

*На правах рукописи*

**Марьясина Софья Семеновна**

**Структура и функции белка WBSCR27,  
ассоциированного с синдромом Вильямса**

1.4.9 «биоорганическая химия»

1.5.3 «молекулярная биология»

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в институте функциональной геномики МГУ имени М.В.Ломоносова.

**Научные руководители**

– **Польшаков Владимир Иванович**  
доктор химических наук

**Сергиев Пётр Владимирович**  
доктор химических наук, член-корреспондент РАН

**Официальные оппоненты**

– **Хомутов Алексей Радиевич**  
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник  
лаборатории молекулярных основ действия  
физиологически-активных соединений Института  
молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта РАН.

**Усачёв Константин Сергеевич**  
доктор физико-математических наук, заведующий  
лабораторией структурного анализа биомакромолекул  
Федерального исследовательского центра «Казанский  
научный центр РАН»

**Минеев Константин Сергеевич**  
доктор химических наук, заведующий лабораторией  
биомолекулярной ЯМР-спектроскопии Института  
биоорганической химии им. академиков М.М Шемякина  
и Ю.А Овчинникова РАН.

Защита диссертации состоится «27» сентября 2022 г. в 16 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 (МГУ.02.03) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: [agapkina@belozersky.msu.ru](mailto:agapkina@belozersky.msu.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о организации защиты и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/482333428/>

Автореферат разослан «\_\_\_» июля 2022 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Агапкина Ю.Ю.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Геном человека содержит около 23000 генов. Предназначение приблизительно четверти из них не установлено — на данный момент нет вообще никакой информации или даже предположения о том, за какие функции могут отвечать приблизительно 6000 генов человеческого генома. Определение назначения генов и кодируемых ими белков помогает решать многие биологические проблемы, а также способствует успехам по внедрению новых технологий в медицине, сельском хозяйстве, криминалистике, фармакологии, промышленности и многих других жизненно важных отраслях.

Быстрое развитие молекулярной биологии и ряда основанных на ней научных направлений (молекулярная фармакология, иммунология, биотехнология, клеточная биология и др.), происходящее в последние десятилетия, во многом обусловлено успехами структурной биологии. Определение строения биологических макромолекул методами рентгеновской кристаллографии, криоэлектронной микроскопии и ядерного магнитного резонанса (ЯМР) часто даёт ключ к пониманию их функций и позволяет создавать методы контроля функциональной активности макромолекул. Так, многие белки являются мишенями действия потенциальных лекарственных препаратов. Современные стратегии поиска новых лекарств основаны на знании строения биомишеней.

Важнейшей группой белков и потенциальных биомишеней для лечения заболеваний человека являются метилтрансферазы (МТазы). Эти ферменты регулирует правильное протекание множества ключевых процессов в живых системах путём катализа метилирования ДНК, РНК, белков и малых молекул, включая эндогенные соединения и лекарственные препараты. Большое количество заболеваний человека связано с нарушениями в работе МТаз, среди них: синдром Боуэна-Конради (аутосомно-рецессивное заболевание, приводящее к смерти в раннем детстве), синдром Ретта (психоневрологическое наследственное заболевание), синдром Вильямса (генетическое заболевание, характеризующееся патологией сердечно-сосудистой системы и умственной отсталостью). Нарушения метилирования играют существенную роль в развитии ревматоидного артрита, системной красной волчанки и многих видов рака.

Таким образом, изучение структуры и функций новых белков и, в частности, МТаз, представляется важной задачей.

### **Цели и задачи исследования**

Целью настоящей работы является изучение структуры и функций белка WBSCR27. Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Произведён поиск потенциального субстрата метилирования WBSCR27.
2. Изучено взаимодействие белка WBSCR27 с низкомолекулярными лигандами.

3. Определена структура и динамические свойства белка WBSCR27 методами спектроскопии ЯМР.

### **Объект исследования**

Объектом исследования в настоящей работе является белок WBSCR27 из *Mus musculus*. Этот белок состоит из 240 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 26,5 кДа.

### **Предмет исследования**

Предметом исследования данной работы являются структура и динамические свойства белка WBSCR27 — в апо-форме, а также в комплексе с S-аденозил-L-гомоцистеином (SAH). Также предметом изучения стали биохимические свойства белка и его функция в клетке.

### **Научная новизна исследования**

В данной работе впервые проводится систематическое исследование белка WBSCR27. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности этого белка указывает на сходство его с группой МТаз семейства ubiE/COQ5. Вместе с тем, поиск гомологов в ряду белков, для которых известна структурная информация, показывает, что ближайшие гомологи – МТазы, вовлечённая в биосинтез убихинона/менахинона из термофильных грамотрицательных бактерий *Thermotoga maritima* (код PDB 2AVN, E-value =  $6e^{-10}$ ) и МТазы из грамположительных почвенных бактерий *Bacillus thuringiensis* (код PDB 3L8D, E-value =  $3e^{-7}$ ) имеют лишь около 30% идентичности аминокислотной последовательности. Ближайшие эукариотические гомологи с известной трёхмерной структурой имеют ещё меньшее сходство с WBSCR27. Поэтому определение структуры WBSCR27 и его динамических свойств представляется актуальной задачей.

В ходе работы впервые определена пространственная структура и динамические свойства этого белка в свободной форме и в форме комплекса с SAH. Впервые проведен поиск субстратов МТазной активности белка WBSCR27. В работе впервые определены такие биохимические свойства белка WBSCR27, как его стабильность в различных условиях и стабильность комплексов с малыми молекулами, которые он образует.

В рамках данной работы впервые проведено изучение методами спектроскопии ЯМР взаимодействия МТазы с низкомолекулярными веществами: SAM, SAH, метилтиоаденозином (МТА), 5'-дезоксаденозином (5'dAdo) и аденином.

