

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.737

К 70-летию Института кристаллографии РАН

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗЫ *E. COLI*
В КОМПЛЕКСЕ С 3'-АЗИДО-2'-ФТОР-2',3'-ДИДЕЗОКСИУРИДИНОМ© 2013 г. В. И. Тимофеев, Ю. А. Абрамчик*, И. В. Фатеев*, Н. Е. Жухлистова,
Т. И. Муравьева*, И. П. Куранова, Р. С. Есипов*

Институт кристаллографии РАН, Москва

E-mail: inna@ns.crys.ras.ru

* Институт биоорганической химии РАН, Москва

E-mail: esipov@ibch.ru

Поступила в редакцию 11.06.2013 г.

При разрешении 1.55 и 1.50 Å определены пространственные структуры тимидинфосфорилазы из *E. coli* со связанным ионом сульфата в фосфатсвязывающем центре и комплекса тимидинфосфорилазы с ионом сульфата в фосфатсвязывающем центре и ингибитором 3'-азидо-2'-фтор-2',3'-дидезоксиуридином (N_3F -ddU) в нуклеозидсвязывающем центре. Описаны аминокислотные остатки, вовлеченные в связывание лигандов, и сеть водородных связей в активном центре, включающем большое число связанных молекул воды. При сравнении структуры комплекса тимидинфосфорилазы/ N_3F -ddU со структурой комплекса пиримидиннуклеозидфосфорилазы из *St. Aureus* с природным субстратом – тимидином (PDB_ID: 3H5Q) показано, что субстрат и ингибитор в нуклеозидсвязывающем кармане ориентированы по-разному. Предполагается, что на позицию N_3F -ddU может влиять присутствие азидогруппы, для которой предпочтительно гидрофобное окружение. В обеих структурах конформации активного центра субъединиц являются открытыми.

DOI: 10.7868/S0023476113060246

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеозидфосфорилазы, включающие пиримидин- и пуриннуклеозидфосфорилазы, катализируют обратимый фосфоролитический расщепление пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и участвуют в запасных путях синтеза природных нуклеозидов [1–3].

При реакции фосфоролитического расщепления, катализируемой нуклеозидфосфорилазами, гликозидная связь в пуриновых и пиримидиновых нуклеозидах разрывается под действием ионов фосфата, в результате реакции образуются соответствующее свободное основание и рибозо-1-фосфат. Нуклеозидфосфорилазы обладают также гликозилтрансферазной активностью, перенося остаток углевода с одного основания на другое. В связи с этим они находят широкое применение для синтеза аналогов нуклеозидов [4].

Как показали рентгеноструктурные исследования, по типу пространственной организации нуклеозидфосфорилазы относятся к одному из двух семейств [5]. Первому семейству принадлежат пуриннуклеозидфосфорилазы и уридинфосфорилаза, ко второму – остальные пиримидинфосфорилазы. Для всех нуклеозидфосфорилаз второго семейства характерны гомодимерная четвертичная структура и двухдоменное строение субъединицы. Степень гомологии между белками этого семейства достигает 40%.

Интерес к изучению структуры и свойств нуклеозидфосфорилаз связан с их вовлеченностью в метаболизм противораковых и противовирусных препаратов – аналогов нуклеозидов. Важным с терапевтической точки зрения является тот факт, что нуклеозидфосфорилазы вовлекаются в фосфоролитический расщепление различных аналогов пиримидиновых нуклеозидов, используемых как антивирусные или противоопухолевые агенты. Ингибиторы пиримидинфосфорилаз могут усиливать фармакологическое действие этих лекарств [6–8].

Тимидинфосфорилаза (ТФ) высоко специфична к нуклеозидам, содержащим в качестве углеводной компоненты 2'-дезоксирибозу, она катализирует превращение тимидина и 2'-дезоксидезоксирибозы в соответствующие основания и 2- α -D-дезоксирибозу-1-фосфат.

Тимидинфосфорилаза вовлечена в процесс ангиогенеза, поэтому в тканях злокачественных опухолей, где ангиогенез протекает постоянно и очень интенсивно [9, 10], концентрация ТФ повышена по сравнению с нормальными тканями [11]. Развитие и рост опухолей зависят от запасного пути синтеза нуклеозидов. Ингибирование данного пути синтеза, катализируемого нуклеозидфосфорилазами, является одной из стратегий борьбы с раковыми заболеваниями, поэтому ТФ может служить белком-мишенью для поиска ингибиторов – потенциальных противоопухолевых препаратов.

Среди ингибиторов ТФ особое место занимают аналоги природных нуклеозидов, содержащих заместители в углеводной компоненте. Многие нуклеозиды, в которых углеводные оксигруппы замещены на фтор или азидогруппу, обладают высокой цитостатической активностью, а также активны против вирусов герпеса, гепатита С, гриппа. Присутствие атома фтора и азидогруппы в углеводном кольце нуклеозида влияет на фармакокинетические свойства и распределение препарата в тканях [12]. Аналоги нуклеозидов, содержащие азидогруппу в рибозном кольце и являющиеся ингибиторами обратной транскриптазы, применяются в качестве лекарственных средств при лечении синдрома иммунодефицита человека [13].

Изучение пространственной структуры комплексов аналогов природных нуклеозидов, применяемых в качестве фармакологических препаратов, с ферментами, вовлеченными в обменные процессы с участием этих соединений, позволяет на атомном уровне выяснить характер взаимодействия нуклеозидов с ферментом, что важно как для рационального дизайна новых ингибиторов, так и для конструирования мутантных форм фермента с измененной специфичностью.

В настоящее время пространственные структуры ряда пиримидиннуклеозидфосфорилаз установлены в интервале разрешений от 2.1 до 3.0 Å: ТФ из *Escherichia coli* (как в свободной форме, так и в комплексах) [14, 15], пиримидиннуклеозидфосфорилазы из *Bacillus stearotherophilus* (BsPyNP) в комплексе с фосфатом и ингибитором псевдоуридином [16], тимидинфосфорилазы человека в комплексе с малой молекулой-ингибитором [17] и в комплексе с тимидином [18], а также пиримидиннуклеозидфосфорилазы из *St. Aureus* в комплексе с одним из субстратов реакции – тимидином (PDB_ID: 3H5Q; разрешение 1.94 Å). Описано двудомное строение субъединиц фермента; в активных центрах субъединиц локализованы участки, в которых связываются оба субстрата реакции: ионы фосфата и нуклеозид; показано, что субъединицы фермента могут иметь открытую или закрытую конформацию [15, 16].

В настоящей работе выращены кристаллы и определены пространственные структуры ТФ из *E. coli* со связанным ионом сульфата и комплекса ТФ с ионом сульфата и ингибитором 3'-азидо-2'-фтор-2',3'-дидезоксиуридином (ТФ/ N_3F -ddU) при разрешении 1.55 и 1.50 Å соответственно. В активном центре каждой субъединицы комплекса локализованы ион сульфата, занимающий фосфатсвязывающий сайт, и ингибитор N_3F -ddU в нуклеозидсвязывающем сайте. Описано ближайшее окружение лигандов и конформационные изменения, сопровождающие связывание ингибитора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ТФ. Рекомбинантная ТФ *E. coli* получена в бактериальном штамме *E. coli* BL21(DE3)/pER_Thy1. На первой стадии очистки супернатант подвергался двойному высаливанию сульфатом аммония, после чего белок очищали последовательно анионообменной хроматографией на сорбенте Sepharose Q HP и гидрофобной хроматографией на сорбенте PhenylSepharose HP [19, 20].

Определение кинетических параметров. Каждая реакционная смесь (1 мл, 50 мМ фосфата калия, рН 7.0) содержала: от 0.06 до 1.80 мМ тимидина, 0.36 мг/л ТФ и ингибитор. Для каждого эксперимента готовилось 15 реакционных смесей с разным содержанием тимидина и одинаковым содержанием ингибитора. Реакция велась одну минуту при комнатной температуре. Концентрация тимидина и тимидина определялась высокоэффективной жидкостной хроматографией в изократическом методе. Элюент 26% метанола в воде, длина волны 254 нм, детектор Waters 2489. Колонка MZ PerfectSil 100 ODS-3.5 мкм, 150 × 4.6 мм. Кинетические параметры определялись по методу Эйзенталя и Корниш-Боудена. Константа ингибирования рассчитывалась для каждого из трех экспериментов исходя из наблюдаемой максимальной скорости реакции при данной концентрации ингибитора и максимальной скорости без ингибитора, после чего вычислялось среднее значение.

