

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 544.1+548.737+577.1+577.3

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ *Vibrio Cholerae* С 2,2'-АНГИДРОУРИДИНОМ И ЕГО ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

© 2020 г. П. А. Эйстрих-Геллер¹, С. В. Рубинский¹, И. И. Прокофьев¹, А. Г. Габдулхаков¹,
А. С. Миронов², А. А. Лашков^{1,*}

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

² Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов,
Москва, Россия

* E-mail: alashkov83@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2019 г.

После доработки 17.06.2019 г.

Принята к публикации 29.08.2019 г.

Методом рентгеноструктурного анализа определена пространственная структура высокого разрешения комплекса уридинфосфорилазы из патогенной бактерии *Vibrio cholerae* с конкурентным ингибитором – 2,2'-ангидроуридином (RCSB IDPDB: 6RCA). Проведено сравнение пространственной структуры этого комплекса с ранее определенными структурами комплексов уридинфосфорилазы *V. cholerae* с субстратом (уридином) и уридинфосфорилазы *S. typhimurium* с 2,2'-ангидроуридином. Методом возмущения свободной энергии проведен расчет свободной энергии связывания ингибитора и субстрата с белком. Молекула 2,2'-ангидроуридина образует с активным центром фермента меньше устойчивых водородных связей, а их длина больше, чем в случае с природным субстратом фермента – уридином. Однако в расчетах, учитывающих энергию сольватации молекул и энтропийные эффекты, связывание ингибитора (2,2'-ангидроуридина) с активным центром белка оказалось энергетически выгоднее, чем нативного субстрата (уридина). Полученные результаты могут быть полезны при разработке новых ингибиторов с более высокой селективностью для сайтов связывания уридинфосфорилаз.

DOI: 10.31857/S002347612002006X

ВВЕДЕНИЕ

В клетках многих видов опухолей человека при развитии заболевания увеличивается потребность в азотистых пиримидиновых основаниях, что вызывает увеличение уровня экспрессии уридинфосфорилазы (UPh) – фермента, катализирующего реакцию фосфоролитического расщепления пиримидиновых нуклеозидов и обратную реакцию синтеза нуклеозидов из (дезокси-)рибозо-1-фосфата и азотистых оснований [1–5]. Поэтому в терапии онкологических заболеваний применяют фармакологические препараты, влияющие на процессы метаболизма азотистых оснований и их производных. Такими препаратами являются среди прочих ингибиторы UPh. Они являются сильными антипаразитическими и антимикробными препаратами, так как у большинства простейших в отличие от млекопитающих нет тимидинселективного фермента, необходимого для ресинтеза тимидина [6].

В настоящее время разработанные ингибиторы UPh (за исключением фосфанов) – это все-

возможные производные пиримидиновых оснований. Снижение концентрации таких ингибиторов приводит к восстановлению активности UPh. Таким образом, они являются обратимыми конкурентными ингибиторами [7–9].

Для разработки новых лекарственных препаратов – лигандов уридинфосфорилазы – необходимо детальное исследование методом рентгеноструктурного анализа (РСА) с высоким разрешением пространственной организации макромолекулярных комплексов UPh (в том числе, с существующими ингибиторами). В [10, 11] показано, что химические производные 2,2'-ангидроуридина (ANU) являются наиболее эффективными ингибиторами для большинства UPh клеток бактерий.

В [12–14] описана структура комплексов уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* (StUPh) с ANU, а также предложены модифицированные на основе 2,2'-ангидроуридина лиганды, имеющие более высокое сродство к UPh как про-, так и эукариот. В настоящей работе приве-

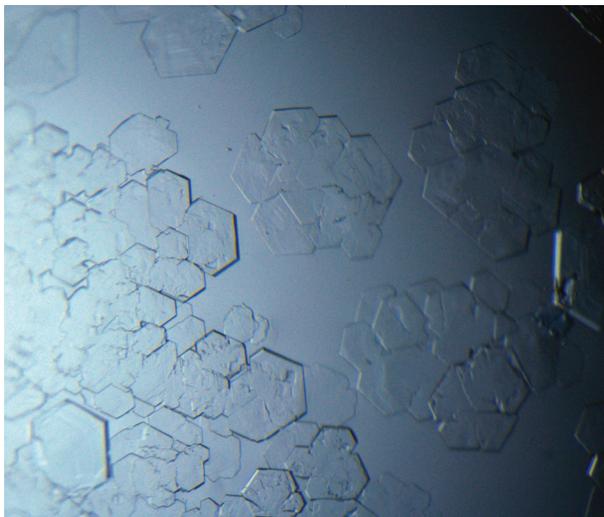


Рис. 1. Кристаллы комплекса уридинфосфорилазы из *V. cholerae* с 2,2'-ангидроуридином.

дены результаты РСА с разрешением 1.34 Å комплекса ANU с уридинфосфорилазой из другого бактериального источника — холерного вибриона. Проведено сравнение пространственной структуры этого комплекса с ранее определенными структурами комплексов уридинфосфорилазы *V. cholerae* (*VchUPh*) с субстратом — уридином (URI) и уридинфосфорилазы *S. typhimurium* с 2,2'-ангидроуридином. Комплексы исследованы методами классической молекулярной динамики. Методом возмущения свободной энергии проведен расчет свободной энергии связывания белок—лиганд. Полученные результаты можно рассматривать как основу для химических модификаций 2,2'-ангидроуридина при разработке новых ингибиторов фермента с более высокой селективностью для сайтов связывания уридинфосфорилаз как про-, так и эукариот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка *VchUPh*. Очистка препарата *VchUPh* проведена методом двухэтапной ионообменной хроматографии с использованием наполнителя бутил-сефароза на первом этапе и Q-сефароза (*Amersham Pharmacia Biotech*) — на втором. По результатам SDS-гель-электрофореза гомогенность препарата *VchUPh* составляла 96%. Методики наработки биомассы продуцента, выделения и очистки *VchUPh* описаны в [15–17].