### **Научная и практическая значимость исследования**

Белок WBSCR27 ассоциирован с синдромом Вильямса – редким (1 на 20 000 рождённых детей), но тяжёлым генетическим заболеванием, проявляющимся в умственной отсталости, патологиях сердечно-сосудистой системы и психических особенностях (чрезмерное добродушие, приветливость, послушание). Причиной возникновения синдрома Вильямса является делеция участка хромосомы, на котором находится от 25 до 27 генов. Одним из генов, подвергающихся делеции, является ген, кодирующий белок WBSCR27. Единственное,

что было известно о белке WBSCR27 до начала нашего исследования – его аминокислотная последовательность, позволившая отнести его к семейству SAM-зависимых МТаз. МТазы играют регуляторную роль в организме, и, следовательно, возможно, что WBSCR27 может оказаться ответственным за развитие некоторых патологий при синдроме Вильямса. Полученные в ходе выполнения работы данные призваны внести вклад в установление роли белка WBSCR27 в развитии синдрома Вильямса.

В представленной работе определена структура белка WBSCR27 в растворе в свободном виде, а также в виде комплекса с ко-продуктом метилирования SAH. Установленные структуры депонированы в международную базу данных белковых структур Protein Data Bank и в дальнейшем могут использоваться учёными всего мира для продолжения изучения белка WBSCR27, а также для установления структур других белков с помощью гомологичного моделирования.

Отнесение сигналов на ЯМР-спектрах, выполненное для белка WBSCR27 в свободном виде, а также в комплексе в SAH, депонировано в международную базу данных BioMagResBank. Следовательно, эти данные вносят вклад в общее разнообразие представленных в BioMagResBank данных о белках.

### **Методология диссертационного исследования**

Для решения поставленных в настоящей работе задач использован ряд современных методов и подходов, соответствующих мировым стандартам проведения подобного рода исследований.

Ключевой метод, использованный в диссертационном исследовании, — спектроскопия ЯМР – один из трёх основных методов структурной биологии, наряду с рентгеновской кристаллографией и криоэлектронной микроскопией, позволяющий определять строение биомолекул. Исследование биомолекул методами ЯМР даёт информацию об их строении в растворе и динамике с разрешением до отдельных атомов. ЯМР — единственный метод, позволяющий напрямую изучать динамические свойства молекул с разрешением до отдельных атомов и групп.

Кроме того, методы ЯМР предоставляют уникальные возможности для изучения белок-лигандных взаимодействий, что также было использовано в настоящей работе.

Для инактивации и модификации гена *Wbscr27* использован метод CRISPR-Cas9. Для анализа функций белка создано несколько клеточных линий: линии с инактивированным геном *Wbscr27*, линии с регулируемой экспрессией гена *Wbscr27*, а также белка с довеском для иммунопреципитации. Для экзогенной экспрессии применялась система транспозонов Sleeping Beauty.

Белковый состав фракций после аффинного выделения анализировали методами панорамной протеомики с использованием масс-спектрометрической технологии MS/MS и

последующего биоинформатического анализа, позволившего идентифицировать более 1500 белков в одном образце. Используются также методы вестерн-блоттинга и автордиографии.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Белок WBSCR27 принадлежит к классу I SAM-зависимых метилтрансфераз.
2. Белок WBSCR27 прочно связывает S-аденозил-L-метионин (SAM) и S-аденозил-L-гомоцистеин (SAH), а также менее прочно метилтиоаденозин (MTA), 5'-дезоксаденозин (5'dAdo) и аденин.
3. Связывание с кофактором и ко-продуктом метилирования приводит к образованию трёх дополнительных  $\alpha$ -спиралей на неупорядоченном в апо-форме N-конце белка.
4. Белок WBSCR27 обладает нуклеозидазной активностью – медленно катализирует отщепление аденина от производных нуклеозидов (SAH, MTA, 5'dAdo).

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность результатов данного исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями.

### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы были представлены на 19-ти конференциях, семинарах и научных школах различного уровня (11 из которых международные и 1 школа с международным участием), а именно:

1. 12-я Зимняя молодёжная школа-конференция с международным участием «Магнитный резонанс и его приложения. Spinus-2015» (г. Санкт-Петербург, 2015) (приз в номинации «Лучший стендовый доклад»);
2. Международная конференция «1st B3 International Conference for Young Scientists» (Москва, 2016) (приз в номинации «Best presentation»);
3. IV Зимняя школа «Современная биология и Биотехнологии будущего — 2016» (Красная Пахра, 2016) (приз в номинации «Лучшее представление постера»);
4. Международный симпозиум «Магнитный резонанс: от фундаментальных исследований к практическим приложениям» (Казань, 2016) (приз в номинации «Best poster presentation»);
5. Международная конференция «International Conference SocBiN Bioinformatics» (Москва, 2016);
6. V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России (Сочи, 2016);

7. Молодёжный научный форум "Open Science" (Гатчина, 2016);
8. Международная молодёжная школа-конференция «Spinus 2016. Магнитный резонанс и его приложения» (Г. Санкт-Петербург, 2016);
9. Конференция «Moscow Conference on Computational Molecular Biology MCCMB'17» (Москва, 2017);
10. Международная школа «EMBO Practical Course NMR» (Базель, Швейцария, 2017);
11. Международный научный семинар с молодёжной секцией и практической школой «Регуляция экспрессии генов. Метилирование» (Москва, 2017);
12. Международная конференция «12<sup>th</sup> International Scientific Conference on Bioorganic Chemistry devoted to the Memory of Professor Ovchinnikov/Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды"» (Москва, 2017);
13. Вторая школа молодых учёных «Компьютерное моделирование структуры и динамики биомолекул» (Новосибирск, 2018);
14. Международная конференция «EUROMAR 2018» (Нант, Франция, 2018);
15. Международная школа «Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics» (Санкт-Петербург, 2018);
16. Международная практическая школа «Advanced Isotopic Labelling Methods for Integrated Structural Biology» (Гренобль, Франция, 2019);
17. Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма 2019), (Судак, Крым, Россия, 2019);
18. Международная конференция «CCPN 2020 Online Conference» (онлайн, Великобритания, 2020);
19. XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2021» (Москва, Россия, 2021).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Сделано 4 депонирования в международные базы данных: базу структур Protein Data Bank и базу данных по спектральным данным ЯМР Biological Magnetic Resonance Data Bank.

