

УДК 575.85

### АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В УВЕЛИЧЕНИИ РАЗНООБРАЗИЯ БЕЛКОВ В КЛЕТКЕ: ДЛЯ АДАПТАЦИИ И ЭВОЛЮЦИИ

А. А. Чиркин, В. В. Долматова

Витебский государственный университет имени П. М. Машерова, chir@tut.by

На примере двух видов легочных пресноводных моллюсков, обитающих в одних и тех же водоемах и различающихся по типу транспорта кислорода, – *Lymnaea stagnalis* L. и *Planorbis cornutus* L. – продемонстрировано разнообразие белков, важных для эволюции и адаптации многоклеточных организмов. Показано, что с уменьшением биодоступности кислорода, вероятно, происходила дивергенция легочных моллюсков с образованием гемоглобина из медьсодержащих тирозиназ, связанных с оксидоредуктазами и, в частности, с фенольными оксидазами, требующими относительно низких уровней энергии активации катализируемых реакций. Выказано предположение, что это был способ сохранения легочных моллюсков в условиях долговременных неблагоприятных условий окружающей среды. Но в настоящее время *Planorbis cornutus* L. (представители легочных моллюсков с переносом кислорода гемоглобином) оказались более устойчивыми к действию цитотоксических агентов (тионина, стрептозоцина) по сравнению с *Lymnaea stagnalis* L. (транспорт кислорода медьсодержащим гемоглобином).

**Введение.** Экспрессия генов – это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт – РНК или белок. Экспрессия генов может регулироваться на всех стадиях процесса: во время транскрипции, во время трансляции и на стадии посттрансляционных модификаций белков. Контроль экспрессии генов осуществляется на следующих уровнях:

- на уровне транскрипции (контролируется время и характер транскрипции гена);
- на уровне процессинга первичного транскрипта, включая явление альтернативного сплайсинга;
- при отборе зрелых мРНК для их транспорта в цитоплазму, учитывая механизмы направленного транспорта через ядерные поры;
- на уровне деградации – избирательная дестабилизация определенных типов мРНК в цитоплазме;
- на уровне трансляции – отбор в цитоплазме мРНК для трансляции на рибосомах, в том числе для синтеза изоформ белков;
- на этапе пострибосомальной модификации белков;
- на уровне активности белка – селективная активация, инактивация или компартиментация молекул белка после их синтеза.

В регуляции транскрипции участвуют регуляторные элементы – cis-действующие факторы (промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, LCR (locus control region)) и транс-действующие факторы (главные и специфичные транскрипционные факторы). Эти факторы обеспечивают базальную экспрессию генов, регуляцию онтогенеза, ответ на внеклеточные сигналы, ответ на изменения окружающей среды, контроль клеточного цикла и др. Регуляция экспрессии генов позволяет клеткам контролировать собственную структуру и функцию и является основой дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации. Экспрессия генов служит субстратом для эволюционных изменений, так как контроль за временем, местом и количественными характеристиками экспрессии одного гена может иметь влияние на функции других генов в целом организме.

Альтернативный сплайсинг – вариант сплайсинга мРНК, при котором в процессе экспрессии одного и того же гена на основе его первичного транскрипта (пре-мРНК) образуется несколько отличающихся по структуре зрелых мРНК. Такие зрелые мРНК – результат как выборочного включения в зрелую мРНК экзонов первичного транскрипта, так и сохранения в ней некоторых

интронов [1]. Известны несколько основных моделей альтернативного сплайсинга [2]. Наиболее распространенной моделью, встречающейся примерно в 40% случаев в клетках млекопитающих, является пропуск экзона или кассетный экзон. В данном случае экзон может быть включен в состав зрелой мРНК или вырезан. Сложной моделью являются взаимоисключающие экзоны, когда из двух экзонов в зрелую мРНК переходит только один. В 18% событий альтернативного сплайсинга у млекопитающих встречается модель альтернативного акцепторного сайта – используется альтернативный 3'-конец интрона (акцепторный сайт), так что меняется 5'-конец нижестоящего экзона, а в 8% случаев альтернативного сплайсинга функционирует модель альтернативного донорного сайта: здесь используется альтернативный 5'-конец интрона (донорный сайт), так что меняется 3'-конец вышестоящего экзона. Кроме того, возможна модель удержания интрона, основанная на том, что последовательность может быть вырезана как интрон или оставлена в зрелой мРНК. Последний вариант отличается от пропуска экзона, поскольку сохраняемая последовательность не окружена интронами. Если оставленный интрон попадает в кодирующую область, то он должен кодировать аминокислотную последовательность с такой же рамкой считывания, как и соседние экзоны. Если же он будет содержать стоп-кодон или иметь другую рамку считывания, нежели окружающие экзоны, то произойдет сдвиг рамки считывания, и белок будет нефункциональным. Такой тип альтернативного сплайсинга встречается в 3% случаев у млекопитающих. Известны также два способа получения нескольких белков по программе одного гена, основанные на использовании соответственно множественных промоторов и множественных сайтов полиаденилирования. Использование множественных промоторов относится скорее к регуляции транскрипции, чем к альтернативному сплайсингу. Начиная транскрипцию с разных точек, можно получить транскрипты с различающимися 5'-концевыми экзонами. С другой стороны, использование множественных сайтов полиаденилирования приводит к образованию разных 3'-концов у созревающих транскриптов. Оба этих механизма в сочетании с пятью вышеизложенными моделями сплайсинга обеспечивают разнообразие мРНК, считываемых с одного и того же гена [3].