Кристаллизацию комплекса *VchUPh* с 2,2'-ангидроуридином проводили методом диффузии паров в варианте “висячей капли” при температуре 293 К. Кристаллизационные капли содержали 1.5 мкл раствора *VchUPh* концентрацией 15 мг/мл в буфере трис-НCl, 1.5 мкл противораствора (0.2 М MgCl₂ · 6H₂O, 15% (в/о) ПЭГ 4000, 0.1 М трис-

НCl, pH 8.5) и 1 мкл водного раствора 0.2 М 2,2'-ангидроуридина. Кристаллы комплекса (рис. 1) росли в течение одной недели.

Регистрация и обработка рентгенодифракционных данных. Рентгенодифракционный набор экспериментальных интенсивностей молекулы комплекса *VchUPh* с 2,2'-ангидроуридином в кристаллическом состоянии получен при температуре 100 К на линии BL14.1 синхротрона BESSYII (Берлин, Германия). С помощью программ комплекса XDS [18] проведена обработка экспериментального набора интенсивностей отражений. Параметры съемки и итоговая статистика рентгенодифракционного набора интенсивностей приведены в табл. 1.

Решение и уточнение структуры. Для получения набора начальных фазовых компонент структурных факторов проведена процедура молекулярного замещения в программе Phaser [19, 20]. В качестве стартовой модели использована структура комплекса *VchUPh* с 6-метилурацилом (IDPDB: 4K6O) [21], из которой предварительно были удалены все лиганды, включая молекулы связанной ферментом воды. В дальнейшем при помощи программы phenix.refine были проведены циклы уточнения структуры [22, 23] как твердого тела (“rigid-body”), а затем уточнения с ограничениями (“restrain”). Коррекция структуры с визуальным контролем параметров стереохимии осуществлялась в программе Coot [24, 25]. При анализе σ_A -взвешенных карт электронной плотности с коэффициентами $F_o - F_c$ и $2F_o - F_c$ выявлено положение молекулы ингибитора — 2,2'-ангидроуридина в активном центре фермента *VchUPh*. В структуре были локализованы и другие лиганды: глицерол, 1,2-этандиол, ионы хлора, магния, натрия и молекулы связанной воды. Температурные факторы атомов рассчитывали в анизотропном приближении. Корректность результатов уточнения структуры оценивали в программах Coot [24, 25], MolProbity [26] и PDB Validation Server (<http://validate.rcsb.org>). Основные значения параметров уточненной структуры приведены в табл. 1. Структура комплекса депонирована в RCSB PDB (IDPDB: 6RCA). Рисунки 3D-структур выполнены в программе PyMOL [27].

Молекулярное моделирование методом классической молекулярной динамики. Для исследования устойчивости связывания ANU с *VchUPh* проводили молекулярно-динамическое (МД) моделирование этого комплекса в пакете программ GROMACS (версия 2018.6) [28] с использованием набора полно-атомных силовых полей CHARMM [29, 30] версии C36m [31]. Обработка моделей лигандов с расстановкой частичных электрических зарядов атомов, параметров Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, констант жесткости для валентных связей, валентных и дву-

гранных углов осуществлена с помощью WEB-сервиса CGenFF [32]. Молекулы воды задавались явно и описывались трехцентровой моделью ТРЗР. Расчет дальних электростатических взаимодействий проводили методом частица–сетка (Partical-mesh Ewald, PME [23]), используя функцию кубической интерполяции. Для описания Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий использована функция сглаживания “force-switch” в интервале от 10 до 12 Å. Давление в системе контролировалось баростатом Паринелло–Рахмана [33] на уровне 1 бар. Температура МД-системы поддерживалась постоянной с помощью термостата V-rescale [34] на уровне 300 К. МД-процедуре предшествовала оптимизация атомных параметров моделей с использованием выбранного силового поля в виртуальной ячейке методом градиентного спуска, а также моделирование системы с ограничениями, накладываемыми на положения тяжелых атомов белка и лиганда в NVT- и NPT-ансамблях в течение 200 пс. Длина МД-траектории задавалась равной 10 нс. Для интегрирования с шагом 2 фс уравнений движения Ньютона использовался алгоритм с перескоками (“leap-frog”) [35].

Определение относительной аффинности связывания лиганда методом расчета линейной энергии взаимодействия (LIE, [36, 37]) осуществляли в программе gmx_lie программного пакета GRO-MACS. Для этого предварительно рассчитывали средние энергии силового поля Ван-дер-Ваальсовых (E_{vdw}^{solv}) и электростатических (E_{coul}^{solv}) взаимодействий лиганда с водой в системе лиганд–вода при МД-симуляции в течение 10 нс. Эмпирические константы α и β , определяющие вклад Ван-дер-Ваальсовых и электростатических взаимодействий в оценку энергии связывания, выбраны в соответствии с [37] и для рассматриваемых в работе лигандов $\alpha = 0.18$ и $\beta = 0.33$.

