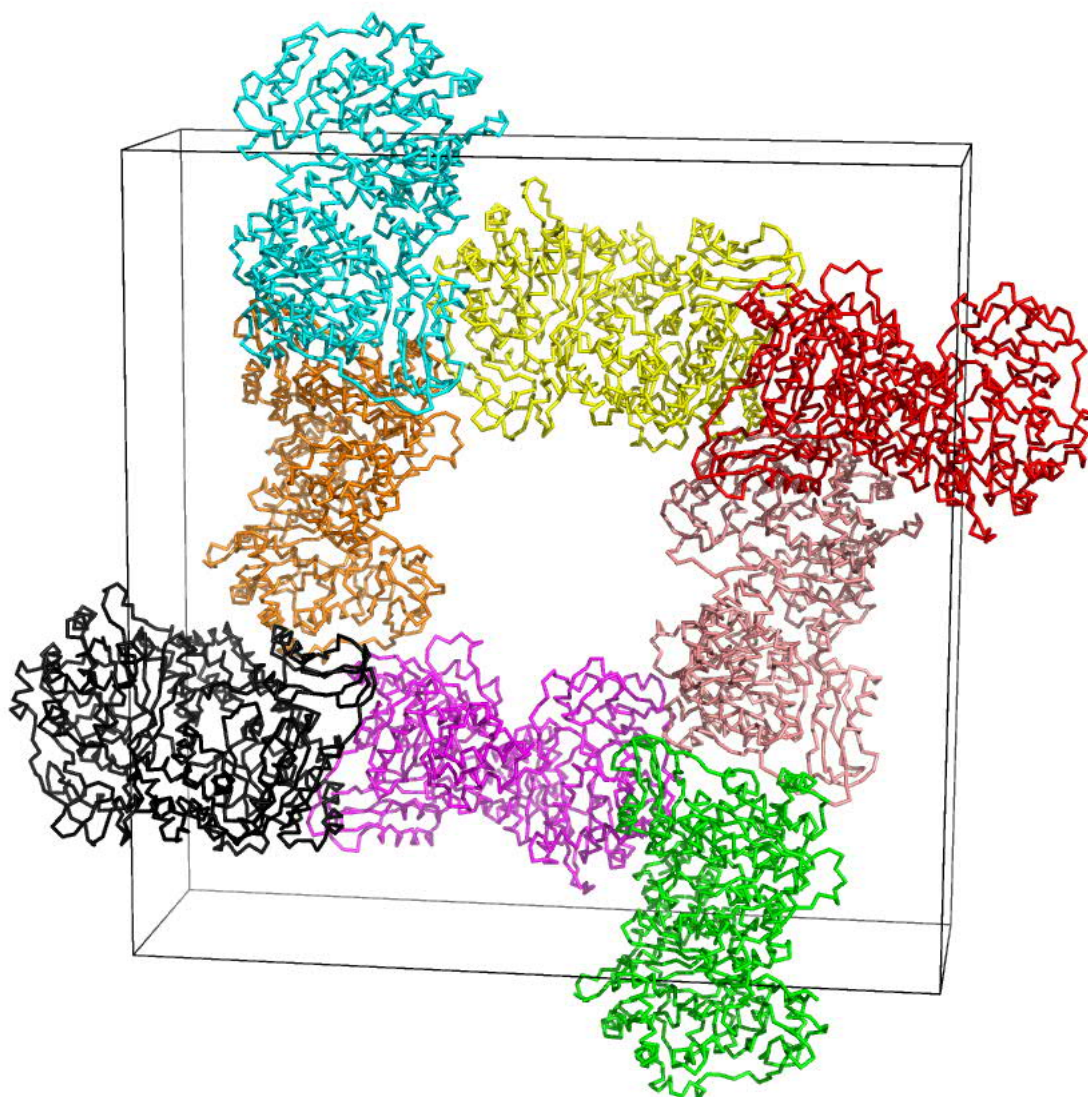


Рисунок 15. Схематическое изображение кристаллической упаковки димеров *StTP* в комплексе с тимидином (PDB код: 4YEK). Пространственная группа I4. Субъединицы *StTP*, приходящиеся на независимую часть элементарной ячейки, обозначены разными цветами.

Кристаллографические контакты для вероятных акцепторов и доноров водородных связей атомов белка *StTP* с лигандами с расстояниями, не превышающими 3,5 Å, приведены в таблице 12.

Таблица 12. Контакты между молекулами, связанными кристаллографической симметрией, тимидинфосфорилазы в комплексе с тимидином (PDB код 4YЕК).

Атомы остатков, образующих контакты	Расстояние, Å.	Оператор преобразования симметрии
NE2_Gln5A-O_Asp172B	2,83	X, Y, Z
OE1_Gln5A-O_Asp172B	3,46	X, Y, Z
NH2_Arg12A-O_Ala175B	2,9	X, Y, Z
OG_Ser35A-OE1_Glu36B	2,31	X, Y, Z
OE2_Glu36A-N_Gly37B	3,47	X, Y, Z
NE2_Gln38A-O_Ile173B	2,99	X, Y, Z
O_Asn78A-NZ_Lys341B	2,4	Y, -X, Z
OD1_Asn78A-OE1_Gln411B	2,96	Y, -X, Z
O_Asp172A-NE2_Gln5B	2,93	X, Y, Z
N_Ile173A-NE2_Gln5B	3,32	X, Y, Z
O_Ile173A-NE2_Gln38B	2,9	X, Y, Z
N_Thr174A-NE2_Gln5B	3,45	X, Y, Z
N_Ala175A-NE2_Gln5B	3,25	X, Y, Z
OH_Tyr214A-O_Gly265A	2,64	-X+1/2, -Y+1/2, Z+1/2
O_Glu266A-N_Arg436A	3,48	-X+1/2, -Y+1/2, Z+1/2
O_Leu289A-O_Ser340B	3,45	Y, -X, Z
OD2_Asp346A-OG_Ser374B	3,47	-Y+1/2, X+1/2, Z+1/2
OD1_Asp406A-O_Asp305B	3,15	-Y+1/2, X+1/2, Z+1/2
N_Glu407A-O_Asp305B	3,45	-Y+1/2, X+1/2, Z+1/2
N_Ala408A-O_Asp305B	2,86	-Y+1/2, X+1/2, Z+1/2
O_Ala419A-OG1_Thr376B	3,19	-Y+1/2, X+1/2, Z+1/2
NZ_Lys426A-OD2_Asp406B	3,23	-Y+1/2, X+1/2, Z+1/2
N_Arg436A-O_Glu266A	3,48	-X+1/2, -Y+1/2, Z+1/2
OE1_Glu20B-NZ_Lys308B	3,45	-Y+1/2, X+1/2, Z+1/2
OE1_Glu36B-OG_Ser35A	2,31	X, Y, Z
OE2_Glu36B-OG_Ser35A	3,15	X, Y, Z
N_Gly37B-OE2_Glu36A	3,47	X, Y, Z
NE2_Gln38B-O_Ile173A	2,9	X, Y, Z
O_Ile173B-NE2_Gln38A	2,99	X, Y, Z
N_Ala175B-NE2_Gln5A	3,37	X, Y, Z
O_Ala175B-NH2_Arg12A	2,9	X, Y, Z
NZ_Lys308B-OE1_Glu20B	3,45	Y+1/2, -X+1/2, Z+1/2
OE1_Glu311B-OG_Ser18B	3,46	Y+1/2, -X+1/2, Z+1/2
OE2_Glu311B-OG_Ser18B	3,11	Y+1/2, -X+1/2, Z+1/2
O_Ser324B-OE2_Glu6B	2,86	Y+1/2, -X+1/2, Z+1/2

O_Ala337B-NZ_Lys299A	3,2	-Y, X, Z
O_Met338B-NZ_Lys299A	3,27	-Y, X, Z
N_Ser340B-NZ_Lys299A	3,27	-Y, X, Z
OG_Ser374B-OD2_Asp346A	3,47	Y+1/2, -X+1/2, Z+1/2
OG1_Thr376B-O_Ala419A	3,19	Y+1/2, -X+1/2, Z+1/2
OD2_Asp406B-NZ_Lys426A	3,23	Y+1/2, -X+1/2, Z+1/2
OE1_Gln411B-OD1_Asn78A	2,96	-Y, X, Z

В межсубъединичном взаимодействии молекулы *StTP* принимают участие а.о. α -спиралей Н1, Н3 и Н8 α -доменов обеих субъединиц гомодимера *StTP* (рис. 16 и 17). Площадь интерфейса взаимодействия составляет ~5% от всей поверхности субъединицы (915 \AA^2 к 17653 \AA^2), а значение свободной энергии сольватации составляет по данным PDBePISA [185] -11,2 ккал/моль. Связывание между субъединицами димера осуществляется в основном за счет водородных связей, параметры которых совпадают с описанными в [97].

Таблица 13. Контакты между субъединицами гомодимера *StTP* (PDB код: 4XR5) в нелигандированном состоянии.

Атомы остатков, образующих кристаллографические контакты	Расстояние, \AA .
OE1_Gln5A - N_Ala175B	2,61
OE1_Gln5A - O_Asp172B	3,14
NE2_Gln5A - O_Asp172B	3,12
NH2_Arg12A - OD2_Asp178B	2,78
OG_Ser35A - OE2_Glu36B	3,35
N_Glu36A - OE2_Glu36B	2,73
OE2_Glu36A - OG_Ser35B	3,15
OE2_Glu36A - N_Gly37B	2,87
NE2_Gln38A - O_Ile173B	2,78
O_Asp172A - OE1_Gln5B	2,53
O_Asp172A - NE2_Gln5B	3,16
O_Ile173A - NE2_Gln38B	3,07
N_Ala175A - NE2_Gln5B	2,62

III.2. Пространственная структура *StTP*

Мономер тимидинфосфорилазы бактерии *Salmonella typhimurium* (*StTP*) состоит из 440 аминокислотных остатков (GenBank: APF16545.1; [95]). Двадцать два а.о. отличают его от аналогичного фермента бактерии *Escherichia*

coli (*EcTP*). В свою очередь идентичность первичной структуры бактериальных тимидинфосфорилаз и тимидинфосфорилазы человека (*hTP*) составляет ~39%. Выравнивание по первичной структуре *StTP* и *hTP* приведено на рис.9. Субъединица *StTP*, как и других бактериальных тимидинфосфорилаз [97] состоит из двух доменов, первый из которых 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, включающий как α -спирали, так и β -тяжи (α/β – домен) (рис.17). На границе раздела доменов в этих ферментах располагается активный центр. В первых работах по тимидинфосфорилазе *E. coli* [97] установлено, что субстраты фосфоролитической реакции, тимидин и фосфат-анион, локализуются в отдельных сайтах связывания, расположенных на противоположных поверхностях «каньона» (рис.18) между доменами, и отстоят друг от друга на ~ 9 Å.

Предполагается, что для прохождения реакции необходимо сближение доменов и переход субъединицы в закрытую конформацию, что подразумевает образование водородных связей между а.о. петли L18 (рис.17 и 18) и а.о. α -домена [104].

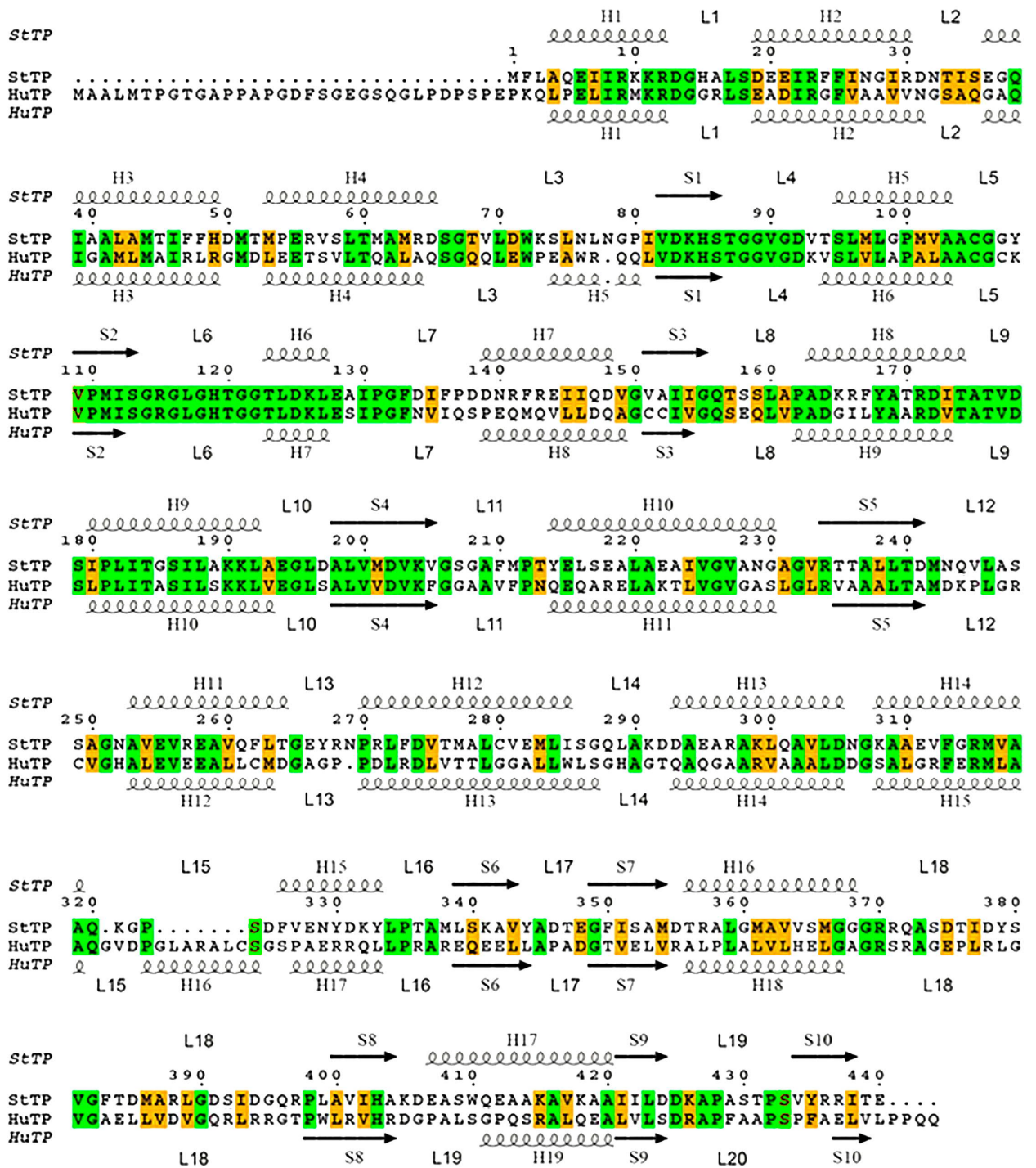


Рисунок 16. Выравнивание по первичной структуре тимидинфосфорилаз *StTP* и *hTP* с элементами вторичной структуры *StTP* (сверху) и *hTP* (снизу). Отмечены идентичные (зеленым) и гомологичные (оранжевым) аминокислотные остатки. Рисунок выполнен при помощи онлайн сервиса ESPrift 3.0 [186]

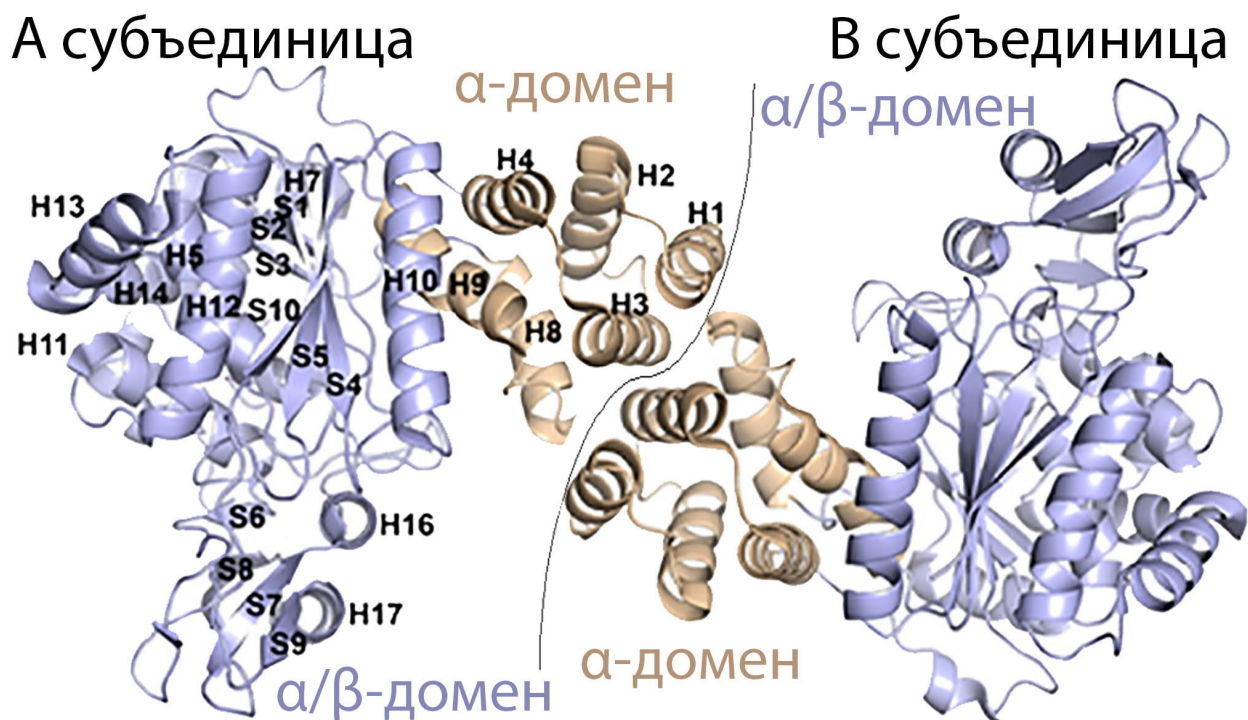
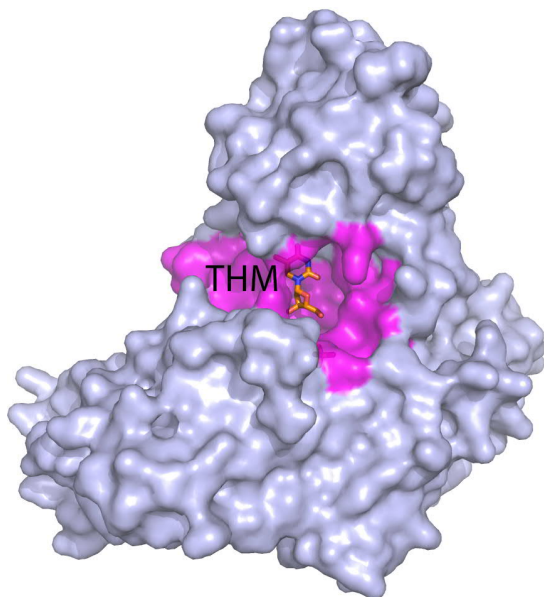


Рисунок 17. Строение гомодимера *StTP* в нелигандированном состоянии. Малый α -домен показан желтым цветом, α/β -домен – синим. Обозначены элементы вторичной структуры. Рисунок выполнен с использованием программы PyMOL [187].

Рисунок 18. Положение молекулы тимидина (ТНМ) в каньоне между доменами *StTP*



По данным программы DSSP [188] количество α -спиральных фрагментов в *StTP* составляет 46%, а β -тяжей 13%. Стоит отметить, что, несмотря на низкую гомологию первичных структур бактериальных тимидинфосфорилаз (*StTP* и *EcTP*) и TP человека (*hTP*), элементы вторичной структуры в достаточной

степени консервативны (рис.16). В *StTP* также как и в *EcTP* и в *hTP* домены связаны между собой тремя петлями: L3 (а.о. 66-81), L8 (а.о. 156-162) и L10 (а.о. 193-197) по нумерации *StTP* (см. рис.16). Из всех а.о. принадлежащих этим петлям в бактериальных TP 10 а.о. (36%) негомологичны при сравнении бактериальных TP (*StTP* и *EcTP*) с *hTP* (рис.16). Из них Val69, Lys73, Ser74, Asn76, Leu77, Asn78, Gly79 и Pro80 в *StTP* принадлежат петле L3 (рис.16). А в *hTP* Glu106, Trp108, Arg109, Asp110, Asp111 в *hTP* соответствующие по выравниванию Ser74, Asp 76, Leu77, Gly79 в *StTP* входят в α -спираль H5 (рис. 16), отсутствующую в бактериальных TP. Аналог Asn78 отсутствует в *hTP*. Таким образом, возможно, что петля L3 принимает меньшее участие в каталитически-значимом междоменном движении по сравнению с L8 и L10 (рис.16).

