



## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗЫ *Escherichia coli* В КОМПЛЕКСЕ С ИНГИБИТОРОМ 3'-АЗИДОТИМИДИНОМ И ФОСФАТОМ

© 2021 г. В. И. Тимофеев\*, \*\*, #, Н. Е. Жухлистова\*, И. П. Куранова\*, \*\*

\*Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Россия, 119333 Москва, Ленинский просп., 59

\*\*НИЦ “Курчатовский институт”, Россия, 123098 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 26.01.2021 г.

Методом молекулярной динамики на траектории 50 нс исследовали состояние димерной молекулы тимидинфосфорилазы из *Escherichia coli* в комплексе с неконкурентным ингибитором фермента 3'-азидотимидином и ионом фосфата. В качестве стартовой модели использовали полученные ранее атомные координаты комплекса тимидинфосфорилазы с азидотимидином и сульфатом при разрешении 1.52 Å. Показано, что в данном временном интервале обе субъединицы димерной молекулы фермента функционируют асинхронно, при этом каждая субъединица сохраняет открытую конформацию. Обнаружено, что природа лиганда в нуклеозидном центре влияет на прочность связывания фосфата в фосфатном центре. В комплексе с ингибитором оба лиганда на всем временном интервале остаются связанными с ферментом, в то время как при симуляции поведения тимидинфосфорилазы в присутствии фосфата и субстрата тимидина наблюдается выход фосфата из активного центра. Стабилизирующее влияние азидотимидина на связывание фосфата согласуется с поведением азидотимидина как неконкурентного ингибитора тимидинфосфорилазы.

*Ключевые слова:* тимидинфосфорилаза, пространственная структура, 3'-азидотимидин, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S0132342321060245

### ВВЕДЕНИЕ

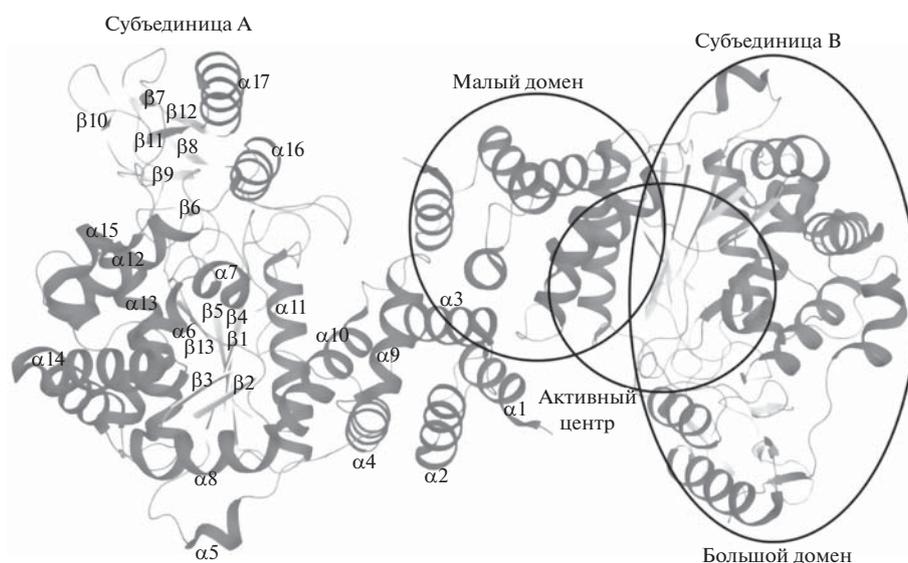
Тимидинфосфорилаза (ТФ), относящаяся к семейству II нуклеозидфосфорилаз [1], катализирует обратимый фосфоролитический распад пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и играет центральную роль в их метаболизме, участвуя в запасных путях синтеза природных нуклеозидов [2, 3]. Интерес к изучению структуры и свойств нуклеозидфосфорилаз связан с их вовлеченностью в метаболизм противоопухолевых и противовирусных препаратов – аналогов нуклеозидов. Среди ингибиторов тимидинфосфорилаз особое место занимают аналоги природных нуклеозидов, содержащих заместители в углеводной компоненте, некоторые из них используются непосредственно как противоопухолевые и противовирусные средства [4–6]. Например, аналог нуклеозида, 3'-азидотимидин, содержащий азидогруппу в рибозном кольце,

применяется как лекарственный препарат при лечении синдрома иммунодефицита человека [7].

Катализируемая ферментом реакция протекает посредством нуклеофильной атаки фосфат-ионом, находящимся в фосфат-связывающем центре фермента, углеродного атома С1' рибозного кольца нуклеозида, расположенного в нуклеозидном центре. Методом рентгеноструктурного анализа установлены пространственные структуры ряда нуклеозидфосфорилаз [8–11]. Пространственная структура тимидинфосфорилазы *Escherichia coli* установлена для апофермента, а также комплексов с субстратами и ингибиторами [12–14]. Молекула тимидинфосфорилазы представляет собой димер из одинаковых субъединиц, каждая из которых имеет двухдоменное строение и состоит из малого  $\alpha$ -спирального домена и большого  $\alpha/\beta$ -домена (рис. 1). Активный центр находится в полости между двумя доменами и включает нуклеозид- и фосфат-связывающие сайты. При этом нуклеозидный сайт состоит преимущественно из аминокислотных остатков малого домена, в то время как фосфатный сайт

Сокращения: АЗТ – 3'-азидотимидин; МД – молекулярная динамика; ТФ – тимидинфосфорилаза.

# Автор для связи: (эл. почта: tostars@mail.ru).



**Рис. 1.** Пространственная структура димерной молекулы тимидинфосфорилазы. Для одной из субъединиц приведены обозначения элементов вторичной структуры.