В результате трансляции зрелых мРНК, полученных в процессах альтернативного сплайсинга, формируются полипептидные цепи с разными аминокислотными последовательностями. Следовательно, при альтернативном сплайсинге один транскрипт обеспечивает синтез нескольких белков. Широкое распространение такого сплайсинга у эукариот приводит к значительному увеличению разнообразия белков, закодированных в их геномах. Например, клетки человека синтезируют не менее чем  $10^6$  различных белков, в то время как число кодирующих их генов составляет 25 тысяч (при этом среди всех генов человека, которые содержат интроны, более 75% выступают как матрицы для синтеза пре-мРНК, подвергаемых далее альтернативному сплайсингу). Геном нематоды *Caenorhabditis elegans*, состоящей примерно из 1000 клеток, по количеству существенно не отличается от генома человека, однако альтернативному сплайсингу подвергаются пре-мРНК только 15% генов. Таким образом, альтернативный сплайсинг позволяет увеличить разнообразие белковых продуктов генов, сохраняя при этом относительно небольшое количество различных генов в геноме и не создавая избыточных копий генов [1, 4].

Посттрансляционная модификация – это ковалентная химическая модификация полипептидной цепи, синтезированной в результате трансляции зрелой мРНК. Для многих белков посттрансляционная модификация оказывается завершающим этапом процесса экспрессии генов. К настоящему времени описано более двухсот вариантов посттрансляционной модификации белков. Считают, что модификациям подвергается подавляющее большинство белков и даже один и тот же белок может подвергаться нескольким различным модификациям. Модификации происходят в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Здесь ферменты гликозилирования присоединяют к белкам сложные цепи остатков сахаров, образуя гликопротеины. Единственный известный случай гликозилирования в цитозоле клеток млекопитающих – это добавление к белкам N-ацетилглюкозамина. Однако большинство других ковалентных модификаций протекает в первую очередь именно в цитозоле. Некоторые из них стабильны и необходимы для активности белка, например, ковалентное присоединение коферментов (биотина, липоидной кислоты или пиридоксальфосфата). Присоединение жирной кислоты к белку направляет его к определенным мембранам, обращенным в цитозоль. К фосфатидилхолинолу наружной поверхности плазматической

мембраны клетки прикрепляются многочисленные белки. Связь белков с фосфоинозитидгликанами осуществляется через концевой этаноламин. Определенные ковалентные модификации, происходящие в цитозоле, обратимы и служат для регуляции активности многих белков. Многие клеточные процессы регулируются путем обратимого фосфорилирования-дефосфорилирования белков. Посттрансляционные модификации включают в себя фосфорилирование факторов транскрипции протеинкиназами, гликозилирование остатков Asn в последовательностях Asn-X-[Ser-Thr], N-концевое ацилирование, циклизацию N-концевого остатка Glu с образованием пироглутаминовой кислоты, C-концевое амидирование последовательностей освобождающихся пептидов, гидроксидирование остатков Lys и Pro, метилирование различных остатков аминокислот. Итак, выделяют следующие основные типы посттрансляционной модификации полипептидной цепи:

- расщепление пептидной связи (удаление N-концевого остатка метионина, ограниченный протеолиз);
- присоединение химических групп (N-ацилирование, C-амидирование, N-миристоилирование, присоединение гликозилфосфатидилинозитола и др.);
- модификация боковых цепей аминокислот (гликозилирование, гидроксидирование, ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, йодирование, окисление и др.);
- присоединение гидрофобных групп для локализации в мембране (пренилирование путем присоединения изопреноидов, S-пальмитирование);
- присоединение белков и пептидов (убиквитирование, сумоилирование).

Посттрансляционные модификации оказывают различные эффекты на белки: регулируют продолжительность их существования в клетке, ферментативную активность, взаимодействия с другими белками. В ряде случаев посттрансляционные модификации являются обязательным этапом созревания белка, в противном случае он оказывается функционально неактивным. Например, при созревании инсулина и некоторых других гормонов необходим ограниченный протеолиз полипептидной цепи, а при созревании белков плазматической мембраны – гликозилирование. Установлено, что гликозилирование – одна из наиболее часто встречающихся модификаций: считается, что около половины белков человека гликозилировано, а 1–2% генов человека кодируют белки, связанные с гликозилированием. Процессы метилирования и этилирования гистонов определяют функциональную активность ДНК за счет переходов в системе конденсированной хроматин  $\pm$  эухроматин. К редким модификациям относят тирозинирование/депренирование и полигликозилирование тубулина [5–7]. Для изучения посттрансляционной модификации применяют методы масс-спектрометрии и вестерн-блоттинга.

Наряду с альтернативным сплайсингом посттрансляционные модификации увеличивают разнообразие белков в клетке, обеспечивая функционирование различных механизмов адаптации [5, 8].

**Цель работы** – поиск иллюстрации целесообразности наличия разнообразия белков для эволюции и адаптации многоклеточных организмов.

**Материалы и методы.** Объектами исследования служили два вида легочных пресноводных моллюсков, обитающих в одних и тех же водоемах: прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis* L.) и катушка роговая (*Planorbis corneus* L.), отличающихся по типу транспорта кислорода [9]. Первый из них признан модельным организмом для исследования действия водорастворимых химических агентов в ЕС в 2010 г. Разработаны детальные требования к проведению строго контролируемых в Европейском союзе исследований в течение всей или части жизни моллюска (Series on Testing and Assessment, No. 121. Detailed review paper on molluscs life-cycle toxicity testing, JT03284405. Environment Directorate, Paris 2010). Представители таксона *Mollusca* имеют четыре типа кислородпереносящих металлопротеинов и тканевых протегомовых белков: тканевые протегомы, гемоглобин красных кровяных клеток, внеклеточные гемоглобины и гемоцианины [10]. У прудовиков транспорт кислорода осуществляет медьсодержащий гемоцианин, а у катушек – железосодержащий гемоглобин. Существует прямая зависимость между активностью животного и концентрацией переносчиков кислорода во внутренней среде [11].

Различия между двумя белками выражаются как их дивергенция, т. е. процент различающихся аминокислотных остатков. При сравнительном изучении определенного белка у нескольких видов его дивергенция для каждой пары сравниваемых видов пропорциональна времени, про-

шедшему с момента их разделения. Тем самым получаются эволюционные часы, измеряющие, по всей видимости, равномерное накопление мутаций в процессе эволюции данного белка. Скорость дивергенции может быть измерена как процент различий, накопившихся за миллион лет, или обратной величины – единицы эволюционного времени (ЕЭВ), соответствующей времени (в миллионах лет), необходимому для осуществления дивергенции на 1%.