### **Личный вклад автора**

Все экспериментальные данные в рамках диссертационного исследования получены лично автором или при его непосредственном участии.

В работе [1], посвященной отнесению сигналов на спектрах ЯМР белка WBSCR27, все экспериментальные процедуры, включая анализ данных ЯМР и депонирование данных в международную базу BioMagResBank, проведены Марьясиной С.С. лично. В работе [2], посвященной взаимодействию белка WBSCR27 с ко-фактором, также вся экспериментальная работа выполнена Марьясиной С.С. лично: получение образцов белка, разработка способа получения белка в апо-форме, проведение экспериментов по взаимодействию белка с лигандами методом ЯМР, анализ ЯМР-спектров и депонирование данных в базу BioMagResBank. Эксперименты по ИКТ выполнены в коллаборации с группой член-корр. РАН Митькевича В.А. В работе [3], посвященной поиску субстрата метилирования белка WBSCR27, а также его структуре и динамическим свойствам, все эксперименты по определению структуры и динамических свойств белка, включающие получение образцов, измерение спектров ЯМР, анализ спектров и расчёт структуры, проведены Марьясиной С.С. Большая часть экспериментальной работы по поиску мишени метилирования также проведена лично Марьясиной С.С., включая эксперименты по поиску белковых партнёров методами PAR-CLIP и BioID, *in vivo* и *in vitro* метилирование, анализ модификаций РНК в нокаутных по WBSCR27 клетках и взаимодействие белка с низкомолекулярными партнёрами.

Личный вклад автора в проведённое исследование заключается также в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании и проведении экспериментальных процедур, анализе и оформлении полученных результатов, подготовке научных статей и в представлении результатов на научных мероприятиях.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 141 странице и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Приложение». Работа содержит 13 таблиц и 73 рисунка. Библиография включает 184 источника литературы.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности WBSCR27

Анализ аминокислотной последовательности, проведённый с помощью pBLAST, позволил обнаружить МТазный домен pfam13649 (E-value  $3 \cdot 10^{-20}$ ), характерный для суперсемейства SAM-зависимых МТаз. Этот факт указывает на то, что белок WBSCR27 с большой вероятностью принадлежит к этому суперсемейству.

Поиск гомологов среди человеческих белков с известной функцией, выполненный с помощью pBLAST, показал, что ближайшими гомологами WBSCR27 являются WBSCR22 (E-value  $3 \cdot 10^{-9}$ ), GNMT (E-value  $6 \cdot 10^{-8}$ ) и METTL10 (E-value  $6 \cdot 10^{-7}$ ). WBSCR22 известен также как Bud23. Ген, кодирующий этот белок, как и ген WBSCR27 входит в область делеции при синдроме Вильямса. Он кодирует рРНК МТазу, катализирующую метилирование седьмого атома азота гуанина в 18S рРНК. Другой близкий гомолог – GNMT, это N-МТаз глицина – широко распространённый фермент, регулирующий баланс SAM/SAH в клетке. Следующий гомолог – белковая МТаз METTL10. Она селективно катализирует метилирование лизина-318 в белке EEF1A. Как видно, среди ближайших гомологов обнаружены МТазы, отвечающие за метилирование субстратов самых разных классов: РНК, малых молекул и белков.

Несмотря на то, что белок WBSCR27 имеет весьма низкий уровень сходства аминокислотной последовательности с паралогами, он содержит несколько высококонсервативных МТазных мотивов: FYD, ILDVxxGxGL и GVDxSPxML (рис. 1). Из литературы известно, что у других МТаз аминокислотные остатки, образующие эти мотивы, участвуют в связывании SAM.

Также стоит отметить, что в непосредственной близости к гену WBSCR27 в геноме расположено несколько генов рРНК МТаз. Так, упомянутый выше WBSCR22 генерирует m<sup>7</sup>G1639 в 18S рРНК. Он, как и WBSCR27, располагается в области делеции, вызывающей синдром Вильямса. Ген NSUN5, расположенный всего лишь на ~ 0.5 Мп.о. от WBSCR27, кодирует МТазу, отвечающую за модификацию m<sup>5</sup>C4447 в 28S рРНК. Исходя из геномного контекста можно было бы ожидать, что WBSCR27 тоже участвует в метилировании рРНК и, следовательно, играет важную роль в клетке. По этой причине было принято решение попытаться определить субстрат метилирования этого белка методами молекулярной биологии, а также провести его систематическое изучение, включающее определение структуры и биохимических свойств методами спектроскопии ЯМР.