расположен около *C*-концевого участка главного  $\beta$ -слоя  $\alpha/\beta$ -домена и включает аминокислотные остатки большого домена. Расстояние между связанными субстратами – ионом фосфата и нуклеозидом – в установленных структурах достаточно велико. Необходимое для протекания реакции сближение субстратов происходит посредством движения доменов и сопровождается переходом фермента из открытой конформации в закрытую. Механизмы этого перехода исследованы недостаточно.

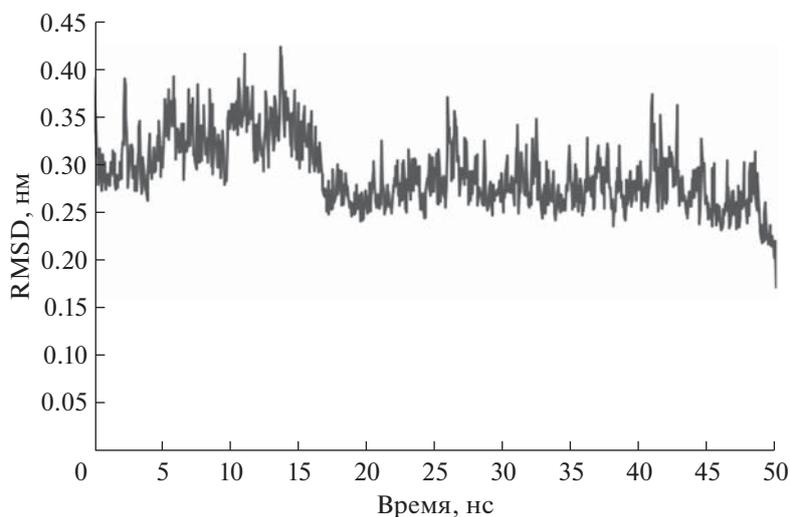
Нами ранее были изучены кинетические параметры фосфорилаза тимидина тимидинфосфорилазой *E. coli* в присутствии 3'-азидотимидина (АЗТ) и показано, что АЗТ, используемый в качестве лекарственного препарата при терапии синдрома иммунодефицита человека, – неконкурентный ингибитор фермента [15]. Пространственная структура кристаллического комплекса тимидинфосфорилазы с АЗТ и сульфатом была установлена при разрешении 1.52 Å [15]. Связывание АЗТ в нуклеозидном центре сопровождалось конформационными изменениями, в результате которых 3'-азидогруппа оказалась погруженной в гидрофобный карман, образованный аминокислотными остатками обоих доменов субъединицы. Такой тип ингибирования был обнаружен в нуклеозидфосфорилазах впервые. Положение АЗТ частично перекрывалось с положением субстрата (тимидина), но при этом ингибитор оказывался повернутым относительно тимидина на 180° вокруг оси, проходящей через 3-й и 6-й атомы азота и углерода пиримидинового кольца. Изменившееся положение атакуемого уг-

леродного атома рибозы относительно ключевых для катализа аминокислотных остатков активного центра объясняет ингибиторное действие АЗТ.

В кристаллической структуре комплекса тимидинфосфорилазы с АЗТ и сульфатом обе субъединицы находятся в открытой конформации, однако открытая конформация может быть обусловлена присутствием межмолекулярных контактов в кристаллической решетке. Цель данной работы заключалась в изучении изменений конформации субъединиц димерной молекулы тимидинфосфорилазы в комплексе с фосфатом и 3'-азидотимидином в условиях отсутствия межмолекулярных контактов. Для этого было исследовано поведение молекулы ТФ и связанных в комплексе лигандов методом молекулярной динамики на временной траектории 50 нс.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе пространственной структуры кристаллического комплекса тимидинфосфорилазы *E. coli* с ингибитором АЗТ и фосфатом было показано, что образование комплекса сопровождается конформационными изменениями и формированием вокруг азидогруппы ингибитора гидрофобного кармана, в образовании которого участвуют аминокислотные остатки обоих доменов субъединиц. При этом сохраняется открытая конформация обеих субъединиц (рис. 1). Однако в кристаллической решетке открытая конформация субъединиц в комплексе ТФ/АЗТ/фосфат может стабилизироваться и межмолекулярными контактами. Анализ кристаллической упаковки



**Рис. 2.** График зависимости среднеквадратичного отклонения (RMSD)  $C\alpha$ -атомов димера тимидинфосфорилазы от времени в комплексе с 3'-азидотимидином и фосфатом.

комплекса указывает на то, что между субъединицами, связанными операцией симметрии  $-y + 1/2, x - 1/2, z - 1/4$ , образуются водородные связи, в которых участвуют аминокислотные остатки петель большого домена. Несколько аминокислотных остатков одной из них, подвижной петли 367–381, закрывают полость активного сайта в закрытой конформации. В образовании межмолекулярных связей (операция симметрии  $-x, -y, -z + 1/2$ ) участвуют также аминокислотные остатки Glu20, Asp65 малого домена и His76, Asp78 связывающей домены петли.

Исследование методом молекулярной динамики (МД) на временной траектории 50 нс дает возможность проследить, как меняется конформация субъединиц димерной молекулы фермента (рис. 1) в комплексе с фосфатом и АЗТ в отсутствие межмолекулярных контактов, возникающих в кристаллическом комплексе, и объяснить особенности ингибирования фермента 3'-азидотимидином.