В анализе использованы нуклеотидные последовательности гена гистона H4, являющегося белком с небольшой молекулярной массой, состав которого обогащен положительно заряженными аминокислотами лизином и аргинином. Последовательность аминокислот в гистонах консервативна и незначительно различается в организмах различных таксонов. Для определения времени дивергенции была использована база данных [www.timetree.org](http://www.timetree.org), режим поиска NODE TIME (поиск времени дивергенции для двух видов). Для построения дендрограммы были сравнены нуклеотидные последовательности для гистона H4 более шестидесяти организмов различных таксономических групп из базы данных [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (представители классов Млекопитающие, Птицы, Пресмыкающие, Земноводные, Насекомые, Брюхоногие, Высшие раки, Коралловые полипы, Невооруженные немертвы, Ланцетники и Сипункулиды). Время дивергенции определяли между видами, принадлежащими к двум семействам, – *Radix auricularia* (семейство прудовики *Lymnaeidae*) и *Biomphalaria glabrata* (семейство катушки *Planorbidae*). Также использовали представителей моллюсков *Nenia tridens*, *Pravispira subserrulata*, *Alopija bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*. Время дивергенции определяли между *Biomphalaria glabrata* и *Nenia tridens*, *Pravispira subserrulata*, *Alopija bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*; между *Radix auricularia* и *Nenia tridens*, *Pravispira subserrulata*, *Alopija bielzii*, *Leucostigma candidescens*, *Cochlodina orthostoma*; между *Leucostigma candidescens* и *Radix auricularia*, *Biomphalaria glabrata*.

Для построения дендрограммы применили программу MEGA 5.2, в которую вносили 64 нуклеотидные последовательности гистона H4 организмов различных таксономических групп. Дендрограмму строили с помощью метода Neighbor-Joining, модели – Tamura-Nei. В основание ветвей было положено время дивергенции легочных пресноводных моллюсков (*Planorbis corneus* и *Lymnaea stagnalis*). Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter в единицах количества базовых замен на сайт. Существует предположение, что гемоцианин произошел от тирозиназ. Для всех тирозиназ характерно одинаковое строение активного центра. Он представляет собой два катиона меди, каждый из которых ориентирован с помощью трех гистидиновых остатков. Активный центр этого фермента очень похож на активный центр гемоцианина как по структуре, так и по свойствам. Активный центр тирозиназы способен захватывать одну молекулу кислорода, которая затем используется для окисления субстрата. На сервере [www.weblogo.berkeley.edu/logo.cgi](http://www.weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) сформирован логотип мотива из 63 аминокислотных последовательностей гемоцианина моллюсков. На этом же сервере был сформирован логотип мотива из 180 аминокислотных последовательностей тирозиназ организмов.

Известны два основных типа протеолиза – АТФ-независимый и АТФ-зависимый. Первый активируется в условиях голодания и не требует затрат энергии, а второй функционирует постоянно и избирательно. В этих процессах участвуют, вероятно, разные протеолитические ферменты. При некоторых типах повреждения клеток нарушается окислительное фосфорилирование, снижается синтез АТФ, растет потребление кислорода, а также синхронно активируются гликолиз и протеолитические процессы. Хотя описанные механизмы известны более 20 лет, их исследование остается актуальным из-за высокой научно-практической важности решения проблемы функционирования системы протеолиз-антипротеолиз. Новый подход для решения этой проблемы может базироваться на исследовании протеолитических ферментов и антипротеолитических факторов в тканях и гемолимфе легочных пресноводных моллюсков – прудовика обыкновенного и катушки роговой, отличающихся по типу транспорта кислорода. Известно, что протеолитические ферменты подразделяются на две основные группы: пептидазы (КФ 3.4.11-15), катализирующие гидролиз пептидных связей с N- и C-конца пептидной цепи, и протеиназы (КФ 3.4.21-24), обеспечивающие гидролиз пептидных связей полипептидных цепей с образованием пептидов. По строению активного центра их делят на сериновые, тироловые, карбоксильные и металлофер-

жашие. Все вместе они образуют комплекс протеаз, расщепляющих белки до пептидов и аминокислот при различных значениях pH: для кислых протеаз – pH 3,0; для слабосильных протеаз – pH 4,8–5,3; для нейтральных протеаз – pH 7,0 и для щелочных протеаз – pH 8,0–9,0.

Материалом для исследования были гемолимфа и гепатопанкреас половозрелых легочных пресноводных моллюсков. В работе использованы N-α-бензоил-D,L-аргинин паранитроанилид (БАПНА; 3 ммоль/л), трипсин (1,7 ммоль/л), ингибитор трипсина (0,42 ммоль/л), сывороточный альбумин человека (30 г/л) фирмы «Fluka». Определение активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА) проводили по методу D. F. Erlanger, а определение активности ингибиторов протеиназ (α1-антипротеазного ингибитора – АПИ и α2-макроглобулина – α2-МГ) – по методу, предложенному Т. А. Хватовым и В. Б. Беловой [12, 13], при значениях pH инкубационных сред 3,0, 3,6, 3,8, 6,1, 7,2, 8,0 и 9,0. Активность ТпА выражали в ммоль(г · с), содержание АПИ и α2-МГ – в г/л. Содержание белков (мг/г) определяли по Лоури [14]. Препарат этионина вводился в ногу в концентрации 1 мг/г массы моллюсков. Исследования проводили через 3, 12, 24 и 48 ч. В качестве контроля вводили раствор хлорида натрия в концентрации 1 мг/г массы моллюсков.