Расчет свободной энергии связывания лиганда с белком методом возмущения свободной энергии (FEP). Расчет свободной энергии связывания лиганда с белком (ΔG_{bind}) проводили, используя термодинамический цикл, описанный в [38]. Первый этап заключался в сборе отсчетов разностей потенциальной энергии в зависимости от параметра связи Кирквуда (λ -параметр [39]). Для систем белок–лиганд и белок–вода МД-симуляцию проводили в течение 2 нс, используя алгоритм интегрирования с перескоками уравнения Ланжевена для каждого набора λ -параметров. В случае системы белок–лиганд наряду с параметрами для кулоновских и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий лиганда с белком вводили дополнительные ограничения с целью удержания лиганда в сайте связывания, при этом параметр λ менялся последовательно в диапазоне [0–1]. В случае системы лиганд–вода параметры связи меняли

Таблица 1. Характеристики получения экспериментального набора интенсивностей, обработки данных, решения и уточнения структуры

Получение экспериментального набора интенсивностей	
Синхротрон, белковая станция	BESSY, Beamline 14.1
Длина волны, Å	0.886
Детектор	PSI PILATUS 6M
Пространственная группа	$P3_1$
$a = b; c$, Å	93.25; 152.93
$\alpha = \beta; \gamma$, град	90.00; 120.00
CC _{1/2} **	99.9 (81.1)*
Диапазон разрешения при сборе данных, Å	44.60–1.34 (1.43–1.34)*
Полное число отражений	3388833 (515634)*
Число независимых отражений	329624 (52973)*
Полнота набора, %	99.7 (99.0)*
R_{measF} , %	14.7 (127.0)*
Среднее значение $\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.52 (1.90)*
Общий температурный фактор Вильсона, Å ²	16.61
Уточнение структуры	
Диапазон разрешения при уточнении, Å	44.59–1.34 (1.36–1.34)*
Срезка набора, $\min(\sigma(F / F))$	1.93
Число рефлексов в рабочем наборе	329397 (12720)*
Число рефлексов в тестовом наборе	3456 (135)*
R_{work} , %	13.5 (26.6)*
R_{free} , %	16.9 (29.1)*
Cruickshank DPI, Å	0.04
Число уточняемых неводородных атомов	
белка	11480
неорганических ионов	6
лигандов	172
воды	2004
R.m.s.d. от “идеальной” геометрии	
по длинам валентных связей, Å	0.017
по валентным углам, град	1.76
Среднее значение B-фактора для всех атомов, Å ²	17.12
Статистика Рамачандрана	
число а.о. в наиболее благоприятных областях, %	98.13
число а.о. в разрешенных областях, %	1.47
IDPDB	6RCA

* В скобках приведены значения для последней зоны высокого разрешения.

** CC_{1/2} – коэффициент корреляции Пирсона между двумя случайно выбранными группами измеренных интенсивностей отражений, составляющих по половине от всего набора.

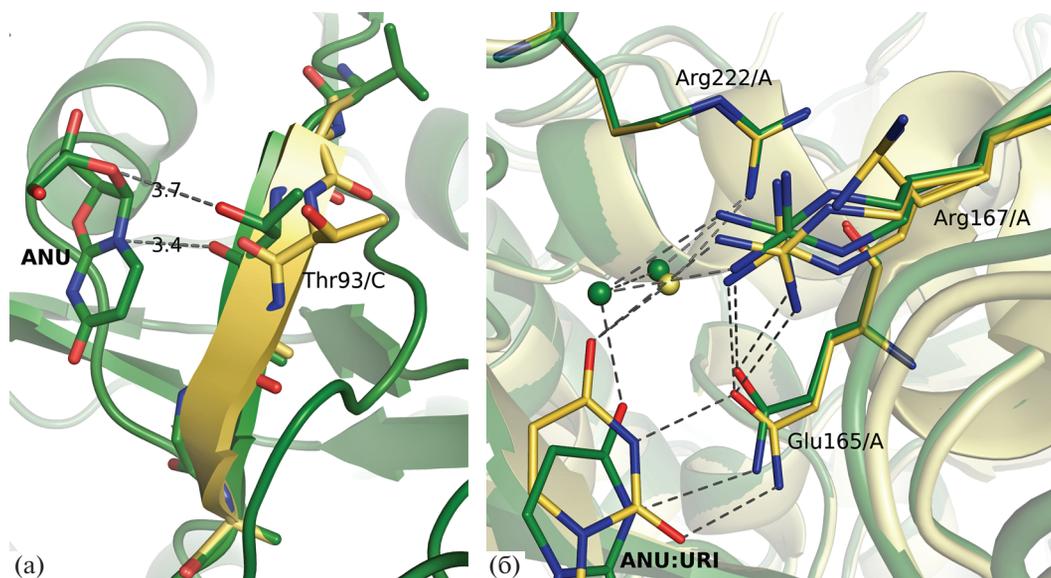


Рис. 3. Альтернативные конформации участка (92–95 а.о.) тяжа $\beta 5$ комплекса *VchUPh* с 2,2'-ангидроуридином (ANU) (а); а.о. Arg167/A в структурах комплексов *VchUPh* с 2,2'-ангидроуридином (темный оттенок) и с уридином (URI) (светлый оттенок).

селенность атомов – 0.53). Отметим, что впервые обнаружено двойное положение консервативного а.о. активного центра при полной заселенности связанного, хоть и опосредованно, с ним лиганда. Кроме того, позиция молекулы воды, через которую Arg167 связывается с ANU, оказалась более стабильна (заселенность = 1.00; температурный фактор = 24.55 \AA^2), чем позиции атомов боковой цепи Arg167.