Отличие бактериальных TP от TP человека заключается также в наличии у последней α -спирали H16 (нумерация *hTP*). Эта α -спираль принадлежит α/β -домену, и состоит почти полностью из а.о. отсутствующих в *StTP* и *EcTP* в сравнении с *hTP* (а.о. 357-371 по нумерации *hTP*). Длина α -спирали H7 (по нумерации *StTP*) в *hTP* меньше на 4 а.о., чем у бактериальных TP. Остальные элементы вторичной структуры консервативны, как по положению в первичной структуре, так и по длине.

III.2. Пространственная структура *BsPyNP* и ее сравнение с *StTP*

Аминокислотная последовательность широко специфичной пиримидин нуклеозидфосфорилазы из *Bacillus subtilis* включает в себя 433 аминокислотных остатка, а идентичность первичных последовательностей *BsPyNP* и *StTP* составляет 44 %. Четвертичная структура *BsPyNP* представляет собой гомодимер (рис. 19а), в котором каждая субъединица состоит из двух доменов: α -домена (содержит лишь α -спиральные фрагменты) и α/β -домена (содержит α -спирали и β -тяжи) аналогично *StTP* (рис.19б). Оба фермента относятся к NP-II-

семейству нуклеозидфосфорилаз [189]; молекула каждого состоит из двух субъединиц, обладающих доменной структурой.

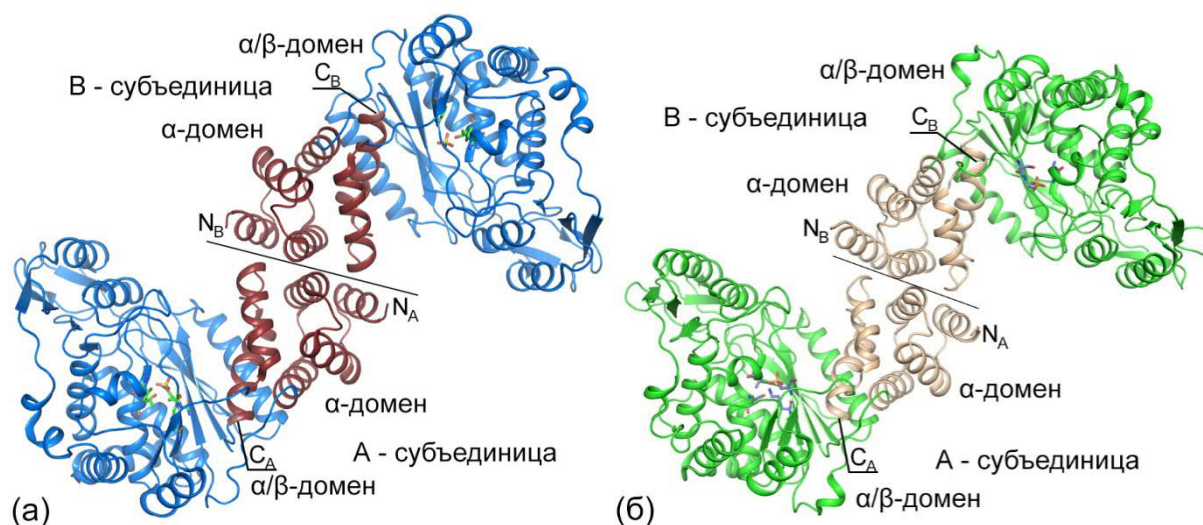


Рисунок 19. Гомодимеры *BsPyNP* (а) и *StTP* (б) в ленточном представлении.

Для выявления ключевых различий бактериальных TP и PyNP провели выравнивание по первичной структуре (с использованием программы Clustal Omega [190]) и анализ элементов вторичной структуры (с использованием программы DSSP [188]). Выравнивание проводилось для представителей обеих групп ферментов, координаты структур которых присутствуют в международном банке данных белковых структур (рис. 20). Вторичная структура анализировалась для *BsPyNP* и *StTP*. На основании выравнивания выявлено, что 38 а.о. являются специфичными для каждого типа ферментов семейства NP-II пиримидинфосфорилаз, т.е. консервативными для всех TP в отдельности и для всех PyNP в отдельности. В [104] описан β -лист, присутствующий исключительно в PyNP. Тем не менее в пространственной структуре *StTP* этот β -лист также обнаружен. Различия первичных структур TP и PyNP сказываются как на этапе подготовки фермента к катализу, так и при осуществлении фосфорилиза нуклеозидов, что в итоге и приводит к различиям в субстратной специфичности. Влияние различных факторов на субстратную специфичность TP и PyNP рассматривается далее.

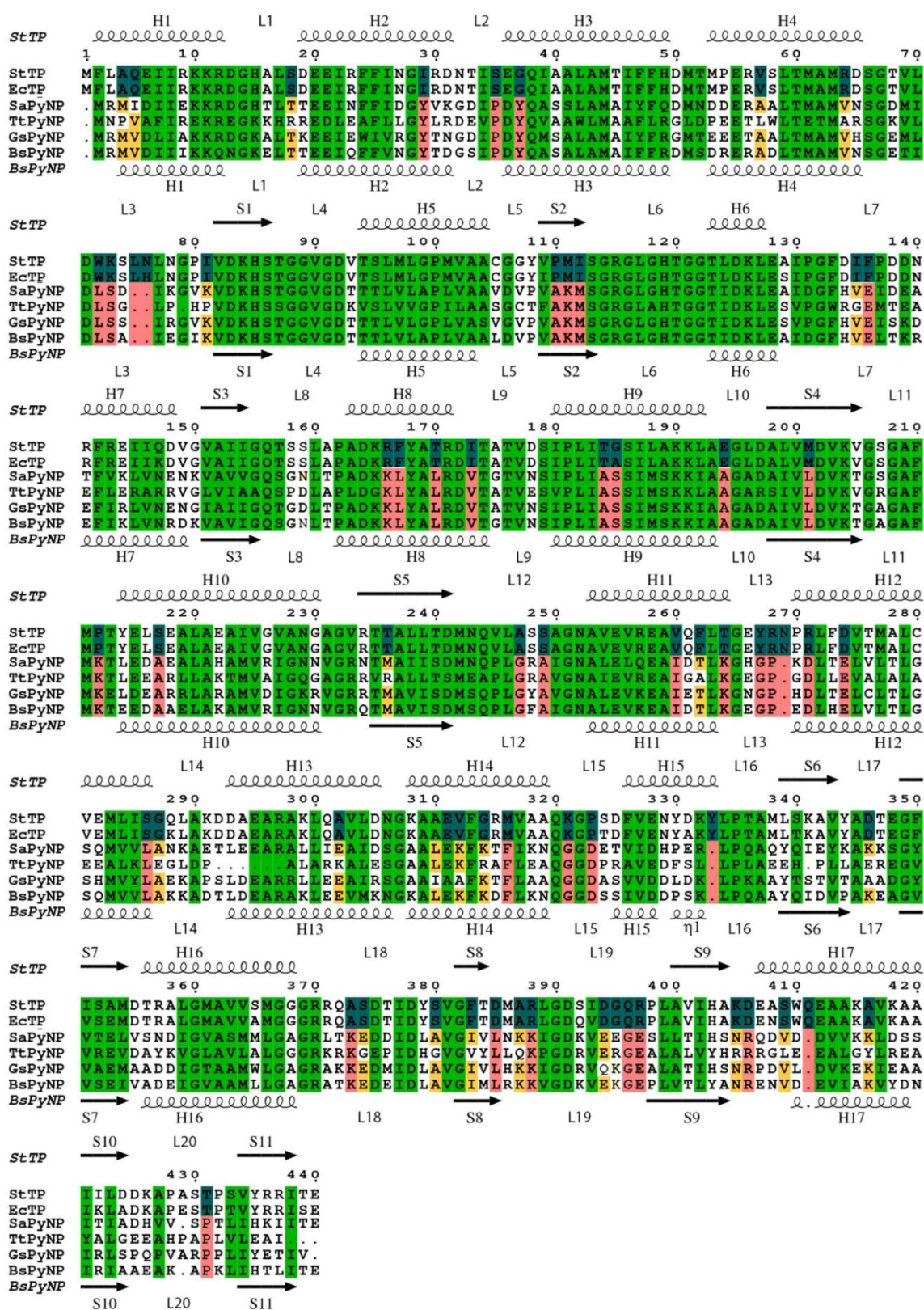


Рисунок 20. Выравнивание по последовательности а.о. тимидинфосфорилаз из *Salmonella typhimurium* (StTP; 5EP3) и *Escherichia coli* (EcTP; 4EAF) и пиримидин нуклеозидфосфорилаз из *Staphylococcus aureus*

(*SaPyNP*; 3H5Q), *Thermus thermophilus* (*TtPyNP*; 2DSJ), *Geobacillus stearothermophilus* (*GsPyNP*; 1BRW) и *Bacillus subtilis* (*BsPyNP*; 5EP8). На рисунке приведены элементы вторичной структуры *StTP* (сверху) и *BsPyNP* (снизу). Обозначены а.о., специфичные для TP (синий) и PyNP (красный) и гомологичные для всех рассматриваемых фосфорилаз (зеленый).

III.3. Влияние междоменных взаимодействий PyNP и TP на их субстратную специфичность.

В международном банке данных белковых структур присутствуют пространственные структуры TP и PyNP, в которых обнаружена закрытая конформация субъединиц молекул фермента: структура TP человека (PDB код 1UOU) и структура PyNP из *Geobacillus stearothermophilus* (*GsPyNP*; PDB код 1BRW). Пространственные структуры бактериальных TP с закрытой конформацией субъединицы отсутствуют.

В hTP взаимодействие между доменами субъединицы в закрытой конформации осуществляется за счет водородных связей, образуемых Tyr199, Arg146, Asp203, Gly149, Lys222, Ile143, His116, Asp114, Leu223, Val224, Leu102. Согласно выравниванию по первичной структуре в *GsPyNP* им соответствуют Tyr165, Arg112, Asp169, Gly115, Lys191, Met109, His82, Asp80, Ile189, Ala190, Leu71, образующие схожие по длинам связи. Максимальное различие длин связей составляет 0,2 Å, что не превышает значения ошибки уточнения координат DPI (табл. 8). Однако при рассмотрении закрытой конформации субъединицы *GsPyNP* оказывается, что при образовании такой конформации существенную роль играют взаимодействия а.о. второй субъединицы димера: Tyr36 (Ala63 в hTP), Gln37 (Gln64 в hTP), Asp5 (Glu32 в hTP) и Asp32 (Thr59 в hTP) из субъединицы B, формируют водородные связи с Trp360, Lys367, Lys368 из субъединицы A (Trp403 в hTP, Lys367 и Lys368 отсутствуют в hTP, а в *StTP* им соответствуют Gln372 и Ala373). В hTP

подобных взаимодействий нет, поскольку Lys368 и Lys367 в ней отсутствуют, а Tyr36 (*BsPyNP*) заменен на Ala.

Контакты между доменами в TP и PyNP также осуществляются за счет гидрофобных взаимодействий, которые присутствуют и в открытой конформации субъединицы [8, 28].

С целью определения различий в междоменных взаимодействиях в субъединицах PyNP и TP проведено МД-моделирование. Согласно [28] предполагалось, что субъединица TP постоянно переходит из открытой конформации в закрытую и обратно. Для определения вероятности этих состояний, траектории движения атомов двух систем: *StTP* с тимидином и фосфат-анионом и *BsPyNP* с этими же лигандами, делились на отрезки по 100 пс и подвергались кластерному анализу. В результате было определено, что *StTP* в течение 50 нс в основном находится в трех конформациях с вероятностями 54, 16 и 15%. Отметим, что каждому домену соответствует одно гидрофобное ядро. Для определения степени закрытости субъединицы рассчитан угол, образуемый прямыми, соединяющими центры гидрофобных ядер обоих доменов с общим центром петель (L3, L8 и L10), их связывающих (далее θ , см. Рис. 21).

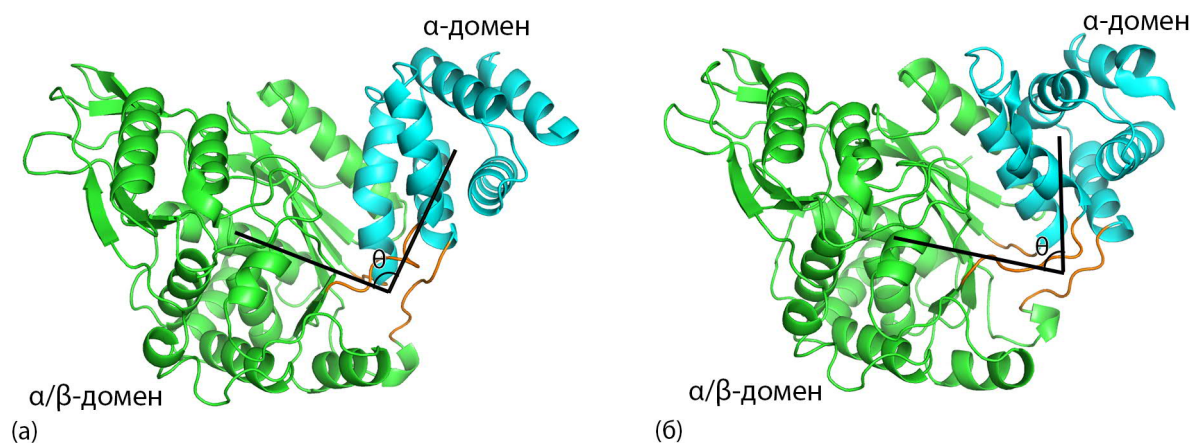


Рисунок 21. Открытая (а) и закрытая (б) конформации *StTP* (б).

Расчет осуществлялся в разработанной авторами программе на базе MatLab R2014b (Math Works, Natick, MA, USA). Значение θ для А субъединицы *GsPyNP*, находящейся в закрытой конформации, составляет 46° . Значения θ для

трех основных конформаций *StTP* составляют $44\pm 1^\circ$ (закрытая конформация, вероятность 54%), $41\pm 1^\circ$ (закрытая конформация, вероятность 16%) и $49\pm 1^\circ$ (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 θ , равный $49\pm 1^\circ$, а второму – $45\pm 1^\circ$. 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*.

III.4. Активный центр

III.4.1. Фосфат-связывающий сайт

Сульфат-анион, структурно похожий на субстрат TP фосфат-анион, был локализован в комплексах *StTP* с сульфат-анионом в обеих субъединицах, в комплексе с тимидином в субъединице В и в комплексе *StTP* с цитидином в субъединице В. Сульфат-анион локализуется в кармане, образованном β -тяжем S1, концами петли L6 и поворотом между S1 и α -спиралью H5 (см рис.16, 17, 22). Водородные связи, формируемые сульфатом с а.о. активного центра *StTP* (PDB код 4X46), приведены на рис. 22а.

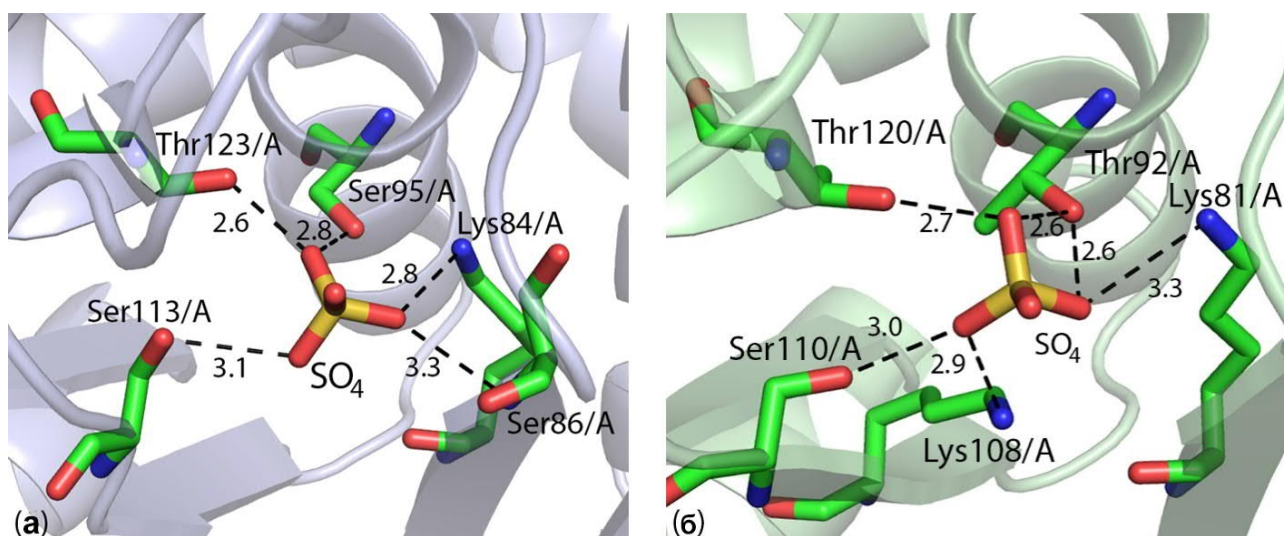


Рисунок 22. Пространственная организация активного центра комплекса с сульфат-анионом *StTP* (а) и *BsPyNP* (б).

Фосфат-анион и сульфат-анион практически совпадают по характеристикам взаимодействия. Валентность фосфора равна 5. К фосфат-аниону при рН оптимуме ТР присоединены два водорода, а к сульфат-аниону один. Заряд у фосфат-аниона и сульфат-аниона при этом совпадает. В PDB банке отсутствуют структуры ТР с ионом фосфата, но присутствует несколько структур с ионом сульфата. Например, структуры ТР *E.coli*, депонированные в PDB банк: 2ТРТ и 4ЕАФ. Авторы [101] на основании этих структур утверждают, что связывание фосфат-аниона (сульфат-аниона) приводит к движению доменов ТР. По мнению авторов [101], оно индуцируется стабилизацией петли L6 (а.о. 114-122), которое приводит к формированию стабильной водородной связи между NE2 атомом боковой цепи His119 и O атомом основной цепи Gly208 (рис.3). В *StTP* все а.о. петли L6 обладают высокими значениями В-фактора в сравнении со средними значениями для каждой структуры, как для нелигандированной, так и для структур комплексов *StTP* с тимидином и уридином. Например, для В субъединицы комплекса *StTP*+ТНМ средний В фактор атомов белка составляет $67,4 \text{ \AA}^2$, а среднее его значение для а.о. петли L6 составляет 113 \AA^2 . Расстояние же между NE2 атомом His119 и O атомом Gly208 в В субъединице комплекса *StTP*+ТНМ составляет

3,7 Å, несмотря на наличие и сульфат-аниона и тимидина в области активного центра. Таким образом, влияние водородной связи His119 – Gly208, описанное авторами [101], на стабилизацию петли L6 не наблюдалось в *StTP*.

III.4.2. Влияние различий пространственной организации фосфатсвязывающего сайта PyNP и TP на их субстратную специфичность.