Представлял интерес поиск общих мишеней для действия антиметаболита этионина на протеолитические ферменты человека и модельного организма. Для этой цели был произведен сравнительный анализ *Biomphalaria glabrata* и *Planorbis carneus*, поскольку они относятся к одному семейству брюхоногих моллюсков (*Planorbidae*) из отряда легочных моллюсков (*Pulmonata*). На сайте [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) в разделе «Nucleotide» была найдена аминокислотная последовательность белка трипсина *Biomphalaria glabrata* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/908461094/>), которая при парном выравнивании с аминокислотной последовательностью белка трипсина человека (PDB ID 1H4W) давала наибольший процент сходства (26,67%). Для проведения молекулярного докинга (соответствия) необходимо наличие 3D-структуры белка, для получения которой был использован сервер [www.swissmodel.expasy.org](http://www.swissmodel.expasy.org). Проведено моделирование по образцу (User Template Mode) с использованием в качестве шаблона структуры белка трипсина человека (PDB ID 1H4W). Две структуры белка трипсина (*Homo sapiens* и *Biomphalaria glabrata*) были загружены на сервер молекулярного докинга [www.dockingserver.com](http://www.dockingserver.com). В качестве лиганда в докинге был использован этионин ((L)-Ethionine). Полученный цифровой материал подвергался статистической обработке методами параметрической статистики.

**Результаты и обсуждение.** Дендрограмма представлена на рис. 1. Точкой отмечено место дивергенции прудовика обыкновенного и катушки роговой.

При дополнительных исследованиях с использованием наземных моллюсков, например, виноградной улитки (*Helix pomatia*, брюхоногий моллюск отряда легочных улиток семейства гелицид), было получено одно и то же время дивергенции – 182 млн лет. Исходя из этого можно считать, что время дивергенции между прудовиком обыкновенным и катушкой роговой также равно 182 млн лет. Данное время относится к тоарскому веку (эре, ярусу). Тоарский ярус (182,7–174,1 млн лет назад) – верхний ярус нижнего отдела юрской системы. Около 183 млн лет назад на Земле случилось тоарское климатическое событие – в результате извержений вулканов в атмосферу попало много углекислого газа, среднегодовая температура Земли выросла на 5 градусов, увеличилось количество осадков и смытых в океан минеральных веществ. Потребляющие растворенный в воде кислород водоросли и бактерии начали бурно размножаться, что привело к формированию черных сланцев – образующихся в бескислородных условиях осадочных пород, богатых органикой [15]. В результате возник длительный период относительной кислородной недостаточности для живых организмов, в том числе для легочных моллюсков. Можно предположить, что у *Lymanea stagnalis* возникли некоторые преимущества в транспорте кислорода по сравнению с *Planorbis carneus*.

Ряд исследователей придерживаются того мнения, что гемоцианин моллюсков прошел через 3 дубликации гена, в результате чего субъединица гемоцианина моллюсков стала содержать 8 активных центров. Субъединица гемоцианина включает 7 или 8 функциональных элементов. Каждый функциональный элемент подразделяется на два домена. Домен α содержит 4 альфа-спирали и активный центр, домен β – состоящий из 7 бета-структур, формирующих антипараллельный бета-баррель. Активный центр содержит два близко расположенных друг к другу катиона меди, которые обратимо связывают молекулу кислорода в комплекс. Каждый катион меди коор-

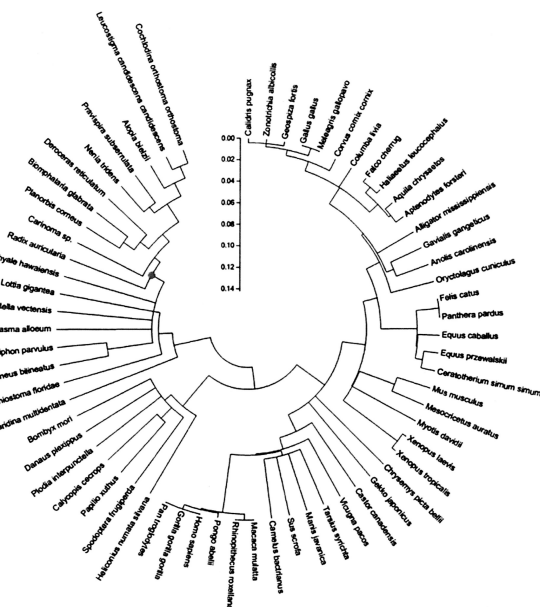


Рис. 1. Дендрограмма для различных таксономических групп организмов, основанная на времени дивергенции между прудовиком обыкновенным и катушкой роговой, построенная при использовании нуклеотидных последовательностей гистона H4

динирован тремя имидазольными группами (гистидиновыми остатками), при оксигенации молекула кислорода оказывается зажатой между этими катионами.

Пептидная цепь образует петли, то приближаясь к активному центру, то удаляясь от него. Самая большая петля (разделяющая гистидиновые остатки His204 и His324) состоит из 119 аминокислотных остатков. В неокисленной форме катионы меди находятся в степени окисления +1, отстоят друг от друга на расстояние 4,6 Å, химическое связывание между ними отсутствует. Конфигурация N–Cu–N близка к треугольной, расстояния Cu–N находятся в пределах 1,9–2,1 Å. При оксигенации ионы меди приобретают степень окисления +2. Катионы меди сближаются друг с другом и расстояние Cu–Cu составляет 3,6 Å, а расстояния Cu–O – 1,8–1,9 Å. В результате сближения ионов меди углы N–Cu–N приближаются к тетраэдрическому. Кроме того, связи Cu–N становятся неравными по длине: в окружении каждого иона две связи имеют длину 1,9–2,0 Å, а третья связь удлиняется до 2,3 Å. Субъединица гемоцианина представляет собой комплекс меди и белка. В отличие от гемоглобина, атомы металла связаны непосредственно с аминокислотой, а не с простетической группой.