Боковая цепь Met196/A стабилизирует положение рибозной компоненты 2,2'-ангидроуридина посредством Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с атомами фуранозного кольца (C1'–C2'–C3'–C4'–O4') (рис. 2). Вблизи атома углерода C5 ароматического гетероцикла ANU находится гидрофобный карман, образованный Ile220 и Ile221 (рис. 2).

Влияние связывания 2,2'-ангидроуридина на конформацию структурно функциональных элементов VchUPh. Как и в рассмотренных ранее структурах высокого разрешения комплексов *VchUPh* с субстратами [43] и псевдосубстратом – 6-метилурацилом [21], в исследованной структуре наблюдаются двойные положения $\beta 5$ - и $\beta 8$ -тяжей при связывании фермента с лигандом, имеющим неполную заселенность. При этом одно из двойных положений фрагментов элементов вторичной структуры соответствует лигандированному состоянию, а второе – нелигандированному. Так, в рассматриваемой структуре в активных центрах С-, D-, E- и F-субъединиц молекулы ANU характеризуются неполной заселенностью. При этом в субъединицах наблюдается двойное положение участка (92–95 а.о.) тяжа $\beta 5$ (рис. 3а), участвующего

в формировании активного центра, а также параллельного ему участка $\beta 8$ -тяжа (217–219 а.о.). R.m.s.d. координат атомов а.о. 92–95 и 217–219 С-субъединицы между одним из двойных положений участка исследуемой структуры и соответствующих а.о. А-субъединицы структуры, нелигандированной *VchUPh* (IDPDB: 6EYP, разрешение – 1.22 \AA), равно 0.18 \AA . R.m.s.d. между а.о. 92–95 и 217–219 второго из двойных положений участков исследуемой структуры и соответствующими участками структуры, лигандированной субстратом фермента – уридином (IDPDB: 5M2T, [43]), равно 0.19 \AA . R.m.s.d. между координатами атомов а.о. 92–95, 217–219, имеющих двойные положения в С-субъединице исследуемой структуры, равно 0.6 \AA . Для D-, E- и F-субъединиц наблюдается аналогичная ситуация. Таким образом, двойные положения $\beta 5$ - и $\beta 8$ -тяжей могут свидетельствовать о крайних положениях этих структурных элементов *VchUPh* в процессе связывания фермента с ингибитором. Смещение $\beta 5$ -тяжа, возможно, обусловлено слабой водородной связью и электростатическим взаимодействием атомов ингибитора как с атомами основной, так и боковой цепи Thr93 (O_Thr93/C – 3.38 \AA – N1_ANU; OG1_Thr93 – 3.70 \AA – O4') (рис. 3а).

Сравнение структур комплексов VchUPh с 2,2'-ангидроуридином и уридином. При сравнении сайтов связывания структур комплексов *VchUPh* с уридином [42] (IDPDB: 5M2T; субъединица В, заселенность URI равна 1.00) и 2,2'-ангидроуридином (IDPDB: 6RCA; субъединица А) установлено, что среднее квадратичное отклонение между

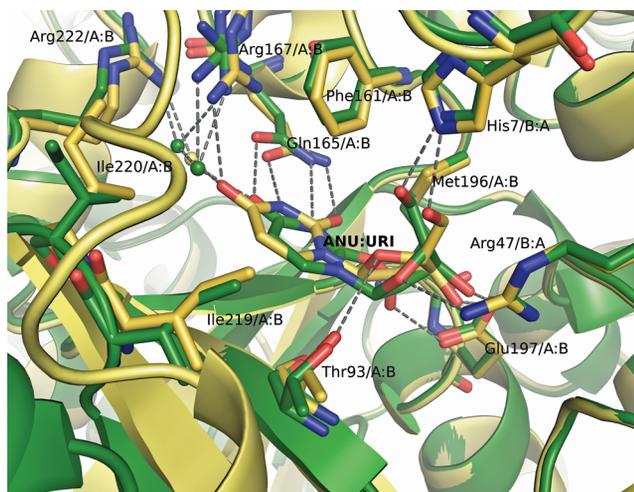


Рис. 4. Совмещение а.о. активных центров структур комплексов *VchUPh* с 2,2'-ангидроуридином (IDPDB: 6RCA, ANU) и уридином (IDPDB: 5M2T; URI).

координатами атомов а.о. главной цепи нуклеозидсвязывающего сайта этих комплексов равно 0.60 \AA , а боковых групп атомов а.о. — 0.71 \AA . Наибольшие различия наблюдаются для положения и конформации остатков Thr93 и Phe6 из окружения лиганда (ANU либо URI).

При сравнении координат атомов а.о. Thr93, входящего в рибососвязывающую часть активного центра, выявлено, что этот остаток располагается ближе к лиганду на $\sim 0.5 \text{ \AA}$ в структуре комплекса *VchUPh* с уридином [43] по сравнению со структурой *VchUPh* с ANU. Таким образом, активный центр структуры комплекса *VchUPh* с уридином является более компактным в сравнении со структурой *VchUPh* + ANU. Остаток Phe6 соседней субъединицы, хотя и не входит в сайты связывания *VchUPh*, находится в непосредственной близости от His8, входящего в рибососвязывающую часть активного центра. Боковая цепь Phe6 представляет собой объемный фенильный радикал, который может ограничивать прохождение лигандов в активный центр фермента. По-видимому, различие в положении боковой цепи Phe6 в структурах комплекса *VchUPh* с ANU и URI (r.m.s.d. координат атомов = 3.61 \AA) обусловлено взаимодействием Ван-дер-Ваальса с атомами боковой цепи Ile227 петли-шлагбаума L11 [21, 43]. Петля L11 в структуре комплекса *VchUPh* с уридином в субъединице B находится в закрытом положении в отличие от структуры комплекса *VchUPh* с ингибитором.

