

УДК 575.11+576.3+577.1+577.2+577.3+576.5+579.22 +579.23+579.25+578.2+57.05+57.085+593.1+616.006+616.8

**МАТЕРИАЛЫ VIII МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИЧЕСКИМ
ТЕХНОЛОГИЯМ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН
(11–14 ОКТЯБРЯ 2022 г., ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РАН,
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ)¹**

DOI: 10.31857/S004137712207001X

СЕКЦИЯ “ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ”

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЕЗОКСИГИПУЗИНСИНТАЗЫ DHS И ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО
ТРАНСЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА 5A EIF5A *CANDIDA ALBICANS***

Э. Э. К. Агбоигба^{1,*}, Э. Э. Валиахметов¹, К. С. Усачев¹, Ш. З. Валидов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: kouranelvis@gmail.com

Гипузинирование представляет собой посттрансляционную модификацию эукариотического трансляционного фактора 5a (eIF5A), в ходе которой из специфичного остатка лизина образуется гипузин. Реакция гипузинирования катализируется ферментами дезоксирибозилтрансферазой (DHS) и дезоксирибозилгидроксилазой (DOHN) в присутствии кофактора NAD⁺ и спермидина (Cwhen et al., 2020). Данная работа посвящена изучению взаимодействия между ферментом DHS и субстратом EIF5A в присутствии никотинамидадениндинуклеотида NAD⁺ и спермидина, что в дальнейшем поможет понять механизм гипузинирования у *Candida albicans*.

DHS представляет собой цитозольную трансферазу, участвующую в первой стадии гипузинирования (Wator et al., 2020). Для своей каталитической активности фермент требует NAD⁺ в качестве кофактора. DHS катализирует перенос 4-аминобутильной части спермидина на специфический лизин предшественника eIF5A, что приводит к образованию дезоксирибозилгипузина, который затем гидроксилируется с помощью DOHN до гипузина (Chen et al., 2020).

Гены *elf5a*, *dhs* и *dohh* амплифицировали из выделенной тотальной ДНК *Candida albicans* штамм SC5314. Полученные фрагменты генов клонировали в вектор pCYCduet-1 для их совместной экспрессии. Далее фрагмент с тремя генами трансформировали в вектор pETGB1a, содержащий 6xHIS Tag на N-конце DHS. Полученную конструкцию pETGB1a:DHS:DOHN:EIF5A трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) pLys. Трансформанты культивировали в среде LB при 37°C до оптической плотности 0.6 при 600 нм. Потом культуру делили на четыре равных части и в каждую из них добавляли соответственно 1 – NAD⁺, 2 – Спермидин, 3 – NAD⁺ + Спермидин, 4 – необработанный контроль. После добавления изопропил-d-1-тиогаляктопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 0.5 М клетки культивировали еще 6 ч при 30°C, после чего осаждали и лизировали. Лизат центрифугировали при 4500 rpm в течение 45 мин. Белки выделяли металлохелатной аффинной хроматографией на никелевой колонке (NI-NTA). Белок 6xHIS-GB1-DHS:DOHN:EIF5A элюировали с 300мМ раствором имидазола. Полученные фракции белка в каждом случае собирали и проводили электрофорез в нативных и в денатурирующих условиях.

В ходе экспериментов мы сделали вывод о том, что в условиях коэкспрессии наблюдается функциональная активность DHS, о чем свидетельствует наличие тримерной формы белка на нативном электрофорезе в ПААГ. Также мы наблюдали, что DHS и EIF5A образуют комплекс и поэтому выделяются вместе, несмотря на то, что 6xHIS присутствует только на DHS. Наконец, мы наблюдали, что добавление NAD⁺ стимулирует димеризацию и тримеризацию DHS и усиливает его связывание EIF5A.

¹ Конференция проведена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021 г.), проект “Использование генетических технологий для поиска биомаркеров, моделирования и терапии заболеваний человека”.