Положения сульфат-аниона в фосфат-связывающем сайте *BsPyNP* (PDB код 5EP8) приведено на рис. 22б. Максимальное различие в длинах водородных связей белок–лиганд при сравнении а.ц. *StTP* и *BsPyNP* составляет 0,2 Å, что меньше величины ошибки уточнения координат (DPI, табл. 8). В *BsPyNP* положения сульфата в фосфат-связывающих сайтах двух субъединиц димера различаются: при суперпозиции пространственных структур обеих субъединиц по C_α-атомам расстояние между атомами серы составляет 3,4 Å. Проведено сравнение ферментативных сайтов связывания субстратов PyNP и TP для A-субъединиц *BsPyNP*+SO₄ и *StTP*+SO₄. В *BsPyNP* в сайт связывания фосфата входят Lys81, Thr92, Lys108, Ser110, Thr120. В *StTP* с сульфат-анионом контактируют Lys84, Ser86, Ser95, Met111, Ser113, Thr123 (рис. 22). Вместо Ser95 во всех рассматриваемых PyNP за исключением *TtPyNP* присутствует Thr92. В *TtPyNP*, как и в TP, присутствует Ser92. В комплексе *StTP*+SO₄ сульфат-анион контактирует с N_Ser86, а в *BsPyNP*+SO₄ эта связь отсутствует (рис. 22). Кроме того, в PyNP с сульфатом контактирует Lys108, которому в TP, согласно результатам выравнивания последовательностей а.о., соответствует Met111. В TP и PyNP различаются следующие а.о.: Ala107 в PyNP вместо Pro110 в TP и Met109 в PyNP вместо Ile112 в TP.

Для определения важности замены Lys108 на Met108 (K108M) для прохождения реакции в *BsPyNP* с использованием QM/MM проведено моделирование комплексов *StTP*+PO₄, *BsPyNP*+PO₄ и *BsPyNP* (K108M)+PO₄ и вычислены заряды атомов фосфатной группы. Разными оказались заряды атома кислорода гидроксильной группы фосфат-аниона, контактирующего посредством водородной связи с Lys108 в *BsPyNP*. В *StTP* его частичный заряд

равен $-1,07e$, а в *BsPyNP* $-0,75e$. Заряд атома водорода, образующего гидроксильную группу с рассматриваемым атомом кислорода, в *SfTP* составляет $0,61e$, а в *BsPyNP* $0,28e$. Тем не менее, замена Lys108 на Met108 в *BsPyNP* привела лишь к незначительному изменению заряда этого атома кислорода ($-0,76e$). Заряд атомов фосфатной группы зависит не только от близлежащих а.о., но и от ее положения. Можно предположить, что специфичное положение фосфатной группы в *PyNP* зависит не только от Lys108, но и от Ala107 и Met109. Так, как только Lys108 был изменен при моделировании, положение фосфатной группы не изменилось в степени достаточной для того, чтобы заряд кислорода фосфат-аниона изменился значительно.

К настоящему моменту неизвестно, какой из механизмов нуклеофильного замещения более предпочтителен для нуклеозидфосфорализ *NP-II* семейства. Так, в [191] предполагается, что реакция может проходить без участия фосфат-аниона, а в [192] и [107] указывается на необходимость нуклеофильной атаки фосфат-анионом. Можно предположить, что для нуклеозидфосфорилаз *NP-II* семейства характерен смешанный механизм нуклеофильного замещения. Большая полярность кислорода фосфатной группы в *SfTP* в сравнении с *BsPyNP* необходима для прохождения реакции нуклеофильного замещения в *TP* в большей степени по механизму S_N2 , т.е. в присутствии фосфат-аниона. При этом реакция такого рода осуществляется лишь для тимидина, а S_N1 -механизм в *BsPyNP* приводит к расщеплению как тимидина, так и уридина, поскольку для осуществления реакции по S_N1 механизму нет необходимости в сближении доменов. Важно также отметить, что природа нуклеофила влияет лишь на реакции проходящие по S_N2 механизму.

III.4.3. Нуклеозид -связывающий сайт

В активных центрах обеих субъединиц гомодимера *SfTP* (PDB код 4YEK) были обнаружены молекулы тимидина (ТНМ). Основные водородные связи,

формируемые тимидином с атомами а.о. активного центра *StTP* приведены на рис.23а. В субъединице А этого комплекса связи аналогичны по геометрии и отличаются по длине не более, чем на ошибку уточнения координат ($DPI = 0,25 \text{ \AA}$).

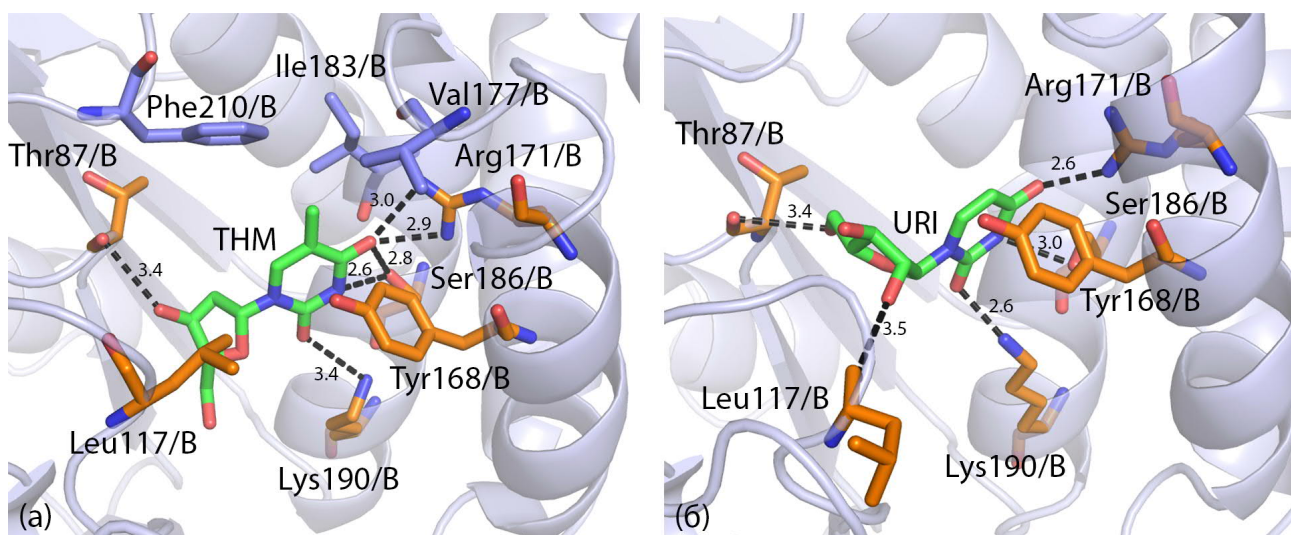


Рисунок 23. Пространственная организация активного центра комплекса *StTP* с тимидином THM (PDB код: 4YEK) (а) и уридином URI (PDB код: 4YYY) (б).

В структуре комплекса TP с уридином (URI; PDB код 4YYY) молекула уридина была локализована лишь в активном центре субъединицы В (рис.23б). Уридин не является субстратом TP, однако значение K_m для него при связывании с TP в 5 раз меньше (60 мкМ по сравнению с 300 мкМ), чем у тимидина [105]. Сродство к урдину, таким образом, оказывается даже выше, чем к нативному субстрату – тимидину. Положение пиримидиновой компоненты уридина в *StTP*+URI (PDB код 4YYY) схоже с положением аналогичной группы молекулы тимидина в комплексе *StTP*+THM (PDB код 4YEK). Основные водородные связи, формируемые уридином с атомами а.о. активного центра *StTP* приведены на рис.23б. По данным кинетических исследований именно замена Arg171 на Glu или на Ser, которая меняет, таким образом, заряд этого а.о. на отрицательный, приводит к потере активности TP

[103]. Замена Ser186 на Gly также приводит к потере ферментативных свойств. Связывание тимидина и уридина происходит также за счет перпендикулярного стекинг- взаимодействия пиримидинового кольца тимидина с боковой цепью Tyr168. Расстояние между центрами пиримидиновой компоненты тимидина и боковой группы Tyr168 5,2 Å для ТНМ (в обеих субъединицах) и 4,7 Å для URI. Замена Tyr168 на другие а.о., обладающие гидрофобными свойствами приводит к уменьшению активности почти в 2 раза при замене на Leu, в 3 раза меньше при замене на Phe и лишает TP активности при замене на Ala [103]. Следовательно, при связывании тимидина важно не только стекинг- взаимодействие, но и образование водородной связи между кислородом Tyr168 и кислородом пиримидинового кольца субстрата. Аминокислотные остатки, принимающие участие во взаимодействии с субстратами, консервативны у TP низших и высших организмов (Рис.16). Метильная группа в 5-ом положении пиримидинового кольца тимидина расположена внутри гидрофобного кармана, включающего а.о. Val177, Ile183, Phe210, из которых лишь Phe210 является неконсервативным среди рассматриваемых TP, и вместо него в hTP присутствует Val. Интересно, что добавление к уридину в 5 положении метильной группы, приводит к небольшому увеличению K_m (100 мкМ)[105].

Замена Ile183 на Ala приводит к уменьшению активности TP в 1,5 раза [103]. Одним из критериев гидрофобности служит значение разности энергий Гиббса при переносе а.о. из воды в октанол [193]. Для Ala это значение составляет -0,4, а для Ile -1,6 [193], что подтверждает важность гидрофобных взаимодействий при связывании тимидина ферментом. Стоит, однако, отметить, что обнаруженный эффект может быть связан с большим объемом Ile и увеличением ван-дер-ваальсовых взаимодействий белка с ТНМ. Подтверждается это также и тем, что отсутствие 5-метильной группы лиганда (2'-дезоксиуридин) приводит к четырехкратному уменьшению отношения

каталитической константы скорости реакции (k_{cat}) к константе Михаэлиса (K_m): k_{cat}/K_m 0,18 с/мкМ по сравнению с 0,66 с/мкМ [105].

Положение рибозной компоненты уридина отличается в $StTP+URI$ в сравнении с комплексом $StTP+ТНМ$. Рибозная компонента URI образует две водородные связи с а.о. фермента (с Leu117 и Thr87), а ТНМ лишь одну (с Thr87) (Рис. 23). СКО между координатами атомов фуранозных компонент лигандов равно 4 Å. Отличающееся положение рибозной компоненты может быть связано с отсутствием второго субстрата (фосфат-аниона) или псевдосубстрата (сульфат-аниона) в структуре $StTP+URI$. В сайте связывания фосфата комплекса $StTP+URI$ был локализован цитрат, C2 атом которого находится на расстоянии ~4 Å от C5' атома тимидина при совмещении В субъединиц структур $StTP+URI$ и $StTP+ТНМ$.

Объяснить отличие в положении рибозной компоненты лигандов (уридина и тимидина) в активном центре TP можно также тем, что наличие гидроксильной группы в 2' положении у URI приводит к изменению положения гидрофобной боковой группы а.о. Leu117: она поворачивает на ~180° вокруг оси проходящей через ее основную цепь. Сдвиг боковой группы Leu117 приводит к смещению его основной цепи в направлении URI и образованию связи с O2' атомом уридина. Leu117 принадлежит петле L6. Аминокислотные остатки этой петли являются консервативными среди TP высших и низших организмов (рис.16). Авторы статьи [101] предположили, что эта петля ответственна за междоменные взаимодействия, и ион фосфата, стабилизируя ее, приводит к образованию стабильной связи His119 с Gly208. Как отмечалось ранее, все а.о. петли L6 обладают высокими значениями В-фактора в сравнении со средними значениями для каждой структуры, как для нелигандированной, так и для структур комплексов $StTP$ с тимидином и уридином. Стабилизация петли L6, таким образом, не наблюдается в $StTP$. Изменение положения рибозной компоненты при замене ТНМ на URI может быть также связано с отсутствием у URI метильной группы в 5 положении, что приводит к

уменьшению аффинности TP к этой группе и, как следствие, способствует смещению рибозной компоненты. Это могло бы объяснить небольшое увеличение значения K_m в 5-метилуридине [105] в сравнении с уридином (см. выше).

Связь, образуемая O5' с а.о. фермента не является определяющей ни для уридина, ни для тимидина. По данным кинетических исследований отсутствие этого атома не приводит к уменьшению k_{cat}/K_m [105]. Тем не менее, добавление к C5' более электроотрицательного атома приводит или к уменьшению активности в 100 раз при замене O5' на Cl ($k_{cat}/K_m = 0,006$ для 5'-хлор-5'-дезокситимидина) или же к полной потере активности при замене его на Br или I [105]. Тем не менее, обнаруженный эффект может быть связан и с большим объемом атомов Cl или Br в сравнении с O.

III.5. Молекулярное моделирование потенциальных ингибиторов PyNP.

Проведен виртуальный скрининг соединений из базы данных ZINC с целью обнаружения соединений, способных связываться с активным центром PyNP и не связываться с активным центром TP. Из ~ 9000 соединений, отобранных на основании правила «пяти» Липински и наличия пиримидиновой группы, выбрано четыре соединения. Взаимодействие каждого из них с *Bs*PyNP или *St*TP моделировалось с использованием методов классической молекулярной динамики с длиной траектории 30 нс. По окончании моделирования одно из четырех соединений оставалось в области фосфатсвязывающего сайта. На рис. 24 приведен фрагмент пространственной структуры комплекса *Bs*PyNP, где происходит связывание фермента с этим соединением: 2-пиримидин-2-ил-1H-имидазол-4-карбоновой кислотой. Три других соединения при моделировании постепенно сместились на расстояние более 10 Å от своего первоначального положения. Интересно отметить, что найденное стабильное соединение обладает карбоксильной группой, расположенной на расстоянии водородной связи от аминокислотной группы а.о. Lys108,

специфичного для РyNP (рис. 20 и 22, и разд. III.4.2.). Для валидации полученных результатов проводилась серия расчетов молекулярного докинга с изменением положения ячейки докинга (смещение вдоль направления от фосфат-связывающего сайта к нуклеозид-связывающему сайту). При смещении ячейки менее чем на 1,5 Å, результат докинга совпадал с результатом виртуального скрининга, а при большем смещении ячейки лиганд локализовался в области нуклеозид-связывающих сайтов *StTP* или *BsPyNP*, где не было обнаружено существенных различий во взаимодействующих с субстратом а.о. При молекулярной динамике расстояние между одним из кислородов карбоксильной группы и аминок группой Lys108 меняется от 2,9 до 5,5 Å.

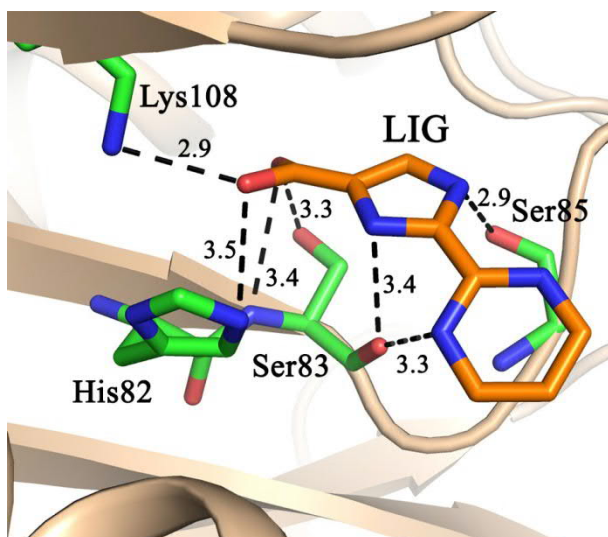


Рисунок 24. Пространственная структура активного центра комплекса *BsPyNP* с 2-пиримидин-2-ил-1H-имидазол-4-карбоновой кислотой (LIG).

III.6. Буферизирующий сайт связывания тимидина и уридина

Тимидин в структуре комплекса *StTP*+ТНМ (в обеих субъединицах) и уридин в структуре *StTP*+УРИ (в субъединице В) были локализованы еще в дополнительном нуклеозид-связывающем сайте (дНСС1, рис.25). Этот сайт находится вблизи α -спирали Н11 и двух петель L12 и L13 (рис.16).

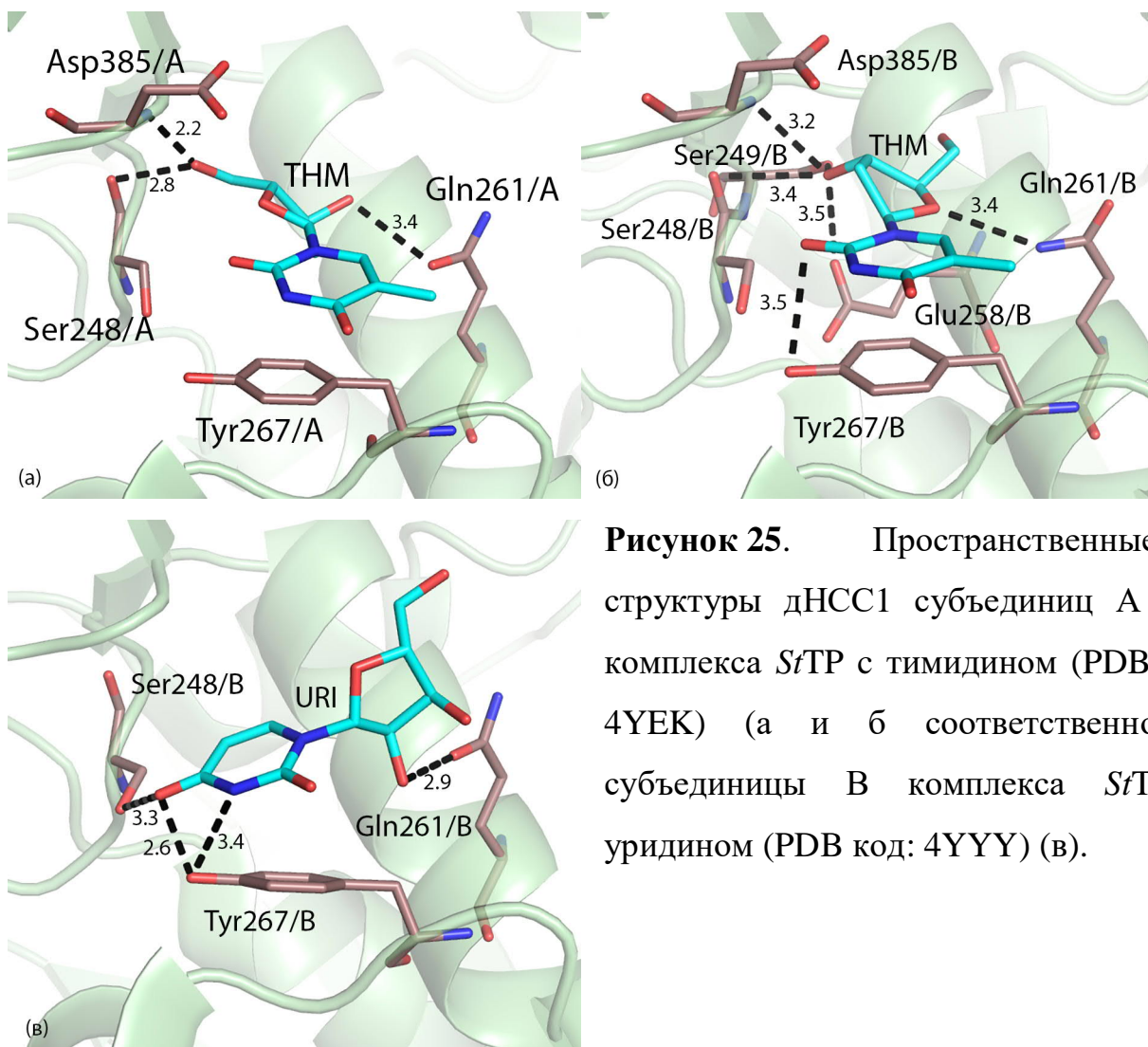


Рисунок 25. Пространственные структуры дНСС1 субъединиц А и В комплекса *StTP* с тимидином (PDB код: 4YEK) (а и б соответственно) и субъединицы В комплекса *StTP* с уридином (PDB код: 4YYY) (в).