			SAM	SAM				
MET27_MOUSE	3	MT-QEEAGRLPQVLARV----	GTSHGITDLACKLRFYDDW	WAPEYDQDVAALKYRAPR----	LAVDCLS-----	RA 63		
MET27_HUMAN	1	MA-QEEGGSLEPVRARV----	RAAHGIPDLAQKLHFYDR	WAPDYDQDVATLLYRAPR----	LAVDCLT-----	QA 61		
BUD23_HUMAN	1	-----MASRGRRPE--HGG	PPPEL-----	<b>FYD</b> -----	ETEARKYVRNSRMIDIQTR	MAGRALELLY 48		
BUD23_YEAST	1	-----MSRPE--ELAPPEI	-----	<b>FYN</b> -----	DSEAHKYTGSTRVQHIQAK	MTLRALELLN 44		
GNMT_HUMAN	1	-----MVDSVYRTRSLGVAA	EGLP-----	DQYAD-GEARVWQLYIGD	TRSRTA--EYKAWL---	LG 51		
EFMT2_HUMAN	1	MSSGADGGGGAAVARSD--	KGSPGEDGFVPSALGTR	EHWD	DAVYERELQTFREYGD	TGEIWFGEESMNRLIRWQ 73		
			SAM	SAM	SAM			
MET27_MOUSE	64	FRGSPHDALILDVACGTGLV	AVELQARGFLQVQGVDSPEML	KQARARGLYHH----	LSLCTLGQE-----	125		
MET27_HUMAN	62	LPGPPHSALILDVACGTGLV	AAELRAPGFLQLHGVDS	SPGMLQEAQAPGLYQR----	LSLCTLGQE-----	123		
BUD23_HUMAN	49	LPE-NKPCYLLDIGCGTGLS	GSYLSDEG-HYWVGLDI	SPAMLE	DEAVDREIEGD----	LLLGD MGQ-----		
BUD23_YEAST	45	LQ---PCSFILDIGCGSGLS	GEILTQEGDHVWCGLDI	SPSMLAT	GLSRELEGD----	LMLQDMGT-----		
GNMT_HUMAN	52	LLRQHGCQRVLDVACGTGV	DSIMLVEEGFS-VTSVD	ASDKMLKYALKERWNR	RHEPAFDKVVIEE	ANWMTLDDKD- 124		
EFMT2_HUMAN	74	KHKIPLDASVLDIGTGN	GVFLVELAKFGFSNIT	GIDYSPSAIQLSGSI	IEKEG----	LSNIKLVKVEDFLNLSTQL 144		
MET27_MOUSE	126	---PLPDP	EGTDFDAVIIVGAL	SEGVPCSA-----	IP	ELLRVTKPGGLVCLTTRTNPS----- 175		
MET27_HUMAN	124	---PLPSP	EGTDFDAVIIVGAL	SDGQVPCNA-----	IP	EL-HVTKPGGLVCLTTRTNSS----- 172		
BUD23_HUMAN	108	---GIPFK	PGTDFDGCISISAV---	QWLCNANKKSEN	PAKRLYCF	FASLFSVLVGRSRAVLQLYPENS----- 168		
BUD23_YEAST	103	---GIPFR	AGSFDAAISISAI---	QWLCNADT	SYNDPKQRLMRF	FNTLYAALKKGGKFVAQFYPKND----- 163		
GNMT_HUMAN	125	---VPQSA	EGGDFDAVICLGNS	FAHLPDCKGQ	QSEHRL-----	ALKNIASMVRAGLLVIDHRNYDHILSTGCAP 190		
EFMT2_HUMAN	145	SGFHICIDK	GTDAISLNP	DAIE-KRKQY-----	VKSL	SRVLKVKGFLLITSCN----- 193		
MET27_MOUSE	176	---NLPYK	ETLE-ATLDSLERAGV	WECLVTPQVDHWELATS-----	EQ	ETG-----L----- 218		
MET27_HUMAN	173	---NLQYK	EALE-ATLDRLEQAG	MWEGLVAVPVDRLW	TAGSWLPPSWR-WYPAS	LPRMASSPA-----L----- 231		
BUD23_HUMAN	169	-----E	QLE-LIT	TQATKAGFSGGMVVDY	PNSAKAKK	FYLCLFSG--PSTF	IPEGLSENQDEVEPRESVFTN 232	
BUD23_YEAST	164	-----D	QVD-DILQSAK	VAGFSGGLVDDPES	KNKYYLVLSG--	APPQGEQVNL	DGVMTD-EENVNLK 226	
GNMT_HUMAN	191	PGKNIYYK	SDLT	TKDVTSV-----	LIVNNAH-----	MVTL	DYT---VQVP---GAGQD	GSPGLSKFRL 243
EFMT2_HUMAN	194	---WTKE	ELLN-----	EF--SEGWS-----	TVAG	FWLTAALTSWAQAI	FSTASASR-----V----- 234	
MET27_MOUSE	219	-----	GTCANDGFISGIIYL-----			YRKQETV- 240		
MET27_HUMAN	232	-----	STCTESGRRRPLRK-----			245		
BUD23_HUMAN	233	-----	ERFPLRMSRRGMV	RSRAWLEKKERHRR	QGREVRPDTQY	TGRKRKPRF----- 281		
BUD23_YEAST	227	-----	KLRQLKGGKDKESAKS	FILRKKELMKRRGR	KVAKDSKFTGRKR	HRF----- 275		
GNMT_HUMAN	244	SYYPHCLAS	FTELLQAAFGGK	QHSVLGDFKPYK-----	PGQTYIPCYFI	HVLKRTD-- 295		
EFMT2_HUMAN	235	-----	GGTTGTHHNAWII	FVFLAETRFCHVV	QAGLELLGSSD	SPTWPPKVLGLYHARPSLA 290		

Рис 1. Выравнивание последовательностей белка WBSCR27 и его ближайших эукариотических гомологов. Аминокислотные остатки с высокой степенью консервативности выделены жирным. Позиции, содержащие аминокислотные остатки со схожими свойствами, выделены серым. Указаны аминокислотные остатки, участвующие в связывании кофактора (SAM), определённые с использованием 3D-структуры комплекса Bud23-SAM (PDB ID 4QTU).

## 2. Функции белка WBSCR27 не ясны

Для определения биологической роли белка WBSCR27 проведена серия экспериментов по поиску его субстрата метилирования и партнёров в клетках эукариот.

### Инактивация гена WBSCR27 не летальна

Для поиска потенциальных субстратов WBSCR27 мы инактивировали ген Wbscr27 с помощью системы CRISPR/Cas9 в клетках линии NIH3T3. Для этого во второй экзон внесли мутацию, нарушающую рамку считывания на обоих аллелях, что приводит к появлению преждевременного стоп-кодона (рис. 2А). Клетки оказались жизнеспособными, фенотипические проявления у нокаутных клеток отсутствовали.

