

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 544.1+548.737+577.1,3,32

Посвящается памяти Б.К. Вайнштейна

УРИДИНФОСФОРИЛАЗА – БИОМЕДИЦИНСКИЙ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АСПЕКТЫ. ОБЗОР

© 2011 г. А. А. Лашков, Н. Е. Жухлистова, Т. А. Серёгина,
А. Г. Габдулхаков, А. М. Михайлов

Институт кристаллографии РАН, Москва

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

Поступила в редакцию 18.01.2011 г.

Частой причиной развития резистентности клеток злокачественных новообразований к химиотерапевтическому лечению является активация ксенобиотиков. Уридинфосфорилаза – ключевой фермент метаболизма пиримидина, катализирующий обратимое фосфорилирование уридина с образованием урацила и рибозо-1-фосфата. Создание высокоселективных противоопухолевых препаратов на основе ингибиторов уридинфосфорилаз перспективно как для борьбы с онкологическими, так и инфекционными заболеваниями. Прогнозирование и рациональная разработка новых лекарственных препаратов возможны лишь на основе детальных биомедицинских и структурно-функциональных знаний о биомакромолекулярном комплексе энзим-мишень – лекарство.

ОГЛАВЛЕНИЕ

- Введение
1. Уридинфосфорилаза – фермент метаболизма уридина
 - 1.1. Общие сведения об уридинфосфорилазе
 - 1.2. Участие уридинфосфорилазы в гомеостазе уридина
 - 1.3. Влияние ингибиторов уридинфосфорилаз на гомеостаз уридина
 - 1.4. Уридинфосфорилазная активность различных тканей в норме и при патологии
 2. Применение уридинфосфорилазы и ее специфических ингибиторов в медицинской практике
 - 2.1. Ингибиторы уридинфосфорилазы как перспективные антимикробные и антипаразитарные препараты
 - 2.2. Участие уридинфосфорилазы в метаболизме 5-фторурацила
 - Ингибиторы уридинфосфорилазы как модуляторы активности 5-фторурацила
 - 2.3. Уридинфосфорилаза в активации капситабина
 - 2.4. Экспрессия уридинфосфорилазы в опухолевых клетках. Чувствительность опухолей различного происхождения к ингибиторам уридинфосфорилазы
 - 2.5. Защитное действие уридина при ишемии нервной ткани и миокарда
3. Ингибиторы фосфорилазы
 - 3.1. Общая классификация ингибиторов уридинфосфорилазы
 - 3.2. Производные ациклонуклеозидов
 - 3.3. Производные бензилациклоуридинов
 - 3.4. Ингибирующая активность структурных аналогов уридина
 - 3.5. Производные ангидроуридина
 4. Пространственное строение уридинфосфорилазы
 - 4.1. Молекула уридинфосфорилазы
 - 4.2. Активный центр
 - 4.2.1. Урацилсвязывающий сайт
 - 4.2.2. Рибозосвязывающий сайт
 - 4.2.3. Фосфатсвязывающий сайт
 - 4.3. Исследование молекулярного гидрофобного потенциала 2,2'-ангидроуридина и сайтов связывания уридинфосфорилазы
 - 4.4. Роль функционально-значимой петли L9 в связывании ингибитора
 - 4.5. Влияние присутствия в активном центре ингибитора и (или) иона фосфата на пространственное строение субъединиц молекулы
 - 4.6. Ион калия в структуре комплекса уридинфосфорилазы с лигандами (2,2'-ангидроуридином и ионом фосфата)
 5. Исследование молекул уридинфосфорилазы методами компьютерного моделирования
 - 5.1. Исследование конформационной лабильности молекул *StUPh* и *HUPhI*

5.2. Решение структуры комплекса $HUPhI$ с 2,2'-ангидроуридином методом молекулярного докинга

5.3. *In silico* дизайн высокоселективного ингибитора (потенциального лекарственного препарата)

5.3.1. Конструирование нового ингибитора уридинфосфорилазы класса 2,2'-ангидроуридина, замещенного в 5-м положении урацильного кольца

5.3.2. Конструирование нового ингибитора уридинфосфорилазы класса 2,2'-ангидроуридина замещенного в 6-м положении урацильного кольца

Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Мишенью для лекарственных препаратов в организме человека в большинстве случаев являются ферменты. Такова ситуация как в фармакокинетике (механизм непосредственного действия препарата), так и в фармакодинамике (превращение и разрушение лекарственных средств в организме и в очаге патологического процесса). Модулируя активность ферментов, можно повысить эффективность лечения и снизить побочные эффекты. Одной из актуальных мишеней в организме с фармакологической точки зрения является уридинфосфорилаза (UPh, УФаза, E.C. 2.4.2.3) [1–5]. Этот фермент принимает участие в метаболизме противоопухолевых препаратов – антиметаболитов пиримидинов, которые, несмотря на высокую токсичность, остаются основным средством химиотерапии некоторых видов опухолей [6–10].

М. Igo с соавторами [1] показал, что ингибирование уридинфосфорилазы способствует увеличению активности основного противоопухолевого лекарственного препарата 5-фторурацила (5ФУ). Из-за конкуренции за тимидилатсинтеазу 5ФУ является антиметаболитом урацила, что и приводит к снижению токсичности при лечении этим лекарственным препаратом. Роль УФазы в обмене уридина у высших организмов менее значима, чем для микроорганизмов, так как большая часть пиримидиновых оснований в клетках высших организмов синтезируется *de novo*, и только значительно меньшая часть синтезируется путем ресинтеза [11].

Клетки многих микроорганизмов лишены тимидинфосфорилазной активности, и именно уридинфосфорилаза катализирует в них фосфорилиз как рибо-, так и дезоксирибозопиримидин нуклеозидов. Инактивация фермента-хозяина не будет столь существенна для высших организмов в целом, как инактивация единственного фермента для паразита.

Ингибирование УФазы, как показали опыты *in vivo*, летально для некоторых паразитов (напри-

Таблица 1. Ингибирование уридинфосфорилазы *G. lamblia* [13, 20]

Соединение	K_i (кажушаяся), мкМ, уридинфосфорилазы из	
	<i>G. lamblia</i>	Мыши
6-метил-5-нитроурацил	10	
6-амино-5-нитроурацил	12	
5-бензилациклоуридин	44	1.0
5-нитроурацил	56	1.7
5-фторурацил	119	59
5-бромуррацил	230	9
6-бензил-тиоурацил	190	
1,3-диметилурацил	1000	

мер, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*), являющихся возбудителями заболеваний человека. Поэтому применение ингибиторов уридинфосфорилаз перспективно не только для борьбы с онкологическими, но и с некоторыми инфекционными заболеваниями, вызванными бактериями и простейшими [12–14].

Для разработки новых лекарственных препаратов – ингибиторов уридинфосфорилазы необходимо понимание механизма ингибирования фермента на атомно-молекулярном уровне, а следовательно, и детальное изучение пространственной организации макромолекулярных комплексов уридинфосфорилаз методами рентгеноструктурного анализа с высокой достоверностью при атомном разрешении. Синтез эффективных селективных ингибиторов невозможен без данных о структуре ферментов из разных организмов как в нативном состоянии, так и в комплексах с субстратами и предполагаемыми ингибиторами. Для прогнозирования и интенсивных поисков селективных ингибиторов уридинфосфорилазы, пригодных для использования при лечении различных заболеваний, неоспоримый вклад вносит использование методов молекулярного моделирования (МД). На основании результатов всех этих исследований можно предложить структурно-функциональный аспект механизма ингибирования данного белка-мишени, что в свою очередь позволяет конструировать химические соединения-ингибиторы, более комплиментарные сайтам связывания ферментов и, возможно, более эффективные в качестве лекарственного препарата.

М.Н. Kouni и F.N. Naguib с соавторами показали, что соединения класса 2,2'-ангидроуридинов являются эффективными ингибиторами для большинства уридинфосфорилаз клеток бактерий и простейших [15, 16]. В табл. 1 приведены данные по ингибирующей способности произ-

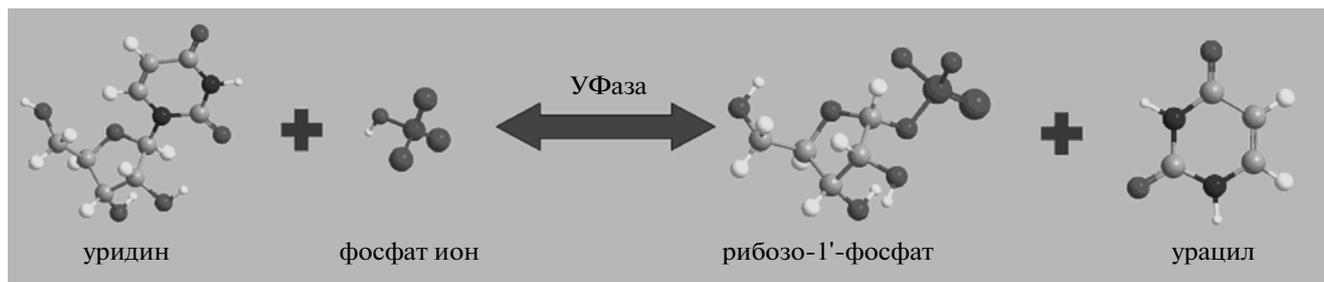


Рис. 1. Уравнение реакции, катализируемой уридинфосфорилазой.

водных уридина для уридинфосфорилаз печени мыши и человека [16–21].

Результаты, полученные при биохимических и структурных исследованиях уридинфосфорилаз, позволяют сузить диапазон поиска при синтезе новых препаратов – ингибиторов уридинфосфорилаз.

1. УРИДИНФОСФОРИЛАЗА – ФЕРМЕНТ МЕТАБОЛИЗМА УРИДИНА

1.1. Общие сведения об уридинфосфорилазе

Уридинфосфорилаза (Е.С. 2.4.2.3) – ключевой фермент метаболизма пиримидина, катализирующий обратимое фосфорилирование уридина (рис. 1) с образованием урацила и рибозо-1-фосфата [22, 23]. УФаза с участием иона фосфата катализирует реакцию превращения уридина в урацил [24], участвует в ресинтезе пиримидиновых оснований. Фермент идентифицирован в прокариотах, дрожжах и высших организмах [25]. Физиологически активные уридинфосфорилазы имеются у всех живых организмов от бактерий до человека, хотя структура гена и пространственная структура белковой молекулы УФазы варьируют в широком диапазоне [26–29]. Белок экспрессируется в различных клетках и тканях человека и животных [4].

1.2. Участие уридинфосфорилазы в гомеостазе уридина

Уридин является предшественником в “реутилизационном” пути пиримидинов, т.е. повторном их использовании [30–32]. В присутствии сахаров уридин может быть важным предшественником как при метаболизме углеводов, так и при биосинтезе пуриновых нуклеотидов через фосфорилиз. В результате продуцируется рибозный компонент или уридин включается в пентозофосфатный путь (рис. 2). Основным ресурсом для “реутилизационного” пути пиримидинов является уридин плазмы крови. В физиологических условиях концентрация уридина в плазме строго

поддерживается на уровне 4–6 мкМ почти у всех организмов [4, 33, 34]. Нефизиологическая доза экзогенного уридина вплоть до 250 мг/кг может повысить концентрацию уридина в плазме до 1 мМ, но этот показатель снижается до величины менее 10 мкМ в течение 1 ч. Т. Gasser с сотрудниками [33] обнаружил, что более 90% уридина плазмы поступает в печень. Непаренхиматозные клетки вначале преобразуют уридин в урацил; затем гепатоциты, обогащенные дигидроурацилдегидрогеназой, отвечают за последующую деградацию урацила до конечного катаболита – бета-аланина [35] (рис. 3).

Уридинфосфорилаза играет решающую роль в так называемом быстром клиренсе, т.е. выведении из организма избытков плазменного уридина. Внутривенное введение частично очищенной бактериальной уридинфосфорилазы приводит к быстрому фосфорилизу уридина плазмы и ингибированию активности “реутилизационного” пути на 65–92% [36]. У мышей с нокаутированным геном уридинфосфорилазы концентрация уридина в плазме возрастала в 5–6 раз по сравнению с интактными животными [36].

1.3. Влияние ингибиторов уридинфосфорилаз на гомеостаз уридина

Роль УФазы в контроле концентрации уридина в плазме подтверждена доклиническими и клиническими исследованиями ингибиторов уридинфосфорилазы, в частности бензилациклоуридина (BAU). У мышей однократная нетоксичная доза BAU 240 мг/кг приводит к 15-кратному увеличению концентрации уридина в плазме и 2–5-кратному подъему в тканях [37]. Пероральное введение BAU приводило к 2–3-кратному увеличению концентрации уридина в плазме больных без значительного токсического воздействия [5].

Концентрация уридина в плазме влияет на биосинтез пиримидинов. Токсичность *in vivo* и влияние на опухоли ингибиторов биосинтеза пиримидинов *de novo*, например N-(фосфонацетил)-L-аспартата и пиразофурина, также связаны

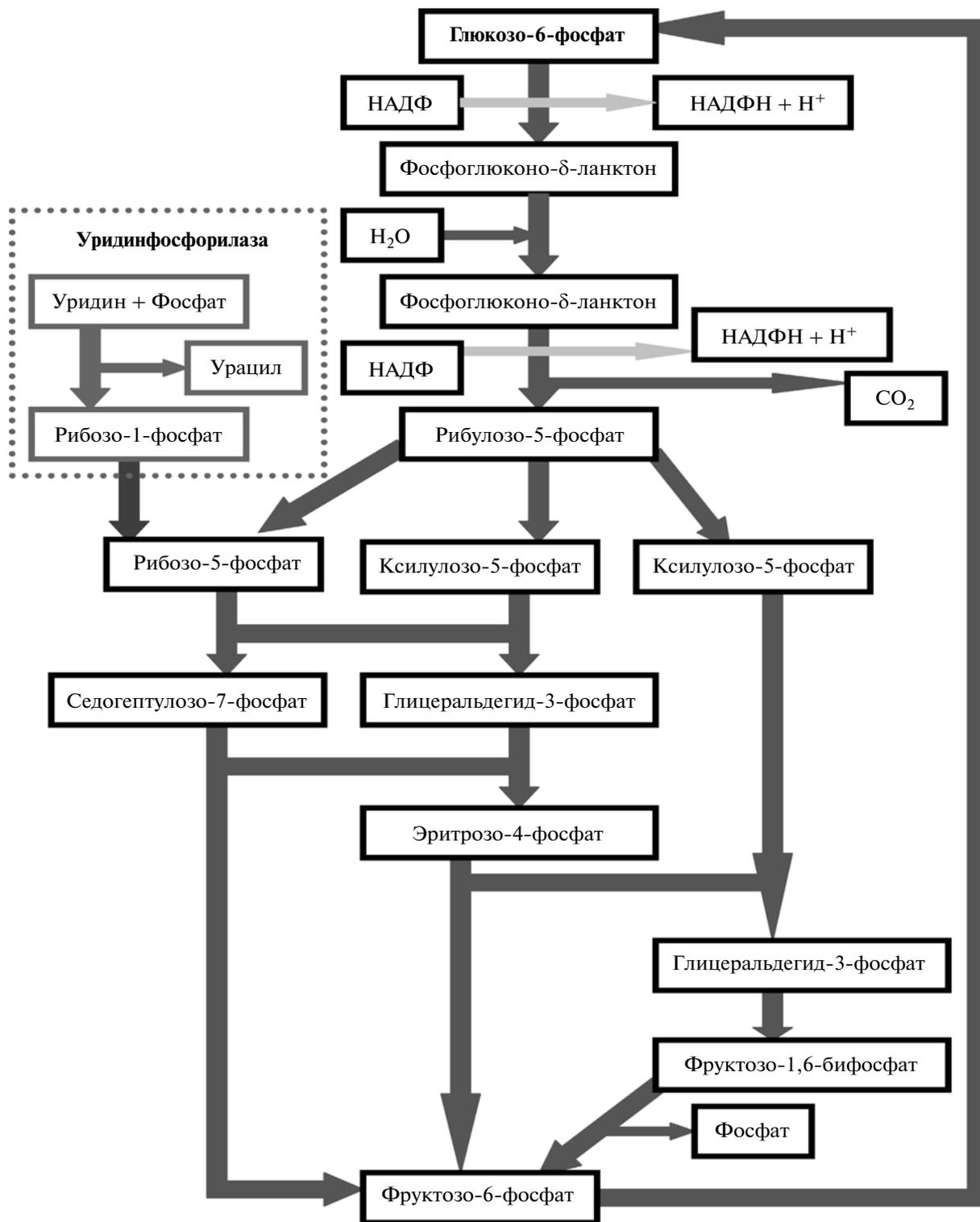


Рис. 2. Схема пентозофосфатного цикла.

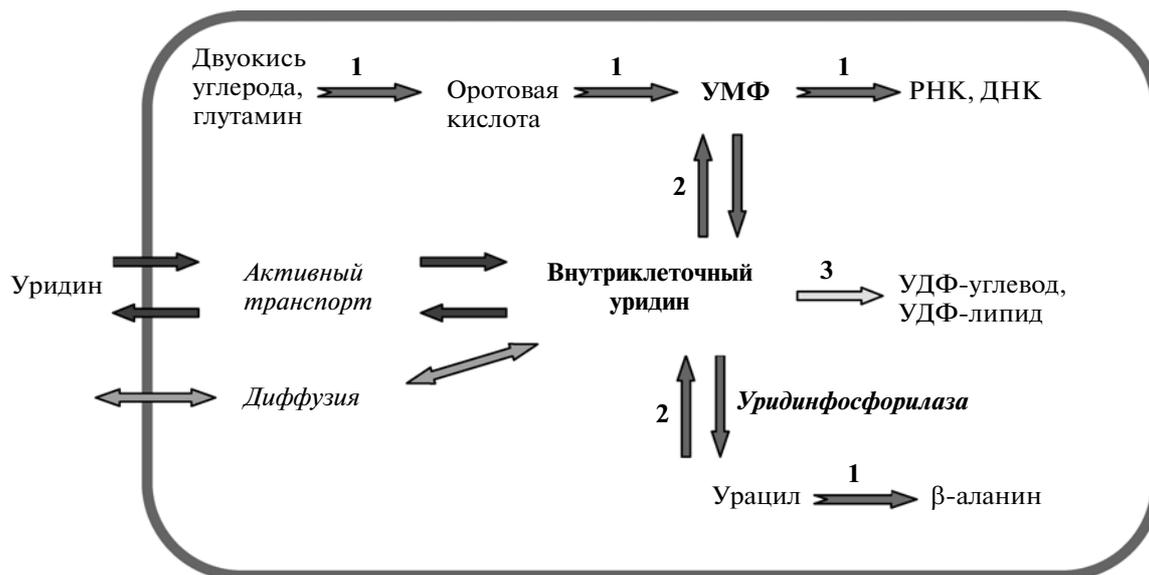


Рис. 3. Обмен уридина: 1 – цепочки ферментативных реакций, 2 – обратимые одиночные ферментативные реакции, 3 – необратимые одиночные ферментативные реакции.