Связывание пиримидиновой компоненты обоих нуклеозидов (тимидина и уридина) осуществляется посредством стекинг- взаимодействия с Tyr267. Причем расстояние между центрами ароматической группы тирозина и пиримидиновой компоненты тимидина (уридина) составляет 3,6 Å, т.е. расположены они более чем на 1 Å ближе, чем в активном центре TP. Взаимное расположение этих ароматических групп также отличается от положения в активного центра: в этом сайте обе группы расположены параллельно. В субъединице А комплекса *StTP*+THM (PDB код 4YEK) и в субъединице В комплекса *StTP*+URI (PDB код 4YYY) образуется водородная связь O2_THM(URI) – OH_Tyr267 (3,4 Å в *StTP*+THM/A и 2,6 Å в *StTP*+URI/B). Параметры других водородных связей, формируемых тимидином в дНСС1 приведены на рис.25б. В субъединице В комплекса *StTP*+THM отсутствует

связь O2_THM(URI) – OH_Tyr267 и рибозная компонента повернута на $\sim 180^\circ$ вокруг C-N гликозидной связи в сравнении с ее положением в субъединице A. Образуемые водородные связи приведены на рис.25. В субъединице B комплекса *StTP*+URI положение уридина во втором сайте связывания отличается от положения тимидина в обеих субъединицах комплекса *StTP*+THM. Пиримидиновая компонента повернута вокруг оси, проходящей через ее центр, таким образом, что водородная связь с OH_Tyr267/B осуществляется уже O4, а не O2 атомом субстрата. И в сравнении с тимидином эта же компонента повернута на 180° вокруг C-N гликозидной связи. При этом образуется также водородная связь O4_URI502/B – 3,32 Å – OG_Ser246/B. Можно предположить, что это положение энергетически выгоднее, чем положение тимидина в *StTP*+THM. При расположении тимидина аналогично положению уридина в *StTP*+URI гидрофобная метильная группа в 5-ом положении находилась бы на расстоянии $\sim 4-5$ Å от атомов кислорода O_Ser248/B и OE1/OE2_Glu258/B. Такое положение пиримидиновой компоненты приводит к изменению положения рибозной компоненты. В результате рибозная компонента уридина образует лишь одну водородную связь с атомами фермента O2'URI502/B – 2,92 Å – OE1_Gln261/B. Аминокислотные остатки, входящие в дНСС1 связывания TP, не являются консервативными и в TP эукариот заменены на другие. В частности Tyr267 заменен в hTP на Gly298, а Gln261 на Leu292 (рис.16). Однако Arg279 (hTP) вместо Ser248(*StTP*), который находится в кармане этого сайта связывания, может способствовать связыванию с пиримидиновой компонентой нуклеозида по аналогии с Arg171 активного центра. O5' гидроксильная группа при этом будет образовывать водородную связи с кислородами боковой группы Glu422 (Thr384 в *StTP*).

В PDB присутствует лишь одна структура TP с субстратами: структура *EcTP* с тимидином и сульфат-анионом в активном центре (PDB код 1TPT). В рассматриваемом нами дополнительном сайте связывания в этой структуре

тимин отсутствует. Однако в статье [97], в которой описывается эта структура, упоминается, что тимин был локализован около а.о. 263-268, т.е. в области рассматриваемого в этом разделе сайта связывания. В структурах неспецифичных пиримидин нуклеозидфосфорилаз с субстратами из *Bacillus stearothermophilus* (*BsPyNP* (PDB код 1BRW); гомология с *StTP* 43 %) с урацилом и из *Staphylococcus aureus* (*SaPyNP* (PDB код 3H5Q); гомология с *StTP* 67,2%) с тимидином субстраты не были локализованы во втором сайте связывания. Тем не менее, в структуре *BsPyNP* с урацилом вблизи этого сайта связывания находится ион Ca^{2+} . В его координационную сферу входят атомы а.о.: Gly88, Thr90, Leu243, Ala246, Glu255 (рис.26). В *StTP* им соответствуют Gly91, Val93, Leu246, Ser249 и Glu258. Остатки Ser249 и Glu258 находятся вблизи рибозной компоненты тимидина во втором сайте связывания. В субъединице А комплекса *StTP*+ТНМ эти два а.о. образуют водородные связи с тимидином во втором сайте связывания. Gly91 и Val93 координационной сферы Ca^{2+} в *BsPyNP* же находятся вблизи фосфат-связывающего сайта. Таким образом, второй субстрат в TP или ион металла в PyNP может опосредованно модулировать активность соответствующего фермента. Существование аллостерического сайта связывания у TP предполагалось ранее на основании кинетических исследований TP в печени мыши [2]. В этих исследованиях было показано неконкурентное ингибирование TP тимином. В [100] это объясняется закрытием субъединицы TP при связывании тимина. Стоит также упомянуть ингибитор KIN59 (см. раздел I.6), который является неконкурентным ингибитором TP. В [119] предполагается, что он связывается с аллостерическим сайтом связывания и в [90] описывается попытка молекулярного докинга этого лиганда на поверхность TP. В результате компьютерного эксперимента роль аллостерического сайта приписывается петле Gly405-Val419 (hTP). Этому участку в *StTP* соответствуют а.о. Gly367 – Val381, входящие в конец α -спирали H16 и начало петли L18, т.е. не относящихся к сайту, обнаруженному нами. Тем не менее, никаких структурных подтверждений этой теории нет.

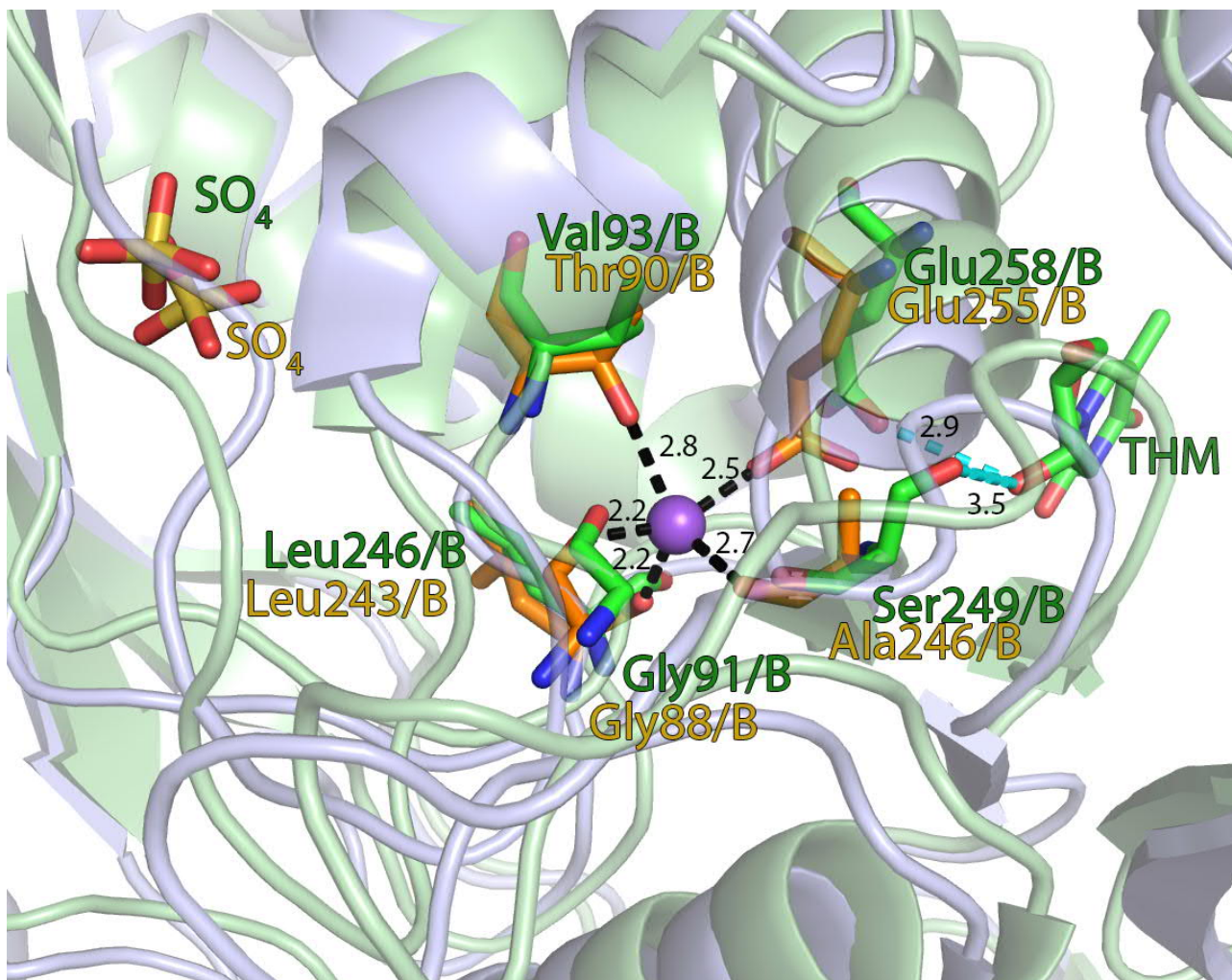


Рисунок 26. Суперпозиция пространственной организации координационной сферы иона Na в *BsPyNP* (PDB код 5EP8) и соответствующих а.о. в *StTP* (PDB код 4YEK). Приведено положение тимидина в дНСС1 и сульфат-анионов обеих структур. Аминокислотные остатки *BsPyNP* показаны оранжевым цветом, *StTP* – зеленым.

III.7. Комплекс *StTP* с цитидином.

В комплексе *StTP*+CTN (PDB код 5EY3) была локализована молекула цитидина, располагающаяся на поверхности взаимодействия субъединиц димера, представляющих собой независимую часть элементарной ячейки. Аминокислотные остатки, контактирующие с цитидином, и параметры этого взаимодействия приведены на рис. 27. Отсутствие его в нуклеозидсвязывающем и дополнительном связывающем сайтах или свидетельствует о неспособности TP катализировать фосфоролитическое

расщепление цитидина, или о том, что для связывания с нуклеозидсвязывающим сайтом необходима более высокая концентрация цитидина, чем та, что присутствовала в кристаллизационном растворе.

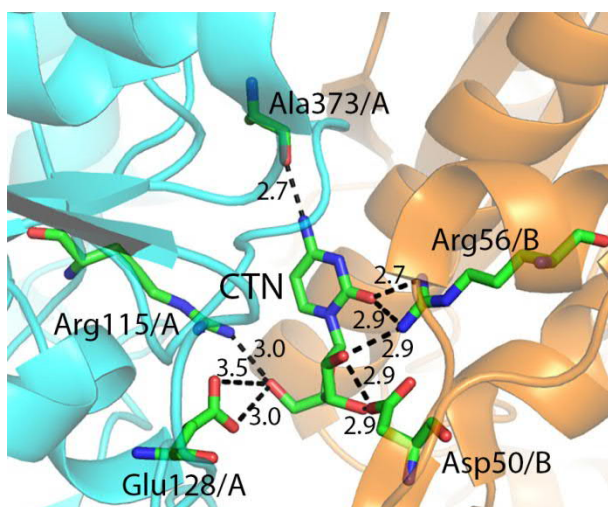


Рисунок 27. Пространственная организация сайта связывания цитидина (CTN) на поверхности взаимодействия субъединиц соседних димеров *StTP*.

III.8. Компьютерное моделирование взаимодействия *StTP* с аналогами неконкурентного ингибитора *TP KIN59*

По литературным данным известны неконкурентные ингибиторы *TP* (см. раздел I.6): *KIN59* и его аналоги [120]. В результате рентгеноструктурного анализа *StTP* было выявлено 2 дополнительных сайта связывания. Был проведен молекулярный докинг *KIN59* в активный центр *TP*, дополнительный сайт связывания *TP* вблизи *Tyr267* (далее дополнительный нуклеозидсвязывающий сайт 1: дНСС1) и в область связывания цитидина на интерфейсе между субъединицами *TP* (далее дНСС2) в структуре *StTP* с цитидином (PDB ID 5EY3). В результате значение оценочной функции для связывания *KIN59* в активном центре составляет -7,71 ккал/моль, в дНСС1 -5,30 ккал/моль, а в дНСС2 -8,36 ккал/моль. С а.о. дНСС2 *KIN59* контактирует посредством водородных связей и гидрофобных взаимодействия. Отдельно стоит отметить стекинг- взаимодействия трифенилметильной части *KIN59* с *Phe47* и *Phe136*, принадлежащих различным субъединицам.

Рисунок 28. Пространственная организация дНСС2 (а) и активного центра (б) *StTP* в комплексе с *KIN59*.

В hTP а.о., соответствующие Arg56 и Asp50, заменены на Thr и Gly соответственно. Остатки Ser374, Asp375 и Ala373 взаимодействуют с KIN59 лишь посредством водородных связей, формируемых лигандом с кислородами их пептидных групп, и замена Ser374 на Gly в hTP не существенна. Arg115 и Glu128 консервативны при сравнении TP высших и низших организмов. Эти два а.о. скорее всего и являются определяющими для ингибирующей активности KIN59, т.к. расположены вблизи Ser113 и Thr123, входящих в сайт связывания фосфат-аниона. Интересно отметить, что в комплексе *SfTP*+CTN сульфат-анион не был обнаружен в А субъединице (расстояния между гидроксигруппами Ser113 и Thr123 и кислородными атомами сульфат-аниона выше 3,5 Å; см. рис. 27), что может быть связано с изменением окружения и объема фосфат-связывающего сайта в связи со связыванием цитидина. Часть а.о. второй субъединицы, взаимодействующие с KIN59 (Arg56, Asp50, Phe47) не присутствуют в hTP, однако в [102] этот ингибитор добавлялся при кристаллизации, что способствовало получению более совершенных кристаллов, чем в [99].

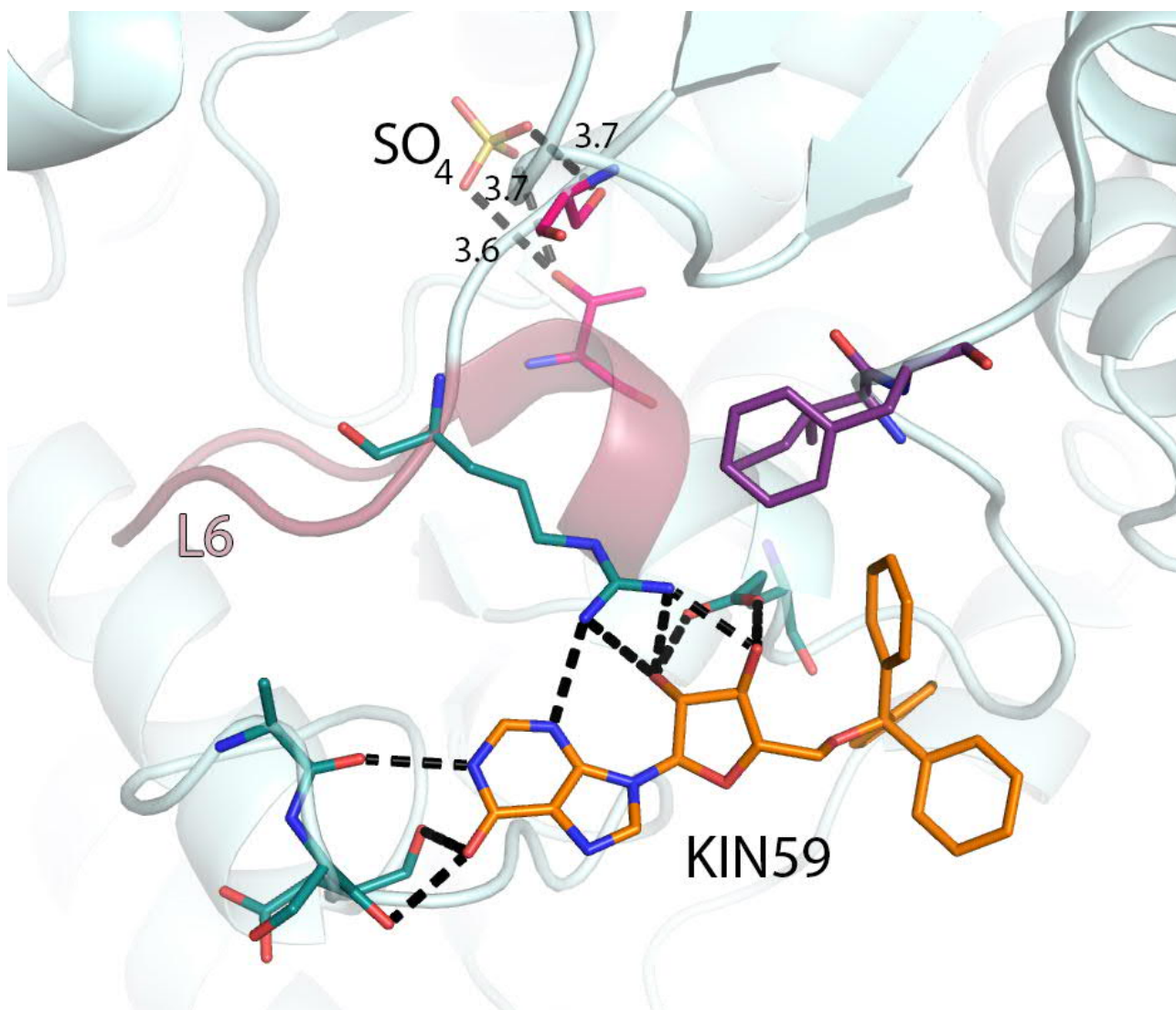


Рисунок 29. Иллюстрация влияния KIN59 на окружение иона сульфата(фосфата) посредством взаимодействия с петлей L6 (а.о. 115-125).

Для валидации полученных результатов был проведен аналогичный молекулярный докинг в программе AutoDock [165]. Результирующие конформации лиганда подвергались кластерному анализу. Помимо конформации, соответствующей наибольшему значению оценочной функции, выбиралась также конформация, соответствующая наибольшему кластеру по числу вхождений из пяти кластеров с наибольшим значением оценочной функции. В результате значение оценочной функции для молекулярного докинга KIN59 в дНСС2 превышало значение оценочной функции для докинга KIN59 в активный центр (-11,26 ккал/моль по сравнению с -8,67 ккал/моль для конформаций, соответствующих наибольшему значению оценочной функции; -

9,94 ккал/моль по сравнению с -8,47 ккал/моль для соответствующая наибольшему кластеру по числу вхождений из пяти кластеров с наибольшим значением оценочной функции). Кроме того, решения, полученные на основании докинга в программах Glide [163, 164] и AutoDock были отранжированы в программах NNScore [166] и DSX [167]. Соответствующие значения оценочных функций этих двух программ приведены в таблице 14. По данным программы NNScore наибольшее значение оценочной функции соответствовало положению KIN59 в активном центре *StTP*, как в результате программы Glide, так и в результате AutoDock. По данным программы DSX значения оценочных функций для положения KIN59 (на основании программы AutoDock) в дНСС2 и в активном центре практически совпадали.

Поскольку в hTP вторая а.о. дНСС2 одной из субъединиц (В субъединица *StTP*+СТН) неконсервативны при сравнении высших и низших организмов был проведен докинг KIN59 в дНСС2 лишь субъединицы А комплекса *StTP*+СТН. Значения оценочных функций для полученных решений по данным программ Glide, AutoDock, NNScore и DSX приведены в таблице 14. Значения оценочной функции положения KIN59 в дНСС2 одной субъединицы в основном оказались ниже соответствующих значений для молекулярного докинга KIN59 в активный центр и в дНСС2 на интерфейсе взаимодействия между субъединицами. Интересно отметить то, что значения оценочной функции программы NNScore для молекулярного докинга KIN59 в дНСС2 одной субъединицы превышали соответствующие значения для молекулярного докинга KIN59 в дНСС2 двух субъединиц.

Таблица 14. Значения оценочных функций молекулярного докинга KIN59 в сайты связывания *StTP*.