Выращивание кристаллов. Кристаллы, использованные для установления пространственной структуры тимидинфосфорилазы из *E. coli* в свободном виде – ТФ и в комплексе с ингибитором – ТФ/ N_3F -ddU, выращены в невесомости методом встречной диффузии через слой геля при использовании сульфата аммония в качестве осадителя. Кристаллы комплекса ТФ с нуклеозидом 3'-азидо-2'-фтор-2',3'-дидезоксиуридином (N_3F -ddU) получены сокристаллизацией при двадцатикратном избытке лиганда [20]. Кристаллы выращены в оборудовании Японского аэрокосмического агентства JAXA [21] по методике [20]. Раствор белка с концентрацией 22 мг/мл в буфере 0.02 М KH_2PO_4 , рН 7.3 содержал 0.04% NaN_3 , 4 мМ 3'- N_3 -2'-F-2',3'-ddU (1 : 20). Состав раствора осадителя: 30%-ный сульфат аммония в 0.05 М Na-цитратном буфере рН 6.0, 0.04% NaN_3 , 4 мМ 3'- N_3 -2'-F-2',3'-ddU (1 : 20).

Сбор и обработка дифракционных данных. Дифракционные наборы от выращенных кристаллов собраны на синхротроне SPring 8 (Япония) при температуре 100 К на станции BL41XU с CCD-детектором MAR225HE. Дифракционные данные от одного кристалла получены методом вращения. Длина волны составляла 0.8 Å. Расстояние кристалл–детектор 188 мм, угол качения

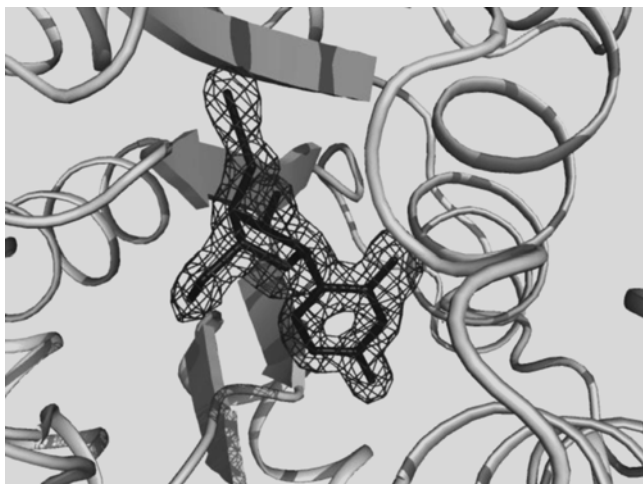


Рис. 1. Участок молекулы ТФ со связанным лигандом N₃F-ddU. Электронная плотность лиганда N₃F-ddU рассчитана с коэффициентами |Fo|–|Fc| при $\sigma = 2.0$. При расчете карт электронной плотности лиганд был исключен.

0.5°, угол вращения 180°. Обработку набора экспериментальных интенсивностей проводили с помощью программы HKL-2000 [22]. Наборы обработаны до разрешения 1.55 и 1.50 Å соответственно для ТФ и ТФ/N₃F-ddU. В независимой части кристаллической ячейки (пр. гр. P₄3₂1₂) находится одна субъединица димерной молекулы фермента. Статистические характеристики наборов приведены в табл. 1.

Решение и уточнение структуры. Структуры ТФ без ингибитора и ТФ в комплексе с N₃F-ddU установлены соответственно при разрешении 1.55 и 1.50 Å методом молекулярного замещения с помощью программы Phaser [23]. В качестве стартовых использовали координаты ТФ из *E. coli*, исследованной при разрешении 2.6 Å (PDB_ID: 2TRT). Уточнение проведено по программе Refmac [24]. Ручную правку моделей проводили при помощи программы Coot [25], используя карты электронной плотности, рассчитанные с коэффициентами 2|Fo|–|Fc| и |Fo|–|Fc|.

На картах электронной плотности в обеих структурах локализовано значительное число молекул воды и ионов сульфата, в том числе расположенных в функционально важных участках молекулы. Из-за присутствия сульфата аммония в составе осадителя, в обоих видах кристаллов фосфатсвязывающий карман активного центра оказался занят ионом сульфата, который является структурным аналогом фосфата. В кристаллах комплекса ТФ/N₃F-ddU в нуклеозидсвязывающем кармане активного центра локализован нуклеозид 3'-N₃-2'-F-2',3'-ddU с полной степенью заселенности (рис. 1). Ион сульфата, локализованный в фосфатсвязывающем субсайте активного

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов

PDB_ID	4EAF	4EAD
Обработка набора		
Пространственная группа	P ₄ 3 ₂ 1 ₂	P ₄ 3 ₂ 1 ₂
Параметры ячейки, Å, град	a = b = 129.9, c = 67.8 α = β = γ = 90	a = b = 129.9, c = 67.8 α = β = γ = 90
Разрешение, Å	30.00–1.55 (1.59–1.55)	30.00–1.50 (1.54–1.50)
Количество независимых рефлексов	82 144	92 521
Полнота набора, %	97.2 (93.4)	99.8 (99.2)
I/σ(I)	32.9 (2.9)	35.6 (3.2)
Rmrgd-F, %	6.4 (38.4)	6.2 (32.8)
Уточнение		
Разрешение, Å	1.55	1.50
Количество рефлексов, использованных при уточнении	77 911	87 704
Количество рефлексов, использованных при расчете Rfree	4 120	4 617
Rcryst/Rfree, %	15.8/20.7	14.5/19.2
Количество уточненных атомов	3 929	3 985
Количество уточненных молекул воды	443	519
B-фактор, Å ²		
Средний	30.9	26.7
Основной цепи	26.8	21.8
Боковых цепей и молекул воды	34.5	30.7
RMSD		
Длины связей, Å	0.006	0.008
Углы, град	1.102	1.443
Карта Рамачандрана		
Наиболее благоприятные области, %	98.6	98.2
Допустимые области, %	1.4	1.6
Запрещенные области, %	0	0.2

* В скобках приведены значения для последней оболочки.

центра с заселенностью, близкой к единице, рассматривается далее как имитирующий положение фосфата. В катализируемой ферментом реакции фосфат выступает в качестве атакующего нуклеофила. Статистические характеристики уточнения приведены в табл. 1. Координаты структур депонированы в Protein Data Bank (PDB_ID: 4EAF, 4EAD).

Таблица 2. Кинетические параметры фосфоролита тимидина при разных концентрациях ингибитора 3'-N₃-2'-F-2',3'-ddU

Концентрация C _i , мМ	K _m , мМ	k _{cat} , 1/с	K _i , мМ
0	0.32 ± 0.05	214 ± 9	
0.19	0.35 ± 0.03	174 ± 9	0.83 ± 0.23
0.40	0.32 ± 0.03	148 ± 6	0.90 ± 0.20
0.60	0.35 ± 0.05	138 ± 8	1.09 ± 0.18

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение взаимодействия аналогов природных нуклеозидов с ферментами, расщепляющими гликозидную связь, в том числе с нуклеозидфосфорилазами, представляет особый интерес, поскольку производные нуклеозидов находят широкое применение в качестве лекарственных средств, а многие ферменты фосфоролита вовлечены в метаболизм лекарственных препаратов на основе нуклеозидов. Нуклеозиды, содержащие азидогруппу в рибозном кольце, применяются при лечении ряда вирусных заболеваний. Присутствие заместителей в рибозном кольце оказывает влияние на скорость расщепления гликозидной связи нуклеозидфосфорилазами. Тимидинфосфорилаза с высокой скоростью расщепляет нуклеозиды — производные дезоксирибозы. В то же время введение заместителей в рибозное кольцо оказывает влияние на скорость катализируемой реакции. Замена 2'-ОН группы урацила атомом фтора сильно понижает скорость реакции [26]. Атом фтора в 2'-положении рибозы изменяет конформацию рибозного кольца и, уменьшая длину гликозидной связи, повышает ее устойчивость к действию фермента [27].