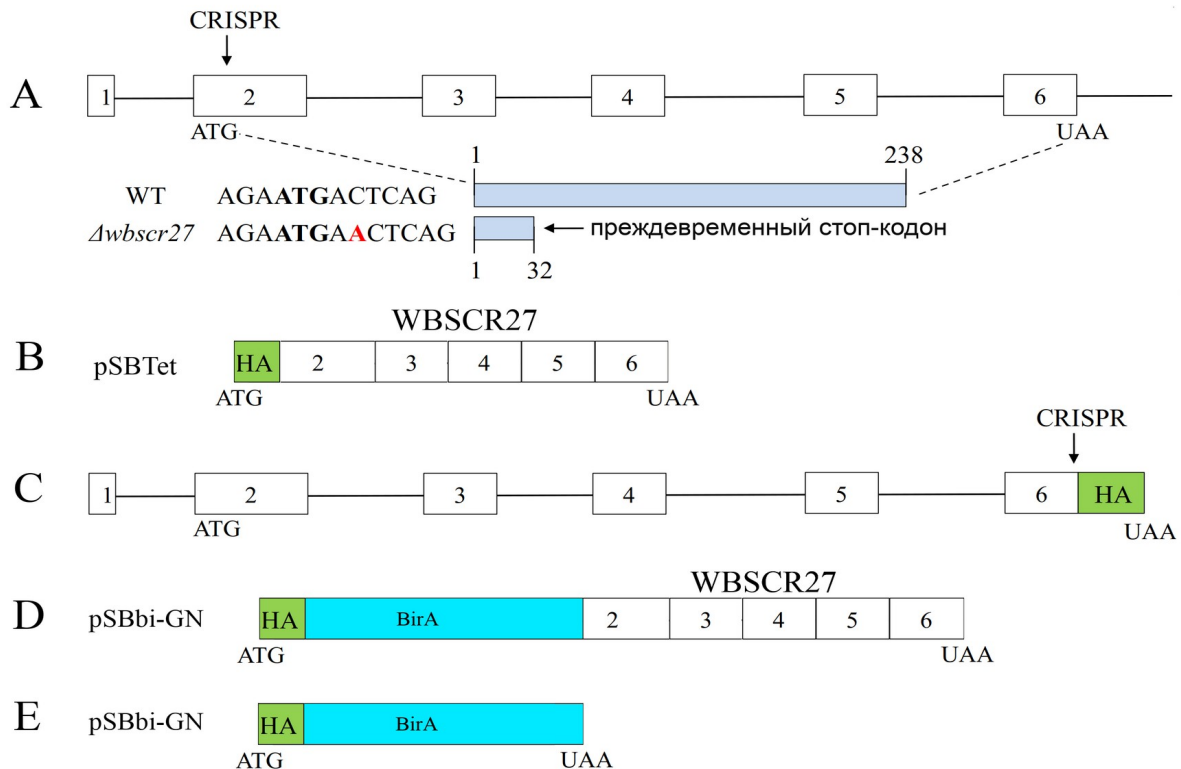


Рис 2. Клеточные линии на основе NIH3T3, созданные в рамках настоящего исследования. **A.** Нокаутная линия, содержащая биаллельную точечную мутацию во 2-м экзоне, используемая для изучения фенотипических последствий инактивации гена *Wbscr27*. Преждевременный стоп-кодон, появляющийся из-за сдвига рамки считывания, приводит к получению продукта из 32-х аминокислот (показано на диаграмме ниже). **B.** Клетки с эктопической экспрессией HA-WBSCR27, используемые для экспериментов по ко-иммунопреципитации. **C.** Клеточная линия с эндогенной экспрессией WBSCR27-HA, используемая в экспериментах по ко-иммунопреципитации. **D.** Клеточная линия с эктопической экспрессией WBSCR27-BirA\*-HA, созданная для эксперимента BioID. **E.** Клеточная линия, экспрессирующая BirA\*-HA, использованная в качестве контроля в эксперименте BioID

Кроме того, в параллельном эксперименте в нашем коллективе получены линии мышей со сдвигом рамки считывания в области гена *Wbscr27*. Мыши оказались жизнеспособными, ярко-выраженные различия в фенотипе между животными дикого типа и нокаутными отсутствовали.

### WBSCR27 не обуславливает метилирование 28S рРНК

В настоящее время для большинства метилированных нуклеотидов в рРНК известны ферменты, ответственные за их модификацию. Единственный метилированный нуклеотид рРНК млекопитающих, для которого фермент, ответственный за модификацию, ещё не установлен, — это  $m^3U4530$  в 28S рРНК. Этот нуклеотид расположен в пептидилтрансферазном центре большой субъединицы рибосомы. Чтобы проверить, связана ли данная модификация с ферментативной активностью WBSCR27 мы использовали метод

остановки обратной транскрипции. Эксперимент показал, что WBSCR27 не отвечает за модификацию U4530 и, следовательно, рРНК не может быть его субстратом метилирования.

### **WBSCR27 не образует комплексы с белками и РНК**

Для того, чтобы определить предполагаемые партнёры, с которыми взаимодействует белок WBSCR27, мы провели эксперименты по **ко-иммунопреципитации**. Для этого на основе мышинной линии NIH3T3 получили две клеточные линии, экспрессирующие белок WBSCR27 с HA-тагом: с регулируемой эктопической экспрессией HA-WBSCR27 (рис. 2B) и с экспрессией WBSCR27-HA на природном уровне (рис. 2C). В обоих случаях ко-иммунопреципитация не привела к идентификации потенциальных партнёров WBSCR27.

Многие белки устанавливают лишь временные, непрочные контакты со своими партнёрами, которые в ходе иммунопреципитации разрушаются. Для проверки такой возможности для WBSCR27 провели ко-иммунопреципитацию с использованием формальдегидных кросс-сшивок, однако применение кросс-сшивки также не привело к идентификации белков-партнёров.