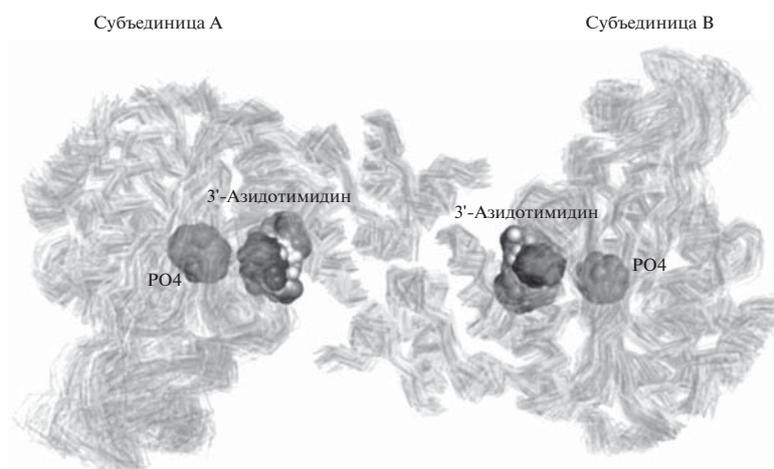
МД-исследование димера фермента показало, что величины RMSD в начале эксперимента имеют тенденцию к увеличению, но, начиная с момента времени  $\sim 16$  нс (рис. 2), происходит некоторая стабилизация конформационных состояний димера (величины RMSD колеблются в диапазоне  $\sim 1.3$  Å). К концу процесса симуляции значения RMSD начинают уменьшаться (рис. 2).

Изменения конформации субъединиц в молекуле комплекса ТФ при МД-исследовании можно определить по результатам суперпозиций координат  $C\alpha$ -атомов исходной молекулы и координат на выбранной точке временной траектории МД 0–50 нс. Суперпозиция моделей димера ТФ в

комплексе с АЗТ и фосфатом, полученных методом молекулярной динамики на временной траектории МД 50 нс с интервалом 0.5 нс (100 фреймов), показана на рис. 3. Полученные данные МД свидетельствуют, что в целом как пространственная структура субъединиц димера, так и положения лигандов (рис. 3) существенно не изменяются.

Сравнение пространственных структур субъединицы А молекулы ТФ в различные моменты МД-эксперимента (11 точек на временной траектории с интервалом 5 нс) со структурой, полученной в результате рентгеноструктурного эксперимента (PDB\_ID: 4LHM), не выявило принципиальных различий; значения RMSD не превысили 1.3 Å. Можно предположить, что на всем протяжении 50-нс симуляции субъединица димера, так же как в кристаллической структуре, сохраняет открытую конформацию (рис. 3). При совмещении молекул по  $C\alpha$ -атомам двух субъединиц в исходной и конечной точках времени симуляции RMSD составляет  $\sim 3.0$  Å, что может свидетельствовать (учитывая небольшое значение RMSD при сравнении субъединиц А) о том, что нет синхронизации изменения конформаций субъединиц димера.

Значения среднеквадратичных смещений  $C\alpha$ -атомов (RMSF) субъединиц димера (рис. 4), свидетельствующих о нестабильности пространственной структуры субъединиц, изменяются в пределах  $\sim 2$  Å, причем в различных субъединицах димера величины и характер флуктуаций разные. При анализе среднеквадратичных флуктуаций  $C\alpha$ -атомов аминокислотных остатков в процессе МД оказалось, что наибольшие флуктуации наблюдаются в петлях или смежных с ними  $\alpha$ -спира-



**Рис. 3.** Суперпозиция моделей димера тимидинфосфорилазы в комплексе с 3'-азидотимидином и фосфатом, полученных методом молекулярной динамики на временной траектории МД 50 нс с интервалом 0.5 нс (100 фреймов).



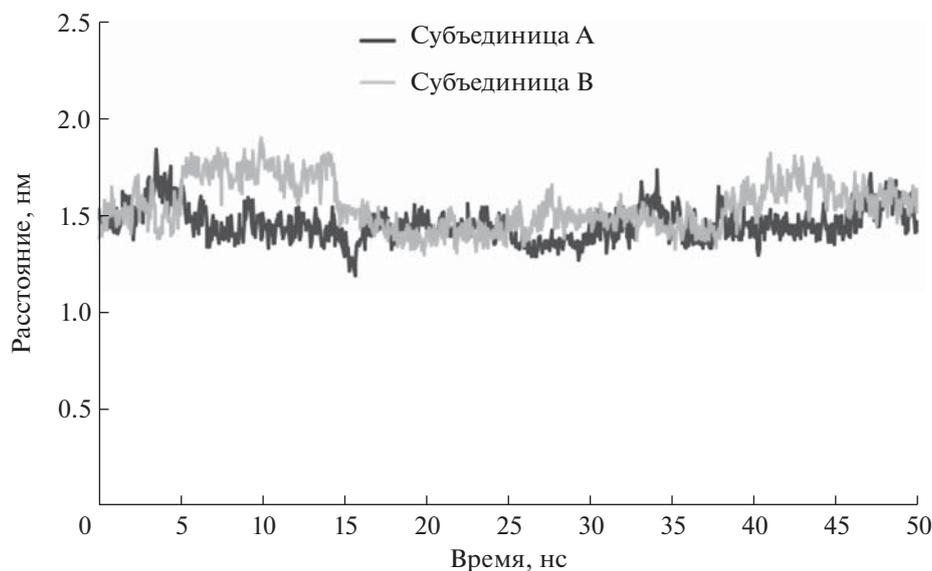
**Рис. 4.** Величины среднеквадратичных смещений  $\alpha$ -атомов (RMSF) субъединиц димера тимидинфосфорилазы.