Исследование влияния 3'-N₃-2'-F-2',3'-ddU на скорость расщепления гликозидной связи тимидина тимидинфосфорилазой показало, что данный нуклеозид является неконкурентным ингибитором. Эксперименты по определению кинетических параметров фосфоролита тимидина тимидинфосфорилазой проводились и без ингибитора 3'-азидо-2'-фтор-2',3'-дидезоксиуридина, и в его присутствии (табл. 2). Обнаружено, что константа Михаэлиса остается постоянной, а максимальная скорость реакции уменьшается. Такая зависимость характерна для неконкурентных ингибиторов. Для иллюстрации результатов приведены графики Лайнуивера—Берка (рис. 2). Средняя константа ингибирования составила 0.94 ± 0.11 мМ. Кроме того, разбавление реакционной смеси приводило к повышению удельной активности фермента, что говорит об обратимости ингибирования.

Полученные в данной работе кристаллографические данные говорят о связывании ингибитора

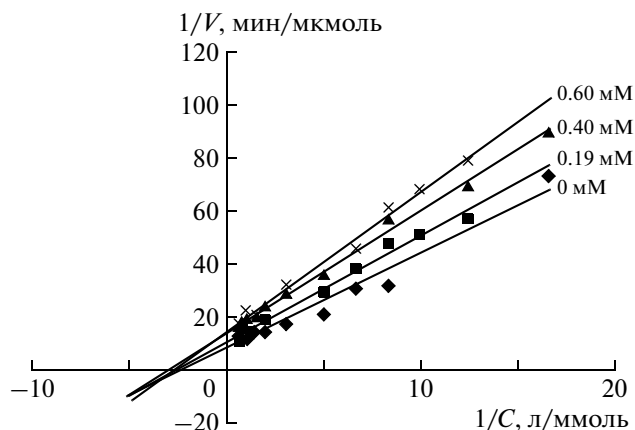


Рис. 2. Графики Лайнуивера—Берка для фосфоролита тимидина при концентрациях 3'-азидо-2'-фтор-2',3'-дидезоксиуридина 0, 0.19 и 0.40 0.60 мМ.

с тем же активным центром, с которым связывается тимидин, что характерно при конкурентном ингибировании. Можно предположить, что кинетика фосфоролита в присутствии N₃F-ddU имеет сложный характер.

На рис. 3 показана молекула ТФ в комплексе ТФ/N₃F-ddU, которая представляет собой димер S-образной формы, составленный из идентичных субъединиц, связанных кристаллографической осью симметрии второго порядка; именно димер является биологически активной формой ТФ. Степень гомологии ТФ с другими нуклеозидфосфорилазами можно видеть на рис. 4. Вторичная структура субъединиц в исследованных соединениях такая же, как в ТФ из *E. coli*, установленной ранее при разрешении 2.6 Å (PDB_ID: 2TPT) [16]. В каждой из субъединиц ТФ полипептидная цепь (рис. 5) образует два домена: малый домен (аминокислотные остатки 1–65, 161–193), сформированный шестью α-спиралями Н1–Н4, Н9–Н10 (α-домен), и большой домен (аминокислотные остатки 66–160, 194–440), состоящий из одинадцати α-спиралей (Н5–Н8, Н11–Н17) и четырех β-слоев (α/β-домен). Если топологию полипептидной цепи представить согласно классификации САТН [28], С-концевой участок большого домена (аминокислотные остатки 337–433) можно рассматривать как самостоятельный, третий домен, составленный из двух α-спиралей и шести β-лент (рис. 6). Между доменами локализован большой карман. Домены соединены тремя гибкими петлями (66–71, 155–160, 194–197), что дает возможность доменам смещаться друг относительно друга.

Активный центр ТФ, в котором находятся фосфатсвязывающий и нуклеозидсвязывающий карманы, расположен в большой полости между α- и α/β-доменами (рис. 7). Со стороны α/β-домена полость ограничена спиралями Н5, Н6, Н11

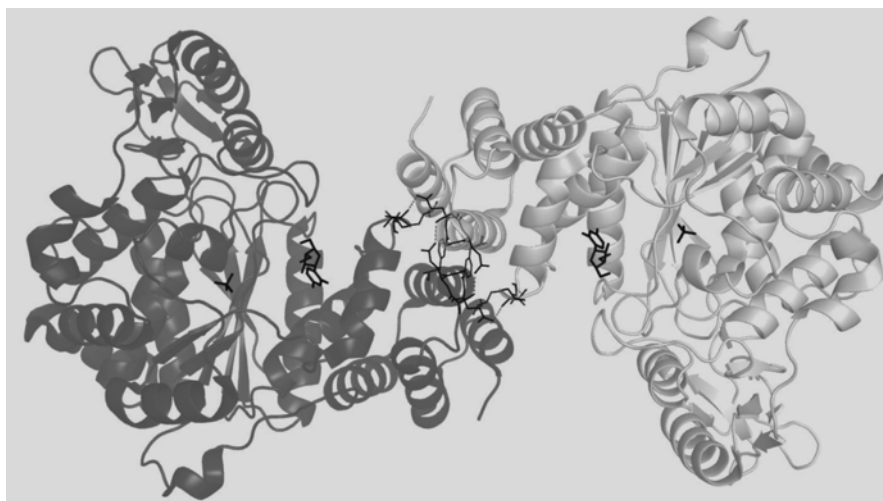


Рис. 3. Димер ТФ в комплексе с ионом SO_4^{2+} и 3'-N₃-2'-F-2',3'-ddU (N₃F-ddU) в активном центре. Выделены молекулы лигандов и зона контакта субъединиц.