Сайт связывания	Кол-во субъединиц	Программа докинга	Способ выбора конформации	Размер кластера	Glide [163], ккал/моль	Autodock [165], ккал/моль	NNScore [166]	DSX DrugScore [167]
АЦ	1	AD	НЗОФ	1	-	-8,67	0,93	-141
АЦ	1	AD	НК	8	-	-8,47	0,43	-106
дНСС2	1	AD	НЗОФ	2	-	-5,98	0,87	-90
дНСС2	1	AD	НК	11	-	-5,51	0,83	-82
дНСС2	2	AD	НЗОФ	5	-	-11,26	-0,86	-119
дНСС2	2	AD	НК	20	-	-9,94	0,59	-148
АЦ	1	Glide	НЗОФ	-	-7,71	-	0,94	-106
дНСС2	1	Glide	НЗОФ	-	-5,37	-	0,73	-78
дНСС2	2	Glide	НЗОФ	-	-8,36	-	0,61	-87

АЦ – активный центр, дНСС – дополнительный нуклеозид-связывающий сайт, AD – AutoDock, НЗОФ – конформация, соответствующая наибольшему значению оценочной функции, НК – конформация, соответствующая одну из пяти кластеров с наибольшим значением оценочной функции и числом вхождений

Для комплексов *StTP* с KIN59, при положении последнего в активном центре и в дНСС2, рассчитывалось значение свободной энергии связывания лиганда с белком. При этом в дНСС2 оценивалось взаимодействие лишь с одной субъединицей. В результате, значения свободной энергии для обоих положений практически совпадало: -4,7 ккал/моль для KIN59 в активном центре и -6,0 для KIN59 в дНСС2. Однако зависимость потенциала средней силы от расстояния между центрами масс *StTP* и KIN59 значительно различались. При расчете свободной энергии связывания для положения KIN59 в активном центре было обнаружено, что прохождение внутрь кармана между доменами *StTP* ингибитора KIN59 ограничено потенциальной ямой, для которой значение свободной энергии связывания KIN59 составляет -6,2 ккал/моль. Важно также отметить, что из рассмотрения исключалась одна из субъединиц дНСС2, учет взаимодействия с которой увеличил бы значение свободной энергии связывания KIN59 с *StTP* в дНСС2. Таким образом, показано, что энергия связывания KIN59 с дНСС2 выше, чем с активным центром.

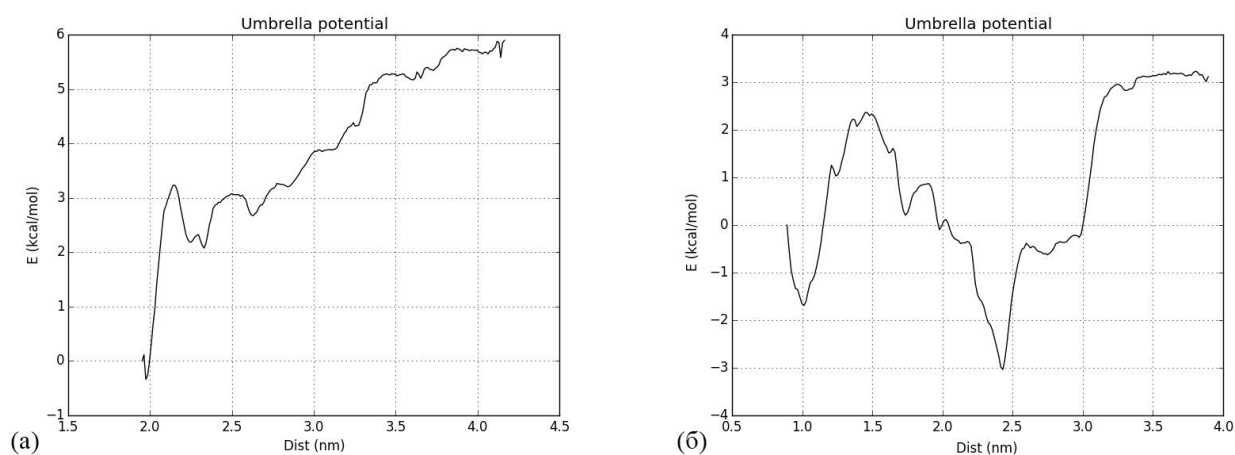


Рисунок 30. Зависимость потенциала средней силы от расстояния между центрами масс *StTP* и KIN59 в дополнительном сайте связывания (а) и в активном центре (б).

Молекулярный докинг в сайт связывания на интерфейсе между субъединицами был проведен и для аналогов KIN59. Значение оценочной функции и основных термов, дающих вклад различных видов взаимодействий в

значение оценочной функции, было сопоставлено со значением коэффициента ингибирования TP. Установлена положительная корреляция $r = 0,78$ между значениями констант ингибирования, определенных биохимически, и эффективностью лигандов (значение оценочной функции нормированной на количество неводородных атомов [194]) по данным молекулярного докинга.

Таблица 15. Показатели связывания KIN59 по биохимическим данным и по результатам докинга в сайт связывания на интерфейсе субъединиц

Лиганд	Ki, мкМ	Эффективность, ккал/моль	GScore, ккал/моль	VDW, ккал/моль	Coulomb, ккал/моль	HBond, ккал/моль
TP136	4,5±1,6	-0,23	-8,81	-42,35	-31,64	-2,03
KIN6	8,6±0,8	-0,22	-7,93	-27,29	-27,99	-1,10
TP134	18,0±0,5	-0,22	-7,93	-32,58	-32,47	-1,69
KIN59	30,0±8,7	-0,22	-8,36	-38,58	-28,43	-2,01
TP137	55±9,2	-0,22	-7,91	-45,03	-25,89	-2,11
TP124	12±1,6	-0,21	-7,90	-36,03	-51,33	-2,45
TP151	86±11	-0,19	-8,03	-39,34	-19,18	-1,80

GScore – основная оценочная функция программы Glide [163, 164];
 Эффективность – Gscore/(число неводородных атомов); VDW – вклад от ван-дер-ваальсовых взаимодействий; Coulomb – вклад от электростатических взаимодействий; HBond – вклад от взаимодействий посредством водородных связей; RotPenal – вклад от запрещенных углов вращения вокруг связей

III.9. Компьютерное моделирование взаимодействия *StTP* с триметопримом

С целью выявления структурных аспектов взаимодействия антибактериального препарата триметоприма с *StTP* было проведено молекулярное моделирование. В литературе отсутствуют данные об ингибировании TP посредством триметоприма. Тем не менее, лиганд схож по структуре с нуклеозидами и мог бы связываться с другими сайтами связывания. Его взаимодействие с активным центром и дополнительным сайтом связывания моделировалось с использованием средств молекулярного докинга.

В результате расчета триметоксибензольная компонента триметоприма располагается в положении параллельного стекинг взаимодействия с Tyr267 аналогично тиминовой компоненте тимидина в структуре 4YЕК, но сдвинутой на 3,1 Å в направлении Gln261. В тимидине или уридине в рибозе присутствуют атомы кислорода, которые могут быть как донорами, так и акцепторами водородных связей. Это может быть связано как с образованием водородной связи O1_TOP – 3,1 Å – NE2_Gln261, так и со стремлением этой гидрофобной группы (триметоксибензольной) к дополнению гидрофобной области TP, включающей а.о. Val401, Val254 и Thr384. Отметим, что в этом же направлении расположена рибозная компонента тимидина в 4YЕК.

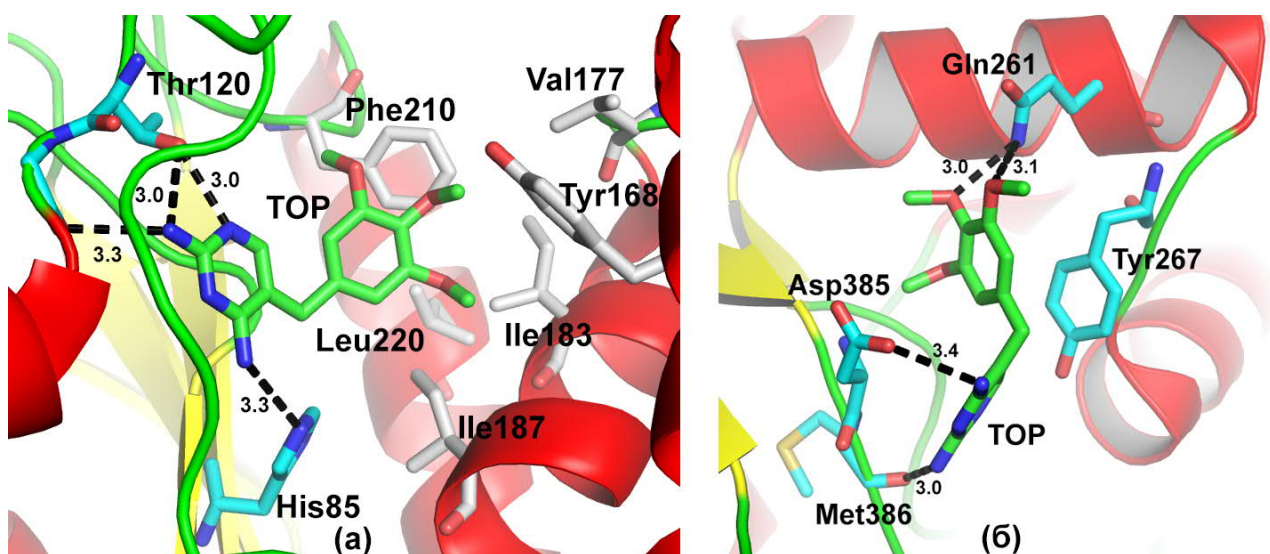


Рисунок 31. Пространственная организация активного центра (а) и дополнительного сайта связывания (б) комплекса *StTP* с триметопримом (TOP).

Докинг ТОР был дополнительно проведен в активном центре. Положение триметоприма в активном центре приведено на рис.31а. В результате докинга какие-либо водородные контакты триметоксибензольной группы с а.о. белка отсутствуют. Эта группа связана лишь за счет гидрофобных взаимодействия с гидрофобным карманом, включающим Tyr168, Ile183, Ile187, Val177, Phe210, Leu220. Тем не менее, в отличие от нативного субстрата ТОР не формирует стекинг-взаимодействий с Tyr168 в активном центре. При смещении ячейки докинга на 0,5 Å, результирующая конформация практически совпадала с указанной на рис. 31а, а расстояние между центрами бензольных колец ТОР и Tyr168 превышало 7 Å в обоих случаях. Диаминпиримидиновая группа триметоприма формирует водородные связи с Asp385 и Met386 (рис.31б). Группа представляет собой пиримидин с двумя аминогруппами в четвертом и шестом положениях. Атомы азота аминогрупп могут быть как донорами, так и акцепторами водородной связи. В тимине или урациле в этих положениях стоят карбонильные группы, в которых атомы кислорода являются лишь донорами водородных связей. Таким образом, имеется определенное сходство между триметопримом и нативным субстратом. Сходство между тимидином и триметопримом позволяет сравнивать значения «эффективности» их взаимодействия с ферментом. Для ТОР значение «эффективности» соответствовало конформации с наибольшим значением оценочной функции по данным программы Glide, а для тимидина на основании его положения в структуре 4YЕК. Значение эффективности ТОР в активном центре ниже значения для тимидина (-0,24 ккал/моль у ТОР в сравнении с -0,36 ккал/моль у ТНМ), а в дополнительном сайте связывания выше (-0,14 ккал/моль у ТОР в сравнении с -0,11 ккал/моль у ТНМ). Важно также отметить, что во втором сайте связывания ключевым является стекинг-взаимодействие триметоксибензольной группы с Tyr267, что характерно и для тимидина в

*St*TP+ТНМ. При смещении ячейки докига на 0,5 Å положение триметоксибензольной группы менялось не более, чем на 0,2 Å.

Полученный результат указывает на то, что триметоприм может связываться с дополнительным сайтом связывания TP и буферизироваться (неспецифически связываться) 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.

III.10. Пространственная структура уридинфосфорилазы из *Yersinia pseudotuberculosis*

Четвертичная структура молекулы *Ypt*UP представляет собой гексамер, составленный из трех гомодимеров (рис.32) аналогично другим бактериальным уридинфосфорилазам [195-197]. 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.

Основные водородные связи как между двумя соседними гомодимерами, так и между субъединицами внутри гомодимера аналогичны связям между субъединицами ранее изученных бактериальных уридинфосфорилаз из *Salmonella typhimurium* (*St*UP) [197, 198] и из *Escherichia coli* (*Ec*UP) [196].

В соответствии с классификацией Россмана [199] пространственная структура субъединицы *Ypt*UP представляет собой трехслойный $\alpha\beta$ -сэндвич. Следующие а.о. имеют в *Ypt*UP дополнительные водородные связи по сравнению с соответствующими а.о. в *St*UP и *Ec*UP: Lys36, Asn40, His43, Ser135, His251. Выявлено, что каждая водородная связь 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*.

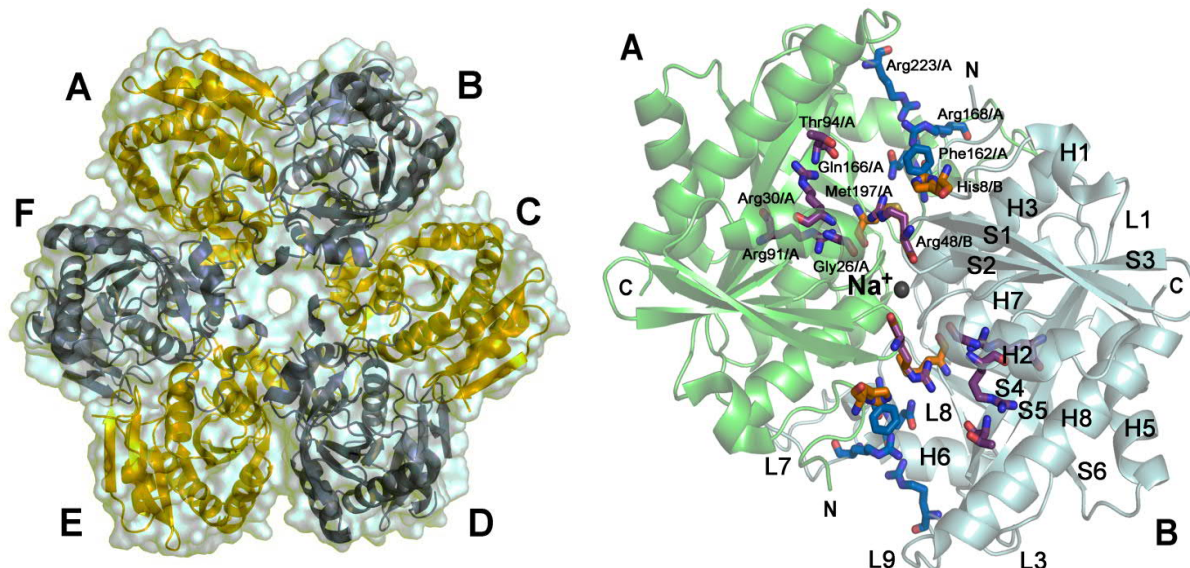


Рисунок 32. Пространственная структура гексамера *YptUP* (а). Функциональная единица *YptUP* - гомодимер (б). Приведены а.о. ферментативных центров обеих субъединиц. Обозначены элементы вторичной структуры.

III.10.1. Пространственная организация активного центра *YptUP*

По литературным данным [172] определены аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра уридинфосфорилазы. По два активных центра приходится на каждый гомодимер и каждый из них образован аминокислотными остатками обеих субъединиц (рис. 32б).

Каждый из активных центров включает в себя нуклеозид- и фосфат-связывающие сайты. Нуклеозид-связывающий сайт А субъединицы сформирован остатками Phe162/A, Gln166/A, Arg168/A, Arg223/A, Met197/A, Arg48/B, His8/B. В свою очередь нуклеозид-связывающий сайт делится на суб-сайты: урацил-связывающий (образован аминокислотными остатками Phe162/A, Gln166/A, Arg168/A, Arg223/A) и рибозо-связывающий (Met197/A,

His8/B, Arg48/B). Фосфат-связывающий сайт же сформирован аминокислотными остатками Gly26/A, Arg30/A, Arg48/B, Arg91/A, Thr94/A.

III.11. Компьютерное моделирование взаимодействия *YptUP* с триметопримом

С целью выявления структурных аспектов взаимодействия антибактериального препарата триметоприма с *YptUP* было проведено молекулярное моделирование. Поскольку в UP известен лишь один сайт связывания, докинг был проведен лишь в область активного центра. На рис. 33а показано взаимодействие посредством водородных связей молекулы триметоприма с а.о. урацил- и рибозо- связывающих сайтов. Кроме этого связывание лиганда осуществляется за счет гидрофобного взаимодействия с а.о. Ile69/A, Phe162/A, Glu196/A, Met197/A (рис. 33б).

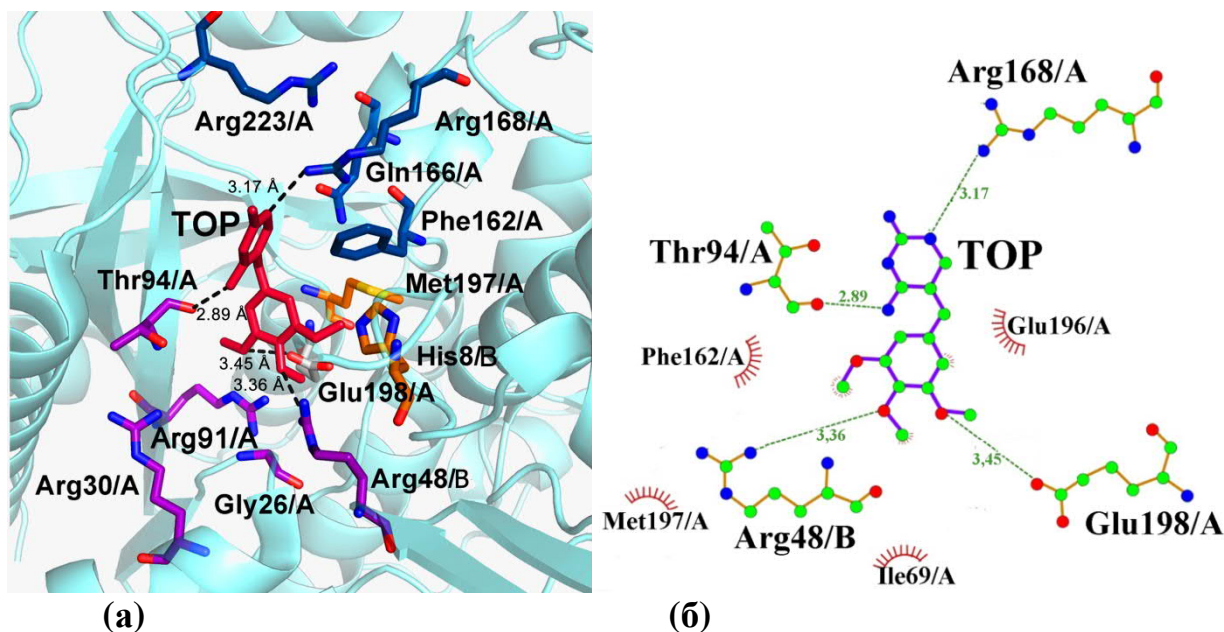


Рисунок 33. Пространственная организация активного центра комплекса *YptUP* с триметопримом (TOP) (а). Схематичное изображение взаимодействия TOP с а.о. ферментативного кармана связывания *YptUP* (б).

Триметоксибензольная группа триметоприма расположена в области аминокислотных остатков урацил-связывающего сайта. Пиримидиндиаминовая группа триметоприма расположена в области а.о. урацил-связывающего сайта.

Было проведено качественное сравнение связывания TOP с *YptUP* и 2,2'-ангидроуридина (ANU) с *StUP*. ANU представляет собой высокоафинный конкурентный ингибитор бактериальных уридинфосфорилаз, исследованный нами ранее [200]. Для конкурентного ингибирования требуется наличие у ингибитора групп схожих с реальным субстратом и отсутствие групп необходимых для протекания реакции. Группы TOP сильно отличаются от ANU, однако количество водородных связей формируемых с ферментом отличается лишь на одну. Кроме того, значение «эффективности» [194] для ANU значительно выше (-0,36 ккал/моль в сравнении с -0,21 ккал/моль) в структуре *StUP*+ANU (ID PDB 3FWP), чем у триметоприма в комплексе с *YptUP*.