лях и  $\beta$ -лентах. Петли 66–71, 155–160 и 194–197, соединяющие большой и малый домены, испытывают значительные флуктуации. Петли большого домена (264–270, 305–334, 365–390, 393–399), аминокислотные остатки которых участвуют в межмолекулярных водородных связях, наблюдаемых в кристаллической структуре (PDB\_ID: 4LHM), также значительно изменяют свои положения по сравнению с исходными, а аминокислотные остатки этих петель – свою конформацию.

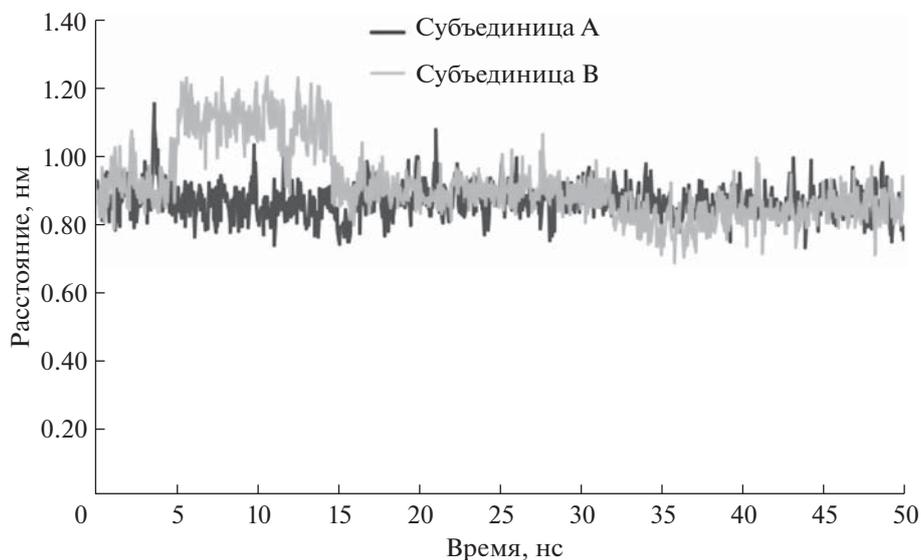
Критерием смещения доменов друг относительно друга можно считать изменение величины расстояния между аминокислотными остатками, находящимися в разных доменах. Эти величины отслеживали на симулируемой траектории, характеризующей изменение расстояний между  $\alpha$ -атомами аминокислотных остатков Ile173–Ala373, Asp178–Phe210, Leu117–Arg171, и использовали для оценки конформационного состояния субъединиц в комплексе ТФ/АЗТ/фосфат на симулируемых траекториях. Согласно данным Pug-

mire et al. [8], более короткие расстояния между парами аминокислотных остатков Phe210–Asp178 и Ala373–Ile173 (5.14 и 6.64 Å, PDB\_ID: 1BRW) подтверждают закрытую конформацию; расстояния 9.42 и 14.04 Å, наблюдаемые в кристаллической структуре [15] (PDB\_ID: 4LHM), соответственно, для Phe210–Asp178 и Ala373–Ile173, – открытую конформацию. Характер сближения остатков Leu117 и Arg171, принадлежащих различным доменам субъединицы ТФ, можно проследить по изменению расстояния  $\text{C}\alpha_{\text{Leu117}} \dots \text{C}\alpha_{\text{Arg171}}$  (рис. 5) на МД-траектории для структуры комплекса ТФ с АЗТ и ионом фосфата.

Расстояния между  $\alpha$ -атомами остатков Leu117, Arg171 в субъединицах А и В комплекса ТФ с АЗТ и ионом фосфата, судя по графику (рис. 5), в начале симуляции заметно различаются, но различия уменьшаются на протяжении времени симуляции ~16–33 нс (величина расстояний колеблется в основном в пределах 13–16 Å), а затем вновь увеличиваются. Можно отметить периодические сближения пары  $\alpha$ -атомов остатков



**Рис. 5.** Изменение расстояния между Cα-атомами остатков Leu117 и Arg171 в течение 50-нс симуляции для комплекса тимидинфосфорилазы с ионом фосфата и 3'-азидотимидином.



**Рис. 6.** Изменение расстояния между Cα-атомами остатков Asp178 и Phe210 в течение 50-нс симуляции для комплекса тимидинфосфорилазы с ионом фосфата и 3'-азидотимидином.

Leu117 и Arg171 до 13 Å (и даже до ~12 Å в субъединице А в момент времени ~15 нс) в обеих субъединицах; расстояние между соответствующими атомами, наблюдаемое в кристаллическом комплексе ТФ с АЗТ и ионом фосфата, т.е. в открытой конформации, равно 14.2 Å. Синхронизации в изменении этих расстояний в субъединицах фермента, судя по приведенному графику (рис. 5), не наблюдается.

На рис. 6 представлены графики, позволяющие оценить характер изменения расстояний

между Cα-атомами остатков Asp178 (малый домен) и Phe210 (большой домен). Периодические сближения пары Cα-атомов остатков в обеих субъединицах происходят асинхронно, и процессы сближения доменов в субъединицах явно не согласованы, хотя к концу процесса симуляции характер периодического сближения остатков становится практически одинаковым. Максимально близкое расстояние между Cα-атомами составляет >7 Å. В кристаллической структуре пиримидиннуклеозидфосфорилазы из *Bacillus*

**Таблица 1.** Изменение расстояния между C $\alpha$ -атомами некоторых остатков субъединицы А тимидинфосфорилазы в течение 50-нс симуляции для комплекса тимидинфосфорилазы с ионом фосфата и 3'-азидотимидином

Время, нс	Расстояние, Å		
	Pe173...Ala373	Asp178...Phe210	Leu117...Arg171
0	14.1	8.6	13.9
5	12.8	8.1	16.4
10	11.2	8.5	13.8
15	11.0	7.9	13.3
20	11.6	10.0	15.0
25	13.8	9.0	14.5
30	12.1	9.1	14.7
35	11.6	8.0	14.3
40	11.1	8.7	14.1
45	13.3	8.7	15.1
50	12.0	7.6	14.2
PDB_ID: 4LHM	14.04	9.42	14.2

*stearothermophilus* [8] (PDB\_ID: 1BRW), где наблюдается закрытая конформация фермента, расстояние между гомологичными остатками Phe207 и Asp175 равно 5.14 Å.