1	-----MFLAQEIIIRKKRDGHALSDEEIRFFING	28	P07650	TYPH_ECOLI
1	MAALMTPGTGAPPAPGDFSGEGSQGLPDPSPPEPKQLPELIRMKRFDGGRLSEADIRGFVAA	60	P19971	TYPH_HUMAN
1	-----MRMIDIIEKKRDGHTLTTEENFFIIG	27	Q5HE64	PDP_STAAC
1	-----MRMVDLIEKKRDGHALTKKEEQFIIEG	27	P77836	PDP_GEOSE
	::*.*.*****:*:*.*.*.::..			
29	IRDNTISEGQIAALAMTIFFFHDMTPERVSLTMAMRDSGTVLDWKSLLHNGPIVDKHSTG	88	P07650	TYPH_ECOLI
61	VVNGSAQGAQIGAMLMAIRLGRMDLEETSVLTQALAQSGQQLWPEA-WRQQLVDKHSTG	119	P19971	TYPH_HUMAN
28	YVKGDIPDYQASSLAMAIYFQDMNDDERAALTMAMVNSGDMIDLSD--IKGVKVDKHSTG	85	Q5HE64	PDP_STAAC
28	YTKGDIPDYQMSALAMAIFFRGMNEEETAELTMAMVHSGDITDLRSR--IEGKIVDKHSTG	85	P77836	PDP_GEOSE
	. * . : : * : * : * * * : . : * : : . * * * * * *			
89	GVGDVTSLMLGPMVAACGGYIPMI SGRGLGHTGGTLDKLESI PGFDIFPDDNRFREI IKD	148	P07650	TYPH_ECOLI
120	GVGDKVSLVLAPALACCGKVPMI SGRGLGHTGGTLDKLESI PGFNVIQSPEQMQLLDQ	179	P19971	TYPH_HUMAN
86	GVGDTTTLVLAPLVAADVVPVAKMSGRGLGHTGGTIDKLEAIDGFHVEIDEATFVKLVNE	145	Q5HE64	PDP_STAAC
86	GVGDTTTLVLGPLVASVGVVPVAKMSGRGLGHTGGTIDKLESVPGFHVETINDEFIDL VNK	145	P77836	PDP_GEOSE
	**** . : * : * : * : : : * * * * * * * * * * * * * : * : : : . : . . .			
149	VGVAIIIGQTSSLAPADKRFYATRDIRATVDSIPLITASILAKKLAEGLDALVMDVKVGS	208	P07650	TYPH_ECOLI
180	AGCCI VQSQEQLVPADGILY AARDVTATVDSLPLITASILSKLVEGLSALVVDVKFGGA	239	P19971	TYPH_HUMAN
146	NKVAVVQSGSNLTPADKKLYALRDVTGTVNSIPLIASSIMSKKIAAGADAI VLDVKTGSG	205	Q5HE64	PDP_STAAC
146	NKIAVVVQSGSNLTPADKKLYALRDVTATVNSIPLIASSIMSKKIAAGADAI VLDVKTGSG	205	P77836	PDP_GEOSE
	. : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
209	AFMPTYELSEALAEAVGVANGAGVRTTALLTDMNQVLSAGNAVEVREAVQFLTGEYR	268	P07650	TYPH_ECOLI
240	AVFPNQEQARELAKTLVGVGASLGLRVAALATAMDKPLGRCVGHAEVEEALLCMDGAGP	299	P19971	TYPH_HUMAN
206	AFMKTLEDAAEALAHAMVRI GNNVGRNTMAII SDMNQPLGRAI GNAL ELQEAIDTLKQGQP	265	Q5HE64	PDP_STAAC
206	AFMKDLNDAKALAKAMVDIGNRVGRKTMALISDSMQPLGYAIGNALEVKEAIDTLKGE	265	P77836	PDP_GEOSE
	* : . : . : * : * : * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *			
269	NPRLFDVTMALCVELI SGKLAKDDAEARAKLQAVLDNGKAAEVFGRMVAQKGPDTDFVE	328	P07650	TYPH_ECOLI
300	P-DLRLVTTLGGALLWL SGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGRFERMLAAQGVDPGLAR	358	P19971	TYPH_HUMAN
266	K-DLTELVLTLGSMVVLANKAETLEEARALLIEAINSGAAL EKFKTFIKNQGGETVID	324	Q5HE64	PDP_STAAC
266	E-DFQELCLVLGSHMVYLA EKASSLEEARHMLEKAMKDGSA LQTFKTFLLAAQGGDASVVD	324	P77836	PDP_GEOSE
	. : : . : * : : . : * : . : . : . : * * * * * : * : * : .			
329	NY-----AKYLPTAMLTKAVYADTEGFVSEMDTRALGMAVVAMGGRRQASDTIDYS	380	P07650	TYPH_ECOLI
359	ALCSGSPAERRQLLPRAREQEELLAPADGTVELVRLPLALVLHEL GAGRSRAGEPLRLG	418	P19971	TYPH_HUMAN
325	HP-----ERLPQAQYQIEYKAKKSGYVTELVSNDI GVASMMLGAGRLTKEDDIDL	375	Q5HE64	PDP_STAAC
325	DP-----SKLPQAKYIIELEAKEDGYVSEIVADAVGTAA MWL GAGRATKESTIDLA	375	P77836	PDP_GEOSE
	. * * * * * * * * * * : : . : . : * : * * * : : : .			
381	VGFTDMARLGDQVDGQRP LAVIHAKDENNWQEA AKAVKAAIKLADK APESTPTVYRRI SE	440	P07650	TYPH_ECOLI
419	VGAE LLDVVGQRLRRGTPWLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSDBAPFAAPSPFAEL VL	478	P19971	TYPH_HUMAN
376	VGI VLNKKI GDKVEEGESLLTIHSNRQDV-DDVVKKLDSSIT IADH-VVSPTL IHKIITE	433	Q5HE64	PDP_STAAC
376	VGLVLRKKVGDVAKKGESLVTIYSNREQV-DDVVKQLYENIRI SATPVQAPTLTYDKI S-	433	P77836	PDP_GEOSE
	** * : * : : : * : *			
441	----	440	P07650	TYPH_ECOLI
479	PPQQ	482	P19971	TYPH_HUMAN
434	----	433	Q5HE64	PDP_STAAC
434	----	433	P77836	PDP_GEOSE

Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей тимидинфосфорилаз из *E. coli* (TYPH_ECOLI), человека (TYPH_HUMAN) и пиримидиннуклеозидфосфорилаз из *Staphylococcus aureus* (PDP_STAAC) и *Bacillus stercorophilus* (PDP_GEOSE). Более светлым выделены α -спирали, более темным – β -ленты. Звездочками внизу отмечены одинаковые остатки, одной или двумя точками – когда не во всех четырех структурах остаток одинаковый, или похожие остатки. Одна или две точки – степень похожести/количество совпадающих.

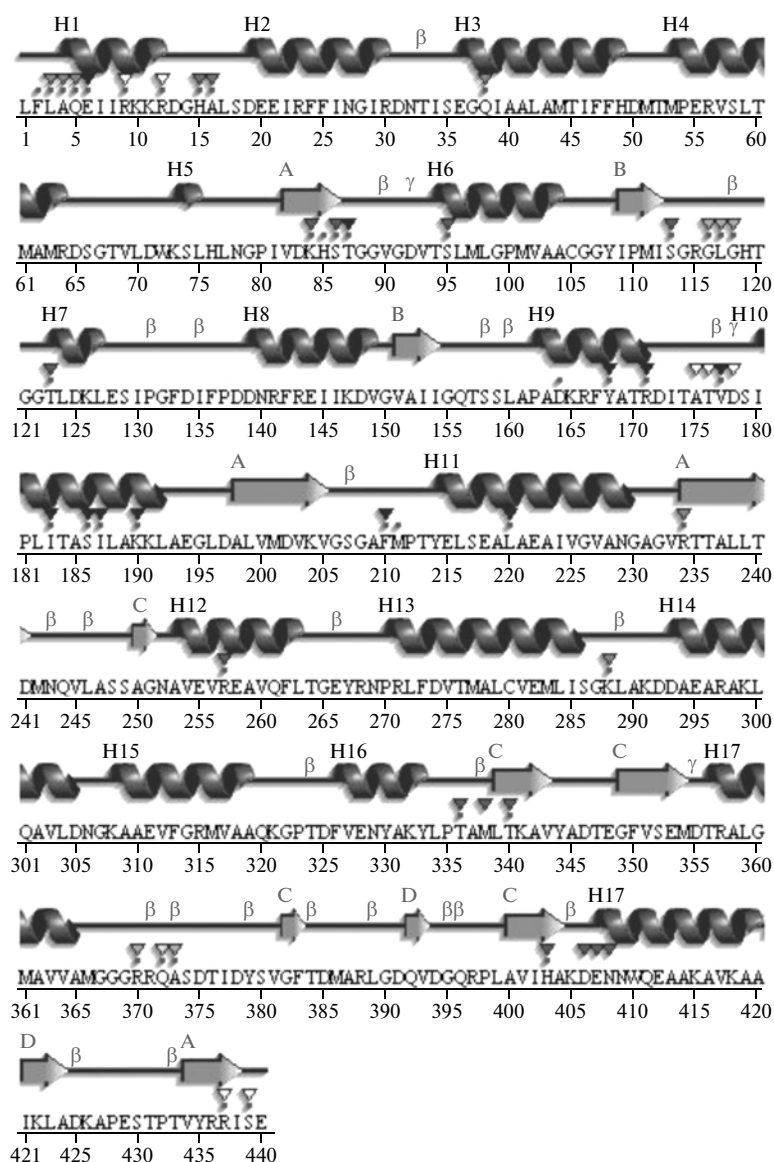


Рис. 5. Вторичная структура полипептидной цепи ТФ/Ν₃F-ddU. H1–H17 – спирали; А, В, С, D – ленты, принадлежащие к разным β-слоям; β, γ – повороты в петлях; ▽ – остатки, контактирующие с лигандами (GOL 505, GOL 509, SO4 503, SO4 504, SO4 502, ONP 501, GOL 507, SO4 506, SO4 510, GOL 508, SO4 511).

и β-лентами (82–86, 108–113). Со стороны α-домена ее ограничивают спирали H9 и H10. В формировании междоменной полости участвуют подвижные петли 113–121, 206–212, 367–381 большого домена и петля 173–179 малого. Петли 113–121, 206–212 со стороны α/β-домена и петля 173–179 из α-домена формируют один из входов в активный центр; другой вход ограничен протяженной нерегулярной петлей С-концевого домена 367–381 и междоменной петлей 155–160.