III.12. Комплекс *YptUP* с модифицированным триметопримом 53I

В [7] синтезирован аналог триметоприма $\{(2E)-3-\{5-[(2,4-диаминопиримидин-5-ил)метил]-2,3-диметоксифенил\}-1-[(1R)-1-(2-метилпроп-1-ен-1-ил)фталазин-2(1H)-ил]проп-2-ен-1-он\}$ (53I, рис.34), имеющий более высокую константу ингибирования фермента-мишени дигидрофолатредуктазы по сравнению с TOP. Наим проведено выявление возможности образования комплекса *YptUP* с лигандом 53I методом молекулярного докинга. После процедуры минимизации потенциальной энергии системы молекула 53I взаимодействует с белком посредством трех водородных связей: N4_53I-3.1Å-NE1_Glu198/A; N4_53I-3.4Å-NE2_Glu198/A и O2_53I-3.0Å-NH1_Arg168/A (рис. 35)

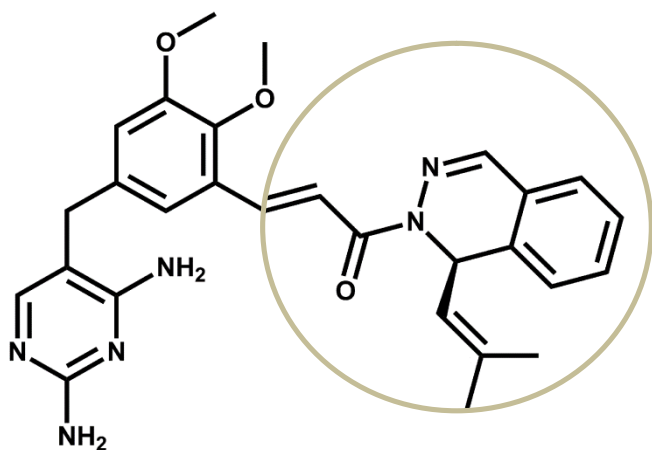


Рисунок 34. Структурная формула модифицированного триметоприма (53I). Эллипсом отмечена дополнительная группа, полученная в результате модификации.

Положительно заряженная пиримидиндиаминовая группа 53I локализуется на границе фосфат- и рибозо- связывающих сайтов. При этом фосфат-связывающий сайт состоит преимущественно из аминокислотных остатков с боковыми группами, обладающими основными свойствами (рис. 33). Следовательно, положение лиганда не стабильно. В изученном комплексе *YptUP*+TOP в области урацил-связывающего сайта локализуется триметоксибензольная группа TOP, обладающая частичным отрицательным зарядом, а его пиримидиндиаминовая группа – в области рибозо-связывающего сайта (рис. 33, 35).

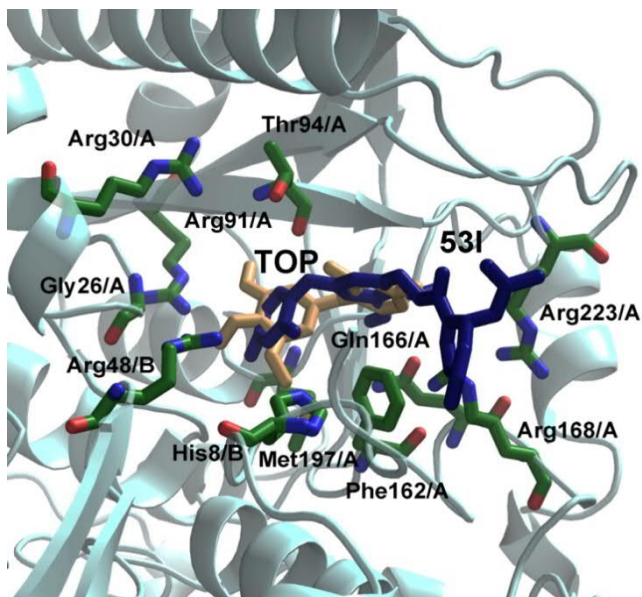


Рисунок 35. Наложение пространственных структур активных центров комплексов *YptUP* с модифицированным триметопримом (53I) и триметопримом (TOP).

Таким образом, положение молекулы 53I в *YptUP* отличается от положения триметоприма в комплексе *YptUP*+TOP. Эти различия обусловлены тем, что в молекуле 53I одна из метоксигрупп заменена на группу, состоящую из 16 неводородных атомов (рис. 34, отмечена эллипсом). В связи с чем локализация этой составной химической группы в фосфат-связывающем сайте невозможна.

В гидрофобное окружение 53I входят 12 а.о.: Ile220, Phe7, Gly96, Met184, Ile98, Val221, Gln236, Arg223, Asp5, Phe162, Tyr163, Thr171. Триметоприм взаимодействует лишь с семью а.о. – Ile220, Ile69, Met215, Glu196, Gly93, Arg91, Ile92. Тем не менее, результаты докинга показывают, что положение молекулы 53I в активном центре менее энергетически выгодно, чем положение триметоприма. Следовательно, 53I обладает меньшей аффинностью связывания с уридинфосфорилами.

Стабильность связывания лиганда с белком исследована методом классической молекулярной динамики. После интегрирования молекулярно-динамической траектории длиной 3 нс лиганд 53I остается внутри активного центра UP (рис. 36) и образует три водородные связи с молекулой фермента.

Тогда как триметоприм в результате аналогичной процедуры связан с молекулой *YptUP* четырьмя водородными связями.

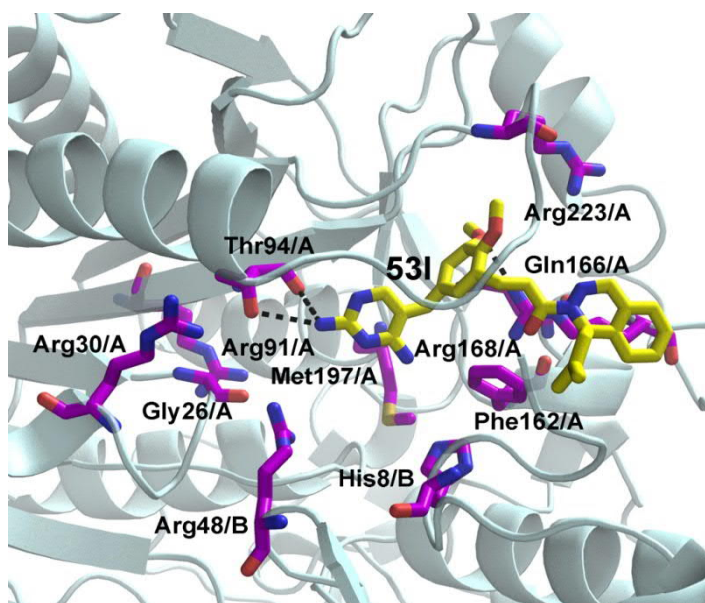


Рисунок 36. Пространственная организация активного центра комплекса *YptUP* с модифицированным триметопримом (53I) после интегрирования методом классической молекулярной динамики с длиной траектории 3 нс.

Таким образом, показано, что как триметоприм, так и его аналог 53I могут связываться с активным центром *YptUP*, но не могут конкурировать с нативным субстратом или же другими ингибиторами UP.

Выводы

- Методом рентгеноструктурного анализа впервые решены и уточнены с высокой достоверностью пространственные структуры атомного разрешения следующих биомакромолекул:
 - **StTP** в нелигандированном состоянии при разрешении 2,05 Å ($R_{\text{factor}} = 22,1\%$; $R_{\text{free}} = 24,7\%$, $\text{DPI} = 0,17$ Å, $\text{СКО} = 0,009$ Å для длин связей и $\text{R.M.S.D.} = 1,275^\circ$ для валентных углов; 97,94% аминокислотных остатков находятся в наиболее благоприятных и разрешённых областях статистики Рамачандрана)
 - комплекса **StTP** с сульфат-анионом при разрешении 2,20 Å ($R_{\text{factor}} = 18,3\%$; $R_{\text{free}} = 22,4\%$, $\text{DPI} = 0,21$ Å, $\text{СКО} = 0,008$ Å для длин связей и $\text{R.M.S.D.} = 1,234^\circ$ для валентных углов; 97,70% аминокислотных остатков находятся в наиболее благоприятных и разрешённых областях статистики Рамачандрана)
 - комплекса **StTP** с тимидином и сульфат-анионом (субстратом и псевдосубстратом тимидинфосфорилазы соответственно) при разрешении 2,55 Å ($R_{\text{factor}} = 17,6\%$, $R_{\text{free}} = 21,5\%$, $\text{DPI} = 0,25$ Å, $\text{R.M.S.D.} = 0,010$ Å для длин связей и $\text{СКО} = 1,325^\circ$ для валентных углов; 96,6% аминокислотных остатков находятся в наиболее благоприятных и разрешённых областях статистики Рамачандрана)
 - комплекса **StTP** с уридином (природным нуклеозидом – ингибитором TP) при разрешении 2,43 Å ($R_{\text{factor}} = 21,5\%$, $R_{\text{free}} = 27,2\%$, $\text{DPI} = 0,28$ Å, $\text{R.M.S.D.} = 0,008$ Å для длин связей и $\text{СКО} = 1,157^\circ$ для валентных углов; 96,0% аминокислотных остатков в наиболее благоприятных и разрешённых областях статистики Рамачандрана)
 - комплекса **StTP** с цитидином (псевдосубстратом прямой реакции, катализируемой тимидинфосфорилазой) при разрешении 1,91 Å ($R_{\text{factor}} = 20,0\%$; $R_{\text{free}} = 23,8\%$, $\text{DPI} = 0,14$ Å, $\text{СКО} = 0,006$ Å для длин связей и $\text{R.M.S.D.} = 0,785^\circ$ для валентных углов; 99,9%

аминокислотных остатков находятся в наиболее благоприятных и разрешённых областях статистики Рамачандрана)

- комплекса ***BsPyNP*** с сульфат-анионом при разрешении 2,66 Å ($R_{\text{factor}} = 21,5\%$; $R_{\text{free}}=29,3\%$; $\text{DPI}= 0,41 \text{ \AA}$; $\text{СКО} = 0,007 \text{ \AA}$ для длин связей и $\text{R.M.S.D.} = 1,125^\circ$ для валентных углов; 99,8% аминокислотных остатков в наиболее благоприятных и разрешённых областях статистики Рамачандрана)
- ***YptUP*** в нелигандированном состоянии при разрешении 1,40 Å ($R_{\text{factor}} = 15,2\%$, $R_{\text{free}} = 18,4\%$, $\text{DPI}= 0,08 \text{ \AA}$, $\text{СКО} = 0,007 \text{ \AA}$ для длин связей и $\text{R.M.S.D.} = 1,165^\circ$ для валентных углов; 99,6% аминокислотных остатков в наиболее благоприятных и разрешённых областях статистики Рамачандрана).

Координаты атомов пространственных структур вышеприведённых шести макромолекулярных соединений и соответствующие им наборы экспериментальных модулей структурных факторов депонированы в международный банк белковых структур (PDB). Им присвоены следующие идентификационные номера ID PDB: 4XR5, 5EY3, 4YEK, 4YYY, 5EP8, 4OF4 соответственно.

- Впервые методом рентгеноструктурного анализа определено место и характер связывания тимидина (субстрата прямой реакции, катализируемой TP), уридина (псевдосубстрата) и сульфат-аниона (псевдосубстрата) с *StTP*. Взаимодействия между ферментом и субстратами осуществляются посредством водородных связей, ван-дер-ваальсовых контактов и стэкинг взаимодействий. Установлено, что специфичность к тимидину и урдину может быть обусловлена различием положение их фуранозных компонент в активном центре TP.
- Методом рентгеноструктурного анализа определена пространственная структура комплекса с сульфат-анионом неспецифичной пиримидинфосфорилазы из *Bacillus subtilis*, на 44% гомологичной *StTP*.

На основании сравнения этой структуры и структуры комплекса *St*TP с сульфат-анионом выявлено, что в PyNP с сульфат-анионом контактирует Lys108, которому в TP соответствует Met111. Это различие приводит к уменьшению частичного заряда кислорода фосфат-аниона в TP. Методом классической молекулярной динамики определено, что субъединица TP 70% времени молекулярно-динамической симуляции находится в закрытой конформации, а PyNP – 8%. Оба факта скорее всего указывают на то, что для TP более характерным является S_N2 механизм нуклеофильного замещения, а в PyNP – S_N1 .

- Проведен виртуальный скрининг соединений базы данных ZINC для поиска лигандов, имеющих сродство с фосфатсвязывающим сайтом PyNP и не способных связаться с TP. В результате этой процедуры четыре соединения из 9000 отвечали этому критерию. Методами молекулярной динамики исследовалась стабильность их связывания с ферментом, и лишь одно (2-пиримидин-2-ил-1H-имидазол-4-карбоновая кислота) из четырех соединений оставалось в области фосфатсвязывающего сайта по истечении 30 нс
- Впервые определены два дополнительных сайта связывания TP, способных связывать нуклеозиды. Один из них обнаружен при структурном исследовании комплексов *St*TP с тимидином и уридином. Этот сайт связывания находится на поверхности молекулы вблизи фосфат-связывающего сайта и включает аминокислотные остатки: Tyr267, Ser248, Ser249, Arg257, Gln261. Второй дополнительный сайт связывания нуклеозидов обнаружен при структурном исследовании комплекса *St*TP с цитидином и сульфат-анионом. Этот сайт связывания находится на интерфейсе взаимодействия между субъединицами, входящими в элементарную ячейку *St*TP в пространственной группе I4, но принадлежащим различным функциональным гомодимерам.

- Методом молекулярного докинга выявлено, что неконкурентный ингибитор TP KIN59 связывается с сайтом связывания на интерфейсе между субъединицами. Связывание происходит посредством водородных связей, гидрофобных и стекинг- взаимодействий. KIN59 при этом локализуется вблизи фосфат-связывающего сайта.
- Методом молекулярного докинга выявлено, что цитостатический антибиотик триметоприм буферизируется TP в дополнительном сайте связывания, вблизи Tyr267, 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.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность:

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

Список 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. Iltzsch, M. H., el Kouni, M. H., Cha, S. Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver // *Biochemistry.* – 1985. – 24 (24). – 6799-807.
3. Friedkin, M., Kalckar, H. Nucleoside phosphorylases // *The Enzymes* / Boyer P. D. et al. – New York: Academic Press, 1961. – С. 237-255.
4. Miyadera, K., Dohmae, N., Takio, K., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Furukawa, T., Yamada, Y., Akiyama, S. Structural characterization of thymidine phosphorylase purified from human placenta // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1995. – 212 (3). – 1040-5.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Woodman, P. W., Sarrif, A. M., Heidelberger, C. Specificity of pyrimidine nucleoside phosphorylases and the phosphorolysis of 5-fluoro-2'-deoxyuridine // *Cancer Res.* – 1980. – 40 (3). – 507-11.
10. Birnie, G. D., Kroeger, H., Heidelberger, C. Studies of Fluorinated Pyrimidines. Xviii. The Degradation of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine and Related Compounds by Nucleoside Phosphorylase // *Biochemistry.* – 1963. – 2 – 566-72.
11. Schwartz, E. L., Baptiste, N., Wadler, S., Makower, D. Thymidine phosphorylase mediates the sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil // *J Biol Chem.* – 1995. – 270 (32). – 19073-7.
12. Schwartz, E. L., Baptiste, N., Megati, S., Wadler, S., Otter, B. A. 5-Ethoxy-2'-deoxyuridine, a novel substrate for thymidine phosphorylase, potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil when used in combination with interferon, an inducer of thymidine phosphorylase expression // *Cancer Res.* – 1995. – 55 (16). – 3543-50.
13. Balzarini, J., Gamboa, A. E., Esnouf, R., Liekens, S., Neyts, J., De Clercq, E., Camarasa, M. J., Perez-Perez, M. J. 7-Deazaxanthine, a novel prototype inhibitor of thymidine phosphorylase // *FEBS Lett.* – 1998. – 438 (1-2). – 91-5.
14. Balzarini, J., Degreve, B., Esteban-Gamboa, A., Esnouf, R., De Clercq, E., Engelborghs, Y., Camarasa, M. J., Perez-Perez, M. J. Kinetic analysis of novel

- multisubstrate analogue inhibitors of thymidine phosphorylase // *FEBS Lett.* – 2000. – 483 (2-3). – 181-5.
15. Esteban-Gamboa, A., Balzarini, J., Esnouf, R., De Clercq, E., Camarasa, M. J., Perez-Perez, M. J. Design, synthesis, and enzymatic evaluation of multisubstrate analogue inhibitors of *Escherichia coli* thymidine phosphorylase // *J Med Chem.* – 2000. – 43 (5). – 971-83.
16. Liekens, S., Bilsen, F., De Clercq, E., Priego, E. M., Camarasa, M. J., Perez-Perez, M. J., Balzarini, J. Anti-angiogenic activity of a novel multi-substrate analogue inhibitor of thymidine phosphorylase // *FEBS Lett.* – 2002. – 510 (1-2). – 83-8.
17. 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.
18. 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.
19. Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Takaku, F., Heldin, C. H. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets // *J Biol Chem.* – 1987. – 262 (9). – 4098-103.
20. Schwartz, E. L., Hoffman, M., O'Connor, C. J., Wadler, S. Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1992. – 182 (3). – 1232-9.
21. Ishikawa, F., Miyazono, K., Hellman, U., Drexler, H., Wernstedt, C., Hagiwara, K., Usuki, K., Takaku, F., Risau, W., Heldin, C. H. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor // *Nature.* – 1989. – 338 (6216). – 557-62.
22. Moghaddam, A., Bicknell, R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity // *Biochemistry.* – 1992. – 31 (48). – 12141-6.
23. Usuki, K., Saras, J., Waltenberger, J., Miyazono, K., Pierce, G., Thomason, A., Heldin, C. H. Platelet-derived endothelial cell growth factor has thymidine phosphorylase activity // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1992. – 184 (3). – 1311-6.
24. Furukawa, T., Yoshimura, A., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Akiyama, S., Fukui, K., Ishizawa, M., Yamada, Y. Angiogenic factor // *Nature.* – 1992 – 356 (6371). – 668.
25. Asai, K., Nakanishi, K., Isobe, I., Eksioglu, Y. Z., Hirano, A., Hama, K., Miyamoto, T., Kato, T. Neurotrophic action of gliostatin on cortical neurons. Identity of gliostatin and platelet-derived endothelial cell growth factor // *J Biol Chem.* – 1992. – 267 (28). – 20311-6.
26. Schwartz, P. M., Milstone, L. M. Thymidine phosphorylase in human epidermal keratinocytes // *Biochem Pharmacol.* – 1988. – 37 (2). – 353-5.
27. Niedzwicki, J. G., Chu, S. H., el Kouni, M. H., Rowe, E. C., Cha, S. 5-benzylacetyluridine and 5-benzoyloxybenzylacetyluridine, potent inhibitors of uridine phosphorylase // *Biochem Pharmacol.* – 1982. – 31 (10). – 1857-61.