Измерение расстояний между C $\alpha$ -атомами аминокислот Pe173 и Ala373, расположенных в разных доменах субъединицы А, в разные моменты времени симуляции с интервалом 5 нс, по которым можно судить о степени сближения доменов во время МД-эксперимента, показало, что эти расстояния меняются в пределах 11.0–14.1 Å. Эти данные также подтверждают, что конформация субъединицы А открытая (табл. 1).

В структуре комплекса ТФ/АЗТ/фосфат [15] (PDB\_ID: 4LHM) ион фосфата, локализованный в  $\alpha/\beta$ -домене субъединицы фермента, непосредственно связан водородными связями с аминокислотными остатками Ser86, Ser95, Ser113, Thr123 и Lys84, а с His85, Lys191 и Asp92 – через молекулы воды. Во время МД-эксперимента фосфат-ион остается в фосфат-связывающем сайте, периодически меняя свою ориентацию. При этом изменяется число водородных связей из-за изменения конформации некоторых аминокислотных остатков из координационной сферы иона фосфата (табл. 2). На рис. 7 представлены ионы сульфата в моменты времени 0 и 15 нс (время наибольшего сближения доменов) и координирующие их аминокислотные остатки.

Как показано Pugmire et al. [13], связывание иона фосфата в активном центре пиримидиннуклеозидфосфорилаз приводит к формированию водородной связи между остатками His119 и Gly208 большого домена. При этом образование водородной связи между остатками His119

и Gly208 ассоциируется с подвижками в большом домене. На графике зависимости между временем эксперимента и расстоянием NE2\_His119...O\_Gly208 в комплексе ТФ с АЗТ и фосфатом (рис. 8) для обеих субъединиц на всем протяжении МД-эксперимента наблюдается тенденция периодического сближения остатков His119 и Gly208 до расстояний, соответствующих водородной связи NE2\_His119...O\_Gly208. В субъединице А от начала симуляции до ~14 нс изменение расстояний NE2\_His119...O\_Gly208 происходит от длины водородной связи 2.8 до 5 Å. В субъединице В вплоть до ~25 нс эти аминокислотные остатки часто образуют водородные связи, а затем расстояния NE2\_His119...O\_Gly208 периодически начинают существенно изменяться, часто увеличиваясь от значения, соответствующего Н-связи, до 4.5 Å и более (рис. 8). В субъединице А в моменты времени 5 и 10 нс, где, судя по расстояниям Pe173...Ala373 и Asp178...Phe210 (табл. 1), происходит некоторое сближение доменов, число водородных связей, образуемых ионом фосфата, уменьшается (табл. 2), а расстояния NE2\_His119...O\_Gly208 несколько увеличиваются (табл. 2). На следующем временном интервале, несмотря на разное число полярных контактов, образуемых ионом фосфата, водородные связи NE2\_His119...O\_Gly208 сохраняются.

В комплексе с ингибитором (ТФ/АЗТ/фосфат) водородная связь между остатками His119 и Gly208, подтверждающая присутствие иона в фосфат-связывающем центре, сохраняется более продолжительное время на всем временном интервале, что отличает его от комплекса с субстратом [16]. Сравнение симулируемых траекторий в

**Таблица 2.** Водородные связи, образуемые ионом фосфата субъединицы А тимидинфосфорилазы, на временном интервале 50 нс в фиксированные промежутки времени с интервалом 5 нс и длины связей NE2\_His119...O\_Gly208, наблюдаемые в эти промежутки времени

Время, нс	Расстояние, Å					
	NZ_Lys84	N_Ser86	OG_Ser95	OG_Ser113	OG1_Thr123	NE2_His119...O_Gly208
0	2.8 (O4)	2.9 (O4)	2.6 (O1)	2.7 (O3)	2.6 (O1)	2.8
5	2.8 (O4)	—	3.0 (O3)	—	—	3.6
10	2.7 (O2)	—	2.7 (O4)	—	2.9 (O4)	3.5
	3.1 (O1)		3.2 (O2)			
15	2.7 (O2)	2.7 (O2)	2.5 (O4)	—	2.6 (O4)	3.0
20	3.2 (O3)	—	2.7 (O3)	—	2.8 (O2)	2.8
	2.8 (O4)		3.1 (O1)		2.8 (O3)	
25	2.7 (O4)	—	—	—	2.7 (O1)	2.8
30	2.8 (O3)	—	2.7 (O4)	—	2.5 (O2)	2.8
35	2.8 (O1)	—	2.7 (O4)	—	2.7 (O4)	2.8
40	—	—	2.5 (O4)	—	2.7 (O4)	2.9
			3.2 (O1)		3.1 (O3)	
45	2.8 (O1)	—	2.6 (O3)	—	2.6 (O2)	2.7
50	2.9 (O2)	—	2.7 (O4)	—	2.8 (O4)	3.0
	2.9 (O1)				3.3 (O3)	

Примечание: в скобках указан атом кислорода иона фосфата, который образует водородную связь с соответствующим остатком. Прочерк означает отсутствие водородной связи между атомами.