с активностью уридинфосфорилазы как фермента “реутилизационного” пути синтеза уридина [37, 38]. J.M. Karle с коллегами [39] установил, что 3–5 мкМ уридина в среде приводит к ингибированию на 50% биосинтеза пиримидинов *de novo* с 50%-ным увеличением пула уридинтрифосфата (УТФ). Когда концентрация уридина увеличивается до 12 мкМ, блокируется более 95% биосинтеза пиримидинов *de novo* и пул УТФ удваивается. Таким образом, уридин плазмы играет важную физиологическую роль в метаболизме пиримидинов.

Концентрация уридина в тканях выше, чем в плазме [37]. В основе поддержания высокого содержания уридина в тканях лежат два основных механизма. Кроме деградации уридинмонофосфата (УМФ), главным образом путем гидролиза рибонуклеиновой кислоты (РНК), внутриклеточный уридин в нормальных тканях аккумулируется посредством облегченной диффузии и Na^+ -зависимого активного транспорта внеклеточного уридина по градиенту концентрации уридина в клетку [5, 37, 40, 41] (рис. 3). Внеклеточный уридин используется для синтеза нуклеиновых кислот и других макромолекул посредством образования пиримидиннуклеотидных липидов и сахаров [5, 30]. Избыток уридина катаболизируется в ходе иницируемых уридинфосфорилазой ферментативных реакций.

Фармакологически значимым открытием в механизме регуляции внеклеточного уридина является отсутствие механизма концентрационного транспорта в некоторых опухолях [5, 40]. В результате концентрация уридина в опухолевых

клетках или тканях будет близкой к концентрации в межклеточной среде или плазме и ниже, чем в нормальных тканях.

1.4. Уридинфосфорилазная активность различных тканей в норме и при патологии

Уридинфосфорилазная активность выше у мультипотентных и незрелых клеток по сравнению с дифференцированными. В мышечных эмбриональных стволовых клетках уридинфосфорилазная активность, оцененная по способности образовывать урацил из уридина, составляет более 6000 нмоль/мг белка в час, в то время как активность в большинстве мышечных тканей – 20–100 нмоль/мг белка в ч. В опухолях активность уридинфосфорилазы оценивается по сравнению с окружающими нормальными тканями и может коррелировать с дифференцировкой и стадией опухолевого процесса [42]. F.N. Naguib с коллегами [16] изучал различие ферментативной активности в линиях гемобластозов при дифференцировке, индуцированной N,N-диметилформамидом и бутилатом натрия, и обнаружил корреляцию между УФазной активностью и дифференциальным статусом клеток.

Тем самым была выявлена тканевая специфичность уридинфосфорилазной активности. Чем больше делений способна совершить клетка, тем больше ее потребность в ресинтезе уридина и тимидина и тем выше уридинфосфорилазная активность. Эти данные следует учитывать при создании лекарственных препаратов для блокирования пролиферации опухолевых клеток.

Таблица 2. Уридинфосфорилазная активность различных тканей

Ткань, орган	Организм, русское (латинское) название	Уридинфосфорилазная активность, нмоль/час/мг белка	Литература
Эмбриональные стволовые клетки	Мышь домашняя (<i>Mus musculus</i>)	6087.3 ± 313.8	[84]
Печень		29.3 ± 5.0	[37]
Почки		92.2 ± 4.1	
Селезенка		23.6 ± 1.1	
Печень		4.38 ± 0.84	[66]
Тонкая кишка		2339.7 ± 147.4	[37]
Опухоль толстой кишки 38		365.8 ± 26.1	
Опухоль L5178Y		50 ± 22	[85]
Красный костный мозг		38 ± 5	
Опухоль толстой кишки 38		212 ± 39	
Красный костный мозг	Серая крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)	130 ± 27	
Опухоль толстой кишки RPMI		228 ± 20	
Лимфоциты периферической крови	Бык домашний (<i>Bos taurus taurus</i>)	1.90 ± 0.91	[32]
	Лошадь домашняя (<i>Equus ferus caballus</i>)	0.68 ± 0.49	
	Домашняя свинья (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	4.5 ± 3.5	
	Домашняя овца (<i>Ovis aries</i>)	1.48 ± 0.69	
		2.25 ± 0.36	
Печень	Человек (<i>Homo sapiens</i>)	5.02 ± 0.61	[66]
Плацента		11.15 ± 0.29	
Лёгкие		12.48 ± 4.4	[86]
Плоскоклеточный рак лёгких		21.24 ± 630	
Аденокарцинома лёгких		25.92 ± 9.96	
Толстая кишка		12.98	[54]
Рак толстой кишки		30.53	
Толстая кишка		157.0 ± 23.0	[57]
Рак толстой кишки		100.0 ± 11.0	
Толстая кишка		40.7 ± 8.4	[55]
Рак толстой кишки	65.7 ± 31.7		

2. ПРИМЕНЕНИЕ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ И ЕЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

2.1. Ингибиторы уридинфосфорилазы как перспективные антимикробные и антипаразитические препараты

Ингибирование уридинфосфорилазы приводит к гибели некоторых простейших возбудителей заболеваний человека и животных (например, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*) [12–14], так как у простейших уридинфосфорилаза участвует в метаболизме уридина и тимидина [14], и большая часть пиримидиновых оснований синтезируется путем ресинтеза. При сравнении кажущейся константы ингибирования (*K_i*) для уридин-

фосфорилазы *G. lamblia* с *K_i* уридинфосфорилазы мышцы [20] при использовании уридина как субстрата оказалось, что наиболее эффективным ингибитором уридинфосфорилазы является ВАУ (табл. 2). Однако в данных работах не рассматривались производные 2,2'- и 2,3'-ангидроуридинов. Для паразита *Schistosoma mansoni* показан цитостатический эффект ингибитора уридинфосфорилазы – 2,2'-ангидроуридина [12].

Ингибиторы уридинфосфорилазы могут являться мощными антипаразитическими препаратами и, возможно, антимикробными препаратами ввиду того, что:

– у многих паразитов в отличие от млекопитающих нет тимидинселективного фермента, который необходим для ресинтеза тимидина [12];

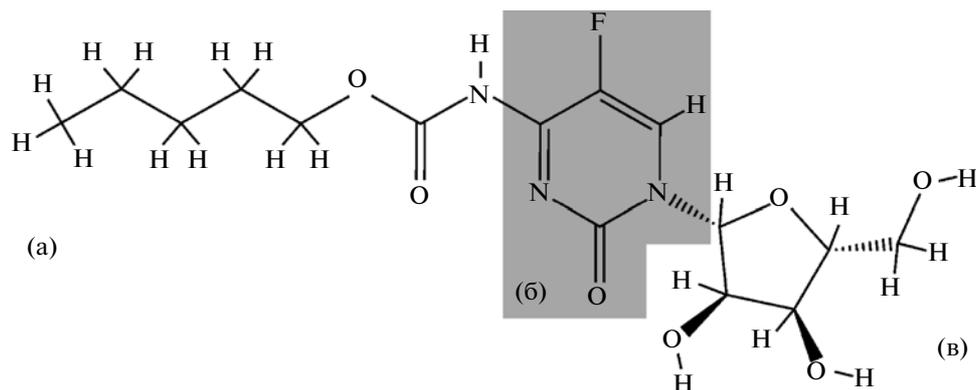


Рис. 4. Структурная формула капецитабина (N^4 -(пентилоксикарбамил)-5'-дезоксидезокси-5-флуороцитидина): а – карбаматная модификация, б – флуороцитозиновая часть, в – рибозная часть.

– по сравнению с клетками хозяина у паразитов ресинтез пиримидиновых оснований преобладает над долей пиримидинов, синтезируемых *de novo*.

Так как ресинтез уридина, протекающий преимущественно с участием уридинфосфорилазы и урацилфосфорибозилтрансферазы, чрезвычайно важен для жизнедеятельности микроорганизмов, то можно считать перспективным применение ингибиторов уридинфосфорилаз для борьбы с некоторыми инфекционными заболеваниями, вызванными бактериями и простейшими.

2.2. Участие уридинфосфорилазы в метаболизме 5-фторурацила. Ингибиторы уридинфосфорилазы как модуляторы активности 5-фторурацила

Важнейший компонент современной химиотерапии – противоопухолевый препарат 5-фторурацил (5ФУ) – успешно применяется при раке толстой кишки, молочной железы, органов пищеварения, мочеполовой системы, опухолях кожи. 5ФУ является антиметаболитом урацила из-за конкуренции за тимидилатсинтазу. В результате действия 5ФУ нарушается синтез нуклеиновых кислот и достигается остановка пролиферации и (или) гибель опухолевых клеток.

Противоопухолевая активность 5ФУ активируется селективным ингибитором уридинфосфорилазы – 2,2'-ангидро-5-этилуридином. При совместном применении 5-фторурацила и 2,2'-ангидро-5-этилуридина наблюдалось уменьшение объема опухоли в 3 раза по сравнению с применением только 5ФУ [1]. Данный эффект, скорее всего, связан с уменьшением катаболизма 5ФУ под действием ингибитора уридинфосфорилазы.

Авторы [1] показали, что ингибиторы уридинфосфорилазы способствуют увеличению активности 5ФУ при химиотерапии индуцированного рака молочной железы у мышей линии BDF₁ и трансплантатов плоскоклеточного рака толстой

кишки человека у безтимусных мышей. Тем самым показана возможность изменения активности 5ФУ специфическими ингибиторами уридинфосфорилазы с целью снижения токсичности основного препарата.

2.3. Уридинфосфорилаза в активации капецитабина

Тройным пролекарством 5ФУ с селективной активацией в опухолях является капецитабин (N^4 -(пентилоксикарбамил)-5'-дезоксидезокси-5-флуороцитидин) (рис. 4). Карбаматная модификация облегчает его прохождение через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта без активации, приводя к более высокой биоактивности и меньшей гастроинтестинальной токсичности [43–45].

В действительности биодоступность капецитабина при пероральном введении составляет около 100% [45]. Опухолевая селективность капецитабина подтверждена на опухолевых трансплантатах [46]. J. Schuller с соавторами [47] проанализировал концентрацию 5ФУ в плазме и биоптатах опухолей и соседней неопухолевой ткани. Концентрация 5ФУ в опухолях была в 2.9 раза выше, чем в окружающих здоровых тканях, и в 16.6 раза выше, чем в плазме. С помощью метода микродиализа авторы [48] подтвердили, что капецитабин и его метаболиты – 5'-дезоксидезокси-5-флуороцитидин (5'ДФЦР) и 5'-дезоксидезокси-5-фторуридин (5'ДФУР) распределяются в строме опухолей и здоровых тканей с очень небольшими различиями. Эти исследования показывают фармакологическую основу опухолевой селективности капецитабина, опосредованной нуклеозидфосфорилазами.

Роль тимидинфосфорилазы в селективной активации капецитабина в опухолевых тканях больше, чем уридинфосфорилазы, из-за высокой экспрессии тимидинфосфорилазы и ее возможной активности в регуляции ангиогенеза [49–53]. Не-

Таблица 3. Константы ингибирования уридинфосфорилазы производными бензилациклоуридина (BAU) [21, 62]

Соединение	Кажущаяся K_i , мкМ уридинфосфорилазы из			K_i , мкМ (конц. $P_i = 50$ мМ) уридинфосфорилазы из		
	мыши	человека	<i>E. coli</i>	мыши	человека	<i>E. coli</i>
BAU	3.12	3.97	18.9	0.42	1.19	4.3
N ₃ -BB-BAU	2000.0	117000.0				
C-метил-BAU	112.0	113.0	1330.0			
DA-BAU	21.3	29.7				
Сукцинат-BAU	9.98	22.6	69.0			42.5
M-гидрокси-BAU	8.9	27.3				
BAU-P	2.79	3.13		2.13	0.9	
AM-BAU	1.95	8.13		0.09		
П-О-изопропил-BAU	1.87	6.45				
M-метокси-BAU	1.86	3.41				
HM-BAU	1.63	2.53	5.1	0.34	0.33	3.9
OH-BAU			9.1			6.6
BBAU	1.25	1.95	0.8	0.17	0.22	0.68
C-метил-BBAU	39.0	65.0	390.0			
DA-BBAU	3.23	6.27				
сукцинат-BBAU	2.50	4.45	13.9	0.38	2.09	17.1
сукцинат-HM-BBAU	2.92	3.88				
HM-BBAU	0.32	0.65	0.5	0.07	0.07	0.15
AM-BBAU	0.25	2.74		0.02		
BBBAU	519.0	340.0	178.0			

смотря на это, увеличение экспрессии уридинфосфорилазы в тканях не только способствует селективной в отношении опухоли активации 5'ДФУР в 5ФУ, но также способствует и фосфорилированию 5ФУ по уридинкиназному пути.

В опухолевых тканях человека активность уридинфосфорилазы или уровень ее мРНК увеличивается от 10 до 1000 раз в различных опухолях [2, 26]. Низкий базовый уровень в нормальных тканях и повышенная активность в опухолевых тканях приводят к более эффективной защите здоровых тканей.

2.4. Экспрессия уридинфосфорилазы в опухолевых клетках. Чувствительность опухолей различного происхождения к ингибиторам уридинфосфорилазы

Индукция уридинфосфорилазной активности была показана для клеток карциномы толстой кишки [42, 54, 55], меланомы [25], аденокарциномы молочной железы [2], гепатомы и асцитной карциномы Эрлиха [56]. P.J. Finan с соавторами [54] обнаружил увеличение уридинфосфорилазной активности в девяти из двенадцати исследованных образцов карциномы толстой кишки (табл. 3). В трех образцах активность фермента не

изменялась или несколько снижалась. Корреляция между уридинфосфорилазной активностью и стадией процесса при раке толстой кишки обнаружена в [42]. Однако в исследованиях [57] только в одной из девяти карцином толстой кишки человека уридинфосфорилазная активность была высокой, а в шести образцах снижена. Подобная ситуация наблюдалась для рака молочной железы. В [2] исследовали экспрессию уридинфосфорилазы в 43 образцах этих опухолей и обнаружили, что уридинфосфорилазная активность варьирует до 1000 раз. Эти данные выявляют гетерогенность уридинфосфорилазой активности в опухолях. Важно, что уридинфосфорилаза может быть активирована в опухолях различного происхождения. Приведенные данные позволяют рационально применять модуляцию флуоропиримидиновой активации ингибиторами уридинфосфорилазы в зависимости от типа опухоли.

2.5. Защитное действие уридина при ишемии нервной ткани и миокарда

Ишемия, вызванная затруднением кровотока, приводит к повреждению тканей мозга или миокарда. Длительный недостаток глюкозы вызывает

гибель клеток вследствие снижения синтеза аденозинтрифосфата (АТФ). В процессе гибели клеток при ишемии участвуют несколько факторов:

- чрезмерный выброс глутамата, обладающего нейротоксическим эффектом;
- избыток внутриклеточного кальция;
- окислительный стресс;
- функциональное повреждение митохондрий;
- истощение пула АТФ.

Известно, что постоянная доставка энергетических субстратов играет ключевую роль в сохранении жизнеспособности клеток при ишемии. Уридин может использоваться для поддержания уровня АТФ, так как он может быть превращен в рибозо-1-фосфат путем фосфорилиза с участием уридинфосфорилазы. Рибозо-1-фосфат включается в пентозофосфатный путь (рис. 2), в результате которого происходит синтез АТФ из аденозиндифосфата.

В норме доля пентозофосфатного пути в количественном превращении глюкозы невелика, варьирует у разных организмов и зависит от типа ткани и ее функционального состояния, и его роль заключается в синтезе восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН) и исходных субстратов для синтеза нуклеиновых кислот *de novo*. Пентозофосфатный путь является запасным путем синтеза АТФ, но в условиях ишемии и недостатка кислорода для окислительного фосфорилирования и функционирования митохондрий может поддерживать жизнеспособность клеток [19].

Нерациональное применение ингибиторов фосфорилаз, особенно имеющих недостаточно высокую тканевую специфичность, может вызвать осложнения. Исследования на смешанной культуре клеток астроцитов с нейронами и на реперфузированном мозге показали, что уридин защищает клетки от гибели. Степень повреждения клеток в этих опытах контролировали как морфологически, так и по активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – маркера клеточного повреждения при ишемии. Кроме того, этой группой исследователей показано, что в защитном действии уридина принимает участие уридинфосфорилаза нейронов и астроцитов. Для выяснения роли уридинфосфорилазы в защитном действии уридина были проведены исследования, показывающие, насколько блокирование УФазы влияет на протекторный эффект уридина в ишемизированных нейронах [19]. Ингибирование уридинфосфорилазы в клетках мозга (нейронах и клетках астроцитарной нейроглии) и кардиомиоцитах может ухудшить состояние тканей при ишемии.

Если попытаться сконструировать ингибиторы, не способные проникать через гистогематические барьеры, в частности гемато-энцефаличе-

ский барьер, то будет найден способ снижения негативных последствий приема ингибиторов уридинфосфорилаз.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что:

- уридинфосфорилаза человека является ключевым ферментом метаболизма противоопухолевых препаратов – антиметаболитов пиримидинов, которые, несмотря на их высокую токсичность, остаются основным средством химиотерапии онкологических заболеваний;

- в опытах *in vivo* показано, что при консервативном лечении злокачественных новообразований [1] специфичные к уридинфосфорилазе ингибиторы усиливают лечебный эффект 5-фторурацила (5ФУ);

- имеется возможность, применяя ингибиторы UPh, уменьшить дозу вводимого антиметаболита пиримидиновых оснований (5ФУ), снизив тем самым токсическое действие фторурацила на здоровые ткани;

- уридинфосфорилаза патогенных бактерий (*Salmonella typhimurium*) и простейших (*Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*) важна для их жизнедеятельности; роль УФазы в обмене уридина у высших организмов менее значима, чем для микроорганизмов, так как большая часть пиримидиновых оснований в клетках высших организмов синтезируется *de novo*, и только значительно меньшая синтезируется путем ресинтеза [11]; инактивация фермента-хозяина не будет столь существенна для высших организмов в целом, как инактивация единственного фермента для паразита;

- ингибирование уридинфосфорилазы летально для некоторых паразитов (например, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*), являющихся возбудителями опасных заболеваний человека [12–14].

В связи с приведенными выше фактами актуальной задачей является изучение структурных аспектов взаимодействия уридинфосфорилаз человека и патогенных микроорганизмов с субстратами и ингибиторами. Рациональное компьютерное конструирование структур высокоаффинных аналогов этих соединений создаст предпосылки для создания противоопухолевых, противобактериальных и противопаразитарных препаратов нового поколения.