Интерфейс между двумя идентичными субъединицами димера образован главным образом аминокислотными остатками α-спиралей H3 (остатки 35–50) α-доменов; аминокислотные остатки Ser35, Glu36, Gly37 обеих субъединиц,

связанных в кристаллической структуре осью второго порядка, образуют междоменные водородные связи: OG_Ser35... OE2_Glu36'; OE2_Glu36...N_Gly37'. В области контакта субъединиц находятся также петли 173–178, связывающие α-спирали H9 и H10 в α-доменах. Остатки Asp172, Ile173, Ala175 из одной субъединицы и остатки Gln5, Arg12, Gln38 из другой участвуют в образовании четырех пар водородных связей между субъединицами димера, связанными кристаллографической осью второго порядка: O_Asp172...NE2_Gln5'; O_Ile173...NE2_Gln38'; N_Ala175...NE2_Gln5'; O_Ala175...NH2_Arg12' (рис. 3).

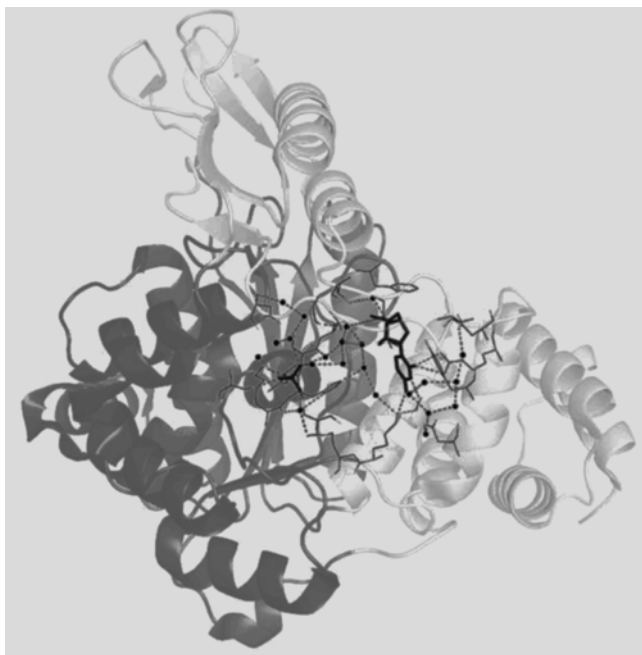


Рис. 6. Ион сульфата, молекула лиганда 3'-N₃-2'-F-2',3'-ddU и связанные с ними молекулы воды в активном центре субъединицы комплекса ТФ/3'-N₃-2'-F-2',3'-ddU. Разными оттенками серого выделены три домена субъединицы. Толстые черные линии — связанные лиганды, тонкие — боковые цепи аминокислотных остатков ближайшего окружения, черные сферы — молекулы воды, пунктирные линии — водородные связи.

ФОСФАТ- И НУКЛЕОЗИДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СУБСАЙТЫ В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ

Катализируемая ТФ реакция фосфорилиза гликозидной связи осуществляется посредством

нуклеофильной атаки одним из атомов кислорода фосфата С1'-углеродного атома нуклеозида [29]. Оба участника реакции, ион фосфата и нуклеозид, связываются в активном центре фермента. Реакция фосфорилиза подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен и протекает по упорядоченному *bi-bi*-механизму; при этом ион фосфата присоединяется первым, а из образовавшихся продуктов 1-фосфорибоза уходит последней [29].

Расположение иона сульфата, имитирующего фосфат, и молекулы лиганда N₃F-ddU в субъединице комплекса ТФ/N₃F-ddU показано на рис. 6. Лиганды находятся по разные стороны полости активного центра: ион сульфата преимущественно координируют аминокислотные остатки большого домена, а нуклеозид — малого.

Фосфатсвязывающий карман расположен между двумя β-лентами вблизи С-концевого участка центрального β-слоя α/β-домена. Ближайшее окружение сульфат-иона, занимающего фосфатсвязывающий центр, представлено на рис. 8. Ион сульфата находится рядом со спиралью Н5 и Н6, β-лентами А (82–86) и В (108–113) большого домена и спиралью Н9 малого домена (рис. 5). С аминокислотными остатками Ser86 (А), Ser95 (Н6), Ser113 (В), Thr123 (Н7), Lys84 (А) он связан как непосредственно, так и через молекулы воды; с His85, Lys191, Asp92 — через молекулы воды. Большинство аминокислотных остатков, участвующих в связывании сульфата, относятся к α/β-домену. Исключение представляет Lys191, находящийся в спирали Н10 α-домена. Рядом с сульфатом локализовано девять молекул воды, вовлеченных в систему водородных связей. Таким

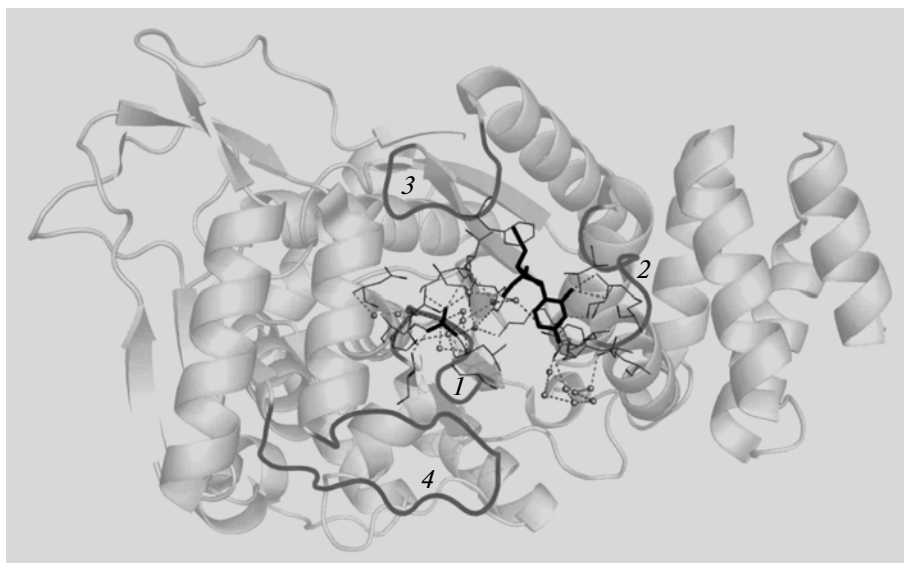


Рис. 7. Подвижные петли, ограничивающие активный центр фермента в комплексе ТФ/N₃F-ddU. Петли 1 (114–121), 3 (206–212), 4 (367–381) относятся к большому домену, петля 2 (173–179) — к малому домену. Связанные лиганды и аминокислотные остатки ближайшего окружения обозначены как на рис. 6.

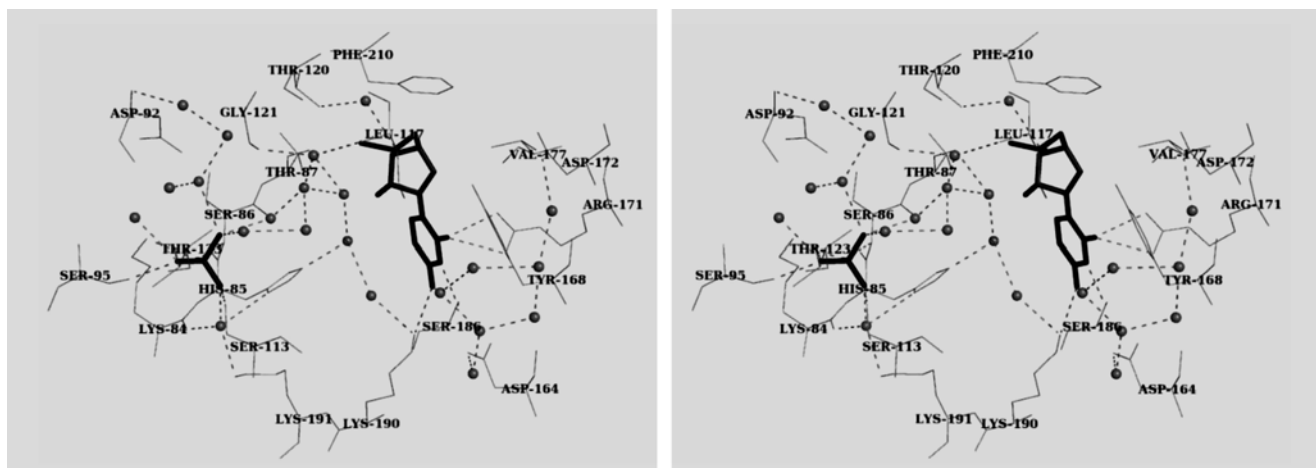


Рис. 8. Ближайшее окружение сульфат-иона и молекулы ингибитора 3'-N₃-2'-F-2',3'-ddU в активном центре комплекса ТФ/N₃F-ddU. Толстые линии – лиганды, тонкие – аминокислотные остатки, сферы – молекулы воды, штриховые линии – водородные связи.