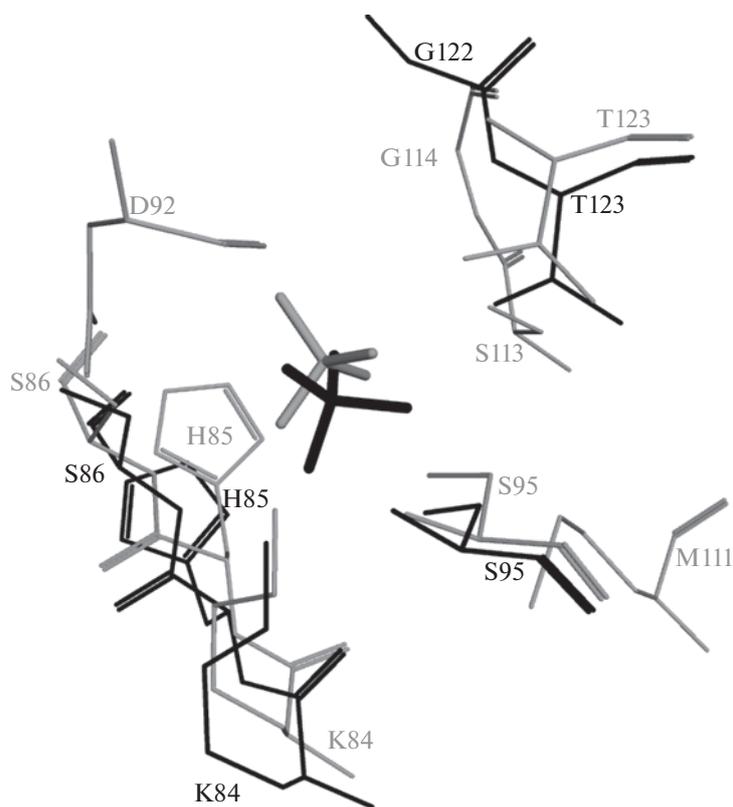
комплексе ТФ с ингибитором и в комплексе ТФ с субстратом [16] показывает, что комплекс с ингибитором и фосфатом стабилен на всем временном интервале, в то время как в комплексе с субстратом и фосфатом наблюдался выход фосфата из связывающего центра.

Молекула АЗТ, расположенная в нуклеозид-связывающем сайте, в кристаллическом комплексе ТФ/АЗТ/фосфат взаимодействует с аминокислотными остатками из обоих доменов. Нуклеозид-связывающий карман ограничен аминокислотными остатками спиралей 161–172 (Tyr168 и Arg171) и 179–193 (Phe183, Ser186 и Lys190), которые расположены на поверхности  $\alpha$ -домена, обращенной к междоменной щели, и остатками спирали 213–231 (Leu220) и  $\beta$ -ленты 82–86 (His85) домена  $\alpha/\beta$ . Атом N3 пиримидинового кольца молекулы АЗТ образует водородную связь с O<sup>y</sup>\_Ser186  $\alpha$ -домена. Атомы O2 и O4 пиримидинового кольца образуют водородные связи с гуанидиновой группой Arg171 и NZ\_Lys190 соответственно.

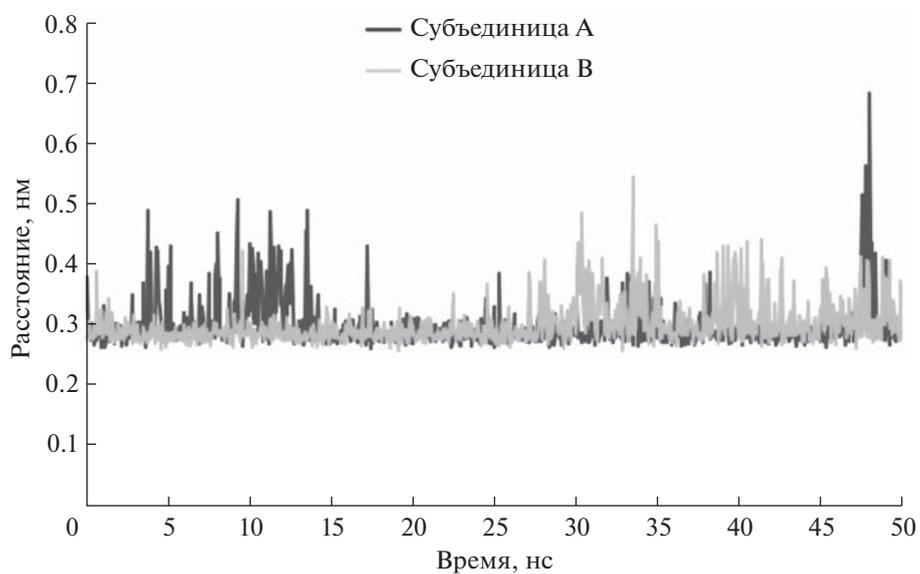
МД-эксперимент показал, что пиримидиновый фрагмент молекулы АЗТ сохраняет контакты с координирующими ее аминокислотными остатками на всем протяжении эксперимента (табл. 3). Однако конформация молекулы АЗТ на протяжении МД-эксперимента изменяется; ориентация O5' гидроксильной группы относительно рибоз-

ного цикла, характеризуемая торсионным углом C3'-C4'-C5'-O5', остается разной во время 50-нс симуляции. В момент времени 15 нс наблюдается некоторое сближение пар остатков из разных доменов (Phe173–Ala373, Asp178–Phe210, Leu117–Arg171) до расстояний 11.0, 7.9 и 13.3 Å соответственно. При этом происходит сближение атомов O\_Leu117 и O5'\_AZT до 4.9 Å. Следует отметить, что боковой радикал остатка Leu117 из гибкой петли большого домена субъединицы ТФ может изменять свою позицию и ориентацию во время процесса симуляции, сдвигаясь периодически в направлении нуклеозида, в отличие от Arg171, который координирует пиримидиновый фрагмент АЗТ и практически не меняет свою конформацию.