3. ИНГИБИТОРЫ ФОСФОРИЛАЗ

3.1. Общая классификация ингибиторов уридинфосфорилазы

Все исследуемые ингибиторы уридинфосфорилаз, за исключением фосфанов, – различные производные пиримидиновых оснований, явля-

Таблица 4. Ингибирующие способности различных производных уридина по отношению к УФазам из цитоплазмы печени мыши и человека (концентрация уридина 1мМ, фосфата – 20 мМ) [15]

Соединение	Кажущаяся K_i , мкМ уридинфосфорилазы из	
	мышь	человека
5-Фторуридин	445	214
5-Бензилуридин	52.9	67.9
5-Бензилоксибензилуридин	18.1	12.5
2'-β-Дезоксиуридин	976	820
2'-β-Дезокси-5-бензилуридин	108	140
2'-β-Дезокси-5-(бензил-оксибензил)уридин	21.5	14.0
2'-α-Дезокси-5-бензилуридин	539	896
2'-α-Дезокси-5-(бензил-оксибензил)уридин	70.7	80.8
5'-β-Дезокси-5-фторуридин	1667	278
Арабинозилурацил	1900	
Арабинозил-5-бензилурацил	472	1000
Арабинозил-5-(бензил-оксибензил)урацил	37.2	39.4
Ациклоуридин	113	68.7
5-Этилациклоуридин	15.9	18.9
5-Бензилациклоуридин	3.12	3.97
5-Бензилоксибензилациклоуридин	1.25	1.95
2,2'-Ангидроуридин	131	245
2,2'-Ангидро-5-этилуридин	0.19	0.47
2,2'-Ангидро-5-бензилуридин	0.81	2.39
2,2'-Ангидро-5-(бензил-оксибензил)уридин	0.29	0.74
2,5'-Ангидроуридин	635	

ющиеся обратимыми конкурентными ингибиторами (при снижении концентрации ингибитора активность уридинфосфорилазы восстанавливается) [29, 58, 59]. Обратимые конкурентные ингибиторы уридинфосфорилаз подразделяются на четыре группы в соответствии с поворотом урацильного кольца относительно N-гликозидной связи:

- фиксированные в *анти*-конформации (6,5'-циклоуридины);
- не фиксированные в определенной конформации (рибозил-, 2'-деоксирибозил-, арабинозил-, ксилозил-, 5'-деоксирибозил-, ликсозил-, ациклоуридин);
- без N-гликозидной связи (карбоциклические соединения);
- фиксированные в *син*-конформации (2,5'-ангидро-, 2,3'-ангидро-, 2,2'-ангидроуридин).

3.2. Производные ациклонуклеозидов

5- и 5,6-замещенные ациклоуридины были изучены в качестве ингибиторов уридинфосфорилаз из *E. coli*, из асцитной опухоли Эрлиха и кишечника крысы [70, 72]. Все соединения этого класса, являясь конкурентными ингибиторами

уридинфосфорилазы, не ингибировали тимидинфосфорилазу (ТФазу) *E. coli* [58].

Из результатов этих работ следует, что значение кажущейся константы ингибирования K_i уменьшается при увеличении длины 5-алкильного заместителя (от атома водорода до пропил-радикала), что связано с увеличением гидрофобности соединений.

3.3. Производные бензилациклоуридинов

Из изученных ациклоуридинов следует выделить ВАУ, исследованные в качестве эффективных и специфичных ингибиторов пиримидинфосфорилаз [18, 21, 37, 60–62]. Бензилациклоуридины повышают уровень уридина в плазме и утилизируют уридин различными тканями [61], а также защищают от токсичности 5ФУ [21, 60]. В [18] показано, что ВАУ ингибируют транспорт нуклеозидов в клетках млекопитающих. В табл. 4 приведены константы ингибирования бензилациклоуридинами уридинфосфорилазы печени человека и мыши [62].

Отмечено, что ВАУ ингибирует уридинфосфорилазу и не ингибирует тимидинфосфорилазу из *E. coli* [18, 21]. Однако ВАУ при концентрациях

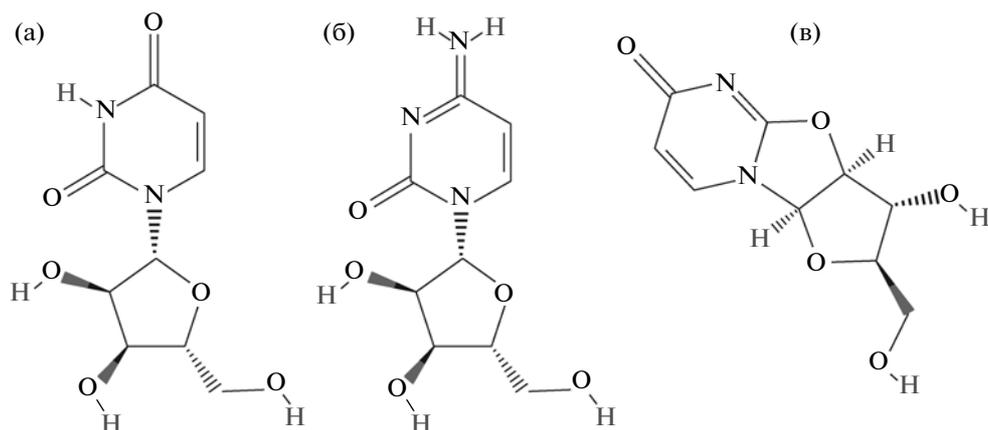


Рис. 5. Структурные формулы молекул: уридина (а); цитидина (б); 2,2'-ангидроуридина (в).

>40 мкМ инактивирует тимидинфосфорилазу *E. coli* и не инактивирует тимидинфосфорилазу млекопитающих даже при концентрациях до 500 мкМ [21]. Бензилациклоуридины являются ингибиторами уридинфосфорилаз паразитов *Giardia lamblia* и *Schistosoma mansoni* [12–14].

3.4. Ингибирующая активность структурных аналогов уридина

Производные уридина способны ингибировать уридинфосфорилазы (табл. 1). Наиболее эффективно с уридинфосфорилазами связываются 2,2'-ангидроуридины (рис. 5), далее следуют ациклонуклеозиды, рибозиды, 2,5'-ангидронуклеозиды, 2'-дезоксирибозиды, 5'-дезоксирибозиды и, наконец, арабинозиды. 2,2'-Ангидроуридины являются более сильными ингибиторами УФазы по сравнению с 6,5'-циклоуридинами, зафиксированными в *анти*-конформации. Из-за *син*-конформации N-гликозидной связи в 2,2'-

ангидроуридинах (рис. 5) они, вероятно, связываются с УФазой в виде *син*-ротамеров. Это подтверждается тем, что 2,5'-ангидроуридин, фиксированный в *син*-конформации, также связывается с УФазой [16–21].

3.5. Производные ангидроуридина

Исследован ряд специфичных ингибиторов уридинфосфорилазы на основе 2,2'-ангидроуридинов [63–65]. Среди производных ангидроуридинов по данным химической кинетики наиболее активным ингибитором уридинфосфорилазы из Sarcoma-180 был 2,2'-ангидро-5-этилуридин (ANEUR) [66, 67]. Соединение оказалось наиболее эффективным в отношении уридинфосфорилазы печени мыши и человека [15]. 2,2'-Ангидро-5-этилуридин также ингибировал уридинфосфорилазу, выделенную из культуры рака толстой кишки Colon-26 [29] (табл. 5).

Таблица 5. Константы ингибирования уридинфосфорилазы ингибиторами, фиксированными в *син*-конформации [15, 58, 59, 67]

Соединение	K_i , мкМ уридинфосфорилазы			
	крысы	<i>E. coli</i>	мыши	человека
2,2'-ангидроуридин	2.3	29	16.4	49
2,2'-ангидро-5-метилуридин	0.18			
2,2'-ангидро-5-этилуридин	0.025	0.03	0.02	0.1
2,2'-ангидро-5-пропилуридин	0.08	1.8		
2,2'-ангидро-5-бензилуридин			0.1	0.5
2,2'-ангидро-5-(бензил-оксибензил)уридин			0.04	0.148
2,3'-О-ацетил-2,2'-ангидро-5-этилуридин	24.1			
2,3'-ангидро-2'-дезоксид-5-этилуридин	15400			
2,5'-ангидроуридин			79	
2,5'-ангидро-2'-дезоксид-5-этилуридин	1360			

По значению кажущейся константы ингибирования K_i (табл. 5) видно, что 2,3'- и 2,5'-ангидроуридины менее эффективны по отношению к уридинфосфорилазе, чем 2,2'-ангидроуридины. Однако недостаточное изучение структуры комплексов этих перспективных ингибиторов с уридинфосфорилазой не позволяет приступить к рациональному синтезу ингибиторов фосфорилаз, более селективных и эффективных, чем 2,2'-ангидроуридин.

4. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ УРИДИНФОСФОРИЛАЗ

Наиболее точные знания о структуре фермента атомного разрешения как в нативном состоянии, так и в комплексах с низкомолекулярными соединениями, а также знания механизмов функционирования фермента и его ингибирования на атомно-молекулярном уровне необходимы при создании новых лекарственных препаратов (антибиотиков, химиотерапевтических агентов и их модуляторов), направленных на мишень — уридинфосфорилазу. На основании результатов детального исследования пространственной организации макромолекулярных комплексов уридинфосфорилаз бактерий и высших организмов методами рентгеноструктурного анализа при атомном разрешении и результатов компьютерного моделирования, создав необходимую структурную базу, можно предложить структурно-функциональный аспект механизма ингибирования данного белка-мишени. Под механизмом ингибирования понимаем такие структурно-функциональные особенности взаимодействия фермент-ингибитор, как структура сайтов связывания ингибитора, характер взаимодействия атомов ингибитора с атомами фермента, структурно-функциональные изменения, происходящие при образовании комплекса фермент-ингибитор. Все это позволяет конструировать химические соединения-ингибиторы, более комплементарные сайтам связывания ферментов и, возможно, более эффективные в качестве лекарственного препарата.

Основное внимание в данной работе уделено рассмотрению результатов исследования пространственных структур уридинфосфорилазы *Salmonella typhimurium*. Этот фермент близок по первичной последовательности к уридинфосфорилазе из *Escherichia coli*, но отличается от нее по ряду свойств: обладает более широкой субстратной специфичностью, а также более высоким сродством к субстрату. Сравнительный анализ трехмерных пространственных структур фермента как нелигандированного, так и его комплексов с субстратом, продуктами ферментативной реакции и ингибиторами даст возможность проанализировать структурные аспекты функционирования и ингибирования данного фермента.

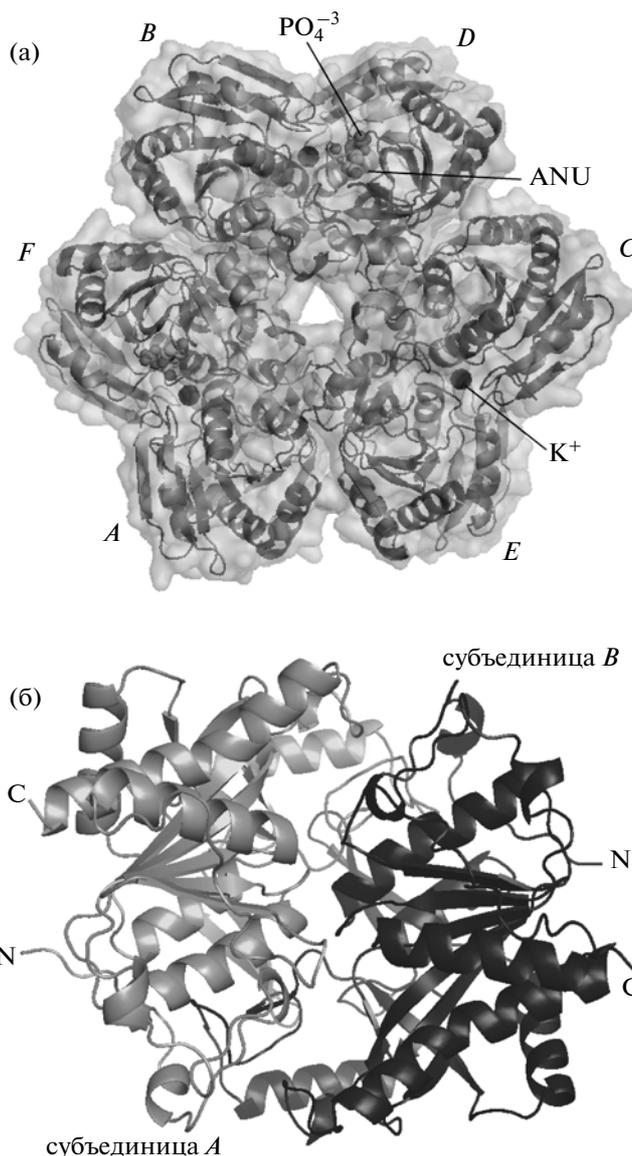


Рис. 6. Четвертичная структура комплекса молекулы *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином (ANU), ионами фосфата (PO_4^{3-}) и калия (K^+) (обозначены сферами большего радиуса), ID PDB: 3FWP (а) и человека (*HUPhI*) [26] (б).

зировать структурные аспекты функционирования и ингибирования данного фермента.

4.1. Молекула уридинфосфорилазы

Бактериальная уридинфосфорилaza функционирует в форме гексамера [3]. Гексамерная молекула бактериального фермента (рис. 6) может быть аппроксимирована тороидом, образованным шестью гомологичными субъединицами молекулярной массой 27 kDa каждая. Каждая субъединица формируется 253 аминокислотами. Четвертичная структура молекулы, имеющей то-

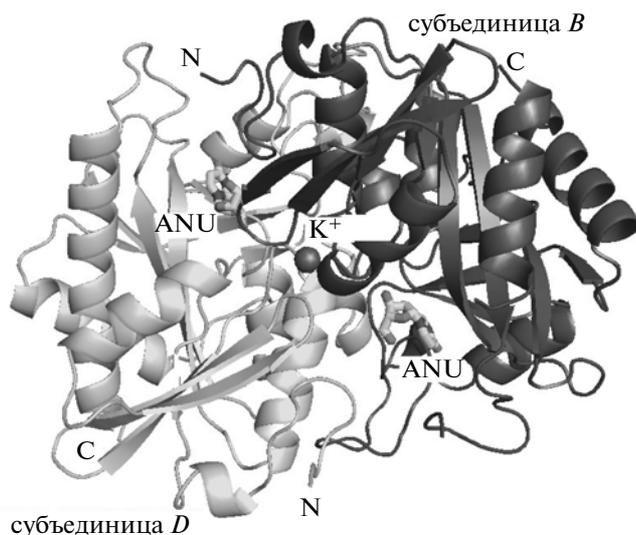


Рис. 7. Гомодимер *BD* гексамерной молекулы уридинфосфорилазы *StUPh* (ID PDB: 3C74). Показаны положения иона калия (K^+) в междимерном пространстве и ингибитора (ANU).

роидальную форму, может быть описана как тример гомодимеров, укладка мономеров соответствует точечной группе симметрии L_33L_2 . Высота молекулы около 51 Å, а наружный диаметр ~108 Å. В центре молекулы находится канал диаметром 10 Å, который расширяется до 19 Å на ее периферии [68]. Четвертичная структура бактериальной уридинфосфорилазы *StUPh* (рис. 6), как и *EcUPh*, и в растворе, и в кристаллическом состоянии, —

гексамер. На основании результатов рентгеноструктурного исследования вплоть до разрешения 1.5 Å установлено, что необходимым и достаточным элементом для формирования молекулы бактериальной уридинфосфорилазы является один ее гомодимер (рис. 7).

Четвертичная структура молекулы уридинфосфорилазы человека (*HUPhI*) в отличие от бактериальных *StUPh* и *EcUPh* представляет собой тетрамер или димер [69] (рис. 6), а каждая субъединица состоит из 310 аминокислот. Минимально необходимой структурной единицей для осуществления ферментативной реакции уридинфосфорилазами эукариот и прокариот, исследованными на данный момент, можно считать гомодимер [69–73].

Проведено исследование поверхности молекул в комплексах *StUPh* [74], а также структур *EcUPh* [68] и *HUPhI* [69] с помощью web-сервиса PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html). Этим же способом моделировали возможную четвертичную структуру молекул. Исследовались следующие параметры молекул комплексов: стабильность в водной фазе (растворе), площадь поверхности, доступной для растворителя (S_{sa}), “заглубленная” площадь поверхности, недоступной молекулам растворителя (S_{buried}), энергия сольватация (ΔG^{int}), энергия диссоциации олигомеров на мономеры (ΔG^{dis}) (табл. 6). Было установлено, что для уридинфосфорилаз бактерий (*StUPh* и *EcUPh*) оптимальная олигомерная форма в растворе — гексамер, представляющий собой тример гомодимеров. Разница между данными для смо-

Таблица 6. Интегральные характеристики поверхности макромолекул (PISA; http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)

Структура	Число мономеров	Состав	Стабильность в растворе	S_{sa} , Å ²	S_{buried} , Å ²	ΔG^{int} , ккал/моль	ΔG^{dis} , ккал/моль
3DPS (крист)	2	<i>AF</i>	стабильна	18400	3200	–15.6	9.3
3DPS (гексамер)	6	A_3F_3	стабильна	48050	16770	–113.9	42.8
3C74	6	<i>AFBDCE</i>	стабильна	46910	20450	–128.7	50.6
1Y1R	6	<i>AFBDCE</i>	стабильна	45340	19980	–107.7	48.2
3DDO	6	<i>AFBDCE</i>	стабильна	46100	20110	–113.5	50.9
3FWP	6	<i>AFBDCE</i>	стабильна	44750	19700	–102.8	45.8
3EUE (<i>HUPhI</i>) (крист)	1	<i>A</i>	нет				
3EUE (<i>HUPhI</i>)	2	A_2	стабильна	23740	4570	–29.8	29.3
3EUE (<i>HUPhI</i>)	6	A_6	условно-стабильна (низкая ΔG^{dis})	65500	19440	–112.8	4.3
3EUF (<i>HUPhI</i>) (крист)	4	<i>ABCD</i>	нет				
3EUF (<i>HUPhI</i>)	2	<i>AB</i>	стабильна	22470	5500	–26.7	27.2
3EUF (<i>HUPhI</i>)	2	<i>CD</i>	стабильна	22990	5540	–24.1	25.5
1K3F (<i>EcUPh</i>)	6	<i>ABCDEF</i>	стабильна	54200	18380	–147.3	54.1

делированного гексамера *StUPh* (3DPS-A₃F₃), гексамерами комплексов *StUPh* и гексамером *EcUPh* незначительна.