28. Yoshimura, A., Kuwazuru, Y., Furukawa, T., Yoshida, H., Yamada, K., Akiyama, S. Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors // *Biochim Biophys Acta.* – 1990. – 23 (1). – 107-13.
29. Matsukawa, K., Moriyama, A., Kawai, Y., Asai, K., Kato, T. Tissue distribution of human gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its drug-induced expression // *Biochim Biophys Acta.* – 1996. – 8 – 1-2.
30. Shaw, T., Smillie, R. H., MacPhee, D. G. The role of blood platelets in nucleoside metabolism: assay, cellular location and significance of thymidine phosphorylase in human blood // *Mutat Res.* – 1988. – 200 (1-2). – 99-116.
31. Jackson, M. R., Carney, E. W., Lye, S. J., Ritchie, J. W. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation // *Placenta.* – 1994. – 15 (4). – 341-53.
32. Usuki, K., Norberg, L., Larsson, E., Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C., Rubin, K., Heldin, C. H. Localization of platelet-derived endothelial cell growth factor in human placenta and purification of an alternatively processed form // *Cell Regul.* – 1990. – 1 (8). – 577-84.
33. Zhang, L., Mackenzie, I. Z., Rees, M. C., Bicknell, R. Regulation of the expression of the angiogenic enzyme platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in endometrial isolates by ovarian steroids and cytokines // *Endocrinology.* – 1997. – 138 (11). – 4921-30.
34. Asai, K., Hirano, T., Matsukawa, K., Kusada, J., Takeuchi, M., Otsuka, T., Matsui, N., Kato, T. High concentrations of immunoreactive gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor in synovial fluid and serum of rheumatoid arthritis // *Clin Chim Acta.* – 1993. – 218 (1). – 1-4.
35. Waguri, Y., Otsuka, T., Sugimura, I., Matsui, N., Asai, K., Moriyama, A., Kato, T. Gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor as a clinical marker of rheumatoid arthritis and its regulation in fibroblast-like synoviocytes // *Br J Rheumatol.* – 1997. – 36 (3). – 315-21.
36. Muro, H., Waguri-Nagaya, Y., Mukofujiwara, Y., Iwahashi, T., Otsuka, T., Matsui, N., Moriyama, A., Asai, K., Kato, T. Autocrine induction of gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (GLS/PD-ECGF) and GLS-induced expression of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis synoviocytes // *Rheumatology.* – 1999. – 38 (12). – 1195-202.
37. Takeuchi, M., Otsuka, T., Matsui, N., Asai, K., Hirano, T., Moriyama, A., Isobe, I., Eksioglu, Y. Z., Matsukawa, K., Kato, T., et al. Aberrant production of gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor in rheumatoid synovium // *Arthritis Rheum.* – 1994. – 37 (5). – 662-72.
38. Boyle, J. J., Wilson, B., Bicknell, R., Harrower, S., Weissberg, P. L., Fan, T. P. Expression of angiogenic factor thymidine phosphorylase and angiogenesis in human atherosclerosis // *J Pathol.* – 2000. – 192 (2). – 234-42.
39. Creamer, D., Jaggar, R., Allen, M., Bicknell, R., Barker, J. Overexpression of the angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in psoriatic epidermis // *Br J Dermatol.* – 1997. – 137 (6). – 851-5.

40. Hammerberg, C., Fisher, G. J., Voorhees, J. J., Cooper, K. D. Elevated thymidine phosphorylase activity in psoriatic lesions accounts for the apparent presence of an epidermal "growth inhibitor," but is not in itself growth inhibitory // *J Invest Dermatol.* – 1991. – 97 (2). – 286-90.
41. Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Maltezos, E., Papazoglou, D., Simopoulos, C., Gatter, K. C., Harris, A. L., Koukourakis, M. I. Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease // *J Clin Pathol.* – 2003. – 56 (3). – 209-13.
42. Saito, S., Tsuno, N. H., Sunami, E., Hori, N., Kitayama, J., Kazama, S., Okaji, Y., Kawai, K., Kanazawa, T., Watanabe, T., Shibata, Y., Nagawa, H. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in inflammatory bowel disease // *J Gastroenterol.* – 2003. – 38 (3). – 229-37.
43. Wang, E. H., Goh, Y. B., Moon, I. S., Park, C. H., Lee, K. H., Kang, S. H., Kang, C. S., Choi, Y. J. Upregulation of thymidine phosphorylase in chronic glomerulonephritis and its role in tubulointerstitial injury // *Nephron Clin Pract.* – 2006. – 102 (3-4). – 10.
44. Kumagai, Y., Sugiura, Y., Sugeno, H., Takebayashi, Y., Takenoshita, S., Yamamoto, T. Thymidine phosphorylase gene mutation is not a primary cause of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) // *Intern Med.* – 2006. – 45 (7). – 443-6.
45. Valentino, M. L., Marti, R., Tadesse, S., Lopez, L. C., Manes, J. L., Lyzak, J., Hahn, A., Carelli, V., Hirano, M. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) // *FEBS Lett.* – 2007. – 581 (18). – 3410-4.
46. Hirano, M., Silvestri, G., Blake, D. M., Lombes, A., Minetti, C., Bonilla, E., Hays, A. P., Lovelace, R. E., Butler, I., Bertorini, T. E., et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder // *Neurology.* – 1994. – 44 (4). – 721-7.
47. Hirano, M., Nishigaki, Y., Marti, R. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes // *Neurologist.* – 2004. – 10 (1). – 8-17.
48. Toi, M., Ueno, T., Matsumoto, H., Saji, H., Funata, N., Koike, M., Tominaga, T. Significance of thymidine phosphorylase as a marker of protumor monocytes in breast cancer // *Clin Cancer Res.* – 1999. – 5 (5). – 1131-7.
49. Moghaddam, A., Zhang, H. T., Fan, T. P., Hu, D. E., Lees, V. C., Turley, H., Fox, S. B., Gatter, K. C., Harris, A. L., Bicknell, R. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1995. – 92 (4). – 998-1002.
50. Arima, J., Imazono, Y., Takebayashi, Y., Nishiyama, K., Shirahama, T., Akiba, S., Furukawa, T., Akiyama, S., Ohi, Y. Expression of thymidine phosphorylase as an indicator of poor prognosis for patients with transitional cell carcinoma of the bladder // *Cancer.* – 2000. – 88 (5). – 1131-8.

51. O'Brien, T. S., Fox, S. B., Dickinson, A. J., Turley, H., Westwood, M., Moghaddam, A., Gatter, K. C., Bicknell, R., Harris, A. L. Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in primary bladder cancers // *Cancer Res.* – 1996. – 56 (20). – 4799-804.
52. Yoshikawa, T., Suzuki, K., Kobayashi, O., Sairenji, M., Motohashi, H., Tsuburaya, A., Nakamura, Y., Shimizu, A., Yanoma, S., Noguchi, Y. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor is upregulated in advanced solid types of gastric cancer // *Br J Cancer.* – 1999. – 79 (7-8). – 1145-50.
53. Takahashi, Y., Bucana, C. D., Akagi, Y., Liu, W., Cleary, K. R., Mai, M., Ellis, L. M. Significance of platelet-derived endothelial cell growth factor in the angiogenesis of human gastric cancer // *Clin Cancer Res.* – 1998. – 4 (2). – 429-34.
54. Shimaoka, S., Matsushita, S., Nitanda, T., Matsuda, A., Nioh, T., Suenaga, T., Nishimata, Y., Akiba, S., Akiyama, S., Nishimata, H. The role of thymidine phosphorylase expression in the invasiveness of gastric carcinoma // *Cancer.* – 2000. – 88 (10). – 2220-7.
55. Levene, P. A., Weber, I. On nucleosidases. II. Purification of the enzyme // *J. Biol. Chem.* – 1924. – 60 – 707-715.
56. Takebayashi, Y., Miyadera, K., Akiyama, S., Hokita, S., Yamada, K., Akiba, S., Yamada, Y., Sumizawa, T., Aikou, T. Expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma // *Jpn J Cancer Res.* – 1996. – 87 (3). – 288-95.
57. Matsumura, M., Chiba, Y., Lu, C., Amaya, H., Shimomatsuya, T., Horiuchi, T., Muraoka, R., Tanigawa, N. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression correlated with tumor angiogenesis and macrophage infiltration in colorectal cancer // *Cancer Lett.* – 1998. – 128 (1). – 55-63.
58. Zhang, J. M., Mizoi, T., Shiiba, K., Sasaki, I., Matsuno, S. Expression of thymidine phosphorylase by macrophages in colorectal cancer tissues // *World J Gastroenterol.* – 2004. – 10 (4). – 545-9.
59. O'Byrne, K. J., Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Cox, G., Turley, H., Steward, W. P., Gatter, K., Harris, A. L. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer // *Br J Cancer.* – 2000. – 82 (8). – 1427-32.
60. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Kakolyris, S., O'Byrne, K. J., Apostolikas, N., Skarlatos, J., Gatter, K. C., Harris, A. L. Different patterns of stromal and cancer cell thymidine phosphorylase reactivity in non-small-cell lung cancer: impact on tumour neoangiogenesis and survival // *Br J Cancer.* – 1998. – 77 (10). – 1696-703.
61. Takebayashi, Y., Natsugoe, S., Baba, M., Akiba, S., Fukumoto, T., Miyadera, K., Yamada, Y., Takao, S., Akiyama, S., Aikou, T. Thymidine phosphorylase in human esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer.* – 1999. – 85 (2). – 282-9.
62. Matsushita, S., Nitanda, T., Furukawa, T., Sumizawa, T., Tani, A., Nishimoto, K., Akiba, S., Miyadera, K., Fukushima, M., Yamada, Y., Yoshida, H., Kanzaki, T., Akiyama, S. The effect of a thymidine phosphorylase inhibitor on angiogenesis and apoptosis in tumors // *Cancer Res.* – 1999. – 59 (8). – 1911-6.

63. Fujimoto, J., Sakaguchi, H., Hirose, R., Wen, H., Tamaya, T. Clinical implication of expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) in metastatic lesions of uterine cervical cancers // *Cancer Res.* – 1999. – 59 (13). – 3041-4.
64. Takebayashi, Y., Yamada, K., Miyadera, K., Sumizawa, T., Furukawa, T., Kinoshita, F., Aoki, D., Okumura, H., Yamada, Y., Akiyama, S., Aikou, T. The activity and expression of thymidine phosphorylase in human solid tumours // *Eur J Cancer.* – 1996. – 7 (32). – 1227-32.
65. Waguri-Nagaya, Y., Otsuka, T., Sugimura, I., Matsui, N., Asai, K., Nakajima, K., Tada, T., Akiyama, S., Kato, T. Synovial inflammation and hyperplasia induced by gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor in rabbit knees // *Rheumatol Int.* – 2000. – 20 (1). – 13-9.
66. Ieda, Y., Waguri-Nagaya, Y., Iwahasi, T., Otsuka, T., Matsui, N., Namba, M., Asai, K., Kato, T. IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases and gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (GLS/PD-ECGF) in a chondrosarcoma cell line (OUMS-27) // *Rheumatol Int.* – 2001. – 21 (2). – 45-52.
67. Tanikawa, T., Waguri-Nagaya, Y., Kusabe, T., Aoyama, M., Asai, K., Otsuka, T. Gliostatin/thymidine phosphorylase-regulated vascular endothelial growth-factor production in human fibroblast-like synoviocytes // *Rheumatol Int.* – 2007. – 27 (6). – 553-9.
68. Nishino, I., Spinazzola, A., Papadimitriou, A., Hammans, S., Steiner, I., Hahn, C. D., Connolly, A. M., Verloes, A., Guimaraes, J., Maillard, I., Hamano, H., Donati, M. A., Semrad, C. E., Russell, J. A., Andreu, A. L., Hadjigeorgiou, G. M., Vu, T. H., Tadesse, S., Nygaard, T. G., Nonaka, I., Hirano, I., Bonilla, E., Rowland, L. P., DiMauro, S., Hirano, M. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations // *Ann Neurol.* – 2000. – 47 (6). – 792-800.
69. Spinazzola, A., Marti, R., Nishino, I., Andreu, A. L., Naini, A., Tadesse, S., Pela, I., Zammarchi, E., Donati, M. A., Oliver, J. A., Hirano, M. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase // *J Biol Chem.* – 2002. – 277 (6). – 4128-33.
70. Marti, R., Nishigaki, Y., Hirano, M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – 303 (1). – 14-8.
71. Lopez, L. C., Akman, H. O., Garcia-Cazorla, A., Dorado, B., Marti, R., Nishino, I., Tadesse, S., Pizzorno, G., Shungu, D., Bonilla, E., Tanji, K., Hirano, M. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice // *Hum Mol Genet.* – 2009. – 18 (4). – 714-22.
72. Haraguchi, M., Tsujimoto, H., Fukushima, M., Higuchi, I., Kuribayashi, H., Utsumi, H., Nakayama, A., Hashizume, Y., Hirato, J., Yoshida, H., Hara, H., Hamano, S., Kawaguchi, H., Furukawa, T., Miyazono, K., Ishikawa, F., Toyoshima, H., Kaname, T., Komatsu, M., Chen, Z. S., Gotanda, T., Tachiwada, T., Sumizawa, T., Miyadera, K., Osame, M., Noda, T., Yamada, Y., Akiyama, S. Targeted deletion

of both thymidine phosphorylase and uridine phosphorylase and consequent disorders in mice // *Mol Cell Biol.* – 2002. – 22 (14). – 5212-21.

73. Dickinson, E. K., Adams, D. L., Schon, E. A., Glerum, D. M. A human SCO2 mutation helps define the role of Sco1p in the cytochrome oxidase assembly pathway // *J Biol Chem.* – 2000. – 275 (35). – 26780-5.

74. Fujimoto, J., Ichigo, S., Sakaguchi, H., Hirose, R., Tamaya, T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and its mRNA in uterine endometrium during the menstrual cycle // *Mol Hum Reprod.* – 1998. – 4 (5). – 509-13.

75. Mainou-Fowler, T., Angus, B., Miller, S., Proctor, S. J., Taylor, P. R., Wood, K. M. Micro-vessel density and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived endothelial cell growth factor (PdEGF) in classical Hodgkin lymphoma (HL) // *Leuk Lymphoma.* – 2006. – 47 (2). – 223-30.

76. Slager, E. H., Honders, M. W., van der Meijden, E. D., van Luxemburg-Heijs, S. A., Kloosterboer, F. M., Kester, M. G., Jedema, I., Marijt, W. A., Schaafsma, M. R., Willems, R., Falkenburg, J. H. Identification of the angiogenic endothelial-cell growth factor-1/thymidine phosphorylase as a potential target for immunotherapy of cancer // *Blood.* – 2006. – 107 (12). – 4954-60.

77. Ono, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy // *Cancer Sci.* – 2008. – 99 (8). – 1501-6.

78. Torisu-Itakura, H., Furue, M., Kuwano, M., Ono, M. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas // *Jpn J Cancer Res.* – 2000. – 91 (9). – 906-10.

79. Nakayama, Y., Sueishi, K., Oka, K., Kono, S., Tomonaga, M. Stromal angiogenesis in human glioma: a role of platelet-derived endothelial cell growth factor // *Surg Neurol.* – 1998. – 49 (2). – 181-7.

80. Nagaoka, H., Iino, Y., Takei, H., Morishita, Y. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in macrophages correlates with tumor angiogenesis and prognosis in invasive breast cancer // *Int J Oncol.* – 1998. – 13 (3). – 449-54.

81. Yao, Y., Kubota, T., Sato, K., Kitai, R. Macrophage infiltration-associated thymidine phosphorylase expression correlates with increased microvessel density and poor prognosis in astrocytic tumors // *Clin Cancer Res.* – 2001. – 7 (12). – 4021-6.

82. Tanaka, Y., Kobayashi, H., Suzuki, M., Kanayama, N., Terao, T. Thymidine phosphorylase expression in tumor-infiltrating macrophages may be correlated with poor prognosis in uterine endometrial cancer // *Hum Pathol.* – 2002. – 33 (11). – 1105-13.

83. Sivridis, E., Giatromanolaki, A., Papadopoulos, I., Gatter, K. C., Harris, A. L., Koukourakis, M. I. Thymidine phosphorylase expression in normal, hyperplastic and neoplastic prostates: correlation with tumour associated macrophages, infiltrating lymphocytes, and angiogenesis // *Br J Cancer.* – 2002. – 86 (9). – 1465-71.

84. Poon, R. T., Fan, S. T., Wong, J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients // *J Clin Oncol.* – 2001. – 19 (4). – 1207-25.

85. Shimada, H., Hoshino, T., Okazumi, S., Matsubara, H., Funami, Y., Nabeya, Y., Hayashi, H., Takeda, A., Shiratori, T., Uno, T., Ito, H., Ochiai, T. Expression of angiogenic factors predicts response to chemoradiotherapy and prognosis of oesophageal squamous cell carcinoma // *Br J Cancer*. – 2002. – 86 (4). – 552-7.
86. Pauly, J. L., Schuller, M. G., Zelcer, A. A., Kirss, T. A., Gore, S. S., Germain, M. J. Identification and comparative analysis of thymidine phosphorylase in the plasma of healthy subjects and cancer patients // *J Natl Cancer Inst*. – 1977. – 58 (6). – 1587-90.
87. Pauly, J. L., Paolini, N. S., Ebarb, R. L., Germain, M. J. Elevated thymidine phosphorylase activity in the plasma and ascitis fluids of tumor-bearing animals // *Proc Soc Exp Biol Med*. – 1978. – 157 (2). – 262-7.
88. Fujimoto, J., Sakaguchi, H., Aoki, I., Tamaya, T. The value of platelet-derived endothelial cell growth factor as a novel predictor of advancement of uterine cervical cancers // *Cancer Res*. – 2000. – 60 (13). – 3662-5.
89. Shimada, H., Takeda, A., Shiratori, T., Nabeya, Y., Okazumi, S., Matsubara, H., Funami, Y., Hayashi, H., Gunji, Y., Kobayashi, S., Suzuki, T., Ochiai, T. Prognostic significance of serum thymidine phosphorylase concentration in esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer*. – 2002. – 94 (7). – 1947-54.
90. Bronckaers, A., Gago, F., Balzarini, J., Liekens, S. The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy // *Med Res Rev*. – 2009. – 29 (6). – 903-53.
91. Voytek, P. Purification of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* and its photoinactivation in the presence of thymine, thymidine, and some halogenated analogs // *J Biol Chem*. – 1975. – 250 (10). – 3660-5.
92. Blank, J. G., Hoffee, P. A. Purification and properties of thymidine phosphorylase from *Salmonella typhimurium* // *Arch Biochem Biophys*. – 1975. – 168 (1). – 259-65.
93. Kubilus, J., Lee, L. D., Baden, H. P. Purification of thymidine phosphorylase from human amniochorion // *Biochim Biophys Acta*. – 1978. – 527 (1). – 221-8.
94. Barton, G. J., Ponting, C. P., Spraggon, G., Finnis, C., Sleep, D. Human platelet-derived endothelial cell growth factor is homologous to *Escherichia coli* thymidine phosphorylase // *Protein Sci*. – 1992. – 1 (5). – 688-90.
95. Schwartz, M. Thymidine phosphorylase from *Escherichia coli*. Properties and kinetics // *Eur J Biochem*. – 1971. – 21 (2). – 191-8.
96. Desgranges, C., Razaka, G., Rabaud, M., Bricaud, H. Catabolism of thymidine in human blood platelets: purification and properties of thymidine phosphorylase // *Biochim Biophys Acta*. – 1981. – 654 (2). – 211-8.
97. 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.
98. Spraggon, G., Stuart, D., Ponting, C., Finnis, C., Sleep, D., Jones, Y. Crystallization and X-ray diffraction study of recombinant platelet-derived endothelial cell growth factor // *J Mol Biol*. – 1993. – 234 (3). – 879-80.
99. Norman, R. A., Barry, S. T., Bate, M., Breed, J., Colls, J. G., Ernill, R. J., Luke, R. W., Minshull, C. A., McAlister, M. S., McCall, E. J., McMiken, H. H., Paterson,