При анализе пространственной структуры кристаллического комплекса *E. coli* ТФ/АЗТ/фосфат [15] было показано, что образование комплекса сопровождается конформационными изменениями и формированием вокруг азидогруппы ингибитора гидрофобного кармана, в образовании которого участвуют аминокислотные остатки обоих доменов субъединиц: Leu220 (спираль 213–231), Phe210 и Met211 (петля 204–214) домена  $\alpha/\beta$  и Val177, Phe183 и Phe187 (спираль 179–193  $\alpha$ -домена), Leu117 (петля 112–122 большого домена). Большинство этих остатков инвариантны в пиримидиновых нуклеозидфосфорилазах семейства П. Было показано [15], что гидрофобный карман об-



**Рис. 7.** Ион фосфата из субъединицы А тимидинфосфорилазы в моменты времени 0 нс (серый цвет) и 15 нс (черный цвет) в окружении координирующих его аминокислотных остатков.



**Рис. 8.** Изменение расстояния между атомами O\_Gly208 и NE2\_His119 в течение 50-нс симуляции для комплекса тимидинфосфорилазы с ионом фосфата и 3'-азидотимидином.

разуется только после связывания АЗТ. При этом обе субъединицы находятся в открытой конформации.

Азидогруппа молекулы АЗТ в течение МД-эксперимента занимает гидрофобный карман, смещаясь в его полости. Гидрофобные остатки,

**Таблица 3.** Величины (Å) контактов пиримидинового фрагмента молекулы 3'-азидотимидина с координирующими его аминокислотными остатками в течение 50-нс симуляции

Время, нс	Расстояние, Å			
	N3_A3T... OG_Ser186	O4_A3T... NZ_Lys190	O2_A3T... NH1_Arg171	O2_A3T... NH2_Arg171
0	2.8	2.9	2.7	3.1
5	2.8	2.9	2.9	3.1
10	2.9	3.2	2.7	3.1
15	3.0	2.7	2.8	2.7
20	2.8	2.9	2.8	2.9
25	2.9	2.9	2.9	2.9
30	2.6	3.0	2.9	3.0
35	2.9	2.8	2.9	2.7
40	2.9	3.1	2.9	3.1
45	3.0	2.8	2.9	3.2
50	2.9	2.9	2.8	3.1

окружающие эту группу, в основном мало меняют свою конформацию. Расположение азидогруппы, которое практически сохраняется во время 50-нс симуляции, в гидрофобном кармане, находящемся между большим и малым доменами, может препятствовать сближению реакционных центров, что объясняет свойства АЗТ как неконкурентного ингибитора.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стартовой моделью комплекса ТФ с фосфатом и АЗТ послужили координаты пространственной структуры димера тимидинфосфорилазы *E. coli* в комплексе с АЗТ и сульфатом, решенной методом молекулярного замещения с разрешением 1.52 Å (PDB\_ID: 4LHM) [15]. С использованием программы Coot [17] сульфат заменили на фосфат. Молекулярное моделирование проводили с использованием программного комплекса GROMACS 2020.2 [18]. В качестве силового использовали поле amber99sb-idln [19]. Область моделирования представляла собой прямоугольный параллелепипед размером 134.955 × 134.955 × 136 Å. Белок помещали в центр ячейки, весь объем ячейки заполняли водой; использовали трехатомную модель воды – TIP3P. Параметризацию АЗТ проводили с использованием программы antechamber [20]. На первой стадии выполняли предварительную минимизацию энергии системы с АЗТ и фосфатом. После минимизации энергии проводили процедуры стабилизации температуры и давления системы. Величину температуры выбрали равной 310 К, величину давления – 1 атм. Использовали следующие алгоритмы поддержания температуры и давления: термостат V-rescale [21] и

баростат Parrinello–Rahman [22] соответственно. Системы моделировали на временном интервале общей продолжительностью 50 нс с шагом 2 фс.

Анализ строения ТФ в определенных точках симулируемой траектории осуществляли с помощью совмещения структурных моделей белка в этих точках со структурой димера в исходной точке процесса симуляции и с помощью совмещения структурных моделей белка в этих точках с кристаллической структурой белка (PDB\_ID: 4LHM). При совмещении структур использовали программу PyMol [23].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе методом молекулярной динамики на траектории 50 нс исследовали состояние димерной молекулы тимидинфосфорилазы из *Escherichia coli* в комплексе с неконкурентным ингибитором фермента 3'-азидотимидином и ионом фосфата. В качестве стартовой модели использовали полученные ранее атомные координаты комплекса тимидинфосфорилазы с азидотимидином и сульфатом при разрешении 1.52 Å.

Сравнение пространственных структур субъединицы А фермента в различных временных точках МД-эксперимента со структурой, полученной в рентгеноструктурном эксперименте, не выявило значительных различий, поэтому можно предположить, что на всем протяжении 50-нс симуляции обе субъединицы димера сохраняют открытую конформацию. Показана большая стабильность комплекса ТФ с АЗТ и фосфатом по сравнению с комплексом ТФ с тимидином и фосфатом [16]. Расположение азидогруппы между

двумя доменами молекулы препятствует сближению доменов, необходимому для перехода к закрытой конформации, что объясняет неконкурентный характер ингибирования 3'-азидотимидином.