Основное различие в формируемых лигандами водородных связях (рис. 4) обусловлено прежде всего конфигурацией лиганда (уридина и 2,2'-ангидроуридина) и относительным расположением их функциональных групп по отношению к а.о. активного центра. Среднеквадратичное от-

клонение между координатами всех аналогичных атомов уридина и 2,2'-ангидроуридина равно 1.01 \AA , координат атомов пиримидиновой компоненты — 1.11 \AA , рибозной — 0.80 \AA . Фуранозный цикл молекулы уридина находится в напряженной твист-конформации — C1'-endo/O4'-exo [42], а молекулы ANU — в конформации “конверт” — C4'-exo. Таким образом, уридин, деформируясь под влиянием а.о. сайта связывания, находится в высокоэнергетической конформации [43]. Кроме того, ANU, имея дополнительную ковалентную связь O2—C2', обладает большей жесткостью в сравнении с молекулой уридина. В отличие от уридина атом N3 2,2'-ангидроуридина оказался не связанным водородной связью с атомом OE1 боковой цепи а.о. Gln165; расстояние между этими атомами во всех лигандированных субъединицах превышает 3.40 \AA . Объясняется этот факт другим по сравнению с уридином положением пиримидинового кольца в молекуле 2,2'-ангидроуридина. Лиганд 2,2'-ангидроуридин в отличие от уридина не формирует устойчивую водородную связь и с другим консервативным а.о. урацилсвязывающей части активного центра — Arg167, а связывается с ним через молекулу структурированной воды (рис. 4).

Различия имеются и в связывании рассматриваемых лигандов рибососвязывающей частью активного центра *VchUPh*. Glu197 взаимодействует посредством водородных связей с O2' и O3' гидроксигруппами рибозной компоненты уридина (OE1_Glu197/B — 2.66 \AA — O2'_URI, OE1_Glu197/B — 3.10 \AA — O3'_URI, OE2_Glu197/B — 2.70 \AA — O3'_URI), в то же время этот а.о. взаимодействует лишь с гидроксигруппой O3' 2,2'-ангидроуридина (OE2_Glu197/A — 2.56 \AA — O3'_ANU, OE1_Glu197/A — 3.33 \AA — O3'_ANU). O2'-гидроксигруппа уридина также взаимодействует с атомом азота основной цепи Met196 (N_Met196/B — 3.00 \AA — O2'_URI). Гидроксигруппа O2' в ингибиторе отсутствует, а атом кислорода O2' входит в алкоксильную группу, которая не образует водородных связей с молекулой белка, а, возможно, лишь взаимодействует электростатически с атомом азота основной цепи Met196 (N_Met196/A — 3.42 \AA — O2'_ANU).

Молекула 2,2'-ангидроуридина образует с активным центром фермента меньше устойчивых водородных связей, а их длина в целом больше, чем в комплексе с уридином, что вместе с открытой конформацией петли-шлагбаума L11 и менее плотным расположением стенок сайта связывания говорит о меньшей энthalпии связывания ингибитора в сравнении с нативным субстратом — уридином. В то же время молекула 2,2'-ангидроуридина более жесткая, чем молекула уридина, что уменьшает энтропийную составляющую свободной энергии связывания.

Таблица 2. Результаты исследования комплексов белок–лиганд методами молекулярной динамики

Комплекс	<i>VchUPh</i> + ANU	<i>VchUPh</i> + URI
Среднее значение среднеквадратичного отклонения координат атомов лиганда от начального положения, Å	2.44 ± 0.55	0.97 ± 0.16
Среднеквадратичное отклонение расстояния между центрами масс белок–лиганд, Å	0.47	0.25
Среднее число водородных связей белок–лиганд	0.76 ± 0.94	4.39 ± 0.77
Расчет относительной аффинности связывания лиганда методом линейной энергии взаимодействия		
E_{vdw}^{solv} , кДж/моль	–66.8	–67.5
E_{coul}^{solv} , кДж/моль	–191.9	–257.9
ΔG_{bind} , кДж/моль	–5.8	–14.8
Расчет ΔG_{bind} белок–лиганд методом возмущения свободной энергии		
$\Delta G_{vdw+coul}^{solv}$, кДж/моль	71.518 ± 0.450	103.835 ± 0.722
ΔG_{rest}^{solv} , кДж/моль	29.969	30.078
$\Delta G_{vdw+coul+rest}^{prot}$, кДж/моль	134.404 ± 0.793	147.205 ± 1.077
ΔG_{bind} , кДж/моль	–32.917 ± 0.912	–13.292 ± 1.297

Остаток Arg167 В-субъединицы структуры комплекса *VchUPh* с уридином имеет единственную конформацию. Однако в А-субъединице боковая цепь Arg167 находится в трех альтернативных конформациях (заселенность: 0.44, 0.33, 0.23). В активном центре А-субъединицы в отличие от активного центра субъединицы В наблюдается неполная заселенность уридина (0.75): можно считать, что в 25% случаев а.о. Arg167 находится в свободном от лиганда состоянии. По-видимому, существует взаимосвязь между подвижностью боковой цепи Arg167 и связыванием его с лигандом: в свободном состоянии боковая цепь этого а.о. более подвижна, чем в связанном водородной связью с атомами лиганда.