- D. S., Timms, D., Tucker, J. A., Pauptit, R. A. Crystal structure of human thymidine phosphorylase in complex with a small molecule inhibitor // *Structure*. – 2004. – 12 (1). – 75-84.
100. Omari, Kamel E., Bronckaers, A., Liekens, S., Pérez-Pérez, M.-J., Balzarini, J., Stammers, David K. Structural basis for non-competitive product inhibition in human thymidine phosphorylase: implications for drug design // *Biochemical Journal*. – 2006. – 399 (Pt 2). – 199-204.
101. Pugmire, M. J., Cook, W. J., Jasanoff, A., Walter, M. R., Ealick, S. E. Structural and theoretical studies suggest domain movement produces an active conformation of thymidine phosphorylase // *J Mol Biol*. – 1998. – 281 (2). – 285-99.
102. El Omari, K., Bronckaers, A., Liekens, S., Perez-Perez, M. J., Balzarini, J., Stammers, D. K. Structural basis for non-competitive product inhibition in human thymidine phosphorylase: implications for drug design // *Biochem J*. – 2006. – 399 (2). – 199-204.
103. Mitsiki, E., Papageorgiou, A. C., Iyer, S., Thiyagarajan, N., Prior, S. H., Sleep, D., Finnis, C., Acharya, K. R. Structures of native human thymidine phosphorylase and in complex with 5-iodouracil // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2009. – 386 (4). – 666-70.
104. Pugmire, M. J., Ealick, S. E. The crystal structure of pyrimidine nucleoside phosphorylase in a closed conformation // *Structure*. – 1998. – 6 (11). – 1467-79.
105. Panova, N. G., Alexeev, C. S., Kuzmichov, A. S., Shcheveleva, E. V., Gavryushov, S. A., Polyakov, K. M., Kritzyn, A. M., Mikhailov, S. N., Esipov, R. S., Miroshnikov, A. I. Substrate specificity of *Escherichia coli* thymidine phosphorylase // *Biochemistry (Moscow)*. – 2007. – 72 (1). – 21-28.
106. Miyadera, K., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Yoshida, H., Konstanty, W., Yamada, Y., Akiyama, S. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase // *Cancer Res*. – 1995. – 55 (8). – 1687-90.
107. Rick, S. W., Abashkin, Y. G., Hilderbrandt, R. L., Burt, S. K. Computational studies of the domain movement and the catalytic mechanism of thymidine phosphorylase // *Proteins*. – 1999. – 37 (2). – 242-52.
108. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications // *N Engl J Med*. – 1971. – 285 (21). – 1182-6.
109. Bergers, G., Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy // *Nat Rev Cancer*. – 2008. – 8 (8). – 592-603.
110. Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? // *Nat Rev Drug Discov*. – 2007. – 6 (4). – 273-86.
111. Fernando, N. T., Koch, M., Rothrock, C., Gollogly, L. K., D'Amore, P. A., Ryeom, S., Yoon, S. S. Tumor escape from endogenous, extracellular matrix-associated angiogenesis inhibitors by up-regulation of multiple proangiogenic factors // *Clin Cancer Res*. – 2008. – 14 (5). – 1529-39.
112. Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., di Tomaso, E., Zhang, W. T., Duda, D. G., Cohen, K. S., Kozak, K. R., Cahill, D. P., Chen, P. J., Zhu, M., Ancukiewicz, M., Mrugala, M. M., Plotkin, S., Drappatz, J., Louis, D. N., Ivy, P., Scadden, D. T.,

- Benner, T., Loeffler, J. S., Wen, P. Y., Jain, R. K. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients // *Cancer Cell*. – 2007. – 11 (1). – 83-95.
113. Perez-Perez, M. J., Priego, E. M., Hernandez, A. I., Camarasa, M. J., Balzarini, J., Liekens, S. Thymidine phosphorylase inhibitors: recent developments and potential therapeutic applications // *Mini Rev Med Chem*. – 2005. – 5 (12). – 1113-23.
114. Langen, P., Etzold, G., Barwolff, D., Preussel, B. Inhibition of thymidine phosphorylase by 6-aminothymine and derivatives of 6-aminouracil // *Biochem Pharmacol*. – 1967. – 16 (9). – 1833-7.
115. Fukushima, M., Suzuki, N., Emura, T., Yano, S., Kazuno, H., Tada, Y., Yamada, Y., Asao, T. Structure and activity of specific inhibitors of thymidine phosphorylase to potentiate the function of antitumor 2'-deoxyribonucleosides // *Biochem Pharmacol*. – 2000. – 59 (10). – 1227-36.
116. Takao, S., Akiyama, S. I., Nakajo, A., Yoh, H., Kitazono, M., Natsugoe, S., Miyadera, K., Fukushima, M., Yamada, Y., Aikou, T. Suppression of metastasis by thymidine phosphorylase inhibitor // *Cancer Res*. – 2000. – 60 (19). – 5345-8.
117. Jain, H. V., Rasheed, R., Kalman, T. I. The role of phosphate in the action of thymidine phosphorylase inhibitors: Implications for the catalytic mechanism // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2010. – 20 (5). – 1648-51.
118. Kalman, T. I., Lai, L. 6-substituted 5-fluorouracil derivatives as transition state analogue inhibitors of thymidine phosphorylase // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. – 2005. – 24 (5-7). – 367-73.
119. Liekens, S., Hernandez, A. I., Ribatti, D., De Clercq, E., Camarasa, M. J., Perez-Perez, M. J., Balzarini, J. The nucleoside derivative 5'-O-trityl-inosine (KIN59) suppresses thymidine phosphorylase-triggered angiogenesis via a noncompetitive mechanism of action // *J Biol Chem*. – 2004. – 279 (28). – 29598-605.
120. 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.
121. Khan, K. M., Ambreen, N., Hussain, S., Perveen, S., Iqbal Choudhary, M. Schiff bases of 3-formylchromone as thymidine phosphorylase inhibitors // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2009. – 17 (8). – 2983-2988.
122. Khan, K. M., Rani, M., Ambreen, N., Ali, M., Hussain, S., Perveen, S., Choudhary, M. I. 2,5-Disubstituted-1,3,4-oxadiazoles: thymidine phosphorylase inhibitors // *Medicinal Chemistry Research*. – 2013. – 22 (12). – 6022-6028.
123. Sun, L., Li, J., Bera, H., Dolzhenko, A. V., Chiu, G. N., Chui, W. K. Fragment-based approach to the design of 5-chlorouracil-linked-pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazines as thymidine phosphorylase inhibitors // *Eur J Med Chem*. – 2013. – 70 – 400-10.
124. Bera, H., Chui, W.-K., Gupta, S. D., Dolzhenko, A. V., Sun, L. Synthesis, in vitro evaluation of thymidine phosphorylase inhibitory activity, and in silico study of 1,3,5-triazin-2,4-dione and its fused analogues // *Medicinal Chemistry Research*. – 2013. – 22 (12). – 6010-6021.

125. Bera, H., Tan, B. J., Sun, L., Dolzhenko, A. V., Chui, W.-K., Chiu, G. N. C. A structure–activity relationship study of 1,2,4-triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-5,7-dione and its 5-thioxo analogues on anti-thymidine phosphorylase and associated anti-angiogenic activities // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2013. – 67 – 325-334.
126. Kravchenko, A. N., Mishan'kin, B. N. [Thymidine phosphorylase activity and its relationship to trimethoprim in initial strains and thymidine-, thymine-dependent and trimethoprim-resistant mutants of plague microbe] // *Antibiot Khimioter.* – 1992. – 37 (1). – 17-20.
127. Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E., Scheiner, J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds // *Nature*. – 1957. – 179 (4561). – 663-6.
128. Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies // *Nat Rev Cancer*. – 2003. – 3 (5). – 330-8.
129. Di Paolo, A., Lencioni, M., Amatori, F., Di Donato, S., Bocci, G., Orlandini, C., Lastella, M., Federici, F., Iannopollo, M., Falcone, A., Ricci, S., Del Tacca, M., Danesi, R. 5-fluorouracil pharmacokinetics predicts disease-free survival in patients administered adjuvant chemotherapy for colorectal cancer // *Clin Cancer Res*. – 2008. – 14 (9). – 2749-55.
130. Takechi, T., Nakano, K., Uchida, J., Mita, A., Toko, K., Takeda, S., Unemi, N., Shirasaka, T. Antitumor activity and low intestinal toxicity of S-1, a new formulation of oral tegafur, in experimental tumor models in rats // *Cancer Chemother Pharmacol*. – 1997. – 39 (3). – 205-11.
131. Kanamitsu, S. I., Ito, K., Okuda, H., Ogura, K., Watabe, T., Muro, K., Sugiyama, Y. Prediction of in vivo drug-drug interactions based on mechanism-based inhibition from in vitro data: inhibition of 5-fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-Bromovinyl)uracil // *Drug Metab Dispos*. – 2000. – 28 (4). – 467-74.
132. Ogura, K., Nishiyama, T., Takubo, H., Kato, A., Okuda, H., Arakawa, K., Fukushima, M., Nagayama, S., Kawaguchi, Y., Watabe, T. Suicidal inactivation of human dihydropyrimidine dehydrogenase by (E)-5-(2-bromovinyl)uracil derived from the antiviral, sorivudine // *Cancer Lett*. – 1998. – 122 (1-2). – 107-13.
133. Morita, T., Matsuzaki, A., Suzuki, K., Tokue, A. Role of thymidine phosphorylase in biomodulation of fluoropyrimidines // *Curr Pharm Biotechnol*. – 2001. – 2 (3). – 257-67.
134. Hoff, P. M. Practical considerations in the use of oral fluoropyrimidines // *Semin Oncol*. – 2003. – 30 (3 Suppl 6). – 88-92.
135. Yoshisue, K., Masuda, H., Matsushima, E., Ikeda, K., Nagayama, S., Kawaguchi, Y. Tissue distribution and biotransformation of potassium oxonate after oral administration of a novel antitumor agent (drug combination of tegafur, 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine, and potassium oxonate) to rats // *Drug Metab Dispos*. – 2000. – 28 (10). – 1162-7.
136. Bollag, W., Hartmann, H. R. Tumor inhibitory effects of a new fluorouracil derivative: 5'-deoxy-5-fluorouridine // *Eur J Cancer*. – 1980. – 16 (4). – 427-32.

137. Bajetta, E., Colleoni, M., Rosso, R., Sobrero, A., Amadori, D., Comella, G., Marangolo, M., Scanni, A., Lorusso, V., Calabresi, F., et al. Prospective randomised trial comparing fluorouracil versus doxifluridine for the treatment of advanced colorectal cancer // *Eur J Cancer*. – 1993. – 12 (63). – 1658-63.
138. Walko, C. M., Lindley, C. Capecitabine: a review // *Clin Ther*. – 2005. – 27 (1). – 23-44.
139. Hoff, P. M., Ansari, R., Batist, G., Cox, J., Kocha, W., Kuperminc, M., Maroun, J., Walde, D., Weaver, C., Harrison, E., Burger, H. U., Osterwalder, B., Wong, A. O., Wong, R. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study // *J Clin Oncol*. – 2001. – 19 (8). – 2282-92.
140. Razin, S., Yogev, D., Naot, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas // *Microbiol Mol Biol Rev*. – 1998. – 62 (4). – 1094-156.
141. Cimolai, N. Do mycoplasmas cause human cancer? // *Can J Microbiol*. – 2001. – 47 (8). – 691-7.
142. Kidder, M., Chan, P. J., Seraj, I. M., Patton, W. C., King, A. Assessment of archived paraffin-embedded cervical condyloma tissues for mycoplasma-conserved DNA using sensitive PCR-ELISA // *Gynecol Oncol*. – 1998. – 71 (2). – 254-7.
143. Hayflick, L., Koprowski, H. DIRECT AGAR ISOLATION OF MYCOPLASMAS FROM HUMAN LEUKAEMIC BONE MARROW // *Nature*. – 1965. – 205 – 713-4.
144. Huang, S., Li, J. Y., Wu, J., Meng, L., Shou, C. C. Mycoplasma infections and different human carcinomas // *World J Gastroenterol*. – 2001. – 7 (2). – 266-9.
145. Feng, S. H., Tsai, S., Rodriguez, J., Lo, S. C. Mycoplasma infections prevent apoptosis and induce malignant transformation of interleukin-3-dependent 32D hematopoietic cells // *Mol Cell Biol*. – 1999. – 19 (12). – 7995-8002.
146. Zhang, S., Tsai, S., Wu, T. T., Li, B., Shih, J. W., Lo, S. C. Mycoplasma fermentans infection promotes immortalization of human peripheral blood mononuclear cells in culture // *Blood*. – 2004. – 104 (13). – 4252-9.
147. Gong, M., Meng, L., Jiang, B., Zhang, J., Yang, H., Wu, J., Shou, C. p37 from Mycoplasma hyorhinis promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR // *Mol Cancer Ther*. – 2008. – 7 (3). – 530-7.
148. Goodison, S., Nakamura, K., Iczkowski, K. A., Anai, S., Boehlein, S. K., Rosser, C. J. Exogenous mycoplasma p37 protein alters gene expression, growth and morphology of prostate cancer cells // *Cytogenet Genome Res*. – 2007. – 118 (2-4). – 204-13.
149. Ketcham, C. M., Anai, S., Reutzel, R., Sheng, S., Schuster, S. M., Brenes, R. B., Agbandje-McKenna, M., McKenna, R., Rosser, C. J., Boehlein, S. K. p37 Induces tumor invasiveness // *Mol Cancer Ther*. – 2005. – 4 (7). – 1031-8.
150. Neale, G. A., Mitchell, A., Finch, L. R. Enzymes of pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism in Mycoplasma mycoides subsp. mycoides // *J Bacteriol*. – 1983. – 156 (3). – 1001-5.

151. Tham, T. N., Ferris, S., Kovacic, R., Montagnier, L., Blanchard, A. Identification of *Mycoplasma pirum* genes involved in the salvage pathways for nucleosides // *J Bacteriol.* – 1993. – 175 (16). – 5281-5.
152. Vande Voorde, J., Gago, F., Vrancken, K., Liekens, S., Balzarini, J. Characterization of pyrimidine nucleoside phosphorylase of *Mycoplasma hyorhinis*: implications for the clinical efficacy of nucleoside analogues // *Biochem J.* – 2012. – 445 (1). – 113-23.
153. 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.
154. McCoy, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2007. – 63 (Pt 1). – 32-41.
155. 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.
156. 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.
157. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution // *Acta Crystallographica Section D.* – 2010. – 66 (2). – 213-221.
158. Emsley, P., Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics // *Acta Crystallographica Section D.* – 2004. – 60 (12 Part 1). – 2126-2132.
159. Vaguine, A. A., Richelle, J., Wodak, S. J. SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model // *Acta Crystallographica Section D.* – 1999. – 55 (1). – 191-205.
160. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures // *Journal of Applied Crystallography.* – 1993. – 26 (2). – 283-291.
161. Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., 3rd, Snoeyink, J., Richardson, J. S., Richardson, D. C. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – 35 (Web Server issue). – W375-83.
162. David Van Der, S., Erik, L., Berk, H., Gerrit, G., Alan, E. M., Herman, J. C. B. GROMACS: Fast, flexible, and free // *Journal of Computational Chemistry.* – 2005. – 26 (16). – 1701-1718.
163. 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.
164. Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., Banks, J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening // *J Med Chem.* – 2004. – 47 (7). – 1750-9.
165. Goodsell, D. S., Olson, A. J. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing // *Proteins.* – 1990. – 8 (3). – 195-202.
166. Durrant, J. D., McCammon, J. A. NNScore: a neural-network-based scoring function for the characterization of protein-ligand complexes // *J Chem Inf Model.* – 2010. – 50 (10). – 1865-71.
167. Gohlke, H., Hendlich, M., Klebe, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions // *J Mol Biol.* – 2000. – 295 (2). – 337-56.
168. Schuttelkopf, A. W., van Aalten, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2004. – 60 (Pt 8). – 1355-63.
169. Maestro // Book *Maestro* / Editor. – New York, NY: Schrödinger, LLC, 2009.
170. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System // Book *The PyMOL Molecular Graphics System* / Editor. – San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific, 2002.
171. Collaborative Computational Project No. 4 The CCP4 suite: programs for protein crystallography // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 1994. – 50 (Pt 5). – 760-3.
172. Zolotukhina, M., Ovcharova, I., Eremina, S., Errais Lopes, L., Mironov, A. S. Comparison of the structure and regulation of the *udp* gene of *Vibrio cholerae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* // *Res Microbiol.* – 2003. – 154 (7). – 510-20.
173. *Handbook of Microbiological Media.* / Atlas, R. M.: CRC Press, Inc., 1993.
174. Weber, K., Osborn, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // *J Biol Chem.* – 1969. – 244 (16). – 4406-12.
175. *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels.* / Gordon, A. H.: New York: American Elsevier Publishing Company, Inc, 1975.
176. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – 72 – 248-54.
177. 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.
178. 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.
179. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., Cowtan, K. Features and development of Coot // *Acta Crystallographica Section D.* – 2010. – 66 (4). – 486-501.
180. Hooft, R. W. W., Vriend, G., Sander, C., Abola, E. E. Errors in protein structures // *Nature.* – 1996. – 381 – 272-272.
181. 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.
182. Schlesier, T., Diezemann, G. Performance of different force fields in force probe simulations // *J Phys Chem B.* – 2013. – 117 (6). – 1862-71.
183. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Gunsteren, W. F. v., DiNola, A., Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *The Journal of Chemical Physics.* – 1984. – 81 (8). – 3684-3690.
184. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H., Kollman, P. A. THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method // *Journal of Computational Chemistry.* – 1992. – 13 (8). – 1011-1021.
185. Krissinel, E., Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // *J Mol Biol.* – 2007. – 372 (3). – 774-97.
186. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., Metz, F. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript // *Bioinformatics.* – 1999. – 15 (4). – 305-8.
187. Schrodinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1 // *Book The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1 / Editor, 2010.*
188. 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.
189. Pugmire, M. J., Ealick, S. E. Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases // *Biochem J.* – 2002. – 361 (Pt 1). – 1-25.
190. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // *Molecular systems biology.* – 2011. – 7 – 539.
191. Schwartz, P. A., Veticatt, M., Schramm, V. L. Transition State Analysis of Thymidine Hydrolysis by Human Thymidine Phosphorylase // *Journal of the American Chemical Society.* – 2010. – 132 (38). – 13425-13433.
192. Birck, M. R., Schramm, V. L. Nucleophilic participation in the transition state for human thymidine phosphorylase // *J Am Chem Soc.* – 2004. – 126 (8). – 2447-53.
193. Fauchere, I. I. P., V. ; . // *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* – 1983. – 18 –
194. Hopkins, A. L., Keseru, G. M., Leeson, P. D., Rees, D. C., Reynolds, C. H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery // *Nat Rev Drug Discov.* – 2014. – 13 (2). – 105-121.
195. Morgunova, E., Mikhailov, A. M., Popov, A. N., Blagova, E. V., Smirnova, E. A., Vainshtein, B. K., Mao, C., Armstrong Sh, R., Ealick, S. E., Komissarov, A. A.,

- et al. Atomic structure at 2.5 Å resolution of uridine phosphorylase from *E. coli* as refined in the monoclinic crystal lattice // *FEBS Lett.* – 1995. – 367 (2). – 183-7.
196. Caradoc-Davies, T. T., Cutfield, S. M., Lamont, I. L., Cutfield, J. F. Crystal structures of *Escherichia coli* uridine phosphorylase in two native and three complexed forms reveal basis of substrate specificity, induced conformational changes and influence of potassium // *J Mol Biol.* – 2004. – 337 (2). – 337-54.
197. Dontsova, M. V., Gabdoulkhakov, A. G., Molchan, O. K., Lashkov, A. A., Garber, M. B., Mironov, A. S., Zhukhlistova, N. E., Morgunova, E. Y., Voelter, W., Betzel, C., Zhang, Y., Ealick, S. E., Mikhailov, A. M. Preliminary investigation of the three-dimensional structure of *Salmonella typhimurium* uridine phosphorylase in the crystalline state // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* – 2005. – 61 (Pt 4). – 337-40.
198. Lashkov, A. A., Zhukhlistova, N. E., Gabdulkhakov, A. G., Mikhailov, A. M. Comparative analysis of three-dimensional structures of homodimers of uridine phosphorylase from *Salmonella typhimurium* in the unligated state and in a complex with potassium ion // *Crystallography Reports.* – 2009. – 54 (2). – 267-278.
199. Rao, S. T., Rossmann, M. G. Comparison of super-secondary structures in proteins // *J Mol Biol.* – 1973. – 76 (2). – 241-56.
200. Lashkov, A. A., Zhukhlistova, N. E., Gabdoulkhakov, A. H., Shtil, A. A., Efremov, R. G., Betzel, C., Mikhailov, A. M. The X-ray structure of *Salmonella typhimurium* uridine nucleoside phosphorylase complexed with 2,2'-anhydrouridine, phosphate and potassium ions at 1.86 Å resolution // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2010. – 66 (Pt 1). – 51-60.