образом, окружение иона SO_4^{2+} полностью полярно. Предполагается, что положительно заряженные остатки лизина обеспечивают требуемую для атаки ориентацию нуклеофила (фосфат-иона); остаток гистидина может регулировать степень нуклеофильности фосфата посредством донирования или акцептирования протона на разных стадиях реакции; остатки серина, треонина, аспарагина, выступая как доноры электронной пары, могут усиливать нуклеофильные свойства фосфата. Отметим, что аминокислотные остатки, находящиеся в ближайшем окружении сульфат-иона, инвариантны в пиримидиннуклеозидфосфорилазах второго семейства. Опыты по точечному мутагенезу показали необходимость некоторых из них (His 85) для активности фермента [30].

Лиганд N₃F-ddU локализован в нуклеозидсвязывающем кармане (рис. 5, 8), который образован аминокислотными остатками спиралей Н9 (Tyr168, Arg 171) и Н10 (Phe183, Ser 186, Lys190), находящимися на обращенной в междоменную полость поверхности α -домена, а также спиралью Н11 (Leu220) и β -лентой А (His85). Остаток His85 через одну молекулу воды связан с сульфатом, а через другую – с 3'-N₃-2'-F-2',3'-ddU большого α/β -домена. Кроме аминокислотных остатков, относящихся к упорядоченным участкам полипептидной цепи, в ближайшее окружение лиганда входят аминокислотные остатки из подвижных участков: Thr87 (петля 87–94 α/β -домена); Leu117, Thr 120 (консервативная петля 113–121 α/β -домена с большим содержанием остатков глицина), Met211, Phe210 (петля 206–213 α/β -домена) и Val177 из петли 173–179 малого домена. Как отмечалось выше, петля 173–179 является частью межсубъединичного интерфейса.

Кольцо пиримидинового основания образует стэкинг-взаимодействие с остатком Tyr168, важного для активности фермента. Известно, что мутация гомологичного остатка тирозина в ТФ человека на фенилаланин понижает каталитическую активность фермента, а замена на аланин полностью ее уничтожает [30].

Атом азота N3 пиримидинового цикла образует водородную связь с Ser186 (H10). Атом кислорода O2 пиримидинового основания связан водородными связями с Arg171 (спираль Н9 малого домена), атом кислорода O4 – с Lys190 (спираль Н10 малого домена). Эти связанные с пиримидиновым основанием аминокислотные остатки способны стабилизировать переходное состояние катализируемой реакции, компенсируя посредством передачи протона отрицательный заряд на уходящей группе (пиримидиновом основании) после расщепления гликозидной связи.

Атом кислорода O5' дидезоксирибозы через молекулу воды связан с Thr120 из петли 113–121 большого домена. Азидная группа в 3'-положении погружена в гидрофобный карман, образованный боковыми цепями Leu220 (спираль Н11) и Phe210 (петля 204–214) α/β -домена и остатками Phe183, Phe187 спирали Н10 α -домена. Атом фтора в 2'-положении дидезоксирибозы сближен с этим же гидрофобным кластером и одновременно соседствует с двумя молекулами воды. Торсионный угол гликозидной связи между рибозным кольцом и пиримидиновым основанием (O4'-C1'-N1-C2) равен -111.70° , что соответствует антиконформации [31].

Наложение исследованных структур свободной ТФ и комплекса ТФ/N₃F-ddU по C α -атомам показало, что связывание нуклеозида сопровождается конформационными изменениями фермента, включающими небольшие сдвиги боковых

цепей аминокислотных остатков, координирующих пиримидиновый цикл, и вытеснением нескольких молекул воды из активного центра. Значительно меняет положение боковой радикал Phe210 (рис. 9). Поворот шестичленного цикла фенилаланина на $\sim 25^\circ$ позволяет разместиться азидной группе и атому фтора рибозного цикла в гидрофобном кармане между большим и малым доменами, образуемом остатками Ile183, Ile187, Leu220, Phe210. Атомы азота пиримидинового цикла располагаются на расстояниях менее 4 Å от атомов фенильного цикла остатка Phe210, концевой атом азота азидной группы находится на расстояниях 3.36 и 3.39 Å соответственно от CG2_Thr87 (петля 86–94, большой домен) и CD2_Leu220 (α -спираль 213–231, большой домен).

Боковая цепь Leu117 поворачивается на $\sim 75^\circ$ вокруг связи C α -C β , в результате атом CD1_Leu117 сближается с атомами C5, C6 пиримидинового цикла. Остаток Leu117 находится в подвижной петле с высоким содержанием глицина. Эта петля, соединяющая одну из лент β -слоя α/β -домена со спиралью H7 того же домена, инвариантна во всех пиримидинфосфорилазах.

Наряду с фосфатом и нуклеозидом в активном центре локализовано большое количество связанных молекул воды (рис. 8). Многочисленные водородные связи между аминокислотными остатками из ближайшего окружения лигандов и локализованными в активном центре молекулами воды формируют единую систему активного центра. Некоторые аминокислотные остатки взаимодействуют с обоими лигандами одновременно (объединяют оба центра связывания) и являются общими для обоих центров связывания. Например, атом фтора нуклеозида через молекулу воды (909) связан с NE2_His85. His85 через две молекулы воды связан водородной связью с NZ_Lys190, координирующим атом O4 пиримидинового основания, а через молекулу воды (669) — с одним из кислородов сульфата и с остатком Lys191. Таким образом, расположенные рядом остатки Lys190 и Lys191 являются общими для обоих центров, в которых локализованы лиганды. Однако оба лиганда, потенциальные участники катализируемой реакции, заметно удалены друг от друга: расстояние между атомом C1' дидезоксирибозы (центром нуклеофильной атаки) и ближайшим атомом кислорода сульфата (атакующим нуклеофилом) равно 10.8 Å. Поскольку при таком расстоянии реакция между обоими компонентами невозможна, описанная конформация не является активной.

В [15, 16] дано описание нескольких различных конформаций активного центра, в том числе конформаций с лигандами, находящимися на меньшем расстоянии друг от друга, и предложен возможный механизм сближения лигандов, обес-

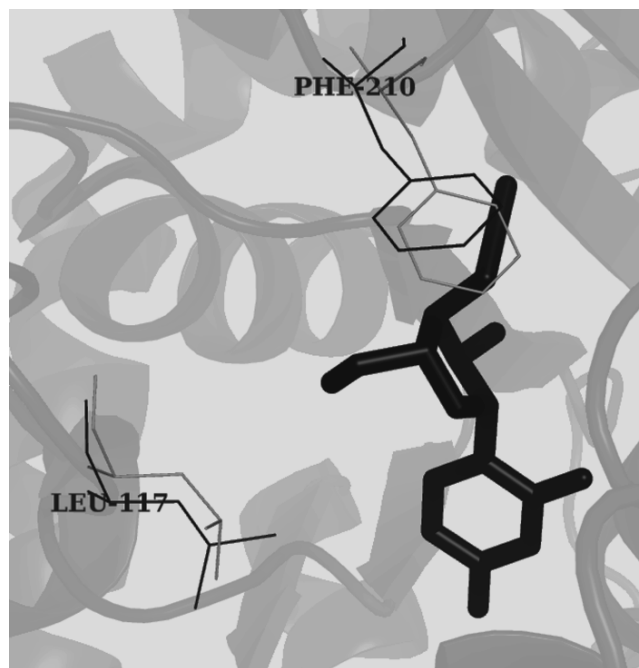


Рис. 9. Конформационные изменения в субъединице ТФ при связывании ингибитора N₃F-ddU. Показано изменение положения боковых радикалов Phe210 и Leu117 в комплексе ТФ/N₃F-ddU (черные линии) по сравнению с их положением в свободном ферменте (светлые линии).