МД-симуляция показала бóльшую стабильность связывания *VchUPh* с нативным субстратом (уридином) по сравнению с ингибитором. Среднее значение среднеквадратичного отклонения координат неводородных атомов уридина от начального положения (RMS) по траектории длиной 10 нс составляло 0.97 Å ($\sigma = 0.16$ Å), атомов 2,2'-ангидроуридина – 2.44 Å ($\sigma = 0.55$ Å) (табл. 2). Кроме того, уридин в среднем по МД-траектории образует значительно больше водородных связей (4.39) с атомами а.о. *VchUPh* по сравнению с 2,2'-ангидроуридином (0.76), что согласуется с данными РСА комплексов. Молекулы 2,2'-ангидроуридина и уридина не покидают область активного центра в течение всей МД-симуляции. Относительная аффинность связывания уридина с белком (ΔG_{bind}), рассчитанная методом ЛЕ, в ~2.6 раза больше, чем ΔG_{bind} для 2,2'-ангидроуридина (табл. 2).

Свободная энергия связывания белок–лиганд, рассчитанная более точным [36, 37], но и более ресурсоемким методом возмущения свободной энергии, для уридина равна -13.292 ± 1.297 кДж/моль, а для 2,2'-ангидроуридина составляет -32.917 ± 0.912 кДж/моль в расчете на один активный центр фермента (табл. 2). Отметим, что слагаемое свободной энергии связи белок–лиганд ($\Delta G_{vdw+coul+rest}^{prot}$) для ингибитора меньше, чем для субстрата, что говорит о меньшей энталпии связывания ингибитора, но разница в энергии сольватации для ингибитора и субстрата больше разницы в $\Delta G_{vdw+coul+rest}^{prot}$. Поэтому, несмотря на меньшее количество водородных связей, связывание ингибитора – 2,2'-ангидроуридина с активным центром *VchUPh* энергетически выгоднее, чем нативного субстрата – уридина. Константа ингибирования K_i , рассчитанная по свободной энергии связывания 2,2'-ангидроуридина ($K_i = e^{(\Delta G/RT)}$), для одного активного центра равна 1.9 мкМ, при условии действия шести активных центров $K_i = 11.4$ мкМ, что по порядку величины соответствует экспериментальным данным, полученным для схожей уридинфосфорилазы из *E. coli* [7]. Метод ЛЕ для системы белок–лиганд оказался неподходящим, по-видимому, из-за высокой подвижности 2,2'-ангидроуридина в активном центре фермента по сравнению с уридином, а также из-за использования в методе эмпирических констант, правильный подбор которых без дополнительных исследований затруднен.

Отметим также относительно низкое значение свободной энергии связывания белок–лиганд для природного субстрата – уридина. По-видимому, малая энергия связывания белок–лиганд в

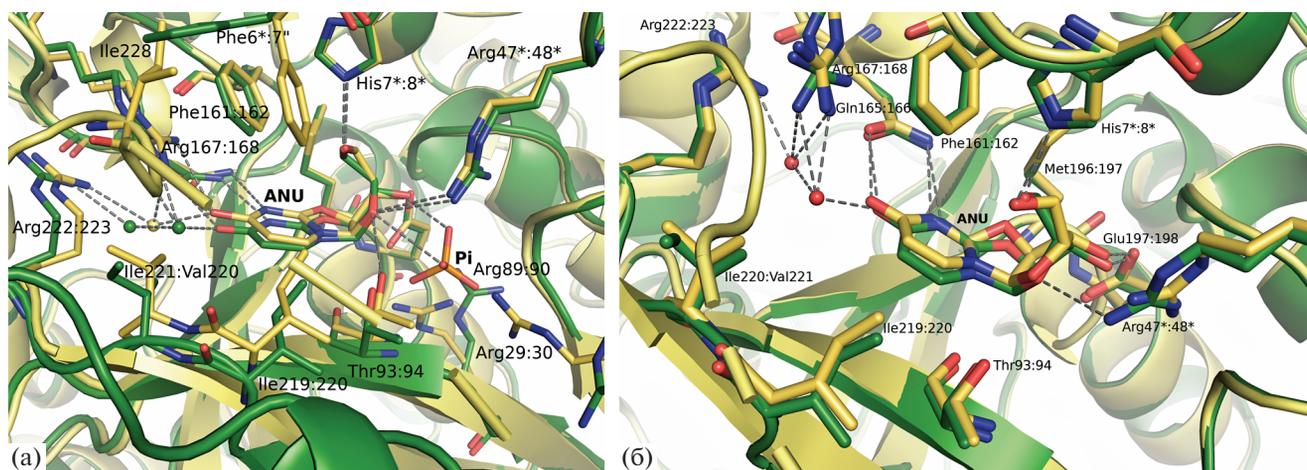


Рис. 5. Совмещения а.о. активных центров структуры комплекса *VchUPh* с 2,2'-ангидроуридином (IDPDB: 6RCA, ANU темный оттенок) и двух комплексов уридинфосфорилазы: *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином и ионом фосфата (Pi) (IDPDB: 3FWP, разрешение – 1.86 Å, активный центр гомодимера BD, светлый оттенок) (а); *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином (IDPDB: 3C74, разрешение – 2.36 Å, активный центр гомодимера BD, светлый оттенок) (б). Звездочкой обозначены а.о. субъединицы, внесшей меньший количественный вклад в образование сайтов связывания (В – для *VchUPh*, D – для *StUPh*).