Гемоцианин, как и гемоглобин, проявляет кооперативность, т. е. при присоединении молекулы кислорода одной субъединицей увеличивает сродство к кислороду соседних субъединиц. Кооперативность гемоцианина моллюсков сравнительно невелика (коэффициент Хилла составляет около 2). В отличие от гемоглобина, входящего в состав эритроцитов, молекулы гемоцианина растворены в гемолимфе. Благодаря этому мономеры гемоцианина могут объединяться в очень большие комплексы, что позволяет лучше проявлять его кооперативным свойствам и в целом лучше переносить кислород. Это особенно важно для организмов, живущих в условиях с малым содержанием кислорода. Гемоцианин может связываться не только с кислородом, но и с угарным газом, образуя карбоксигемоцианин. При этом также обнаруживается кооперативный эффект [16, 17].

При выравнивании последовательностей гемоцианинов и тирозиназ был обнаружен мотив (H - - - - - W H R), который присутствует в гемоцианах и тирозиназах. H (His) соответствует 6 аминокислоте на логотипах гемоцианинов и тирозиназ, W H R (Trp, His, Arg) – 14, 15 и 16 соот-



Рис. 2. Логотип гемоцианинов

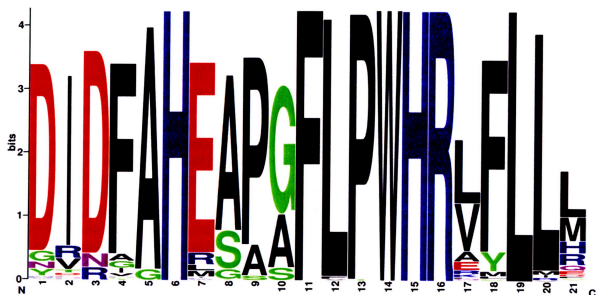


Рис. 3. Логотип тирозиназ

ветственно. При построении логотипов нами были использованы только части аминокислотных последовательностей (21 аминокислота) (рис. 2, 3).

Наличие этого общего мотива свидетельствует в пользу предположения о происхождении гемоцианинов из тирозиназ, когда в окружающей среде снизилось количество биодоступного кислорода. При хронической гипоксии концентрация гемоцианина в гемолимфе значительно растет, компенсируя нехватку кислорода в воде. На профиль связывания кислорода значительно влияет величина pH. Рост температуры на 10 градусов может уменьшать pH на 0,3, что влияет на кооперативные свойства гемоцианина к условиям среды. Вызванные этим изменения величины pH могут влиять также на процессы протеолиза и антипротеолиза.

При исследовании гемолимфы протеолитическая и антипротеолитическая активности были обнаружены во всем исследуемом диапазоне значений pH. Это значит, что комплекс протеаз гемолимфы легочных пресноводных моллюсков включает кислые (pH 3), слабокислые (pH 3,6–3,8), нейтральные (pH 6,1–7,2) и щелочные (pH 8–9) протеазы (табл. 1).

Наиболее высокие значения трипсиноподобной активности были выявлены при значениях pH инкубационной среды в диапазоне 3,6–9,0, а количества α1-антипротеазного ингибитора при pH 3,6–3,8 и α2-макроглобулина при pH 3,0.

Таблица 1. Распределение протеолитической и антипротеолитической активности гемолимфы (%) в зависимости от pH инкубационной среды

| Диапазон pH | Прудовики |      |       | Катушки |      |       |
|-------------|-----------|------|-------|---------|------|-------|
|             | ТрА       | АПИ  | α2-МГ | ТрА     | АПИ  | α2-МГ |
| 3,0         | 13,8      | 6,1  | 37,8  | 16,6    | 15,3 | 34,8  |
| 3,6–3,8     | 29,5      | 77,4 | 23,8  | 23,9    | 78,1 | 24,0  |
| 6,1–7,2     | 30,3      | 7,0  | 19,6  | 35,4    | 2,1  | 20,7  |
| 8,0–9,0     | 26,4      | 9,5  | 18,8  | 24,1    | 4,5  | 20,5  |

Данные о зависимости количества ингибиторов протеолиза гепатопанкреаса от величины pH инкубационной среды приведены в табл. 2.

Таблица 2. Зависимость активности ингибиторов протеиназ в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков от pH буферного раствора (г/л)

| pH  | Прудовик обыкновенный |                    | Катушка роговая |                    |
|-----|-----------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
|     | АПИ                   | α <sub>2</sub> -МГ | АПИ             | α <sub>2</sub> -МГ |
| 3,0 | 0,97 ± 0,11           | 22,80 ± 3,70**     | 3,06 ± 0,59     | 20,1 ± 3,80**      |
| 3,6 | 2,45 ± 0,25*          | 4,48 ± 0,95*       | 5,81 ± 0,79*    | 5,21 ± 1,88*       |
| 3,8 | 9,84 ± 0,16*          | 9,92 ± 0,11*       | 9,82 ± 0,17*    | 8,65 ± 1,02*       |
| 6,1 | 0,36 ± 0,08*          | 5,99 ± 0,52**      | 0,22 ± 0,11*    | 6,10 ± 0,58*       |
| 7,2 | 0,75 ± 0,14           | 5,84 ± 0,59**      | 0,19 ± 0,14*    | 5,83 ± 0,49*       |
| 8,0 | 1,04 ± 0,17           | 5,44 ± 0,21**      | 0,59 ± 0,27*    | 5,98 ± 0,43*       |
| 9,0 | 0,47 ± 0,05*          | 5,89 ± 0,03**      | 0,31 ± 0,11*    | 5,85 ± 0,58*       |

\* P < 0,05 по сравнению с контролем.

\*\* P < 0,05 по сравнению между одноименными группами прудовиков и катушек.

Аналогичные результаты были получены при исследовании гепатопанкреаса обоих видов моллюсков: количество α1-антипротеазного ингибитора оказалось наиболее высоким при pH 3,6–3,8 и α2-макроглобулина при pH 3,0. Таким образом, выявлена мощная антипротеазная активность, направленная против кислых и слабокислых протеаз, вероятно, лизосомального происхождения. Данные о влиянии этионина на активность трипсиноподобных протеиназ в гепатопанкреасе и гемолимфе моллюсков приведены в табл. 3.