Альтернативным подходом к идентификации короткоживущих взаимодействий белок-белок является эксперимент **BioID**, основанный на экспрессии гена гибридного белка, состоящего из исследуемого белка и присоединенного к нему домена BirA\*. Этот домен представляет собой мутированный вариант бактериальной биотин-лигазы BirA, он способен неспецифически присоединять биотин к остаткам лизина любых белков, расположенных поблизости. Таким образом, выделив биотинилированные белки из клеток, экспрессирующих гибридный белок, можно идентифицировать его белковые партнёры. Для проведения эксперимента получили соответствующие клеточные линии (рис. 2D и F). Эксперимент выполнили в трёх биологических репликах. В образцах биотинилированных иммунопреципитатов удалось идентифицировать от 500 до 1500 различных белков, среди которых нашли 81 белок, имеющийся в опытных образцах, но отсутствующий в контроле. Однако ни один из этих белков не был обнаружен даже в двух биологических репликах, следовательно, их следует отнести к биологическому шуму. Таким образом, выявить белки-партнёры потенциальной МТазы WBSCR27 методом BioID не удалось.

Чтобы идентифицировать потенциальные партнёры белка WBSCR27 среди молекул РНК мы применили протокол **PAR-CLIP**, основанный на выращивании клеток в присутствии 4-тиоуридина с последующим УФ-облучением для индуцирования кросс-сшивок РНК-белок. Однако и в этом случае никакие потенциальные партнёры МТазы WBSCR27 не были обнаружены.

### **WBSCR27 не катализирует метилирование макромолекул в реакциях *in vitro***

Для поиска субстрата метилирования белка WBSCR27 проведены эксперименты по *in vitro* метилированию возможных субстратов радиоактивным <sup>14</sup>C-меченым по метильной

группе SAM в присутствии рекомбинантного белка WBSCR27, однако продукты метилирования среди РНК и белков обнаружены не были.

### **Инактивация гена WBSCR27 не влияет на количество модифицированных нуклеотидов в тРНК**

Среди тРНК имеется несколько позиций метилирования, для которых до сих пор не найдены соответствующие МТазы. Для проверки возможности участия WBSCR27 в установлении этих модификаций сравнили общее количество модифицированных нуклеотидов в тРНК в клетках дикого типа и нокаутных по WBSCR27 методами хромато-масс-спектрометрии в коллаборации с Tsutomu Suzuki (Graduate School of Engineering, Университет Токио). Измерения, проведённые на образцах тРНК, расщеплённых до отдельных нуклеотидов, показали, что количество 34-х модифицированных оснований значимо не изменяется при инактивации гена WBSCR27.

### **WBSCR27 не распознает фрагменты потенциальных субстратов**

Проведена проверка способности белка WBSCR27 узнавать фрагменты потенциальных субстратов. Для этого использован подход, применяющийся в методе поиска соединений-лидеров, основанном на исследовании взаимодействия с молекулярными фрагментами (fragment based lead discovery). В основе этого подхода лежит способность метода ЯМР обнаруживать высокоспецифичные взаимодействия, с помощью которых небольшие фрагменты более крупных лигандов узнаются белками даже в случае слабого связывания.

Мы исследовали взаимодействие малых молекул, имитирующих фрагменты макромолекул, с  $^{15}\text{N}$ -меченым комплексом WBSCR27/SAM методами гетероядерной ЯМР-спектроскопии. В качестве фрагментов макромолекул использовали аминокислоты (Thr, Ser, Arg, Tyr, Cys, Glu и Lys), нуклеозиды (гуанозин, уридин, цитидин, тимидин) и олиго-дезоксирибонуклеотид, моделирующий взаимодействие с основной цепью ДНК.

Ни одно из исследованных низкомолекулярных веществ не вызывало изменений химических сдвигов  $^1\text{H}$  и/или  $^{15}\text{N}$  амидных групп белка WBSCR27, следовательно, специфическое узнавание данных фрагментов белком отсутствовало.

### **WBSCR27 не катализирует метилирование низкомолекулярных веществ**

С помощью предложенного нами метода была предпринята попытка поиска субстрата *in vivo* методом ЯМР с использованием  $^{13}\text{CH}_3$ -SAM. Идея предложенного метода заключалась в выращивании эукариотических клеток в среде, содержащей  $^{13}\text{C}$ -метионин. Весь SAM, биосинтезируемый клеткой, генерируется из метионина, поэтому при выращивании клеток в такой среде все  $\text{CH}_3$ -группы, вводимые МТазами в различные молекулы, должны содержать изотоп  $^{13}\text{C}$ .

Опыт проводили параллельно на нокаутных по Wbscr27 клетках, клетках дикого типа и клетках, оверэкспрессирующих WBSCR27. После экстракции метаболитов регистрировали

$^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC-спектры, на которых ожидали обнаружить искомую малую молекулу по разнице сигналов, однако вариабельность спектров оказалась столь высока, что идентифицировать субстрат по ним не удалось.

Для устранения проблемы вариабельности метаболитов в клетках провели эксперимент по *in vitro* метилированию  $^{13}\text{C}$ -меченным по метильной группе SAM. Однако в этом случае полученные в результате экспериментов спектры  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC не различались.

Таким образом, несмотря на все усилия, ни одна из попыток идентификации субстрата не увенчалась успехом, что, вероятно, должно объясняться низкой концентрацией либо полным отсутствием субстрата МТазы WBSCR27 в клетках.

### 3. WBSCR27 взаимодействует с низкомолекулярными веществами

Как показали наши эксперименты, WBSCR27 способен взаимодействовать с SAM, SAH и родственными соединениями.