печаивающий протекание катализируемой реакции. На основе результатов рентгеновского исследования и компьютерного моделирования [15] на примере ТФ *E. coli* показано, что сближение лигандов происходит посредством перемещения и поворота доменов друг относительно друга. Конформация активного центра, при которой оба лиганда сближены, а входы в активный центр закрыты из-за перемещения ряда нерегулярных петель, получила название закрытой (активной конформации), а конформацию с удаленными друг от друга сайтами связывания предложено называть открытой [15, 16].

Открытая конформация субъединиц найдена в моноклинной кристаллической форме ТФ из *E. coli* (PDB_ID: 1AZY); оба субстратсвязывающих центра в этой форме ТФ не содержат связанных лигандов. В кристаллической структуре 2ГРТ [15] (орторомбическая форма), где в фосфатсвязывающем сайте локализован ион сульфата, конформация субъединицы ТФ частично закрытая [15]. Примером закрытой конформации является структура одной из кристаллографически независимых субъединиц пиримидиннуклеозидфосфорилазы *Bacillus stearothermophilus* (BsPyNP), содержащей в активном центре фосфат и псевдоуридин [16]. В этой структуре оба лиганда находятся на расстоянии 5 Å, а доступ в полость активного центра ограничен из-за смещения пе-

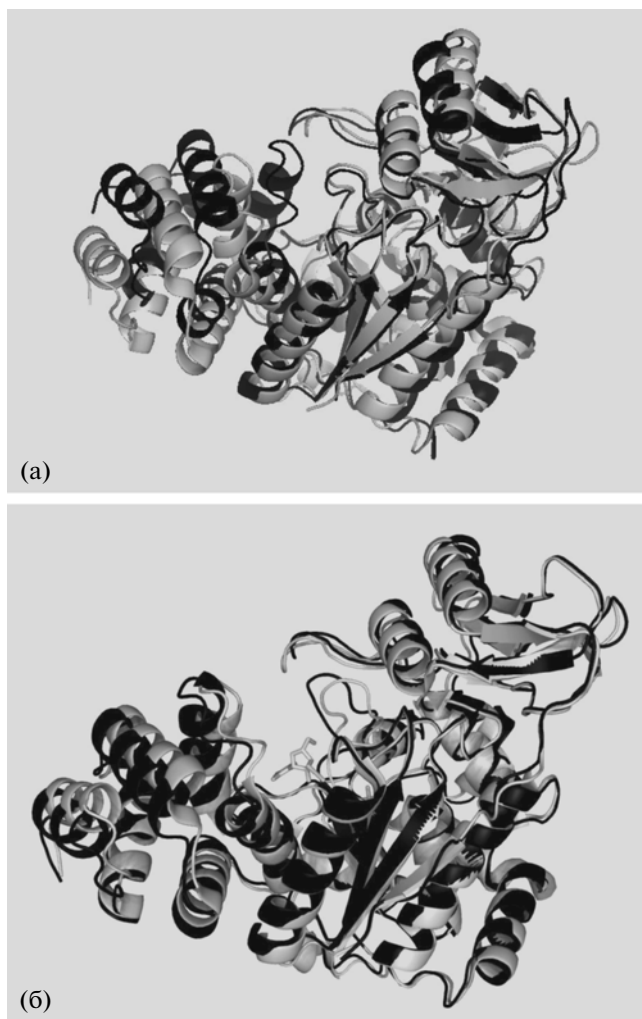


Рис. 10. Сравнение конформации субъединиц в комплексах BsPyNP/псевдоуриндин (черный цвет) и TΦ/N₃F-ddU (серый цвет). Видна разница в положении подвижных петель и α-спиралей малого домена. Совмещение проводилось по элементам вторичной структуры (а). Сравнение конформации субъединиц в открытой форме TΦ из *E. coli* (PDB_ID: 1AZY, черный цвет) и в комплексе TΦ/N₃F-ddU (серый цвет) (б).

тель 113–121 и 367–381 в полость междоменного кармана.

Совмещение структуры BsPyNP (PDB_ID: 1BRW), которая соответствует закрытой конформации, со структурой комплекса TΦ/N₃F-ddU показывает значительную разницу в положении нерегулярных петель, ограничивающих полость активного центра (рис. 10а). При совмещении структур по Cα-атомам малого домена сдвиг между Cα-атомами гомологичных остатков фенилаланина, расположенных в петле 206–213, (Phe210 в структуре TΦ/N₃F-ddU и Phe207 в BsPyNP) составляет 6.17 Å. Ближайшее расстояние между Cα-атомами Phe210 (207) и Asp 178

(175) из петли 173–181 в структуре TΦ/N₃F-ddU составляет 8.69 Å, а в BsPyNP эти остатки сближены до расстояния 5.14 Å. В структуре TΦ/N₃F-ddU Cα-атомы остатков Ala373 подвижной петли 367–381 и Ile173 из петли 173–179, расположенных на разных сторонах полости активного центра, находятся на расстоянии 13.44 Å, тогда как в BsPyNP эти петли заметно сближены; расстояние между Cα-атомами гомологичных остатков равно 6.64 Å. Результаты сравнения структур BsPyNP и TΦ/N₃F-ddU показывают, что конформация субъединицы в комплексе TΦ/N₃F-ddU не является закрытой.

Сравнение структур TΦ и TΦ/N₃F-ddU со структурой открытой формы TΦ из *E. coli* (PDB_ID: 1AZY) по Cα-атомам показало, что α-спирали малого домена в комплексе TΦ/N₃F-ddU несколько сдвинуты в сторону большого домена относительно их положения в открытой форме. Следовательно, карман между доменами в комплексе TΦ/N₃F-ddU в некоторой степени закрывается (рис. 10б). Кроме того, заметно смещаются петли 113–121 и 367–381. Среднее значение *rmsd* при сравнении структур TΦ/N₃F-ddU и открытой формы TΦ из *E. coli* по Cα-атомам равно 1.04 Å, максимальные отклонения между Cα-атомами наблюдаются для Leu117 (4.00 Å), Ile173 (3.707 Å), Ser374 (3.134 Å), Phe48 (3.542 Å), Asp13 (3.680 Å). Пространственное строение TΦ/N₃F-ddU и TΦ из *E. coli*, содержащей в активном центре только ион сульфата (PDB_ID: 2TPT), практически одинаково (*rmsd*_{сред} = 0.324 при сравнении структур TΦ/N₃F-ddU и 2TPT по Cα-атомам), т.е. в обоих структурах субъединицы находятся в одинаковой степени “открытости”.

Совмещение структуры комплекса TΦ/3'N₃-2'F-2',3'-ddU с гомологичной структурой TΦ из *St. aureus*, содержащей в активном центре природный субстрат – тимидин (PDB_ID: 3H5Q), позволило сравнить положение субстрата и ингибитора в нуклеозидсвязывающем сайте. Как показано на рис. 11, положения субстрата и ингибитора в нуклеозидсвязывающем сайте обоих ферментов частично перекрываются. При этом, хотя ориентация обоих лигандов различна, плоскости пиримидиновых оснований практически совпадают. Атомы кислорода и атом азота N3 пиримидинового основания в обеих структурах связаны водородными связями с гомологичными аминокислотными остатками лизина, аргинина и серина (Lys190, Arg 171, Ser186 в структуре TΦ/N₃F-ddU; Lys187, Arg168, Ser183 – в 3H5Q). Однако пиримидиновые кольца повернуты друг относительно друга таким образом, что в TΦ/N₃F-ddU с гуанидиновой группой Arg171 связан атом O2 основания, с Lys190 – атом O4. Напротив, в комплексе TΦ *St. aureus*/тимидин с атомом O2 осно-