Из анализа данных табл. 3 следует, что в гепатопанкреасе прудовиков активность трипсиноподобных протеиназ изменялась волнообразно с двумя пиками активности через 3 и 24 ч после введения этионина. В гепатопанкреасе катушек этионин вызывал повышение активности трипсиноподоб-



Таблица 3. Влияние этионина на протеолитическую активность гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков

| Срок наблюдения                | Трипсиноподобные протеиназы (ТпА) |              |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------------|
|                                | Прудовики                         | Катушки      |
| Гепатопанкреас, мкмоль (г · с) |                                   |              |
| Контроль                       | 213 ± 31,5                        | 159 ± 15,2   |
| Через 3 ч                      | 330 ± 24,5*                       | 242 ± 19,3** |
| Через 12 ч                     | 115 ± 19,7*                       | 252 ± 16,8** |
| Через 24 ч                     | 381 ± 29,6*                       | 226 ± 25,2** |
| Через 48 ч                     | 212 ± 27,4                        | 180 ± 16,2   |
| Гемолимфа, мкмоль (мл · с)     |                                   |              |
| Контроль                       | 37,1 ± 3,02                       | 28,8 ± 3,77  |
| Через 3 ч                      | 21,0 ± 2,86*                      | 34,1 ± 6,73  |
| Через 12 ч                     | 20,0 ± 6,95*                      | 31,8 ± 7,12  |
| Через 24 ч                     | 18,3 ± 1,87*                      | 26,4 ± 4,85  |
| Через 48 ч                     | 17,2 ± 0,56*                      | 25,7 ± 5,81  |

\* P < 0,05 по сравнению с контролем.

\*\* P < 0,05 по сравнению между одноименными группами прудовиков и катушек.

ных протеиназ в интервале 3–24 ч. Но значения активности трипсиноподобных протеиназ гепатопанкреаса у катушек были достоверно ниже по сравнению с прудовиками через 3 и 24 ч после введения этионина. Эти данные позволяют сделать предположение, что система протеолиза клеток гепатопанкреаса катушек оказалась более устойчивой к действию этионина по сравнению с прудовиками.

Поскольку оценка трипсиноподобной активности производилась при pH 8,0, вначале было проведено исследование количества ингибиторов протеолиза после введения этионина также при pH 8 (табл. 4).

Установлено, что в гепатопанкреасе обоих видов моллюсков содержание АПИ достоверно возросло уже через 3 ч после введения этионина и достигало максимума через 12 ч (превышение исходного уровня было в 7–20 раз). У прудовиков количество АПИ снижалось до контрольного уровня через 48 ч, а в гепатопанкреасе количество АПИ оставалось повышенным в 8 раз по сравнению с исходными данными. Количество α2-макроглобулина в гепатопанкреасе катушек в 15 раз превышало уровень этого ингибитора протеолиза у прудовиков. После введения этионина количество α2-макроглобулина в гепатопанкреасе прудовиков повышалось до уровня этого показателя в гепатопанкреасе катушек.

Таблица 4. Влияние этионина на антипротеолитическую активность гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков (pH 8,0)

| Срок наблюдения      | Антипротеолитический ингибитор (АПИ) |               | α2-Макроглобулин (α2-МГ) |              |
|----------------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------|--------------|
|                      | Прудовики                            | Катушки       | Прудовики                | Катушки      |
| Гепатопанкреас, мг/г |                                      |               |                          |              |
| Контроль             | 1,04 ± 0,37                          | 0,31 ± 0,08** | 0,44 ± 0,21              | 6,61 ± 0,63  |
| Через 3 ч            | 1,19 ± 0,03*                         | 1,61 ± 0,01** | 2,41 ± 0,15*             | 2,24 ± 0,30* |
| Через 12 ч           | 7,58 ± 1,04*                         | 6,44 ± 0,99*  | 7,60 ± 0,79*             | 7,83 ± 0,52  |
| Через 24 ч           | 5,54 ± 0,61*                         | 4,51 ± 0,09*  | 5,96 ± 0,68*             | 5,86 ± 0,66  |
| Через 48 ч           | 0,68 ± 0,21                          | 2,32 ± 0,08*  | 5,48 ± 0,31*             | 5,77 ± 0,04  |
| Гемолимфа, мг/мл     |                                      |               |                          |              |
| Контроль             | 1,04 ± 0,37                          | 0,59 ± 0,27   | 5,44 ± 0,31              | 5,98 ± 0,43  |
| Через 3 ч            | 0,12 ± 0,01                          | 0,27 ± 0,19   | 6,00 ± 0,09              | 5,65 ± 0,15  |
| Через 12 ч           | 0,15 ± 0,01                          | 0,29 ± 0,04** | 5,86 ± 0,02              | 6,03 ± 0,24  |
| Через 24 ч           | 0,21 ± 0,09*                         | 0,29 ± 0,08   | 5,84 ± 0,03              | 5,77 ± 0,04  |
| Через 48 ч           | 0,29 ± 0,02*                         | 0,42 ± 0,15*  | 6,19 ± 0,08              | 6,20 ± 0,67  |

\* P < 0,05 по сравнению с контролем.

\*\* P < 0,05 по сравнению между одноименными группами прудовиков и катушек.

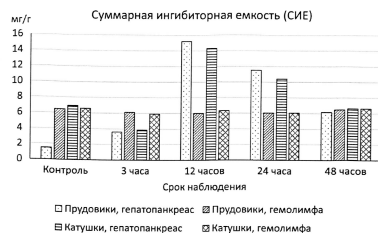


Рис. 4. Влияние этионина на СИЕ гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков (pH 8,0)

У катушек уровень α2-макроглобулина оставался на исходном уровне после кратковременно-го снижения его содержания через 3 ч после введения этионина. Таким образом, можно предположить, что основной реакцией на введение этионина является повышение концентрации ингибиторов протеолиза в гепатопанкреасе, если определение ведется при pH 8,0.