#### WBSCR27 выделяется из бактериальных клеток в комплексе с SAM или SAH

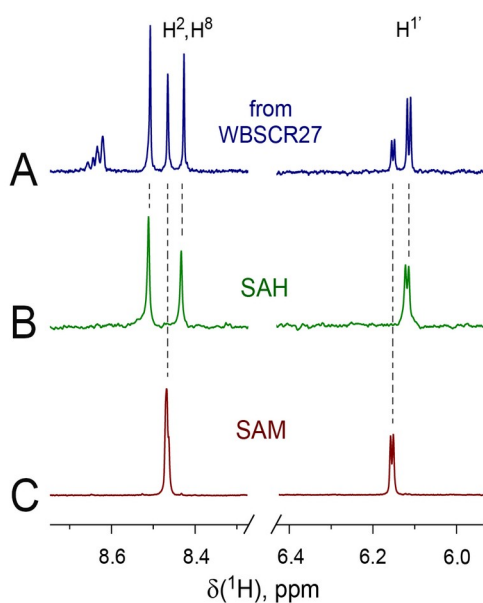


Рис 3. Определение лиганда, совыделяющегося с белком WBSCR27. Интегральная интенсивность сигналов показывает молярное соотношение 1:2,7 между концентрацией SAM и SAH

$^1\text{H}$ -спектр ЯМР. С помощью этого метода удалось показать, что белок WBSCR27 выделяется из клеток *E. coli* в виде смеси из двух комплексов – WBSCR27/SAM и WBSCR27/SAH в соотношении 1:2,7 (рис. 3).

Первые ЯМР-спектры, измеренные для белка WBSCR27, не воспроизводились от образца к образцу. Они содержали больше сигналов, чем можно было бы ожидать от белка из 240 аминокислотных остатков. При этом добавление избытка SAM или SAH приводило к упрощению спектров и исчезновению некоторых дублирующих сигналов. Всё это указывало на то, что белок WBSCR27 совыделяется с SAM или SAH.

Для проверки этого факта мы разработали протокол определения состава комплекса белка с совыделяющимся лигандом основанный на ЯМР. Белок, выделенный из *E. coli*, лиофилизировали, растворили в  $\text{D}_2\text{O}$  и денатурировали кислотой DCI (довели pH до 1). Спустя сутки выдерживания при комнатной температуре выпавший денатурировавшийся белок отделили центрифугированием, а для супернатанта измеряли

### Апо-форма WBSCR27 может быть получена с помощью рефолдинга

Для получения образцов белка в апо-форме разработали протокол, основанный на способности белка к ренатурации после полной денатурации 8М мочевиной. При этом выяснилось, что если делать ренатурацию путём диализа денатурированного белка в физиологическом буфере, то ренатурация происходит быстрее, чем диффузия лиганда через диализную мембрану, в итоге большая часть белка, сворачиваясь, захватывает лиганд, вновь образуя комплекс. Таким образом, для получения апо-формы требуется дополнительный шаг очистки — после денатурации белка мочевиной необходимо проводить диализ в денатурирующий буфер (содержащий 8М мочевины) в течение ночи. В этом случае лиганд успевает диффундировать через диализную мембрану, и последующая смена буфера на физиологический приводит к сворачиванию белка в виде апо-формы. Этот способ позволяет почти количественно переводить WBSCR27, полученный в клетках *E. coli*, в состояние апо-формы.

Используя этот подход удалось получить образцы  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -WBSCR27 в виде апо-формы в количестве, достаточном для измерения 3D-спектров, требуемых для отнесения сигналов и определения структуры апо-формы белка, а также детального изучения взаимодействия белка с низкомолекулярными веществами.

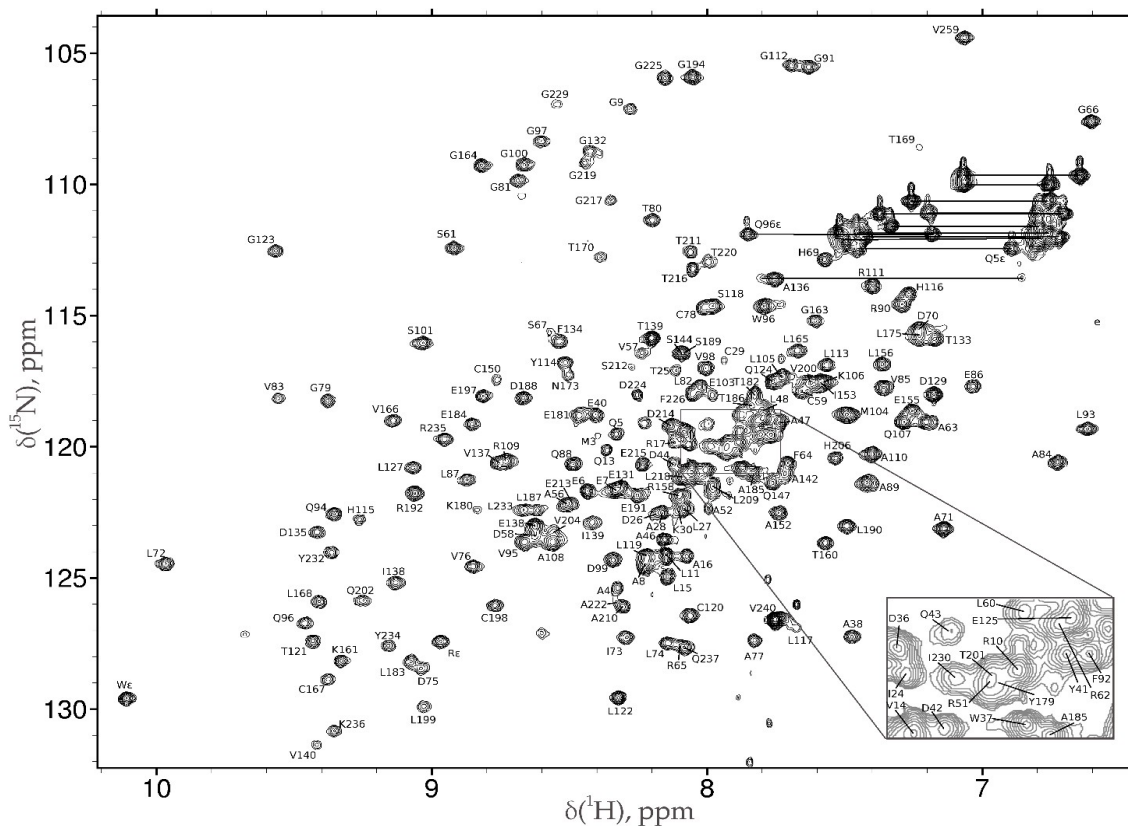


Рис 4. Спектр  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC апо-формы белка WBSCR27. Отмечены номера аминокислотных остатков.