Целью данной работы являлось исследование влияния хромонилаллилморфолинов (ХМ) на физико-химические свойства модельных липидных мембран и встроенных в них ион-проводящих каналов. Были проведены электрофизиологические и флуориметрические измерения изменений граничного потенциала (ϕ_b) липидных бислоев и дипольной компоненты (ϕ_d) граничного потенциала мембран, включающих пальмитолеилфосфохолина (ПОФХ), диолеилфосфолипид и Кдо2 (2-кето-3-деоксиоктановая кислота) – липид А. Следует отметить, что фосфохолин широко распространен в мембранах клеток млекопитающих, а фосфолипид и Кдо2-липид А характерны для внутренней и наружной мембран грамотрицательных бактерий. Кроме того, было охарактеризовано влияние производных морфолина на проводимость одиночных каналов, сформированных грамицидином А (Гра) и макроскопический ток, индуцированный полимиксином Б (ПМБ).

Обнаружено, что среди протестированных соединений наибольшей мембраномодифицирующей способностью обладает хлорид 1-[1-(4-оксо-6-хлор-4Н-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолина. Максимальное снижение ϕ_b липидных бислоев из ПОФХ, вызванное введением в мембраноомывающий 0.1 М раствор KCl (рН 7.4) этого производного, составляет 120 ± 20 мВ. Включение в липидную систему отрицательно заряженных компонентов, приводит к падению изменения ϕ_b почти в 2 раза в присутствии указанного соединения. Также, оно вызывает значительное снижение ϕ_d ПОФХ – мембран. Расчет доли молекул в заряженной форме показал, что при физиологических условиях ионизировано лишь около 10%. Исходя из полученных данных, выдвинуто предположение о том, что модуляция ϕ_b вызвана преимущественно встраиванием в мембрану незаряженной формы протестированного ХМ.

Результаты исследований порообразующей активности Гра в ПОФХ показали, что введение хлорид 1-[1-(4-оксо-6-хлор-4Н-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолина до концентрации 250 μ М приводит к росту проводимости одиночных Гра-каналов примерно на 16%, что можно объяснить снижением величины энергетического барьера для проникающего катиона вследствие вызванного соединением снижения ϕ_d . В свою очередь, падение ϕ_b мембран, включающих фосфолипид и Кдо2-липид А, в присутствии указанного соединения вызывает 5-кратное увеличение ПМБ-индуцированного тока, вероятно, из-за потенциации встраивания в липидный бислой положительно заряженных молекул липопептида. На основании полученных результатов можно предположить, что падение электрического потенциала на границе вода-мембрана, индуцированное изученным производным ХМ, может влиять на свойства ионных каналов, встроенных в мембраны клеток млекопитающих и бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-15-00417).

ВНУТРИЯДЕРНЫЕ ТЕЛЬЦА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ ЗЕБРОВОЙ АМАДИНЫ: МОРФОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ

К. С. Матвеева^{1,*}, Е. А. Кондакова¹, С. А. Галкина¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ksum.miha@gmail.com

Организация и молекулярный состав внутриядерных структур в растущих ооцитах у птиц были в разной степени исследованы на таких объектах, как зяблик (*Fringilla coelebs*), голубь (*Columba livia*), курица (*Gallus g. domesticus*) и японский перепел (*Coturnix japonica*). Среди них только у голубя обнаружены тельца, подобные тельцам Кахалы (Khodyuchenko et al., 2012). Канонические тельца Кахалы (ТК) – внутриядерные органеллы соматических и половых клеток высших эукариот, которые участвуют в сборке малых ядерных и ядрышковых рибонуклеопротеинов (мяРНП и мякРНП), включая мяРНП сплайсосом, играя роль в созревании РНК. Важным компонентом ТК является белок коилин, ключевой функцией которого является сборка и поддержание целостности ТК. Долгое время коилин считался маркером ТК, однако на сегодняшний день известно о его наличии и в других внутриядерных органеллах.

Зебровая амадина *Taeniopygia guttata* (Estrildidae, Passeriformes) служит важным модельным объектом нейробиологии и сравнительной геномики, и в настоящее время является наиболее изученным представителем певчих воробьиных птиц. Используя методы иммунохимического анализа и флуоресцентной гибридизации *in situ*, мы показали особенности организации и состава внутриядерных телец растущих ооцитов у амадины.

Мы обнаружили, что в ооцитах амадины все обнаруживаемые внутриядерные тельца являются коилин-положительными, содержат РНК, в разной степени накапливают фактор сплайсинга SC35 и Sm-белки сплайсосомных мяРНП. В некоторых тельцах выявляются нуклеолин и фибрилларин – белки ядрышка, наличие которых обнаружено и в ТК млекопитающих (Trinkle-Mulcahy, Sleeman, 2017). В тельцах не выявля-

ются белки когезинового комплекса (Rad21, SMC1, SMC3, STAG2), топоизомераза IIa, характерные для центромерных белковых тел ооцитов птиц, и малая ядрышковая РНК U3.