расчете на один активный центр *in vivo* компенсируется мультимерной структурой бактериальных *UPh*.

Сравнение структур комплексов VchUPh и StUPh с 2,2'-ангидроуридином. Проведено сравнение высококонсервативных сайтов связывания структур комплексов уридинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium*: *StUPh* + ANU (IDPDB: 3FWP) и *VchUPh* + ANU (IDPDB: 6RCA). Среднеквадратичное отклонение между координатами всех атомов а.о., входящих в активный центр структур комплексов, равно 0.20 Å, между координатами атомов ANU в сайтах связывания – 0.26 Å. Наибольшее смещение наблюдается для координат атомов кислорода O4_ANU (0.55 Å) и координат атомов пиримидинового кольца N3 и C4 (0.33 и 0.26 Å соответственно). Различие в положениях молекул ANU в сайтах связывания структур *VchUPh* и *StUPh*, возможно, обусловлено дополнительным взаимодействием ANU в сайте связывания *VchUPh* с молекулой воды, которая в свою очередь образует водородную связь с а.о. фермента (O4_ANU – 2.68 Å – H₂O – 2.88 Å – NH₂_Arg167). Относительно объемный фосфат-ион, связанный с фосфатсвязывающим сайтом в структуре комплекса *StUPh* с ANU и фосфат-ионом (3FWP), может помешать молекуле ANU проникнуть глубже в активный центр фермента. Однако при рассмотрении структуры комплекса *StUPh* с ANU, определенной при разрешении 2.36 Å (IDPDB: 3C74) (рис. 5б), эта гипотеза не подтвердилась. В этой структуре ни один из активных центров не связан с ортофосфат-ионом, как и в структуре комплекса *VchUPh* с ANU. Од-

нако положение и конформация ингибитора в комплексе *StUPh* с ANU значительно ближе к его конформации в комплексе 3FWP, лигандированном кроме ANU ионом фосфата, чем к конформации в комплексе *VchUPh* с ANU (рис. 5б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулы ингибитора – 2,2'-ангидроуридина локализованы во всех нуклеозидсвязывающих сайтах шести одинаковых активных центрах молекулы уридинфосфорилазы из холерного вибриона.

При сравнении сайтов связывания структур комплексов *VchUPh* с 2,2'-ангидроуридином и уридином установлено, что наиболее сильно различаются положения и конформации остатков Thr93 и Phe6, координирующих лиганды. Thr93 располагается ближе к лиганду на ~0.5 Å в структуре комплекса *VchUPh* с уридином в сравнении со структурой *VchUPh* с ANU. Таким образом, активный центр структуры комплекса *VchUPh* с уридином является более компактным в сравнении со структурой *VchUPh* + ANU. Различие в положении боковой цепи Phe6 в структурах комплекса *VchUPh* с ANU и URI обусловлено взаимодействием Ван-дер-Ваальса с боковой цепью Ile227 петли-шламбаума L11. Петля L11 находится в разных конформациях: в структуре комплекса *VchUPh* с ANU – в открытой, а с уридином – в закрытой конформации. В целом молекула 2,2'-ангидроуридина образует с активным центром фермента меньше устойчивых водородных связей, а их длина больше, чем в случае с природным суб-

стратом фермента – уридином. Вместе с открытой конформацией петли-шламбаума и менее плотным расположением стенок сайта связывания это приводит к меньшей энтальпии связывания ингибитора в сравнении с нативным субстратом – уридином. В то же время молекула 2,2'-ангидроуридина более жесткая, чем уридина, что уменьшает энтропийную составляющую свободной энергии связывания.