Согласно представленным данным стабильности олигомеров в растворе и энергиям диссоциации (ΔG^{dis}), существование димера *StUPh*, а для *HUPhI* мономера, модельного тетрамера и гексамера представляется сомнительным. Следовательно, независимым методом показано, что в условиях водного раствора уридинфосфорилазы *StUPh* и *EcUPh* находятся в виде гексамера, а *HUPhI* в виде димера.

Межсубъединичные взаимодействия в гомодимере осуществляются контактами гидрофобной природы, водородными связями и ионными мостиками. Как правило, число водородных связей между субъединицами в гомодимере варьирует от гомодимера к гомодимеру от 20 до 25. Этот разброс вызван тем, что среди пар атомов, между которыми устанавливаются водородные связи, находятся атомы аминокислотных остатков, формирующих высокоподвижные петли. Формирование гексамерной молекулы *StUPh* из гомодимеров осуществляется, прежде всего, за счет гидрофобного взаимодействия и широкой сети водородных связей. Следует отметить, что в области центрального канала молекулы как *StUPh*, так и *EcUPh*, установлено наличие водородных связей между аминокислотными остатками субъединиц, связанных между собой некристаллографической осью симметрии 3-го порядка. Длины связей укладываются в диапазон от 2.7 до 3.4 Å [74].

Третичная структура мономера молекул уридинфосфорилаз [3, 68, 71, 74] (рис. 7) относится к классу α/β -белков с архитектурой трехслойного $\alpha/\beta/\alpha$ -сэндвича. В центральной области мономера находится смешанный β -лист, окруженный спиральными участками. Помимо спиралей и β -лент мономер содержит протяженные петли, одна из которых (*L9* в *StUPh*) может наиболее заметно менять свое положение в зависимости от функционального состояния активного центра.

4.2. Активный центр

Каждый гомодимер (рис. 7) молекулы уридинфосфорилазы (рис. 6а) содержит по два активных центра. Активный центр уридинфосфорилазы (рис. 8) включает в себя фосфатсвязывающий (ФСС) и нуклеозидсвязывающий (НСС) сайты. Нуклеозидсвязывающий сайт с целью более четкого разграничения структурных особенностей, где это необходимо, описывается как совокупность урацил- и рибозосвязывающих сайтов. Фосфат- и нуклеозидсвязывающие сайты связывания субстратов в активном центре формируются аминокислотными остатками обеих субъединиц гомодимера (рис. 7, 8). При образовании ак-

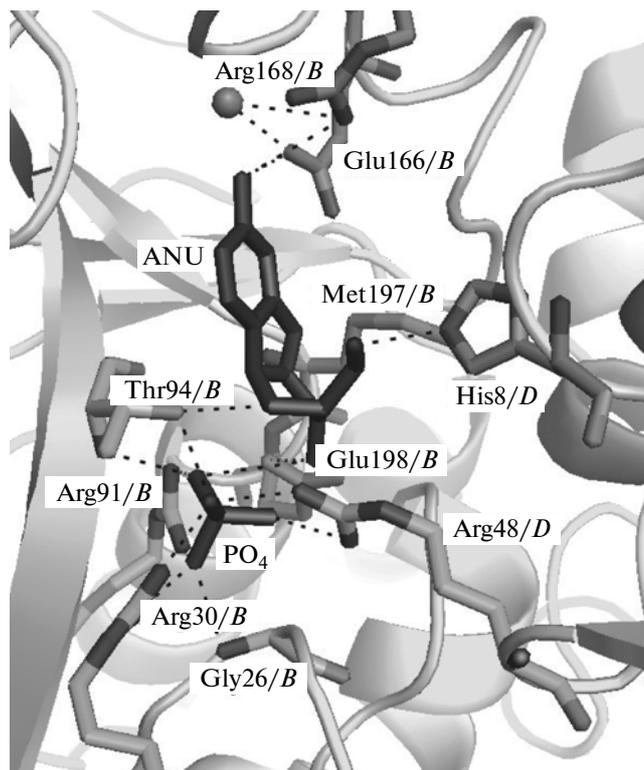


Рис. 8. Ингибитор 2,2'-ангидроуридин и ион фосфата в активном центре *StUPh* (ID PDP: 3FWP). Пунктирными линиями показаны водородные связи.

тивного центра число аминокислотных остатков одной субъединицы превалирует над вкладом аминокислотных остатков из соседней субъединицы гомодимера. При обозначении сайтов связывания субстратов активного центра будем использовать идентификатор той субъединицы гомодимера, число аминокислотных остатков которой превалирует в сайте связывания.

4.2.1. Урацилсвязывающий сайт

Анализ комплексов *StUPh* с урацилом, уридином и тиминном [75] позволил локализовать пиримидинсвязывающий сайт и идентифицировать аминокислотные остатки, входящие в его состав. Основными остатками во взаимодействии с урацилом являются Phe162/A, Gln166/A, Arg168/A и Arg223/A (рис. 9) одной A-субъединицы гомодимера AB. Данные аминокислотные остатки консервативны для большинства уридинфосфорилаз и играют ключевую роль в узнавании пиримидинового кольца субстрата. Молекулы урацила, тимина и пиримидиновая часть уридина образуют водородные связи с атомами боковой цепи Gln166 и Arg168 (рис. 10). В случае связывания уридина (урацила) NE2 и OE1 атомы Gln166 формируют водородные связи с N3- и O2-атомами пиримидинового кольца, а NH2 атом Arg168 вза-

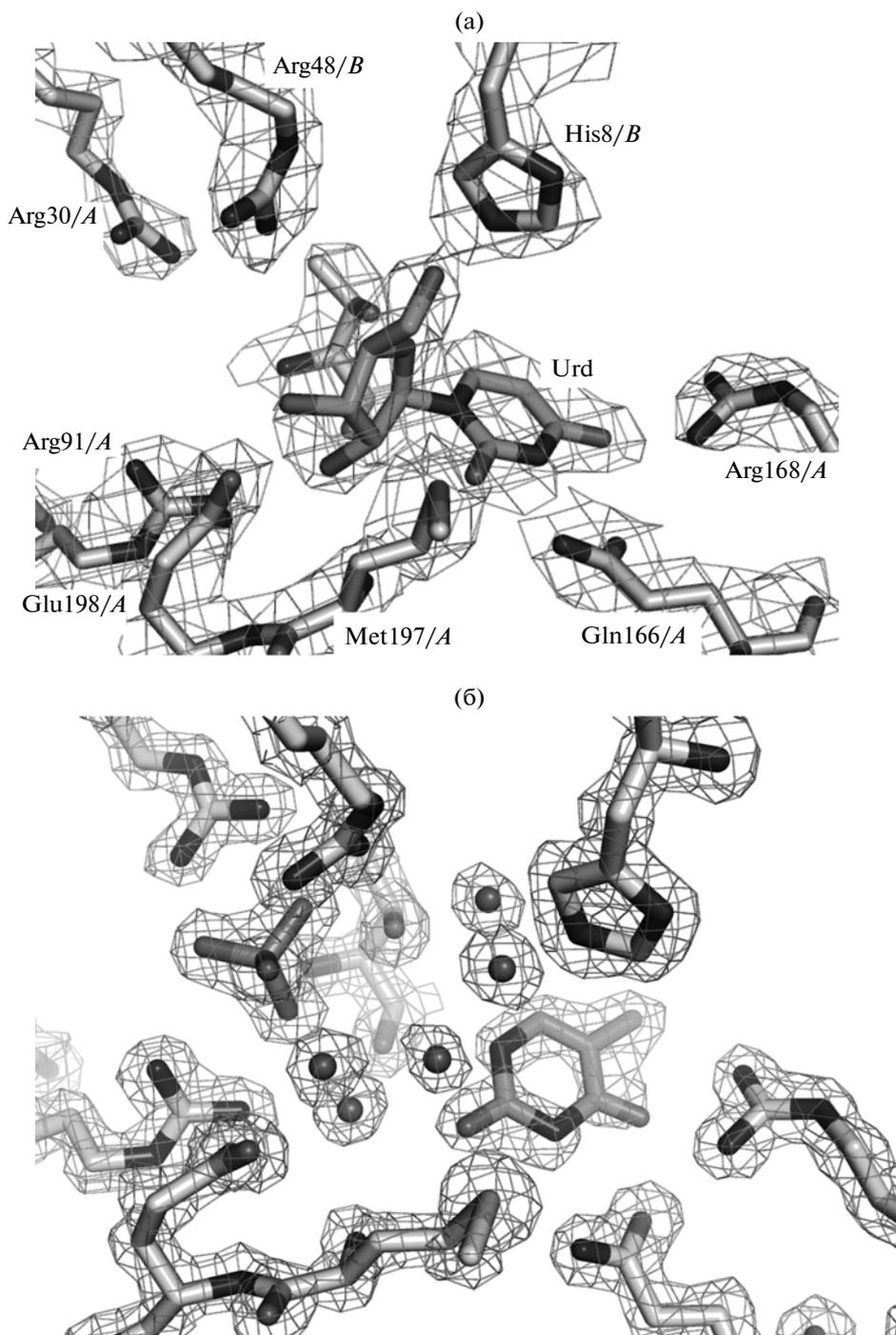


Рис. 9. Область активного центра фермента с вписанными в электронную плотность молекулами лигандов комплексов с: уридином (Urd) (ID PDB: 2HWU) (а); тиминем (Tdr) и ионом фосфата (Php) (ID PDB: 2HRD) (б); шарики – молекулы воды.

имодействует с O4-атомом уридина (урацила) (табл. 7) Однако в комплексах *StUPh* с тиминем NE2 и OE1 атомы Gln 166 формируют водородные связи только с N3-атомом пиримидинового кольца основания (табл. 7). Тем самым структурно показано, что сродство фермента к уридину (урацилу) выше, чем к тимину. Влияние индук-

тивного эффекта метильной группы в пиримидиновом кольце тимина, возможно, сказывается на скорости прохождения ферментативной реакции. *StUPh* расщепляет нуклеозиды, производные тимина и урацила. При этом Gln166 и Arg168 являются ключевыми аминокислотными остатками в узнавании субстрата при прохождении

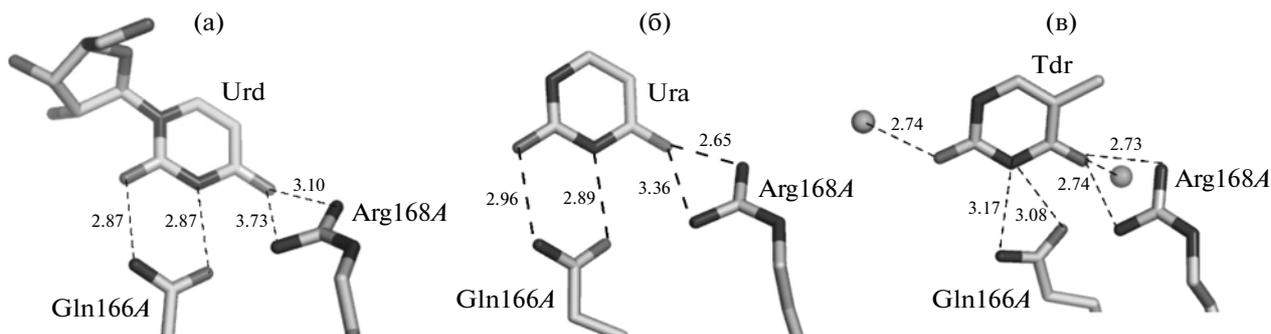


Рис. 10. Ключевые аминокислотные остатки урацилсвязывающего сайта и связанные с ними молекулы: уридина (Urd) (ID PDB: 2HWU) (а); урацила (Ura) (б); тимина (Tdr) (ID PDB: 2HRD) (в); водородные связи (Å) – пунктирные линии; шарики – молекулы воды.

ферментативной реакции. Но *StUPh* не расщепляет производные цитозина. Вероятно, различная природа заместителей в 4-м положении пиримидинового кольца в урдине и цитидине (рис. 5а, 5б) (карбонильная и аминогруппа соответственно), а также различный характер их связывания с Arg168 определяют прохождение или отсутствие ферментативной реакции расщепления нуклеозида энзимом.

В исследованных комплексах бактериальных уридинфосфорилаз *StUPh* (1Y1R, 3C74, 3FWP) с ингибитором 2,2'-ангидроуридином (ANU) аминокислотные остатки Gln166/B, Arg168/B и Arg223/B консервативны и играют основную роль в узнавании пиримидинового кольца [68, 70, 72]. В активных центрах в урацилсвязывающем сайте атом O4 урацильного фрагмента ингибитора ANU формирует водородные связи с теми же атомами, что и атом O4 ациклоуридинов (BAU, BBAU, BBA, PTAU, PSAU) [17] и субстратов [71], а именно: с Arg168/B (NH1_Arg168/B – 3.24 Å – O4_ANU; NH2_Arg168/B – 2.82 Å – O4_ANU) и через молекулы воды с боковой группой Arg223/B (O4_ANU – 2.60 Å – HOH – 3.11 Å – NH1_Arg223/B). В отличие от ациклоуридинов (BAU, PTAU и др.) атом N3 2,2'-ангидроуридина оказался не связанным водородной связью с атомом OE1 боковой цепи Gln166, что объясняется другим по сравнению с ациклоуридинами [17] положением пири-

мидинового кольца в молекуле 2,2'-ангидроуридина из-за фиксации пиримидинового кольца в *син*-конформации. Также отсутствует водородная связь между атомом O2 2,2'-ангидроуридина и NE2 боковой цепи Gln166. Однако атом OE1_Gln166/B связан с атомом O4 ингибитора (OE1_Gln166/B – 3.05 Å – O4_ANU). Расстояние между атомом NE2_Gln166/B и N3-атомом 2,2'-ангидроуридина равно 3.39 Å (рис. 8). В структуре комплекса *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином (ID PDB: 3C74) взаимодействие ингибитора с аминокислотными остатками из урацилсвязывающих сайтов происходит аналогично структуре 3FWP. Параметры водородных связей, стэкинг и ван-дер-ваальсовых контактов рассматриваемого ингибитора с остатками сайтов связывания в структурах 3C74 и 3FWP в целом аналогичны (табл. 8). Однако в этих структурах по-разному ориентированы боковые радикалы Arg168. Смещения радикала обусловлены, скорее всего, наличием водородной связи с атомом O4_ANU в субъединицах гомодимера BD в структуре 3FWP (в структуре 3C74 расстояния O4_ANU...NH2_Arg168 равны 3.69 и 4.04 Å соответственно в B- и D-субъединице).

При сравнении аминокислотных остатков, формирующих нелигандированные урацилсвязывающие сайты, показана высокая степень гомологии между урацилсвязывающими сайтами

Таблица 7. Водородные связи между атомами аминокислотных остатков активного центра уридинфосфорилазы *S. typhimurium* и атомами уридина, урацила, тимина

Атом_аминокислотный остаток/субъединица	Уридин		Урацил		Тимин	
	Атом	Длина, Å	Атом	Длина, Å	Атом	Длина, Å
OE1_Gln166/A	N3	2.87	N3	2.89	N3	3.08
NE2_Gln166/A	O2	2.87	O2	2.96	N3	3.17
NH1_Arg168/A	O4	3.73	O4	3.36	O4	2.74
NH2_Arg168/A	O4	3.10	O4	2.65	O4	2.73

Таблица 8. Водородные связи между атомами 2,2'-ангидроуридина и атомами аминокислотных остатков сайтов связывания в *StUPh* (3FWP, 3C74, димер *BD*, *B*-субъединица)

Атом аминокислотный остаток/субъединица	Атом 2,2'-ангидроуридина	Расстояние, Å, 3FWP	Расстояние, Å, 3C74
NH1_Arg168/B	O4	3.24	
NH2_Arg168/B	O4	2.82	
OE1_Gln166/B	O4	3.05	2.92
NE2_Gln166/B	N3	3.39	3.32
OE2_Glu198/B	O3'	2.42	2.59
OE1_Glu198/B	O3'	3.03	3.37
NE2_His8/D	O5'	2.68	3.19
OG1_Thr94/B	O4'	3.03	3.38
O_Thr94/B	N1		3.33
O_Tyr195/B	N3		3.26
NH1_Arg 223/B	HOH*	3.11	
HOH*	O4	2.60	

* Молекула воды — посредник в связывании атома аминокислотного остатка с атомом ингибитора.

HUPhI [69] и *StUPh* (3DPS, 3DDO, 3FWP) [74, 76], о чем свидетельствуют R.M.S.D. При попарном сравнении атомов главной цепи: R.M.S.D. = 0.18 Å (Gln217/*A/HUPhI* с Gln/166/*B/StUPh*); R.M.S.D. = 0.56 Å (Arg219/*A/HUPhI* с Arg168/*B/StUPh*); R.M.S.D. = 0.43 Å (Arg275/*A/HUPhI* с Arg223/*B/StUPh*). При попарном сравнении атомов боковых цепей: R.M.S.D. =

0.47 Å (Gln217/*A/HUPhI* с Gln/166/*B/StUPh*); R.M.S.D. = 0.75 Å (Arg219/*A/HUPhI* с Arg168/*B/StUPh*); R.M.S.D. = 0.40 Å (Arg275/*A/HUPhI* с Arg223/*B/StUPh*). Приведены R.M.S.D., полученные при сравнении *StUPh* (3FWP) с *HUPhI* (ID PDB: 3EUE). Гидрофобное окружение пиримидинового кольца молекулы ANU в активном центре *StUPh* формируется аминокислотными остатками: Gly96/*B*, Phe162/*B*, Ile220/*B*, Val221/*B*. Из них наиболее гидрофобные остатки — Ile220/*B* и Val221/*B* — сосредоточены около 5-го положения пиримидинового кольца 2,2'-ангидроуридина в комплексах *StUPh* (1Y1R, 3C74, 3FWP). Гидрофобное окружение пиримидинового кольца ингибитора в уридинфосфорилазе человека [78] представлено остатками Gly143/*A*, Phe213/*A*, Leu272/*A*, Leu273/*A*. Эти остатки (по гидрофобным свойствам) для *StUPh* и *HUPhI* уридинфосфорилаз аналогичны, а R.M.S.D. координат для атомов главной цепи между ними при попарном сравнении соответствующих атомов не превышает 0.95 Å.

Остаток Phe7 в *StUPh* сам не вступает во взаимодействие с субстратом, но его положение определяется наличием (отсутствием) пиримидинового кольца субстрата в активном центре. В случае, когда в активном центре уридинфосфорилазы находится молекула ингибитора, боковая цепь Phe7/*D* (3FWP) из соседнего мономера закрывает доступ растворителя к урацилсвязывающему сайту. Этот остаток также близок к 5-му положению урацильного кольца рассматриваемого ингибитора ANU. Положение фенильного кольца Phe7 в комплексах уридинфосфорилазы из *StUPh* (1Y1R, 3C74, 3FWP) с ANU по сравнению с его положением в комплексах *EcUPh* с BAU и положением Tyr35/*D* (аналога остатка Phe7 в *StUPh*) в комплексе уридинфосфорилазы человека *HUPhI* с BAU [69] отличается приблизительно на 30°. По-видимому, это объясняется ван-дер-ваальсовым взаимодействием боковых групп остатков Phe7 (*EcUPh*) и Tyr35 (*HUPhI*) с атомами фенильного кольца BAU.