Показано изменение количества, размера и внешнего вида коилиновых телец по мере завершения стадии хромосом-ламповых щеток и их конденсации, а также закономерный характер ассоциации этих телец с определенными хромосомами. В частности, коилиновые тельца меньшего размера выявляются в ассоциации с хромосомой клеток половой линии (Germline-Restricted Chromosome, GRC), а именно с гетерохроматиновыми “поясками” — маркером данной хромосомы. Анализ гистологических срезов яичника амадины, окрашенных гематоксилин-эозином, позволил предположить взаимосвязь между ядрышком и внутриядерными тельцами. По всей видимости, исследуемые нами внутриядерные тельца необходимы для запасания и/или распределения различных ядрышковых и сплайсосомных белков. Утверждать, что они выполняют функции ТК, пока оснований нет.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00967а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Khodyuchenko T., Gaginskaya E., Krasikova A. 2012. Non-canonical Cajal bodies form in the nucleus of late stage avian oocytes lacking functional nucleolus. *Histochem. Cell Biol.* V. 138. P. 57.

Trinkle-Mulcahy L., Sleeman J.E. 2017. The Cajal body and the nucleolus: “In a relationship” or “It’s complicated”? *RNA Biol.* V. 14. P. 739.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ, ЭВОЛЮЦИЯ И РАЗНООБРАЗИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ СУПЕРСЕМЕЙСТВА P-LOOP: КАК МЫ ВИДИМ ЭТО СЕГОДНЯ

И. А. Поздняков*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: pozdnyakov@incras.ru*

P-loop-каналы — суперсемейство катионных каналов, представители которого характеризуются наличием консервативного структурного мотива так называемой поровой петли, или P-loop. Среди наиболее известных представителей этого суперсемейства — потенциал-управляемые калиевые, натриевые и кальциевые каналы. Порообразующие субъединицы таких каналов всегда представлены (псевдо)тетрамерами, в которых формирование собственно поры канала происходит за счет сближения четырех P-loop-мотивов. По-видимому, первые P-loop-каналы возникли на самых ранних этапах эволюции клетки, еще до появления так называемого последнего универсального общего предка (LUCA) и довольно быстро дали структурное и функциональное разнообразие родственных белков. На сегодняшний день может быть насчитано около 20 известных эволюционных линий P-loop-каналов. Эволюция этих белков шла разнообразными путями: дубликациями и внутригенными дубликациями, межгенными слияниями и тасовкой доменов, крупными делециями и др. Мы считаем, что основным событием в эволюции всего суперсемейства стало слияние анцестрального порового домена с так называемым потенциал-чувствительным доменом (VSD), что позволило этим каналам управляться изменениями мембранного потенциала. Важнейшим же событием в эволюции VSD-каналов стало изменение в структуре селективного фильтра: замена “жесткой бочки” карбониллов на “гибкое кольцо” боковых радикалов аминокислотных остатков. Мы считаем, что именно это событие привело к систематическому возникновению $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -селективности среди P-loop-каналов и, как следствие, на системном уровне к возникновению электровозбудимости у эукариот. Эволюционные отношения между большинством из 20 линий каналов не разрешены. Причин этому две. Во-первых, белки, составляющие комплексы ионных каналов, низко консервативны по первичной последовательности. Так, идентичность последовательностей из разных подгрупп внутри одной эволюционной линии P-loop-каналов редко превышает 30%. Мы считаем, что решению этой проблемы могло бы отчасти способствовать развитие методов молекулярного моделирования и 3D-выравнивания, поскольку фолд этих белков относительно консервативен. Во-вторых, основные молекулярные и структурные данные о каналах получены на очень ограниченном круге объектов. Решению этой проблемы способствует вовлечение в поле исследований данных, полученных на нестандартных организмах. Такими организмами, например, являются одноклеточные эукариоты, составляющие основное разнообразие всех эукариот. В этом докладе будут представлены наши последние результаты, полученные с помощью методов эволюционной и структурной биоинформатики, которые демонстрируют значение ионных каналов этих организмов не только для нашего понимания эволюции и разнообразия P-loop-каналов, но и для понимания такого базового свойства канала, как селективность.