Молекулярно-динамическая симуляция показала большую стабильность связывания *VchUPh* с нативным субстратом – уридином по сравнению с ингибитором. Однако свободная энергия связывания белок–лиганд, рассчитанная методом возмущения свободной энергии, для уридина равна -13.292 ± 1.297 кДж/моль, а для 2,2'-ангидроуридина составляет -32.917 ± 0.912 кДж/моль в расчете на один активный центр фермента. Слабое свободной энергии связи белок–лиганд для ингибитора меньше, чем для субстрата, что говорит о меньшей энтальпии связывания ингибитора, но разница в энергии сольватации намного перекрывает разницу в энергии связи белок–лиганд. Поэтому, несмотря на меньшее количество водородных связей, связывание ингибитора – 2,2'-ангидроуридина с активным центром *VchUPh* оказалось энергетически выгоднее, чем нативного субстрата – уридина.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН. Для выполнения расчетов был использован гибридный высокопроизводительный вычислительный комплекс ФИЦ ИУ РАН [48].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Katsumata K., Tomioka H., Sumi T. et al. // Cancer Chemother Pharmacol.* 2003. V. 51. P. 155.
2. *Finan P.J., Koklitis P.A., Chisholm E.M. et al. // Br. J. Cancer.* 1984. V. 50. P. 711.
3. *Leyva A., Kraal I., Lankelma J. et al. // Anticancer Res.* 1983. V. 3. P. 227.
4. *Kanzaki A., Takebayashi Y., Bando H. et al. // Int. J. Cancer.* 2002. V. 97. P. 631.
5. *Luccioni C., Beaumatin J., Bardot V. et al. // Int. J. Cancer.* 1994. V. 58. P. 517.
6. *el Kouni M.H., Naguib F.N., Niedzwicki J.G. et al. // J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 6081.
7. *Drabikowska A.K., Lissowska L., Veres Z. et al. // Biochem. Pharmacol.* 1987. V. 36. P. 4125.
8. *Veres Z., Neszmelyi A., Szabolcs A. et al. // Eur. J. Biochem.* 1988. V. 178. P. 173.
9. *Watanabe S., Hino A., Wada K. et al. // J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 12191.
10. *el Kouni M.H., Naguib F.N., Chu S.H. et al. // Mol. Pharmacol.* 1988. V. 34. P. 104.
11. *Naguib F.N., Niedzwicki J.G., Iltzsch M.H. et al. // Leuk Res.* 1987. V. 11. P. 855.
12. *Лашков А.А., Жухлистова Н.Е., Сотниченко С.Е. и др. // Кристаллография.* 2010. Т. 55. № 1. С. 44.
13. *Lashkov A.A., Zhukhlistova N.E., Gabdoulkhakov A.G. et al. // Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. P. 51.
14. *Timofeev V.I., Lashkov A.A., Gabdoulkhakov A.G. et al. // Acta Cryst. F.* 2007. V. 63. P. 852.
15. *Lashkov A.A., Gabdoulkhakov A.G., Prokofev I.I. et al. // Acta Cryst. F.* 2012. V. 68. P. 1394.
16. *Prokofev I.I., Lashkov A.A., Gabdoulkhakov A.G. et al. // Acta Cryst. F.* 2014. V. 70. P. 60.
17. *Zolotukhina M., Ovcharova I., Eremina S. et al. // Res. Microbiol.* 2003. V. 154. P. 510.
18. *Kabsch W. // Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. P. 125.
19. *McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D. et al. // J. Appl. Cryst.* 2007. V. 40. P. 658.
20. *McCoy A.J. // Acta Cryst. D.* 2007. V. 63. P. 32.
21. *Прокофьев И.И., Лашков А.А., Габдулхаков А.Г. и др. // Кристаллография.* 2018. Т. 63. № 3. С. 415.
22. *Adams P.D., Afonine P.V., Bunkoczi G. et al. // Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. P. 213.
23. *Afonine P.V., Grosse-Kunstleve R.W., Echols N. et al. // Acta Cryst. D.* 2012. V. 68. P. 352.
24. *Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D.* 2004. V. 60. P. 2126.
25. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G. et al. // Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. P. 486.
26. *Davis I.W., Leaver-Fay A., Chen V.B. et al. // Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 375.
27. *DeLano W.L. // Abstracts of Papers American Chem. Soc.* 2004. V. 228. P. 313.
28. *Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B. et al. // J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. P. 1701.
29. *MacKerell A.D., Bashford D., Bellott M. et al. // J. Phys. Chem. B.* 1998. V. 102. P. 3586.
30. *MacKerell A.D. // Abstracts of Papers American Chem. Soc.* 1998. V. 216. P. 696.
31. *Huang J., Rauscher S., Nawrocki G. et al. // Nature Methods.* 2016. V. 14. P. 71.
32. *Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C. et al. // J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. P. 671.
33. *Parrinello M., Rahman A. // J. Appl. Phys.* 1981. V. 52. P. 7182.
34. *Bussi G., Parrinello M. // Comput. Phys. Commun.* 2008. V. 179. P. 26.
35. *Leimkuhler B.J., Reich S., Skeel R.D. // Mathematical Approaches to Biomolecular Structure and Dynamics / Eds. Mesirov J.P. et al. The IMA Volumes in Mathematics and its Applications. V. 82. N.Y.: Springer, 1996. P. 161.*
36. *Aqvist J., Marelius J. // Combinatorial Chem. High Throughput Screening.* 2001. V. 4. P. 613.

37. *Hansson T., Marelius J., Aqvist J.* // J. Comput. Aided Mol. Des. 1998. V. 12. P. 27.
38. *Aldeghi M., Heifetz A., Bodkin M.J. et al.* // Chem. Sci. 2016. V. 7. P. 207.
39. *Kirkwood J.* // J. Chem. Phys. 1935. V. 3. P. 300.
40. *Boresch S., Tettinger F., Leitgeb M. et al.* // J. Phys. Chem. B. 2003. V. 107. P. 9535.
41. *Klimovich P.V., Mobley D.L.* // J. Comput. Aided Mol. Des. 2015. V. 29. P. 1007.
42. *Shirts M.R., Chodera J.D.* // J. Chem. Phys. 2008. V. 129. P. 124105.
43. *Прокофьев И.И., Габдулхаков А.Г., Балаев В.В. и др.* // Кристаллография. 2016. Т. 61. С. 919.
44. *Touw W.G., Baakman C., Black J. et al.* // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. 364.
45. *Caradoc-Davies T.T., Cutfield S.M., Lamont I.L. et al.* // J. Mol. Biol. 2004. V. 337. P. 337.
46. *Lashkov A.A., Zhukhlistova N.E., Gabdoulkhakov A.H. et al.* // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 51.
47. *Mikhailov A.M., Smirnova E.A., Tsuprun V.L. et al.* // Biochem Int. 1992. V. 26. P. 607.
48. **Федеральный исследовательский центр Информатика и управление РАН Москва: ФИЦ ИУ РАН.** <http://hhpcc.frccsc.ru>.