Данные о суммарной ингибиторной емкости (рис. 4) показали, что до введения этионина сумма АПИ и α2-МГ в гепатопанкреасе у прудовиков была в 4,7 раза ниже, чем у катушек.

После введения этионина показатель суммарной ингибиторной емкости (СИЕ) изменялся односторонне, что доказывает наличие общего эффекта повышения антипротеолитической активности после введения этионина у прудовиков и катушек. Поскольку наибольшее повышение величины СИЕ было зарегистрировано через 12 ч у прудовиков в 10 раз, а у катушек только в 2 раза, можно полагать, что катушки могут быть более устойчивыми организмами к действию антимитабита этионина. Это предположение подтверждается данными о более значительном снижении содержания АПИ в гемолимфе прудовиков по сравнению с катушками (см. табл. 3).

В табл. 5 приведены данные о влиянии этионина на содержание ингибиторов протеиназ, определенных при оптимальных значениях pH.

В результате проведенных исследований установлено, что содержание АПИ и α<sub>2</sub>-МГ в гепатопанкреасе у контрольных моллюсков находится на уровне, близком к максимальному их содержанию через 12 ч после введения этионина и определенному при pH 8,0.

Таблица 5. Влияние этионина на антипротеолитическую активность гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков (pH 3,8 при определении АПИ и pH 3,0 при определении α<sub>2</sub>-МГ)

| Срок наблюдения      | АПИ (pH 3,8) |               | α <sub>2</sub> -МГ (pH 3,0) |               |
|----------------------|--------------|---------------|-----------------------------|---------------|
|                      | Прудовики    | Катушки       | Прудовики                   | Катушки       |
| Гепатопанкреас, мг/г |              |               |                             |               |
| Контроль             | 9,59 ± 0,92  | 10,7 ± 1,32   | 17,2 ± 1,16                 | 25,6 ± 2,59*  |
| Через 3 ч            | 9,55 ± 0,74  | 6,01 ± 1,01** | 30,5 ± 2,58*                | 14,3 ± 2,97** |
| Через 12 ч           | 9,24 ± 1,08  | 7,65 ± 1,19   | 26,3 ± 2,40*                | 26,4 ± 3,96   |
| Через 24 ч           | 11,0 ± 1,53  | 9,51 ± 1,64   | 20,4 ± 1,32                 | 25,0 ± 2,39   |
| Через 48 ч           | 18,4 ± 1,90* | 11,9 ± 1,32** | 52,4 ± 4,09*                | 33,4 ± 4,93** |
| Гемолимфа, мг/мл     |              |               |                             |               |
| Контроль             | 9,84 ± 0,16  | 9,82 ± 0,17   | 22,8 ± 2,79                 | 20,1 ± 2,84   |
| Через 3 ч            | 5,12 ± 0,38* | 4,67 ± 1,19*  | 7,02 ± 2,44*                | 11,7 ± 1,81*  |
| Через 12 ч           | 5,59 ± 0,51* | 5,42 ± 1,45*  | 5,26 ± 0,54*                | 4,67 ± 0,73*  |
| Через 24 ч           | 4,11 ± 0,18* | 4,50 ± 0,96*  | 5,22 ± 0,58*                | 3,86 ± 0,55*  |
| Через 48 ч           | 7,17 ± 0,87* | 7,61 ± 0,76*  | 7,08 ± 0,83*                | 9,99 ± 0,87*  |

\* P < 0,05 по сравнению с контролем.

\*\* P < 0,05 по сравнению между одноименными группами прудовиков и катушек.

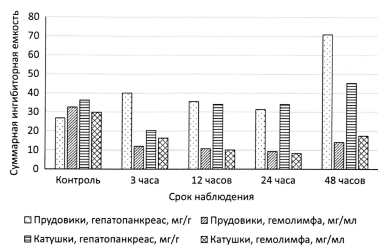


Рис. 5. Влияние этионина на СИЕ гепатопанкреаса и гемолимфы легочных пресноводных моллюсков (определение при оптимальном рН)

Пик содержания АПИ и  $\alpha_2$ -МГ, определенных при оптимальном рН в гепатопанкреасе, сдвигается у прудовиков на 48 ч после введения этионина. В гепатопанкреасе катушек через 3 ч после введения этионина снижено количество АПИ и  $\alpha_2$ -МГ, но в последующие сроки наблюдения эти показатели соответствуют контрольным значениям. В гемолимфе обоих видов моллюсков отмечено одинаковое по величине снижение концентрации АПИ и  $\alpha_2$ -МГ во все сроки наблюдения.

Данные о суммарной антипротеолитической активности гепатопанкреаса и гемолимфы моллюсков представлены на рис. 5.

Анализ содержания ингибиторов при оптимальных значениях рН показал, что в контрольных образцах гепатопанкреаса показатель суммарной ингибиторной емкости у прудовиков всего в 1,35 раза меньше, чем у катушек. Через 48 ч после введения этионина в гепатопанкреасе прудовиков уровень СИЕ превышает контрольные значения в 2,65 раза. У катушек через 3 ч после введения этионина величина СИЕ снизилась в панкреасе в 1,79 раза, но затем значения СИЕ нормализовались. В гемолимфе величины СИЕ в гемолимфе обоих видов моллюсков были снижены через 3–24 ч после введения этионина. Признаки тенденции к нормализации этого показателя просматриваются через 48 ч, причем этот эффект выражен в большей степени у катушек.