Полученные данные объясняют некоторые особенности механизма функционирования ТФ и могут быть использованы для разработки антиопухолевых и противовирусных средств.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках выполнения работ по государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pugmire M.J., Ealick S.E.* // *Biochem. J.* 2002. V. 361. P. 1–25.  
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3610001>
- Friedkin M., Roberts D.* // *J. Biol. Chem.* 1954. V. 207. P. 245–256.
- Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M.* // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 75. P. 217–224.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11520.x>
- Desgranges C., Razaka G., Rabaud M., Bricaud H., Balzarini J., De Clercq E.* // *Biochem. Pharmacol.* 1983. V. 32. P. 3583–3590.  
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(83\)90307-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(83)90307-6)
- Woodman P.W., Sarrif A. M., Heidelberger C.* // *Cancer Res.* 1980. V. 40. P. 507–511.
- Schwartz E.L., Baptiste N., Megati S., Wadler S., Otter B.A.* // *Cancer Res.* 1995. V. 55. P. 3543–3550.
- Zhu L., Yang F., Chen L., Meehan E.J., Huang M.* // *J. Struct. Biol.* 2008. V. 162. P. 40–49.
- Pugmire M.J., Ealick S.E.* // *Structure.* 1998. V. 6. P. 1467–1469.  
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(98\)00145-2](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00145-2)
- Norman R.A., Barry S.T., Bate M.M., Breed J., Colls J.G., Ernill R.J., Luke R.W.A., Minshull C.A., McAlister M.S.B., McCall E.J., McMiken H.H.J., Paterson D.S., Timms D., Tucker J.A., Paupit R.A.* // *Structure.* 2004. V. 12. P. 75–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2003.11.018>
- El Omari K., Bronckaers A., Liekens S., Pérez-Pérez M.-J., Balzarini J., Stammers D.K.* // *Biochem. J.* 2006. V. 399. P. 199–204.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20060513>
- Balaev V.V., Lashkov A.A., Gabdulkhakov A.G., Dontsova M.V., Seregina T.A., Mironov A.S., Betzel C., Mikhailov A.M.* // *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* 2016. V. 72 (Pt 3). P. 224–233.  
<https://doi.org/10.1107/S2053230X1600162X>
- Walter M.R., Cook W.J., Cole L.B., Short S.A., Koszalka G.W., Krenitsky T.A., Ealick S.E.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 14016–14022.  
<https://doi.org/10.2210/pdb1tpt/pdb>
- Pugmire M.J., Cook W.J., Jasanoff A., Walter M.R., Ealick S.E.* // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 281. P. 285–299.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1941>
- Timofeev V.I., Abramchik Yu.A., Fateev I.V., Zhukhlistova N.E., Murav'eva T.I., Kuranova I.P., Esipov R.S.* // *Crystallogr. Rep.* 2013. V. 58. P. 842–853.  
<https://doi.org/10.1134/S1063774513060230>
- Timofeev V., Abramchik Yu., Zhukhlistova N., Mura-vieva T., Fateev I., Esipov R., Kuranova I.* // *Acta Cryst.* 2014. V. D70. P. 1155–1165.  
<https://doi.org/10.1107/S1399004714001904>
- Сидоров-Бирюков Д.Д., Подшивалов Д.Д., Тимофеев В.И., Жухлистова Н.Е., Куранова И.П.* // *Кристаллография.* 2019. Т. 64. С. 99–105.
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K.* // *Acta Cryst.* 2010. V. D66. P. 486–501.  
<https://doi.org/10.1107/s0907444910007493>
- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E.* // *SoftwareX* 2015. V. 1–2. P. 19–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E.* // *Proteins.* 2010. V. 78. P. 1950–1958.  
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>
- Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C.* // *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2013. V. 3. P. 198–210.  
<https://doi.org/10.1002/wcms.1121>
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., Dinola A., Haak J.R.* // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 3684–3690.
- Parrinello M., Rahman A.* // *J. Chem. Phys.* 1982. V. 76. P. 2662–2666.
- Schrodinger LLC.* // *The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.8.* 2015.  
<https://github.com/schrodinger/pymol-open-source>

## Molecular Dynamics Study of *Escherichia coli* Thymidine Phosphorylase in a Complex with an Inhibitor 3'-Azidothymidine and Phosphate

V. I. Timofeev<sup>\*, \*\*, #</sup>, N. E. Zhukhlistova<sup>\*</sup>, and I. P. Kuranova<sup>\*, \*\*</sup>

<sup>#</sup>E-mail: [tostars@mail.ru](mailto:tostars@mail.ru)

<sup>\*</sup>*Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 59, Moscow, 119333 Russia*

<sup>\*\*</sup>*National Research Centre "Kurchatov Institute", pl. Akademika Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia*

The state of a dimeric thymidine phosphorylase molecule from *Escherichia coli* in a complex with a noncompetitive enzyme inhibitor 3'-azidothymidine and a phosphate ion was studied by the molecular dynamics method on a 50 ns trajectory. The previously obtained atomic coordinates of the complex of thymidine phosphorylase with azidothymidine and sulfate at a resolution of 1.52 Å were used as a starting model. It was shown that in this time interval both subunits of the dimeric enzyme molecule function asynchronously, while each subunit retains an open conformation. It was found that the nature of the ligand in the nucleoside center affects the binding strength of phosphate in the phosphate center. In a complex with an inhibitor, both ligands remain bound to the enzyme over the entire time interval, while when simulating the behavior of thymidine phosphorylase in the presence of phosphate and thymidine substrate, phosphate is released from the active site. The stabilizing effect of azidothymidine on phosphate binding is consistent with the behavior of azidothymidine as a noncompetitive inhibitor of thymidine phosphorylase.

*Keywords: thymidine phosphorylase, spatial structure, 3'-azidothymidine, molecular dynamics*