4.2.2. Рибозосвязывающий сайт

Рибозосвязывающий сайт в комплексе *StUPh* с уридином [75] формируют Arg91/*A*, Thr94/*A*, Met197/*A*, Glu198/*A* *A*-субъединицы и His8/*B* *B*-субъединицы гомодимера *AB* (рис. 11). С 2'- и 3'-гидроксилами рибозы формируют водородные связи Arg91/*A*, Met197/*A*, Glu198/*A*; с 4'-гидроксильной группой — Thr94/*A*; с 5'-гидроксильной группой — His8/*B* (табл. 9). Данные остатки высоко консервативны среди уридинфосфорилаз из различных источников.

В комплексах *StUPh* с ангидроуридином (1Y1R, 3C74, 3FWP) рибозная компонента ANU находится в промежутке между урацил- и фос-

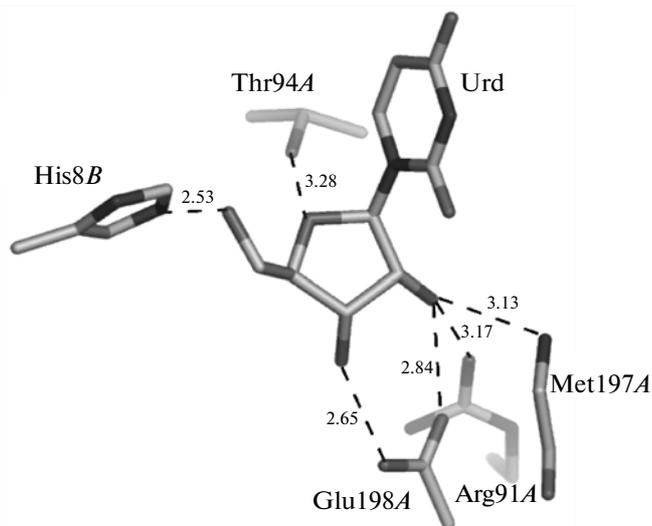


Рис. 11. Ключевые аминокислотные остатки рибозосвязывающего сайта в комплексе *StUPh* с уридином (Urd) (ID PDB: 2HWU); водородные связи (Å) — пунктирные линии.

фатсвязывающими центрами фермента (рис. 8). Атом O3' (гидроксил) рибозного компонента образует водородные связи с боковой группой остатка Glu198/B (OE2_Glu198/B – 2.42 Å – O3'_ANU; OE1_Glu198/B – 3.03 Å – O3'_ANU) в отличие от структур комплексов EcUPh и HUPhI с ациклоуридинами, где аналогичный остаток связан с молекулами воды. Остаток His8/D/StUPh из соседнего мономера образует водородную связь с 5'-гидроксилом рибозного компонента 2,2'-ангидроуридина (NE2_His8/D/StUPh – 2.68 Å – O5'_ANU). Подобная связь наблюдается и в структурах комплексов EcUPh с ациклоуридинами [17]. Кроме того, гидроксил боковой цепи Thr94/B/StUPh образует водородную связь с атомом O4' углеводного компонента ингибитора (OG1_Thr94/B – 3.03 Å – O4'_ANU).

В структуре комплекса StUPh с 2,2'-ангидроуридином (3C74) расстояние O2'_ANU...OG1_Thr94 в StUPh (3C74) увеличено с 3.38 до 4.23 Å по сравнению со структурой StUPh (3FWP) (сравнивались B-субъединицы), что связано, по-видимому, с влиянием иона фосфата на положение этого аминокислотного остатка в структуре StUPh (3FWP) (табл. 8).

Атом серы Met197/B в StUPh (1Y1R, 3C74, 3FWP, 2HWV) стабилизирует положения рибозного фрагмента уридина и 2,2'-ангидроуридина посредством ван-дер-ваальсовых взаимодействий с атомами фуранозного кольца (C1'-C2'-C3'-C4'-O4') (рис. 8, 9а).

Рибозная компонента 2,2'-ангидроуридина связывается подобно рибозному фрагменту субстратов данного фермента в отличие от структур комплексов с ациклоуридинами, где рибозной компоненте соответствует цепочка атомов C1'-O2'-C3'-C4'-O5' [17, 69].

Рибозсвязывающие сайты уридинфосфорилаз HUPhI [69] и StUPh гомологичны между собой по аминокислотной последовательности и третичной структуре. R.M.S.D. координат при попарном сравнении атомов главной цепи равны: 0.33 Å (Glu250/A/HUPhI и Glu198/B/StUPh); 0.36 Å (His36/B/HUPhI и His8/D/StUPh); 0.16 Å/0.40 Å (Met249/A/HUPhI и Met197/B/StUPh).

R.M.S.D координат при попарном сравнении атомов боковых цепей следующие: 0.52 Å (Glu250/A/HUPhI и Glu198/B/StUPh); 0.50 Å (His36/B/HUPhI и His8/D/StUPh); 0.40 Å (Met249/A/HUPhI и Met197/B/StUPh).

4.2.3. Фосфатсвязывающий сайт

На основании рентгеноструктурных исследований комплекса StUPh с тиминем и ионом фосфата были идентифицированы остатки аминокислот, участвующие в связывании фосфата в фосфатсвязывающем сайте (рис. 12) [75]. Атомы кислорода фосфатного иона образуют водород-

Таблица 9. Водородные связи между атомами рибозного кольца уридина и атомами активного центра уридинфосфорилазы *S. typhimurium*

Атом аминокислотный остаток/субъединица	Длина связи, Å	Атом рибозного кольца уридина
NH2_Arg91/A	3.17	O2'
OG1_Thr94/A	3.28	O4'
N_Met197/A	3.13	O2'
OE1_Glu198/A	2.84	O2'
OE2_Glu198/A	2.65	O3'
NE2_His8/B	2.53	O5'

ные связи с Arg30/A, Arg91/A, Thr94/A и Gly26/A субъединицы A и Arg48/B субъединицы B (табл. 10).

Подобные взаимодействия наблюдаются в активных центрах гомодимера BD комплекса StUPh (3FWP), где находятся одновременно молекула субстрата PO₄³⁻ (в фосфатсвязывающем сайте) и молекула ингибитора 2,2'-ангидроуридина (в нуклеозидсвязывающем сайте) (рис. 8) [74]. Ключевыми аминокислотными остатками фосфатсвязывающего сайта B-центра являются Arg30/B, Arg91/B B-субъединицы и Arg48/D – D-субъединицы. С каждым из этих аминокислотных остатков атомы кислорода фосфатного иона образуют одну или две водородные связи (рис. 8). А именно: NH2_Arg48/D – 2.91 Å – O2_PO4;

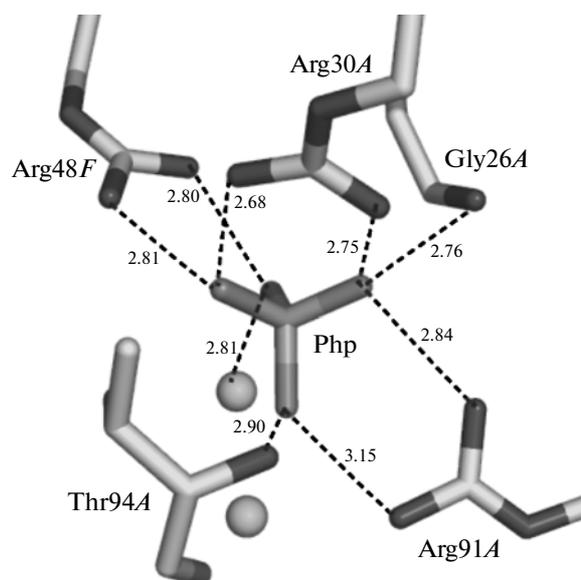


Рис. 12. Взаимодействие иона фосфата (Php) с аминокислотными остатками в активном центре StUPh в комплексе с тиминем; водородные связи (Å) – пунктирные линии; шарики – молекулы воды.

Таблица 10. Водородные связи между атомами иона фосфата и атомами активного центра комплекса *StUPh* с тимином

Атом_аминокислотный остаток/субъединица	Длина связи, Å	Атом иона фосфата
N_Gly26/A	2.76	O4
NH1_Arg30/A	2.75	O4
NH2_Arg30/A	2.68	O3
NH1_Arg91/A	2.84	O4
NH2_Arg91/A	3.15	O1
N_Thr94/A	2.90	O1
OG1_Thr94/A	2.67	O3
NH1_Arg48/F	2.80	O2
NH2_Arg48/F	2.81	O3

NH1_Arg48/D – 2.96 Å – O3_PO4; *NH2_Arg30/B* – 2.68 Å – O2_PO4; *NH1_Arg 30/B* – 2.67 Å – O1_PO4; *NH1_Arg91/B* – 3.2 Å – O1_PO4; *NH1_Arg91/B* – 2.82 Å – O4_PO4. Кроме этого, во взаимодействии с ионом фосфата принимают участие гидроксильный атом кислорода боковой цепи (*OG1_Thr94/B* – 2.62 Å – O2_PO4) и атом азота основной цепи (*N_Gly26/B* – 2.81 Å – O1_PO4). Ион фосфата связан посредством водородной связи с молекулой 2,2'-ангидроуридина: O3'_ANU-2.68 Å-O3_PO4.

Между положительно заряженными аминокетильными группами боковых цепей аминокислотных остатков

аргинина (*NH2_Arg48/D*, *NH1_Arg48/D*, *NH2_Arg30/B*, *NH1_Arg30/B*, *NH1_Arg91/B*, *NH1_Arg91/B*) и отрицательно заряженными атомами кислорода (O1, O2, O3) иона фосфата существуют сильные электростатические взаимодействия.

По сравнению с активным центром, где отсутствует ион фосфата (субъединица *C*, гомодимер *CE*, *StUPh* (3FWP)), положение боковой группы остатка *Arg30*, формирующего активный центр в субъединице *B*, содержащей ион фосфата в фосфатсвязывающем центре, значительно изменилось (R.M.S.D = 4.05 Å). Менее значительно поменялось положение атомов боковых групп других аминокислотных остатков: *Arg91/B* по сравнению с *Arg91/C* (R.M.S.D. = 1.60 Å); *Arg48/D* по сравнению с *Arg48/E* (R.M.S.D. = 1.95 Å). Атомы основной цепи *Arg30/B* (R.M.S.D. = 0.31 Å), *Arg91/B* (R.M.S.D. = 0.24 Å) и *Arg48/D* (R.M.S.D. = 0.11 Å) практически не поменяли свое положение по сравнению с соответствующими аминокислотными остатками в нелигандированном активном центре субъединицы *C StUPh* (3FWP).

В структуре комплекса *StUPh* с ионом фосфата (3DDO) ион фосфата взаимодействует с остатками фосфатсвязывающего сайта так же, как в структуре 3FWP. Параметры связей, образуемых ионом фосфата с остатками сайтов связывания, аналогичны в структурах 3DDO и 3FWP (табл. 11). Различия заключаются в том, что в 3DDO, где отсутствует молекула ингибитора, с атомами кислорода фосфатных групп контакти-

Таблица 11. Водородные связи иона фосфата с остатками сайта связывания в *StUPh*

3DDO, B-субъединица			3FWP, B-субъединица		
Атом_аминокислотный остаток/субъединица	Длина, Å	Атом иона фосфата	Атом_аминокислотный остаток/субъединица	Длина, Å	Атом иона фосфата
<i>NH1_Arg48/D</i>	2.90	O4	<i>NH1_Arg48/D</i>	2.96	O3
<i>NH2_Arg48/D</i>	2.93	O1	<i>NH2_Arg48/D</i>	2.91	O2
<i>NH1_Arg30/B</i>			<i>NH1_Arg30/B</i>	2.87	O1
<i>NH2_Arg 30/B</i>	2.80	O2	<i>NH2_Arg30/B</i>	2.68	O2
<i>NH1_Arg91/B</i>	3.10	O2			
<i>NH2_Arg91/B</i>	2.84	O3	<i>NH2_Arg91/B</i>	2.82	O4
<i>N_Gly26/B</i>	2.90	O2	<i>N_Gly26/B</i>	2.81	O1
<i>N_Thr94/B</i>	3.04	O3	<i>N_Thr94/B</i>	2.85	O4
<i>OG1_Thr94/B</i>	2.81	O1	<i>OG1_Thr94/B</i>	2.62	O2
НОН* (<i>Glu198/B</i>)	2.55	O4			
НОН (<i>Met197/B</i>)	3.08	O3			
НОН (<i>Arg30/B</i>)	2.89	O1			
			O3'_ANU	2.68	O3

* Молекула воды – посредник в связывании атома аминокислотного остатка с атомом кислорода иона фосфата.

руют еще и молекулы воды, а в 3FWP — молекула 2,2'-ангидроуридина (табл. 11).

Сравнение трехмерных структур бактериальной уридинфосфорилазы *StUPh* и уридинфосфорилазы человека *HUPhI*, лигандированных ионом фосфата, позволило установить, что фосфатсвязывающий сайт уридинфосфорилазы *HUPhI* [69] представлен остатками Arg138, Arg64, Thr141 одной субъединицы и остатком Arg194 соседней субъединицы. При попарном сравнении атомов основных цепей расхождения между атомами следующие: 0.65 Å (Arg138/A/*HUPhI* и Arg91/B/*StUPh*); 0.66 Å (Arg64/A/*HUPhI* и Arg30/B/*StUPh*); 0.79 Å (Thr141/A/*HUPhI* и Thr94/B/*StUPh*); 1.01 Å (Arg94/B/*HUPhI* и Arg48/D/*StUPh*). Большие отклонения положений атомов главной цепи в последнем случае, по-видимому, связаны с отмеченной авторами [69] более высокой подвижностью мономеров в гомодимере уридинфосфорилазы человека по сравнению с бактериальным ферментом. При попарном сравнении по боковым цепям аминокислотных остатков структур комплексов с ионом фосфата и ингибиторами уридинфосфорилазы человека (A-субъединица) и *StUPh* (3FWP, B-субъединица) наблюдались следующие отклонения: R.M.S.D. = 0.56 Å (Arg138/A/*HUPhI* и Arg91/B/*StUPh*); 0.86 Å (Thr141/A/*HUPhI* и Thr94/B/*StUPh*); 1.43 Å (Arg94/B/*HUPhI* и Arg48/D/*StUPh*). Существенное различие наблюдалось для атомов боковых цепей при попарном сравнении Arg64/A/*HUPhI* с Arg30/B/*StUPh*, R.M.S.D. = 3.63 Å. Боковая цепь Arg64/A/*HUPhI* в структуре уридинфосфорилазы человека не имеет коротких контактов с ионом фосфата. По-видимому, это объясняется влиянием остатка Gln296/*HUPhI*, с которым образует водородную связь Arg64 (NH1_Arg64/A/*HUPhI* — 2.96 Å — OE1_Gln296/A/*HUPhI*). Аминокислотный остаток Gln296/*HUPhI* по свойствам и положению боковой группы не имеет аналогов в структуре *StUPh*. Однако можно предположить, что у Arg64/*HUPhI* имеется возможность связать ион фосфата при условии образования ротamera, аналогичного ротамеру Arg30/*StUPh*.

4.3. Исследование молекулярного гидрофобного потенциала 2,2'-ангидроуридина и сайтов связывания уридинфосфорилаз

Во взаимодействиях 2,2'-ангидроуридина с ферментом немаловажную роль играют гидрофобные контакты. С помощью программы PLATINUM [77] рассчитано распределение молекулярного гидрофобного потенциала на поверхности молекулы 2,2'-ангидроуридина. При сопоставлении собственных свойств гидрофобности 2,2'-ангидроуридина со свойствами гидрофобности сайтов связывания 2,2'-ангидроуридина была выявлена комплементарность гидрофоб-

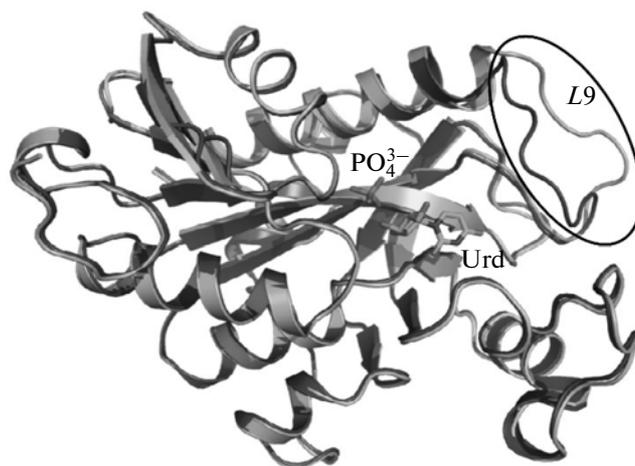


Рис. 13. Наложение двух пространственных структур мономеров *StUPh* с различными конформациями петель, соответствующими “открытому” и “закрытому” активному центру; область петель обведена овальной линией; более светлая — структура фермента с “открытым” активным центром; темная — структура с “закрытым” активным центром.

ных свойств (более 90% поверхности оказалось комплементарным, данные PLATINUM), чем подтверждается высокая эффективность связывания 2,2'-ангидроуридина с ферментом.

4.4. Роль функциональнозначимой петли L9 в связывании ингибитора

Как показано в [71], в зависимости от отсутствия или присутствия субстратов активный центр уридинфосфорилаз может находиться в “открытой”, “промежуточной” или “закрытой” конформациях. Анализ кристаллических структур фермента *StUPh* как в свободной от лигандов, так и в лигандированной формах, позволил локализовать петлю, сформированную аминокислотными остатками 224–234 (петля L9), играющую важную роль при функционировании активного центра и принимающую конформацию, соответствующую “открытому” или “закрытому” активному центру. В случае наличия в активном центре субстрата или продуктов реакции наблюдается “закрытое” состояние активного центра и соответствующее ему положение петли [74]. Однако возможно статистическое распределение положения петли в нелигандированной *StUPh*. Существенных изменений в позициях аминокислот, взаимодействующих с субстратами, не наблюдается, а основные изменения происходят в окружении активного центра. Петля L9 открывает или закрывает доступ растворителя (субстрата) в область активного центра. При “открытой” конформации активного центра остатки петли Thr233, Met234 и Glu238 экспонированы в растворитель и взаимодействуют с молекулами воды (рис. 13) [75].