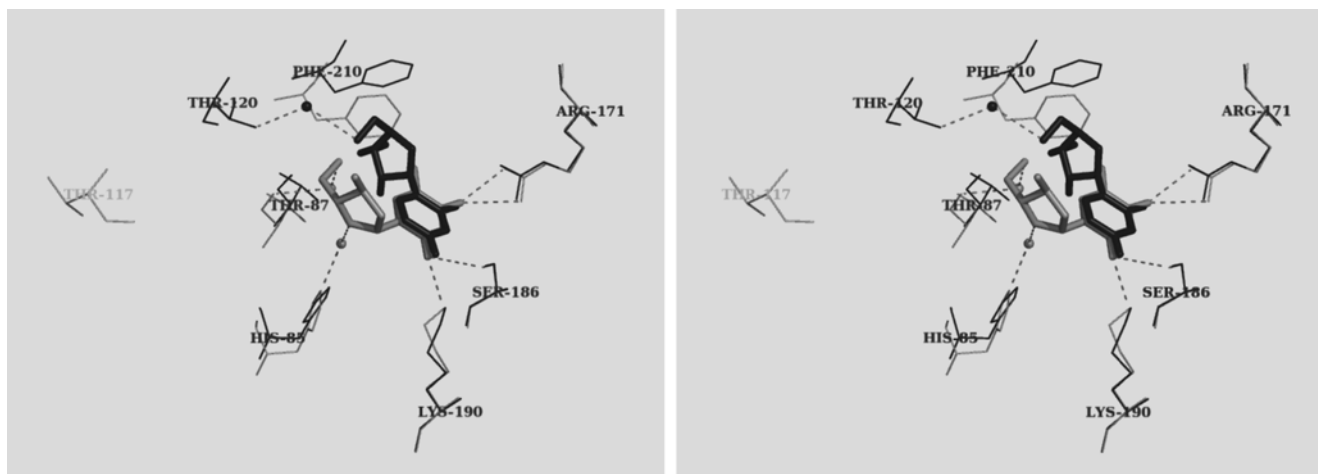


Рис. 11. Сравнение положения тимидина (субстрата ТФ) в комплексе ТФ *St. Aureus*/тимидин (PDB_ID: 3H5Q) и ингибитора в комплексе ТФ/ N_3F -ddU. Тонкие серые и темно-серые линии – ближайшее окружение лигандов для ТФ *St. Aureus*/тимидин и ТФ/ N_3F -ddU соответственно, жирные серые линии – тимидин, черные – ингибитор, сферы – молекулы воды, пунктирные линии – водородные связи.

вания связан Lys187 (Lys190 в ТФ/ N_3F -ddU), а с O4 – Arg168 (Arg171 в ТФ/ N_3F -ddU). В результате рибозные кольца в сравниваемых структурах оказываются в разном окружении. Атом кислорода рибозы O5' в ТФ *St. Aureus* посредством молекулы воды связан водородными связями с атомом кислорода основной цепи Thr84 (Thr 87 в ТФ/ N_3F -ddU), а в комплексе ТФ/ N_3F -ddU – с OG1_Thr120 (Thr117 в ТФ *St. Aureus*). Атом O4' в ТФ *St. Aureus* через молекулу воды связан с His82 (His85 в ТФ/ N_3F -ddU), в то время как атом O4' в ТФ/ N_3F -ddU находится на расстояниях 3.27 и 4.18 Å соответственно от CG1_Val177 и OH_Tyr168. Заместители в 3'-положении рибозных колец, 3'-ОН группа в тимидине и 3'-азидогруппа ингибитора противоположно направлены. При этом азидная группа ингибитора погружена в гидрофобный карман, формируемый остатками Ile183, Ile187, Leu220, Phe210. В ТФ *St. Aureus* в том же кармане располагается метильная группа пиримидинового основания тимидина, а ближайшим соседом 3'-ОН группы тимидина является атом OH_Tyr165, 3.61 Å (Tyr168 в ТФ/ N_3F -ddU).

Несколько различаются и конформации обоих нуклеозидов: торсионный угол гликозидной связи в тимидине равен -148.88° , а в 3'- N_3 -2'-F-2',3'-ddU -111.70° . Таким образом, замена 3'-гидроксильной группы рибозы на азидогруппу и введение атома фтора в 2'-положение изменяют положение ингибитора в активном центре по сравнению с положением субстрата. Очевидно, что в случае сближения лигандов ориентация нуклеофила относительно гликозидной связи будет различаться для обоих соединений, что скажется и на скорости катализируемой реакции.

Совмещение структур ТФ/ N_3F -ddU и ТФ *St. Aureus*/тимидин показало открытую конформацию субъединиц в обеих молекулах. Этот факт свидетельствует о том, что присутствие лиганда, в том числе субстрата в нуклеозидсвязывающем кармане, не является достаточным условием для перехода к закрытой конформации. Возможно, что конформация субъединиц зависит также от условий кристаллизации (природы осадителя – полиэтиленгликоль или сульфат аммония) и от межмолекулярных контактов в кристаллической решетке.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-01100-а, 12-02-12053-офи_м), ЦНИИМаш Роскосмоса и Программы 9 отделения химии и материаловедения РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Iltzsch M.H., el Kouni M.H., Cha S.* // Biochemistry. 1985. V. 19. P. 6799.
2. *Friedkin M., Roberts D.* // J. Biol. Chem. 1954. V. 207. P. 245.
3. *Krenitsky T.A., Koszalka G.W., Tuttle J.V.* // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 3615.
4. *Sivets G.G., Kalinichenko E.N., Mikhailopulo I.A.* // Helvetica Chimica Acta. 2007. V. 90. P. 1818.
5. *Pugmire M.J., Ealick S.E.* // Biochem. J. 2002. V. 361. P. 1.
6. *Desgranges C., Razaka G., Rabaud M. et al.* // Biochem. Pharmacol. 1983. V. 32 P. 3583.
7. *Woodman P.W., Sarrif A.M., Heidelberger C.* // Cancer Res. 1980. V. 40. P. 507.
8. *Schwartz E.L., Baptiste N., Megati S. et al.* // Cancer Res. 1995. V. 55. P. 3543.

9. *Usuki K., Saras J., Waltenberger J. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 184. P. 1311.
10. *Akiyama S., Furukawa T., Sumizawa T. et al.* // *Cancer Sci.* 2004. V. 95. № 11. P. 851.
11. *Ligo M., Nishikata K., Nakajima Y. et al.* // *Biochem. Pharmacol.* 1990. V. 39. № 7. P. 1247.
12. *Сивец Г.Г., Калининко Е.Н.* // *Труды БГУ.* 2010. Т. 5. Часть 1. С. 210.
13. *Zhu L., Yang F., Chen L. et al.* // *J. Struct. Biology.* 2008. V. 162. P. 40.
14. *Walter M.R., Cook W.J., Cole L.B. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 14016.
15. *Pugmire M.J., Cook W.J., Jasanoff A. et al.* // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 281. P. 285.
16. *Pugmire M. J., Ealick S. E.* // *Structure.* 1998. V. 6. P. 1467.
17. *Norman R. A., Barry S. T., Bate M. et al.* // *Structure.* 2004. V. 12. P. 75.
18. *El Omari K., Bronckaers A., Liekens S. et al.* // *Biochem. J.* 2006. V. 399. P. 199.
19. *Есинов Р.С., Гуревич А.И., Мирошников А.И., Чуви-ковский Д.В.* Патент № 2188234.
20. *Куранова И.П., Смирнова Е.А., Абрамчик Ю.А. и др.* // *Кристаллография.* 2011. Т. 56. № 5. С. 944.
21. *Takahashi S., Tsurumura T., Aritake K. et al.* // *Acta Cryst. F.* 2010. V. 66. P. 846.
22. *Otwinowski Z., Minor W.* // *Methods in Enzymology / Ed. Barrett A.J.* New York: Academic Press, Inc., 1997. V. 276. P. 307.
23. *McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R.W., Storoni L.C., Read R.J.* // *Acta Cryst. D.* 2005. V. 61. P. 458.
24. *Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J.* // *Acta Cryst. D.* 1997. V. 53. P. 240.
25. *Emsley P., Cowtan K.* // *Acta Cryst. D.* 2004. V. 60. P. 2126.
26. *Tuttle J.V., Tisdale M., Krenitsky T.A.* // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 119.
27. *Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I.* // *Mendeleev Commun.* 2011. V. 21. P. 57.
28. *Sillitoe I., Cuff A.L., Dessailly B.H. et al.* // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. 490.
29. *Schwartz M.* // *Eur. J. Biochem.* 1971. V. 21. P. 191.
30. *Mitsiki E., Papageorgiou A.C., Iyer S. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 486. P. 666.
31. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. 584 с.