На основании полученных данных о влиянии этионина на содержание ингибиторов протеолиза можно сделать заключение о большей устойчивости системы протеолиз-антипротеолиз у катушек по сравнению с прудовиками. Полученные данные представляют существенный интерес для исследования действия субстанций типа этионина, способных оказывать влияние на биосинтез белка и его посттрансляционную судьбу как у модельного организма, так и у человека. При сравнении результатов двух докингов между собой было выяснено, что 6 аминокислот у *Homo sapiens* и у *Biomphalaria glabrata* связываются с этионином. Аминокислоты для *Homo sapiens*: Asp 189, Ser 190, Gln 192, Ser 195, Val 213, Cys 220. Аминокислоты для *Biomphalaria glabrata*: Asp 224, Ser 225, Gln 227, Ser 230, Val 248, Cys 254. Таким образом, места связывания этионина с протеолитическими ферментами человека и легочных пресноводных моллюсков располагаются в близких локациях молекул ферментов, что позволяет рассматривать последних в качестве потенциальных модельных организмов для биофармацевтических исследований системы протеолиз-антипротеолиз.

**Заключение.** Исследование видового разнообразия белков может быть инструментом для понимания как эволюции многоклеточных эукариотических организмов, так и их адаптации к изменяющимся условиям среды обитания. Накопление материалов о межвидовом разнообразии белков, являющемся следствием альтернативного сплайсинга и пострибосомальной трансформации белков, может быть эффективным путем для обоснования и использования достаточно простых, удобных в содержании и недорогих модельных организмов. Показано, что при уменьшении биодоступного кислорода произошла дивергенция легочных моллюсков с образованием гемоцианина из медьсодержащих тирозиназ, относящихся к оксидоредуктазам и, в частности, к фенолокси-

дазам, требующим для катализируемых реакций относительно низкие уровни энергии активации. Это был, вероятно, способ сохранения популяции при длительно существующих неблагоприятных условиях среды обитания. Но в настоящее время катушки как представители легочных моллюсков с гемоглобиновым транспортом кислорода оказались более устойчивыми к действию цитотоксических агентов (этионин, стрептозотцин) по сравнению с прудовиками.

**Литература**

1. Дымшин, Г. М. «Разорванные» гены и сплайсинг / Г. М. Дымшин, О. В. Саблина // Вавилон. журн. генетики и селекции. – 2014. – Т. 18, № 1. – С. 71–80.
2. Black, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing / D. L. Black // Ann. Rev. Biochem. – 2003. – Vol. 72. – P. 291–336.
3. Matlin, A. J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code / A. J. Matlin, F. Clark, C. W. Smith // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2005. – Vol. 6, № 1. – P. 386–398.
4. Blencowe, B. J. Alternative splicing: new insights from global analysis / B. J. Blencowe // Cell. – 2006. – Vol. 126, № 1. – P. 37–47.
5. Jensen, O. N. Interpreting the protein language using proteomics / O. N. Jensen // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2006. – Vol. 7. – P. 391–403.
6. Walsh, G. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins / G. Walsh, R. Jeffers // Nat. Biotechnol. – 2006. – Vol. 24. – P. 1241–1252.
7. Rosenbaum, J. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last / J. Rosenbaum // Curr. Biol. – 2000. – Vol. 10. – P. 801–803.
8. Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features / L. J. Jensen [et al.] // Mol. Biol. – 2002. – Vol. 319. – P. 1257–1265.
9. Чиркин, А. А. Биохимия филогенеза и онтогенеза / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко, С. Б. Бокуть. – Минск : Новое знание : М. : ИНФРА-М, 2012. – 288 с.
10. Алжирская, И. О. Гемоглобин и гемоцианин беспозвоночных (Биохимические адаптации к условиям среды) / И. О. Алжирская. – М. : Наука, 1979. – 153 с.
11. Стадниченко, А. П. Сравнительная характеристика белкового спектра гемолимфы некоторых видов группы *Lymnaea Lamarek (Gastropoda)* / А. П. Стадниченко // Вестн. зоол. – 1974. – № 5. – С. 33–37.
12. Erlanger, D. F. Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / D. F. Erlanger, N. Kokowsky // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95, № 2. – P. 271–278.
13. Хаатов, В. Б. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназ в плазме крови человека : метод. рекомендац. / В. Б. Хаатов, Т. А. Белова. – М., 1981. – 16 с.
14. Lowry, O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
15. Carbon sequestration in an expanded lake system during the Toarcian oceanic anoxic event [Electronic resource] / W. Xu [et al.]. – Mode of access: <http://www.nature.com/ngo/journal/v10/n2/full/ngo2871.html>.
16. Minireview: recent progress in hemocyanin research / H. Decker [et al.] // Integr. Compar. Biol. – 2007. – Vol. 47, № 4. – P. 631–644.
17. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences / K. Magnus [et al.] // Proteins. – 1994. – Vol. 19. – P. 302–309.
18. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков / А. А. Чиркин [и др.] // Новости мед.-биол. наук. – 2016. – Т. 14, № 3. – С. 28–32.

**ALTERNATIVE SPLAYSING AND POST-TRANSLATION MODIFICATIONS INCREASE THE DIFFERENCE OF PROTEINS IN THE CELL**

**A. A. Chirkin, V. V. Dolmatova**

Vitebsk State University named after P. M. Masherov, chir@tut.by

The purpose of this work was to search for an illustration of the feasibility of having a variety of proteins for the evolution and adaptation of multicellular organisms. The objects of the study were two types of pulmonary freshwater mollusks that live in the same reservoirs: *Lymnaea stagnalis* L. and *Planorbis cornuus* L., which differ in the type of oxygen transport. The article shows that with decreasing bioavailable oxygen, there was a divergence of pulmonary mollusks with the formation of hemocyanin from copper-bearing tyrosinases related to oxidoreductases and, in particular, to phenolic oxidases requiring relatively low levels of activation energy for catalyzed reactions. This was probably a way of preserving the population under long-term adverse environmental conditions. But at present *Planorbis cornuus* L. as representatives of pulmonary mollusks with hemoglobin oxygen transport proved to be more resistant to the action of cytotoxic agents (ethionine, streptozotocin) in comparison with *Lymnaea stagnalis* L.

Поступила в редакцию 09.06.2017