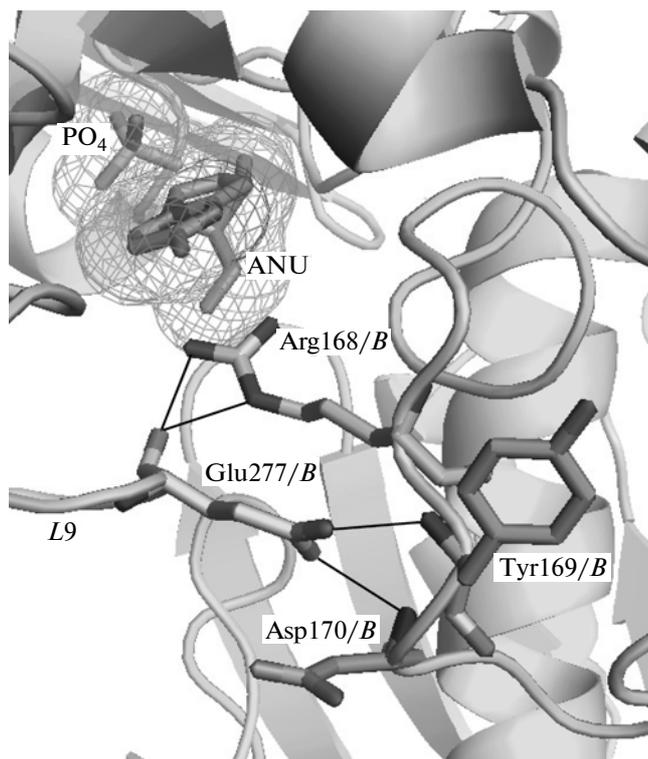


Рис. 14. Система водородных связей (связи показаны сплошными линиями), фиксирующая конформацию петли *L9* в субъединице *B* структуры *StUPh* (ID PDB: 3FWP) в случае “закрытого” состояния активного центра. В активном центре находятся молекула ингибитора и ион фосфата.

В структурах комплексов *StUPh* с ингибитором ANU [74] подвижная функционально значимая для ферментативной реакции петля *L9*, образованная аминокислотными остатками 223–233, также меняет свою конформацию и имеет разное положение в зависимости от состояния активного центра (“закрытый”, “открытый”, “промежуточный”). В структуре *StUPh* (3FWP), где в сайтах связывания локализованы молекула ингибитора и ион фосфата, происходит большое смещение всей петли *L9* в сторону активного центра, и остаток Glu227/*B* образует водородные связи с Arg168/*B*, Tyr169/*B*, Asp170/*B*, что характерно для “закрытой” конформации активного центра ($NE_Arg168/B - 2.80 \text{ \AA} - O_Glu227/B$; $NH2_Arg168/B - 2.73 \text{ \AA} - O_Glu227/B$; $N_Tyr169/B - 2.71 \text{ \AA} - OE2_Glu227/B$; $N_Asp170/B - 2.93 \text{ \AA} - OE1_Glu227/B$) (рис. 14) [74]. Чтобы осуществить это движение, должно произойти “расплетение” концевой α -спирали *H8* и удлинение мобильной петли за счет нескольких остатков, что, по-видимому, и происходит. Такие движения нарушают стабильность структуры в данной области субъединицы, вследствие чего на картах электронной плотности субъединиц в структуре *StUPh* (3FWP) часть остатков, формирующих конец петли *L9* и

начало концевой спирали, не идентифицируются. Ранее другими авторами на примере *EcUPh* [71] было отмечено аналогичное положение остатка Glu227 при “закрытом” активном центре.

При “открытом” состоянии активного центра, например, в субъединице *A* структуры *StUPh* (3FWP), где активный центр *A*-субъединицы свободен от субстратов, остаток Glu227/*A* экспонирован в растворитель и взаимодействует с молекулами воды. Изменение положения петли в структуре комплекса фермента с ионом фосфата и 2,2'-ангидроуридином индуцируется взаимодействием ингибитора одновременно с аминокислотными остатками всех трех сайтов связывания активного центра. Подобная ситуация наблюдается при связывании *EcUPh* как с ациклорибонуклеозидными ингибиторами и ионом фосфата, так и с некоторыми субстратами и псевдосубстратами [17, 71].

В [74] установлено, что в субъединицах, содержащих ион фосфата или молекулу ангидроуридина, можно наблюдать некие “промежуточные” положения активной петли *L9*, близкие тем, что свойственны для “закрытого” или “открытого” активного центра, независимо от того, заняты сайты связывания одинаковыми ионами или молекулами или нет. Проведенные сравнения свидетельствуют о нестабильности петли *L9*, имеющей высокую степень подвижности. В двух идентичных *B*- и *D*-субъединицах, содержащих в сайтах связывания молекулу ангидроуридина (*StUPh* (3C74)) или ион фосфата (*StUPh* (3DDO)), существует различное положение подвижной функциональной петли *L9*. Для субъединиц с “псевдооткрытой” (*D*-субъединица) конформацией активного центра удалось идентифицировать все остатки петли и концевой спирали в отличие от случая “закрытого” (*B*-субъединица) активного центра. Для остатков петли *L9*, локализованных на картах электронной плотности в субъединице *D*, среднее значение температурного фактора атомов основной цепи равно 51.4 \AA^2 .

В *HUPhI* петля, аналогичная петле *L9* в *StUPh*, образована остатками 275–284 [69]. Судя по признакам, характерным для бактериальных фосфорилаз [71], во всех исследованных структурах уридинфосфорилазы человека [69] петля находится в положении, близком тому, что характерно для “закрытого” активного центра, вне зависимости от того, какие лиганды присутствуют в активном центре. Во всех структурах уридинфосфорилазы человека остаток Asp279, соответствующий Glu227 в *StUPh*, образует связи с остатками белковой молекулы. Так, для субъединицы *C* молекулы комплекса уридинфосфорилазы человека с BAU (ID PDB: 3EUF) остаток Asp279 образует следующие водородные связи: $OD1_Asp279/A - 3.12 \text{ \AA} - NE_Arg275/A$; $OD1_Asp279/A - 3.09 \text{ \AA} -$

NH2_Arg275/A; *OD2_Asp279/A* – 2.75 Å – *N_Leu220/A*. Для структуры *HUPhI* характерна высокая по сравнению с рассматриваемой бактериальной *StUPh* гомология пространственного расположения остатков петли в разных субъединицах.

В структуре уридинфосфорилазы человека (ID PDB: 3EUE) петля *L9* также находится в положении, близком тому, которое характерно для “закрытого” состояния активного центра, что, по нашему мнению, может быть объяснено влиянием не специфически связанного с активным центром иона сульфата.

4.5. Влияние присутствия в активном центре ингибитора и (или) иона фосфата на пространственное строение субъединиц молекулы

В [74] проведен сравнительный анализ пространственного строения субъединиц из различных структур *StUPh*, в активных центрах которых находятся или отсутствуют ингибиторы (ANU) и (или) ионы фосфата. На основании проведенных сравнений сделаны следующие заключения об изменении конформации отдельных аминокислотных остатков и фрагментов субъединиц в зависимости от занятости активного центра. А именно: наличие иона фосфата в ФСС значительно меняет ориентацию боковых радикалов аминокислотных остатков Arg30, Arg91, Arg48, координирующих этот ион. Проведенные сравнения свидетельствуют также о нестабильности петли *L9*, имеющей высокую степень подвижности. Помимо смещений аминокислотных остатков петли *L9*, обусловленных состоянием активного центра, как показано в [74], заметно меняется конформация отдельных аминокислотных остатков, нарушаются и образуются новые водородные связи как внутри субъединицы, так и между субъединицами. В структурах *StUPh* (3FWP), *StUPh* (3C74), *StUPh* (3DDO) в субъединицах с “закрытой” (или “псевдозакрытой”) конформацией активного центра формируются Н-связи между остатками Lys145 и Glu142, отсутствующие в субъединицах с “открытым” активным центром. Боковой радикал остатка Arg175 может образовывать различные водородные связи независимо от наличия или отсутствия в активных центрах иона фосфата или молекул ингибитора. Во всех исследованных в [74] структурах боковой радикал остатка Arg178, ориентированный во внутреннюю полость центрального канала, образует междимерные связи с карбонильными атомами кислорода основной цепи остатков Arg178 и Lys181 другого гомодимера.

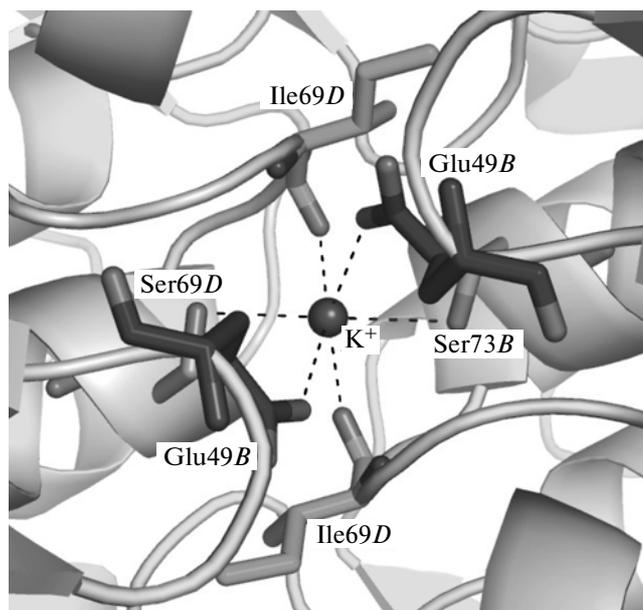


Рис. 15. Координация иона калия в гомодимере *BD* комплекса *StUPh* (ID PDB: 3FWP).

4.6. Ион калия в структуре комплекса уридинфосфорилазы с лигандами (2,2'-ангидроуридином и ионом фосфата)

В исследованных структурах уридинфосфорилаз, содержащих ион калия [74], K^+ находится в межмономерном пространстве каждого гомодимера гексамерной молекулы в области, где проходит локальная ось симметрии 2-го порядка молекулы *StUPh*, точечная группа симметрии которой L_33L_2 (рис. 6а).

Боковые цепи аминокислотных остатков Glu49/*B*, Ser73/*B*, карбонильный кислород Ile69/*B* *B*-субъединицы *StUPh* (3FWP) и симметричные им одноименные аминокислотные остатки *D*-субъединицы гомодимера *BD* координируют ион калия. Координирующие ион калия атомы OE2_Glu49/*B*, O_Ile69/*B*, OG_Ser73/*B*, OE1_Glu49/*D*, O_Ile69/*D*, OG_Ser73/*D* (рис. 15) образуют полиэдр (искаженный октаэдр или искаженная тригональная призма). Расстояния между ионом K^+ и координирующими его атомами кислорода приведены в табл. 12.

Таблица 12. Расстояния между ионом калия и аминокислотными остатками гомодимера *BD StUPh* (3FWP)

Атом_аминокислотный остаток/ субъединица	Расстояние, Å
OE2_Glu49/ <i>B</i>	2.66
O_Ile69/ <i>B</i>	2.82
OG_Ser73/ <i>B</i>	2.86
OE1_Glu49/ <i>D</i>	2.75
O_Ile69/ <i>D</i>	2.78
OG_Ser73/ <i>D</i>	2.86

В гомодимерах *AF* и *CE StUPh* (3FWP) имеют место аналогичные связи иона калия с атомами, координирующими его. Кроме того, вблизи каждого из ионов калия во всех гомодимерах обнаружена молекула воды, связанная с атомами O_Пe69 соседних субъединиц гомодимера водородными связями: O_Пe69/*B* – 2.75 Å – H₂O; O_Пe69/*D* – 2.57 Å – H₂O (приведены данные для гомодимера *BD*).

Исследование бактериальной уридинфосфоорилазы из *E. coli* (*EcUPh*) [71] показало, что присутствие иона калия в молекуле фермента увеличивает ее относительную активность. Сравнивая пространственные структуры нелигандированной молекулы *StUPh*, не содержащей ион K⁺, и молекулы, его содержащей, можно прийти к выводу, что ион калия стабилизирует пространственную структуру нелигандированных сайтов связывания субстратов в состоянии, характерном для “открытой” или наиболее приближенной к ней “промежуточной” конформации активного центра. Сопоставление приведенных выше двух фактов, установленных для высокоомологичных по первичной и пространственной структурам бактериальных *StUPh* и *EcUPh*, позволяет предположить, что присутствие иона K⁺ в молекуле, скорее всего, имеет лишь опосредованное влияние на повышение активности уридинфосфоорилазы, а именно через стабилизацию петли *L9*. Тем самым сайты связывания активного центра гомодимера *StUPh* в этом случае более доступны для молекул субстрата по сравнению с нелигандированной формой фермента, не содержащей ион K⁺. Непосредственного влияния иона калия на связывание ингибитора 2,2'-ангидроуридина обнаружено не было.

Отметим, что в структурах *HUPhI* и ее комплексах с бензилациклоуридином и 5ФУ отсутствовал ион калия в межмономерной области гомодимера [69, 78].

5. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛ УРИДИНФОСФОРИЛАЗ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Согласно полученным данным рентгеноструктурного анализа и литературным данным изменения конформации, положения петли *L9* и области межмономерного интерфейса *StUPh* и *HUPhI* являются функционально важными. Результаты, полученные методом рентгеноструктурного анализа, могут быть дополнены, если при исследовании подвижности отдельных фрагментов биомолекул использовать методы МД.

5.1. Исследование конформационной лабильности молекул *StUPh* и *HUPhI*

Поставлена задача посмотреть различия в лабильности *StUPh* в присутствии или в отсутствие иона калия в межмономерном пространстве, а также различия в лабильности уридинфосфоорилаз *StUPh* и *HUPhI*, о которых шла речь в [69]. Исследование осуществлялось несколькими этапами. На каждом этапе эмпирически был подобран оптимальный протокол.

На первом этапе к модели белка-мишени, полученной методом рентгеноструктурного анализа, были добавлены атомы водорода и рассчитаны парциальные заряды атомов в программе *pdb2gmx* программного пакета GROMACS [79]. Параметризация атомных характеристик и все дальнейшие расчеты проводились с использованием набора силовых полей GROMACS/GMX. Далее модели белков помещали в виртуальную ячейку с растворителем. Ячейка представляла собой прямоугольный параллелепипед. Минимальное расстояние между координатами атомов белка и гранью ячейки равно 0.9 нм. Параметризацию атомных характеристик молекул растворителя и распределение растворителя в объеме виртуальной ячейки осуществляли в программе *genbox* (GROMACS), используя трехцентровую модель воды SPC216.

Второй этап заключался в оптимизации атомных параметров моделей с использованием выбранного силового поля в виртуальной ячейке. Инициализацию оптимизации параметров модели с использованием параметров протокола осуществляли в программе-препроцессоре *grompp* (GROMACS). Компенсация общего заряда системы проводилась добавлением к моделям одновалентных ионов Na⁺. Расчет траектории сделан в программе *mdrun* (GROMACS). Остальные параметры процедуры оптимизации геометрии: *Dt* (шаг интегрирования) = 0.001 пс, *Nsteps* (число шагов) = 10000, *Coulombtype* (метод расчета электростатических взаимодействий) – PME, *Rvdw* (радиус срезки для сил Ван-дер-Ваальса) = 1.2 нм.

Третий этап – приведение атомных параметров моделей к условиям температуры 310.0 К. Расчет траектории осуществлялся в программе *mdrun* (GROMACS) с термостатом Берендсена при изотропном давлении. Использовались следующие значения параметров протокола приведения атомных параметров к температуре системы 310.0 К: *Constraints* (“жесткие” ограничения геометрии модели) – all-bonds (ограничения накладывать на все валентные связи), *Dt* (шаг интегрирования) = 0.002 пс, *Nsteps* (число шагов) = 25000, *Nstxout* (шаг записи координат атомов в траекторный файл) = 500, *Nstfout* (шаг записи скоростей атомов в траекторный файл) = 5000, *Nstlog* (шаг протоколирования) = 100, *Coulomb-*

type (метод расчета электростатических взаимодействий) – PME, Rcoulomb, нм (радиус срезки для кулоновских взаимодействий) = 1.0 нм, Vdwtype (метод расчета сил Ван-дер-Ваальса) – Cut-off, Rvdw (радиус срезки для сил Ван-дер-Ваальса) = 1.2 нм, tau_p (начальное давление) = = 1 бар, annealing_temp, К (диапазон температур отжига) – 5–310 К.

Последний этап заключался в молекулярно-динамической симуляции системы при постоянной температуре (термостат Берендсена) 310 К и изотропном давлении 1 бар. Шаг интегрирования составил 0.002 пс, число шагов – 3 млн.

Анализ и преобразование форматов термодинамических траекторий осуществлялся в программах trjconv, g_rms, g_covar комплекса GROMACS [79] и VMD [80].

Согласно графикам зависимости RMSD от времени, молекулярной динамики существенной разницы обнаружено не было ни в средней подвижности всей молекулы *StUPh*, ни в средней подвижности основной цепи (рис. 16). Однако согласно графику зависимости среднеквадратичных флуктуаций (root means square fluctuation – RMSF) атомов основной цепи от номера аминокислотного остатка, наблюдаются локальные изменения подвижности остатков петли, важной для активного центра, и остатков, координирующих ион калия в межмономерном пространстве димера *StUPh* (рис. 17а).

Уридинфосфорилаза человека оказалась более лабильна по сравнению с *StUPh*, что, возможно, связано с большим общим числом аминокислотных остатков, содержащихся в петлях молекулы уридинфосфорилазы человека (рис. 16, 17б). Кроме того, для этого фермента наблюдается более значительная подвижность петли (40–90) по сравнению с аналогичной петлей в бактериальном ферменте. Эти данные подтверждают высказанное в [69] предположение о более высокой по сравнению с мономерами бактериального фермента конформационной подвижности мономера уридинфосфорилазы человека.

5.2. Решение структуры комплекса *HUPhI* с 2,2'-ангидроуридином методом молекулярного докинга

Решение задачи создания высокоэффективных ингибиторов *StUPh* и *HUPhI* с помощью дизайна наиболее подходящих молекул ангидроуридина с заместителем атома кольца урацильного фрагмента [76] (рис. 5в) проводилось в несколько этапов.

На первом этапе для подтверждения правильности выбранной методики встраивания молекулы лиганда в активный центр молекулы уридинфосфорилазы и программного обеспечения был проведен докинг 2,2'-ангидроуридина в активный

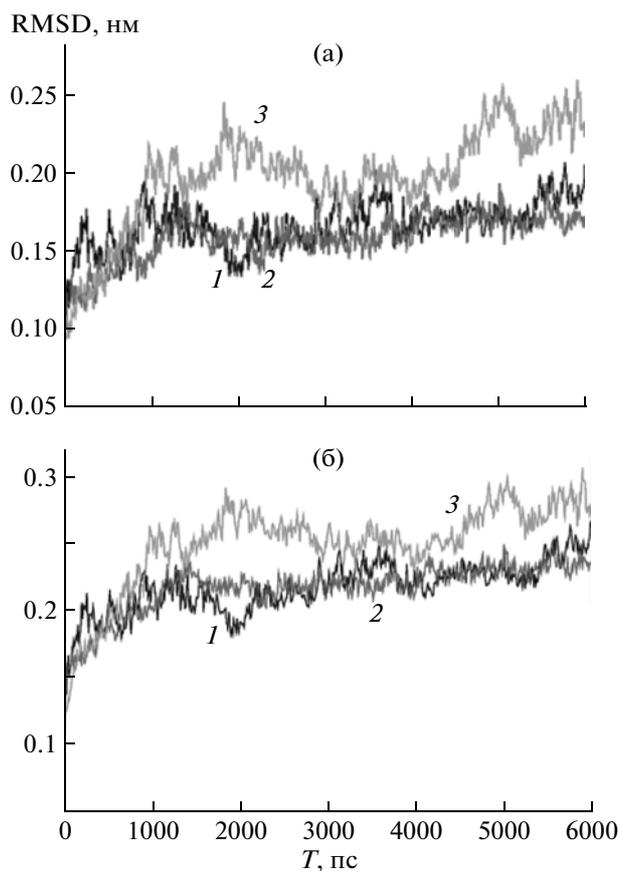


Рис. 16. Зависимость RMSD координат всех атомов белка (а), атомов основной цепи (б) от времени МД: 1 – димер нелигандированной *StUPh*; 2 – димер комплекса *StUPh* с ионом калия; 3 – димер *HUPhI* (результат выдачи программы g_rms_d).

центр субъединицы *B* (рис. 8) структуры *StUPh* (ID PDB: 3FWP), из модели которой были исключены координаты молекулы 2,2'-ангидроуридина, полученные методом рентгеноструктурного анализа. Сетка докинга строилась по поверхности остатков активного центра в радиусе 15 Å от точки центра масс молекулы ингибитора в кристаллической структуре. Был использован вариант XP-докинга (eXtra Precision – высокая точность) подвижного лиганда программного модуля Glide [81]. Положение лиганда, координаты которого получены в одном из решений (с наибольшим по модулю значением функции оценки GlideScore = –5.53), близко соответствовало положению и конформации лиганда в кристаллической структуре 3FWP (RMSD < 0.5 Å).

На втором этапе осуществляли докинг 2,2'-ангидроуридина в активный центр субъединицы, свободный от субстратов, когда положение подвижной петли соответствовало “открытой” конформации активного центра в кристаллической структуре 3FWP (субъединица *A*). В результате были получены два решения, различающиеся по

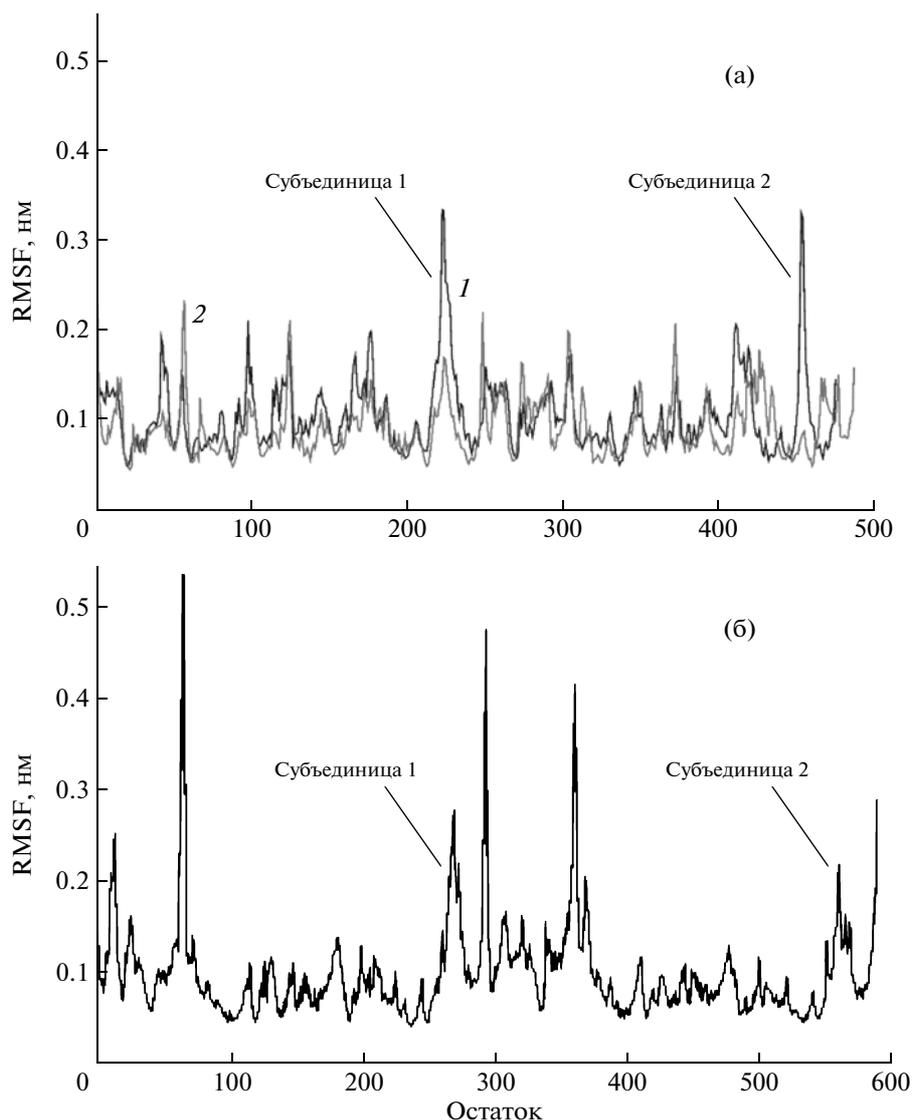


Рис. 17. Зависимость средних флуктуаций координат (RMSF) атомов основной цепи аминокислотных остатков от номера остатка. График для димера *StUPh* (а): 1 – нелигандированный фермент, 2 – комплекс *StUPh* с ионом калия; график для димера *HUPhI* (б). Применена последовательная нумерация остатков для димеров. Стрелками показаны пики флуктуаций атомов основной цепи петли *L9* (*StUPh*) и аналогичной ей петли *HUPhI* (результат выдачи программы *g_rmsf_d*).

ложением гидроксильной группы у атома C5' рибозного компонента молекулы ангидроуридина.

Только в одном из этих решений гидроксильная группа у C5'-атома рибозного компонента образовывала водородную связь с атомом N3 остатка His8, аналогичную той, что существует в области активного центра В-субъединицы в кристаллической структуре *StUPh* (ID PDB: 3FWP).

При наложении по C α -атомам структур активных центров комплекса, полученного методом докинга 2,2'-ангидроуридина в сайт связывания субъединицы А, и субъединицы В из кристаллической структуры *StUPh* оказалось, что положения молекул 2,2'-ангидроуридина идентичны

(RMSD < 0.6 Å). Было отмечено образование водородных связей молекулы 2,2'-ангидроуридина, положение которой найдено в результате докинга (ANUdock), с остатками сайтов связывания, аналогичных таковым в кристаллической структуре (O4_ANUdock – 2.97 Å – NH₂_Arg168/A; O5'_ANUdock – 3.04 Å – NE₂_His8/F; O3'_ANUdock – 3.40 Å – OD1_Glu198/A).

Хорошее совпадение положений молекул ANU и ANUdock, несмотря на то, что положение одной из них определено методом рентгеноструктурного анализа, а вторая – методом докинга помещена в субъединицу, свободную от лигандов, можно объяснить тем, что изменения конформа-

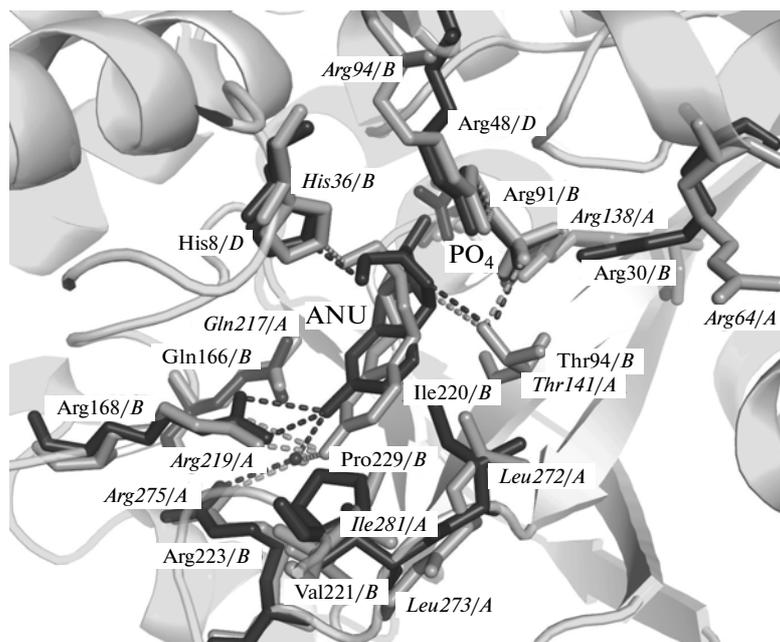


Рис. 18. Сравнение структуры активных центров комплексов *StUPh* и *HUPhI* с 2,2'-ангидроуридином и ионом фосфата [75]. Остатки *StUPh* и соответствующая молекула ANU показаны серым цветом, а остатки *HUPhI* с молекулой ANU – черным. Курсивом обозначены остатки *HUPhI*.

ций остатков сайтов связывания уридинфосфооридазы при ее взаимодействии с лигандами и ингибиторами незначительны [74].

Таким образом, результаты докинга *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином и последующие сравнения полученных данных с результатами исследования структуры кристаллического комплекса *StUPh* с ANU и ионом фосфата подтвердили правильность выбранной методики.

На следующем этапе был проведен докинг 2,2'-ангидроуридина в активный центр *A*-субъединицы димера *AB* уридинфосфооридазы человека. Из активного центра была исключена находящаяся там молекула 5-бензилациклоуридина. В результате докинга получено одно решение.

При сравнении активных центров комплекса *HUPhI* с ANUdock и кристаллической структуры комплекса *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином оказалось, что конформации молекул ингибитора (син-конформации) идентичны в обоих случаях (рис. 18). Несмотря на различия в положении 2,2'-ангидроуридина, водородные связи 2,2'-ангидроуридина с аминокислотными остатками сайтов связывания в комплексе *HUPhI* образовывались с такими же аминокислотными остатками, что и в структуре *StUPh*: O4_ANUdock – 2.63 Å – NH2_Arg219/A/*HUPhI*, O4_ANU – 2.82 Å – NH2_Arg168/B/*StUPh*; O5'_ANUdoc – 2.91 Å – NE2His36/B/*HUPhI*, O5'_ANU – 2.68 Å – NE2His8/D. Это подтверждает высокую гомологию структур сайтов связывания *HUPhI* и *StUPh*. Разница в положении 2,2'-ангидроуридина, по всей

видимости, обусловлена заменой остатков Pro229/*StUPh* → Ile226/*HUPhI*, Ile220/*StUPh* → Leu257/*HUPhI*, Val221/*StUPh* → Leu258/*HUPhI* в петле, осуществляющей в *B*-субъединице *StUPh* и *A*-субъединице *HUPhI* движение в положение, соответствующее “закрытому” активному центру. Эти остатки находятся в непосредственной близости от пятого атома урацильного кольца ингибитора (рис. 18). Данные замены приводят к изменению конфигурации гидрофобного кармана активного центра, что в свою очередь приводит к сдвигу 2,2'-ангидроуридина в смоделированном комплексе *HUPhI* по сравнению со структурой комплекса *StUPh* с ANU, полученной в результате рентгеноструктурного анализа.

5.3. *In silico* дизайн высокоселективного ингибитора (потенциального лекарственного препарата)

На основании литературных данных, полученных при изучении аналогов бензилациклоуридина и характера их взаимодействий [17, 21, 62], а также рентгеноструктурных данных для комплексов уридинфосфооридаз с 2,2'-ангидроуридином проведено конструирование эффективного высокоаффинного ингибитора. Конструирование осуществлено путем подбора заместителей 5-го и 6-го положений гетероциклической части 2,2'-ангидроуридина.

Таблица 13. Выборка оптимальных заместителей 5-го положения 2,2'-ангидроуридина по CombiGlide [87]

Заместитель	Формула заместителя урацильного кольца 2,2'-ангидроуридина, <i>StUPh</i> , “открытая” конформация (ANU 5 R)	G-SCORE лучшего конформера	Формула заместителя урацильного кольца 2,2'-ангидроуридина, <i>UPh</i> человека (ANU 5 R)	G-SCORE лучшего конформера
1		-9.02		-10.84
2		-8.92		-10.49
3		-8.83		-10.42
4		-8.81		-10.42
5		-8.68		-10.34
6		-8.67		-10.11
ANU-dock		-5.03		-5.58

5.3.1. Конструирование нового ингибитора уридинфосфорилазы класса 2,2'-ангидроуридина, замещенного в 5-м положении урацильного кольца

На основании рентгеноструктурного исследования комплекса *StUPh* с 2,2'-ангидроуридином и ионом PO_4^{3-} в [74, 76] проведен подробный анализ и описание активного центра уридинфосфорилазы и характер взаимодействий лигандов с аминокислотными остатками. Эти данные позволяют предположить, что возможный заместитель 5-го положения пиримидинового кольца 2,2'-ангидроуридина состоит из короткой гидрофобной цепочки и ароматической группы.

Гидрофобная цепочка будет взаимодействовать с гидрофобным “карманом” около атома C5 пиримидинового кольца, а ароматическая группа формировать стэкинг-взаимодействия с Phe162 и Phe7 соседнего мономера. Также учитывалось, что конформация петли *L9* и концевой α -спирали *H8* при “закрытом” состоянии активного центра, возможно, будет препятствовать связыванию ингибитора с крупным заместителем 5-го положения урацильного кольца в условиях компьютерного моделирования с “неподвижным рецептором”. С помощью программы CombiGlide был

проведен молекулярный дизайн (Drug design) [81–83]. Подбирался заместитель 5-го положения урацильного кольца из электронной библиотеки, содержащей 146 готовых функциональных групп и доступной на сервере программы CombiGlide (www.schrodinger.com/productpage/14/2/66/). Использовались сетки докинга, полученные на предыдущих этапах для уридинфосфорилазы человека и уридинфосфорилазы *StUPh*, имеющей два возможных состояния активного центра (“открытый” и “закрытый” активный центр) и соответствующие им два положения функциональной петли *L9*.

Положение основного жесткого (“якорного”) фрагмента (“ядра”) сконструированного ингибитора задавали с помощью “мягких” ограничений (RMSD ограничений равнялись 1 Å) [81–83]. В качестве “ядра” ингибитора для сайтов связывания *StUPh* при “закрытом” состоянии активного центра использовали координаты 2,2'-ангидроуридина из активного центра субъединицы *B* кристаллической структуры *StUPh* (ID PDB: 3FWP) [74, 76]. Для сайтов связывания *StUPh* при “открытом” состоянии активного центра и для уридинфосфорилазы человека были использованы координаты 2,2'-ангидроуридина из комплек-

сов, смоделированных методом молекулярного докинга. Решения, полученные методом молекулярного дизайна, фильтровали, используя фильтры для лекарственноподобных соединений (“DrugLike”), доступные в программе CombiGlide.

В результате получены три выборки структур возможных ингибиторов, по одной для каждой из структур белка-мишени. Выборка возможных ингибиторов для *StUPh* при “закрытом” состоянии активного центра состояла из 14 возможных структур соединений, для *StUPh* при “открытом” состоянии активного центра – из 313 возможных соединений, для уридинфосфорилазы человека – из 311 возможных соединений.

Затем был проведен молекулярный докинг по всем трем структурам белка-мишени с такими же ограничениями для положений “ядра” ингибитора, как и при молекулярном дизайне. Результаты представлены в табл. 13.

Для “закрытой” конформации активного центра *StUPh* программа определила только короткие линейные заместители. Это связано с тем, что положение остатков Phe7 и остатков 227–230 петли *L9* аналогично положению этих остатков при связывании ангидроуридина без заместителя урацильного кольца.

Результаты молекулярного дизайна, полученные при конструировании заместителей пиримидинового кольца ингибитора, и последующий молекулярный докинг для “открытой” конформации активного центра *StUPh* и уридинфосфорилазы человека (табл. 13, рис. 19) [76] подтвердили предположения, высказанные в начале параграфа, о том, что возможный заместитель 5-го положения пиримидинового кольца 2,2'-ангидроуридина состоит из короткой гидрофобной цепочки и ароматической группы. Имеющаяся разница в сконструированных заместителях для *StUPh* и уридинфосфорилазы человека обусловлена, по всей видимости, разницей в конформации и аминокислотном составе петли (остатки 223–233/*StUPh*, 275–284/*HUPhI*) и гидрофобного кармана, а также различием в положении и типе боковой группы аминокислотного остатка Phe7 в *StUPh* и Tyr35 в *HUPhI*.

Можно отметить различия во взаимодействии сконструированных групп с аминокислотными остатками в структурах *StUPh* и *HUPhI*. Для имидазольной группы ингибитора *StUPh* характерно стэкинг-взаимодействие с Phe7/*StUPh*, которое значительно меньше выражено при рассмотрении контактов пиридиновой группы ингибитора *HUPhI* с Tyr35/*HUPhI* (рис. 19). Для атома азота пиридиновой группы сконструированного ингибитора *HUPhI* с заместителем № 1 (табл. 13) наблюдается водородная связь с атомом ND1 остатка His36/*B/HUPhI* (рис. 196).

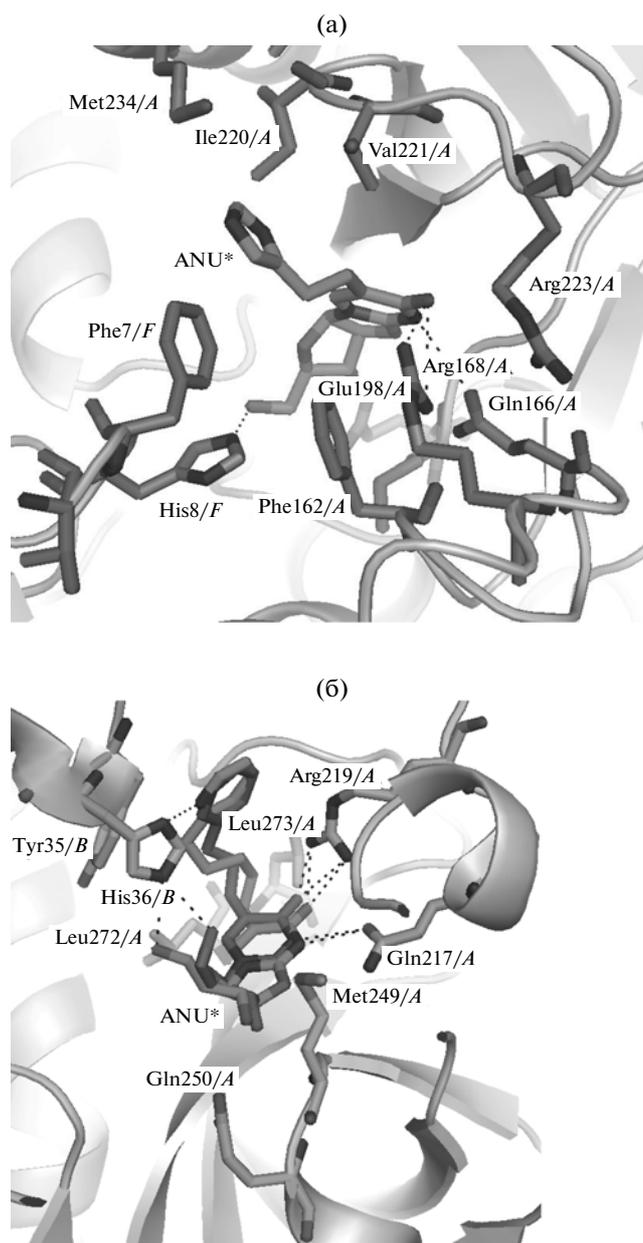


Рис. 19. Ингибитор ANU*, модифицированный по 5-му положению пиримидинового кольца, в активном центре *StUPh* (а) и ингибиторы, модифицированные по 5-му положению пиримидинового кольца, с разным числом звеньев насыщенной углеводородной цепочки в активном центре *HUPhI* (б).

5.3.2. Конструирование нового ингибитора уридинфосфорилазы класса 2,2'-ангидроуридина, замещенного в 6-м положении урацильного кольца

В дополнение к изложенному выше проведен молекулярный дизайн (Drug design) заместителя 6-го положения урацильного кольца по протоколу, использованному для молекулярного дизайна заместителя в 5-м положении. В результате была получена выборка структур заместителей 6-го по-

Таблица 14. Выборка оптимальных заместителей 6-го положения 2,2'-ангидроуридина

Заместитель	Формула заместителя урацильного кольца 2,2'-ангидроуридина, <i>StUPh</i> , "открытая" конформация (ANU 6 R)	G-SCORE лучшего конформера	Формула заместителя урацильного кольца 2,2'-ангидроуридина, <i>HUPhI</i> (ANU 6 R)	G-SCORE лучшего конформера
1		-7.42		-7.64
2		-7.21		-7.12
3		-6.31		-7.11
4		-6.14		-7.05
5		-6.04		-6.78
6		-5.88		-6.77
ANU-dock		-5.03		-5.58

ложения ANU, оптимальных для встраивания в активные центры уридинфосфорилаз *StUPh* и *HUPhI*. Первые шесть заместителей с наибольшими по модулю значениями оценочной функции GlideScore, прошедшие проверку на возможную высокую биодоступность (с использованием фильтров для лекарственноподобных соединений ("DrugLike"), программа CombiGlide), приведены в табл. 14.

Выявлены следующие закономерности в структуре заместителя. Добавленной функциональной группой является либо бензольное, либо пиридиновое кольцо для *StUPh* и *HUPhI*. Различия структур заместителей наблюдаются в длине оптимальной углеводородной цепочки. Для уридинфосфорилазы человека характерны заместители 6-го положения ароматического кольца ANU с числом атомов большим, чем для уридинфосфорилазы *StUPh*. Этот факт можно использовать при синтезе новых лекарственных препаратов – ингибиторов специфичных *StUPh* либо *HUPhI*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ингибиторы уридинфосфорилаз перспективны для применения в онкологии, а также как про-

тивомикробные и противопаразитарные препараты. Однако при создании и применении ингибиторов уридинфосфорилаз следует учитывать, что высокое содержание уридина в нейронах и нейроглии является фактором защиты нервной ткани от гипоксического повреждения при инсульте. Ингибирование UPh приводит к снижению концентрации уридина, так как нарушается его ресинтез в тканях нервной системы, что приводит к ухудшению состояния нервной ткани при инсульте.

Основой ингибирования уридинфосфорилазы 2,2'-ангидроуридином является установление связей 2,2'-ангидроуридина с аминокислотными остатками нуклеозидсвязывающего сайта активного центра *StUPh* [74] (рис. 8, 20).

По сравнению с уридином в случае связывания 2,2'-ангидроуридина N-гликозидная связь остается стабильной как за счет фиксации пиридинового кольца в *син*-положении атомом O2, так и за счет иного, чем в случае с субстратами уридинфосфорилазы, взаимного расположения урацильного кольца и остатков Glu168 и Arg166 (рис. 20). Следует учитывать и то, что молекула 2,2'-ангидроуридина и уридин имеют разную конформационную подвижность, т.е. разную воз-

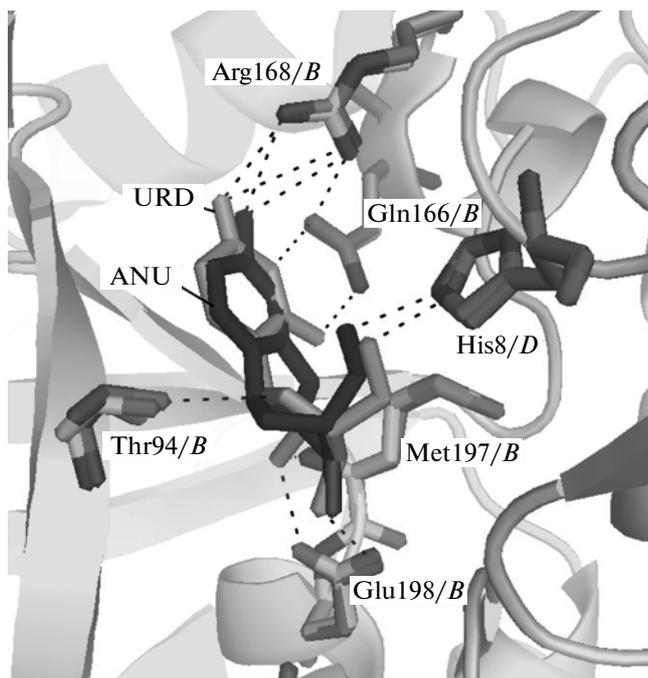


Рис. 20. Положения 2,2'-ангидроуридина (АНУ, черный) и уридина (URD, серый) в нуклеозидсвязывающем сайте активного центра *StUPh*. Показаны ключевые аминокислотные остатки. Пунктирные линии – водородные связи.

возможность для вращения отдельных химических групп. Это приводит к уменьшению энтропийной составляющей (S) свободной энергии (G) комплекса фермент–ингибитор. При практически неизменной энтальпии (H) комплексов, определяемой связями фермент–ингибитор, эффект уменьшения энтропийной составляющей положительно сказывается на “времени жизни” (“время жизни” увеличивается) комплекса фермент–ингибитор и вероятности его самопроизвольного распада.

Исходя из высокой гомологии пространственной организации активных центров *StUPh* и *HUPhI* и приведенных выше результатов молекулярного докинга, можно предположить и схожесть механизмов ингибирования 2,2'-ангидроуридинном уридинфосфорилаз бактерий и человека.

Были смоделированы структуры предполагаемых лекарственных препаратов – высокоселективных ингибиторов уридинфосфорилаз. Они являются 5-замещенными или 6-замещенными 2,2'-ангидроуридинами, где в качестве заместителя выступает короткая алифатическая насыщенная цепочка с ароматической группой на конце. Для 5-замещенных 2,2'-ангидроуридинов имеются различия в предпочтительном типе ароматической группы ингибитора (*HUPhI* – фенильная группа и *StUPh* – имидазольная группа), что объясняется различным аминокислотным окружением активного центра фосфорилаз из разных ис-

точников при высокой гомологии сайтов связывания. Для 6-замещенных 2,2'-ангидроуридинов имеются лишь различия в длине углеводородной цепочки оптимального заместителя.

Работа выполнена за счет средств базового бюджетного финансирования ИКРАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Igo M., Nishikata K., Nakajima Y. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1990. V. 39. № 7. P. 1247.
2. Kanzaki A., Takebayashi Y., Bando H. et al. // *Int. J. Cancer.* 2002. V. 97. № 5. P. 631.
3. Mikhailov A.M., Smirnova E.A., Tsuprun V.L. et al. // *Biochem. Int.* 1992. V. 26. № 4. P. 607.
4. Pizzorno G., Cao D., Leffert J.J. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1587. № 2-3. P. 133.
5. Pizzorno G., Yee L., Burtness B.A. et al. // *Clin. Cancer Res.* 1998. V. 4. № 5. P. 1165.
6. Borowsky M.E., Elliott K.S., Pezzullo J.C. et al. // *Bull. Cancer.* 2005. V. 92. № 2. P. E19.
7. Goette D.K. // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1981. V. 4. № 6. P. 633.
8. Kemeny N. // *Semin. Surg. Oncol.* 1987. V. 3. № 3. P. 190.
9. Litwin M.S., Ryan R.F., Ichinose H. et al. // *Proc. Natl. Cancer. Conf.* 1972. V. 7. № P. 549.
10. Zaniboni A. // *J. Chemother.* 1989. V. 1. № 5. P. 330.
11. Niedzwicki J.G., el Kouni M.H., Chu S.H. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1983. V. 32. № 3. P. 399.
12. El Kouni M.H., Naguib F.N., Niedzwicki J.G. et al. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 13. P. 6081.
13. Jimenez B.M., Kranz P., Lee C.S. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1989. V. 38. № 21. P. 3785.
14. Lee C.S., Jimenez B.M., O'Sullivan W.J. // *Mol. Biochem. Parasitol.* 1988. V. 30 № 3. P. 271.
15. El Kouni M.H., Naguib F.N., Chu S.H. et al. // *Mol. Pharmacol.* 1988. V. 34. № 2. P. 104.
16. Naguib F.N., Niedzwicki J.G., Iltzsch M.H. et al. // *Leuk. Res.* 1987. V. 11. № 10. P. 855.
17. Bu W., Settembre E.C., el Kouni M.H. et al. // *Acta Cryst. D: Biol. Cryst.* 2005. V. 61. № 7. P. 863.
18. Cha S.M. // *Yonsei. Med. J.* 1989. V. 30. № 4. P. 315.
19. Choi J.W., Shin C.Y., Choi M.S. et al. // *J. Neurotrauma.* 2008. V. 25. № 6. P. 695.
20. Niedzwicki J.G., Chu S.H., el Kouni M.H. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1982. V. 31. № 10. P. 1857.
21. Park K.S., el Kouni M.H., Krenitsky T.A. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1986. V. 35. № 21. P. 3853.
22. Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M. // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 75. № 1. P. 217.
23. Vita A., Amici A., Cacciamani T. et al. // *Int. J. Biochem.* 1986. V. 18. № 5. P. 431.
24. Paegle L.M., Schlenk F. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1952. V. 40. № 1. P. 42.
25. Leyva A., Kraal I., Lankelma J. et al. // *Anticancer Res.* 1983. V. 3. № 4. P. 227.
26. Liu M., Cao D., Russell R. et al. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. № 23. P. 5418.

27. Takehara M., Ling F., Izawa S. et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995. V. 59. № 10. P. 1987.
28. Walton L., Richards C.A., Elwell L.P. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. № 16. P. 6741.
29. Watanabe S., Hino A., Wada K. et al. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 20. P. 12191.
30. Connolly G.P., Duley J.A. // *Trends Pharmacol Sci.* 1999. V. 20. № 5. P. 218.
31. Lucas Z.J. // *Science.* 1967. V. 156. № 779. P. 1237.
32. Peters G.J., Veerkamp J.H. // *Int. J. Biochem.* 1983. V. 15. № 2. P. 115.
33. Gasser T., Moyer J.D., Handschumacher R.E. // *Science.* 1981. V. 213. № 4509. P. 777.
34. Moyer J.D., Oliver J.T., Handschumacher R.E. // *Cancer Res.* 1981. V. 41. № 8. P. 3010.
35. Liu M.P., Beigelman L., Levy E. et al. // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 274. № 6 Pt 1. P. G1018.
36. Moyer J.D., Henderson J.F. // *Biochem. Pharmacol.* 1985. V. 34. № 1. P. 101.
37. Darnowski J.W., Handschumacher R.E. // *Cancer Res.* 1986. V. 46. № 7. P. 3490.
38. Cadman E.C., Dix D.E., Handschumacher R.E. // *Cancer Res.* 1978. V. 38. № 3. P. 682.
39. Karle J.M., Anderson L.W., Cysyk R.L. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 1. P. 67.
40. Lee C.W., Sokolowski J.A., Sartorelli A.C. et al. // *In Vivo.* 1994. V. 8. № 5. P. 795.
41. Wiley J.S. // *Nat. Med.* 1997. V. 3. № 1. P. 25.
42. Katsumata K., Tomioka H., Sumi T. et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2003. V. 51. № 2. P. 155.
43. Reigner B., Blesch K., Weidekamm E. // *Clin Pharmacokinet.* 2001. V. 40. № 2. P. 85.
44. Venturini M. // *Eur. J. Cancer.* 2002. V. 38. Suppl. 2. P. 3.
45. Wagstaff A.J., Ibbotson T., Goa K.L. // *Drugs.* 2003. V. 63. № 2. P. 217.
46. Ishikawa T., Utoh M., Sawada N. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1998. V. 55. № 7. P. 1091.
47. Schuller J., Cassidy J., Dumont E. et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2000. V. 45. № 4. P. 291.
48. Mader R.M., Schrolnberger C., Rizovski B. et al. // *Br. J. Cancer.* 2003. V. 88. № 5. P. 782.
49. Endo M., Shinbori N., Fukase Y. et al. // *Int. J. Cancer.* 1999. V. 83 № 1. P. 127.
50. Griffiths L., Stratford I.J. // *Br. J. Cancer.* 1997. V. 76. № 6. P. 689.
51. Ishikawa F., Miyazono K., Hellman U. et al. // *Nature.* 1989. V. 338. № 6216. P. 557.
52. Morita T., Matsuzaki A., Tokue A. // *Int. J. Cancer.* 2001. V. 92. № 3. P. 451.
53. Sivridis E. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000. V. 476. № P. 297.
54. Finan P.J., Koklitis P.A., Chisholm E.M. et al. // *Br. J. Cancer.* 1984. V. 50. № 5. P. 711.
55. Luccioni C., Beaumatin J., Bardot V. et al. // *Int. J. Cancer.* 1994. V. 58. № 4. P. 517.
56. Ishitsuka H., Miwa M., Takemoto K. et al. // *Gann.* 1980. V. 71. № 1. P. 112.
57. Denton J.E., Lui M.S., Aoki T. et al. // *Cancer Res.* 1982. V. 42. № 3. P. 1176.
58. Drabikowska A.K., Lissowska L., Veres Z. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1987. V. 36. № 23. P. 4125.
59. Veres Z., Neszmelyi A., Szabolcs A. et al. // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 178. № 1. P. 173.
60. Cortes P., Dumler F., Levin N.W. // *Am. J. Physiol.* 1988. V. 255. № 4 Pt. 2. P. F635.
61. Martin D.S., Stolfi R.L., Sawyer R.C. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1989. V. 24. № 1. P. 9.
62. Naguib F.N., el Kouni M.H., Chu S.H. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1987. V. 36. № 13. P. 2195.
63. De Clercq E. // *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 1980. V. 2. № 5. P. 253.
64. De Clercq E., Descamps J., De Somer P. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1979. V. 76. № 6. P. 2947.
65. Heidelberger C., Griesbach L., Cruz O. et al. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1958. V. 97. № 2. P. 470.
66. el Kouni M.H., el Kouni M.M., Naguib F.N. // *Cancer Res.* 1993. V. 53. № 16. P. 3687.
67. Veres Z., Szinai I., Szabolcs A. et al. // *Drugs Exp. Clin. Res.* 1987. V. 13. № 10. P. 615.
68. Morgunova E., Mikhailov A.M., Popov A.N. et al. // *FEBS Lett.* 1995. V. 367. № 2. P. 183.
69. Roosild T.P., Castronovo S., Fabbiani M. et al. // *BMC Struct. Biol.* 2009. V. 9. № P. 14.
70. Burling F.T., Kniewel R., Buglino J.A. et al. // *Acta Cryst. D: Biol. Cryst.* 2003. V. 59. № 1. P. 73.
71. Caradoc-Davies T.T., Cutfield S.M., Lamont I.L. et al. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 337. № 2. P. 337.
72. Dontsova M.V., Gabdoulkhakov A.G., Molchan O.K. et al. // *Acta Cryst. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2005. V. 61. № 4. P. 337.
73. Dontsova M.V., Savochkina Y.A., Gabdoulkhakov A.G. et al. // *Acta Cryst. D.* 2004. V. 60. № 4. P. 709.
74. Лашков А.А., Жухлистова Н.Е., Сотниченко С.Е. и др. // *Кристаллография.* 2010. Т. 55. № 1. С. 1183.
75. Павлюк Б.Ф. “Структурная основа механизма ферментативной активности нуклеозидфосфорилазы из *Salmonella typhimurium*”. Дис. ... канд-та хим. наук. М.: ИК РАН, 2007.
76. Lashkov A.A., Zhukhlistova N.E., Gabdoulkhakov A.H. et al. // *Acta Cryst. D: Biol. Cryst.* 2004. V. 60. № 1. P. 51.
77. Pyrkov T.V., Chugunov A.O., Krylov N.A. et al. // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. № 9. P. 1201.
78. Roosild T.P., Castronovo S. // *PLoS One.* V. 5. № 9. P. e12741.
79. David Van Der S., Erik L., Berk H. et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1701.
80. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. № 1. P. 33.
81. Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B. et al. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. № 7. P. 1739.
82. Maestro. Schrödinger, LLC, New York: NY, 2009.
83. Halgren T.A., R.B. Murphy, R.A. Friesner et al. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. № 7. P. 1750.
84. Cao D., Russell R.L., Zhang D. et al. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 8. P. 2313.
85. Schwartz P.M., Moir R.D., Hyde C.M. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1985. V. 34. № 19. P. 3585.
86. Maehara Y., Moriguchi S., Emi Y. et al. // *Cancer.* 1990. V. 66. № 1. P. 156.
87. CombiGlide. Schrödinger, LLC, New York: NY, 2007.