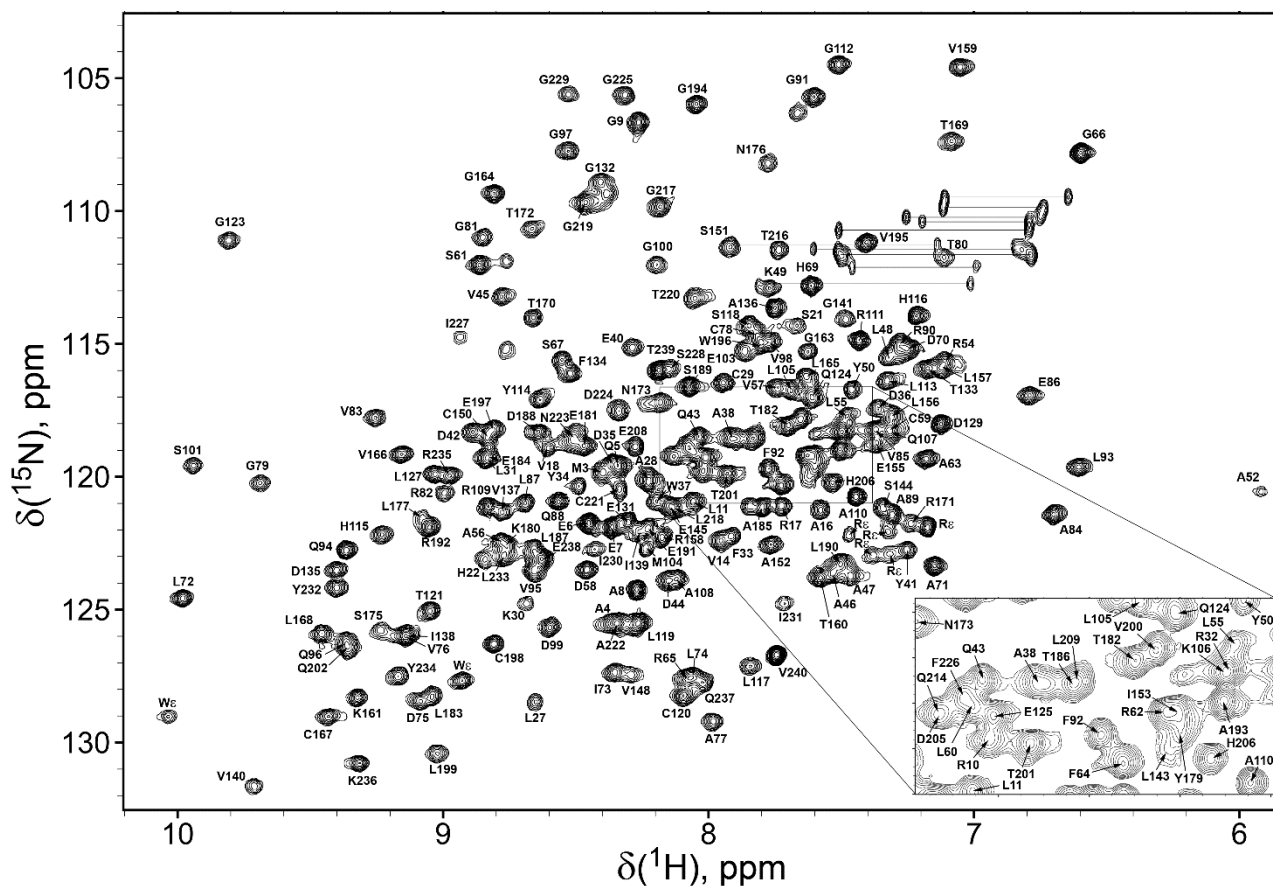


Рис 5. Спектр  $^{15}\text{N},^1\text{H}$  HSQC комплекса WBSRC27/SAH. Отмечены номера аминокислотных остатков.

### Отнесение сигналов на спектрах ЯМР

Важнейшим шагом в большинстве ЯМР-исследований является отнесение сигналов на спектрах ЯМР – то есть получение информации о химических сдвигах атомов. В ходе настоящей работы на основании анализа серии гетероядерных 3D-экспериментов ЯМР выполнено отнесение сигналов  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  атомов белка WBSRC27 в свободном виде и в виде комплекса с SAH. Спектры  $^{15}\text{N},^1\text{H}$  HSQC, отражающие отнесение амидных атомов NH для белка WBSRC27, приведены на рис. 4 (апо-форма) и 5 (комплекс).

Отнесение сигналов белка WBSRC27 депонировано в международную базу данных BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) под номерами BMRB-27578 для апо-формы белка и BMRB-27417 для комплекса WBSRC27/SAH.

Кроме того, выполнено отнесение сигналов  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  в молекуле SAH, находящейся в связанном с белком состоянии. Для этого понадобилось разработать методику получения  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -меченного SAH. Она заключалась в экспрессии и выделении из *E.coli* комплекса  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -WBSRC27/SAH с последующей денатурацией белка и очисткой со-выделившегося с ним лиганда. Из полученного  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -SAH готовили комплексы с немеченным белком.



### Стабильность бинарных комплексов WBSCR27 с SAM и SAH

Разработка метода получения белка WBSCR27 в виде апо-формы позволила подробно изучить его взаимодействие с кофактором метилирования SAM и ко-продуктом метилирования SAH. Спектры  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC, измеренные для комплекса WBSCR27 с SAH без избытка лиганда, показали, что при 35 °C комплекс медленно превращается в апо-форму (рис. 6). Конверсия ~90% происходит за ~17 дней и сопровождается появлением на  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах сигналов аденина — продукта разложения SAH.

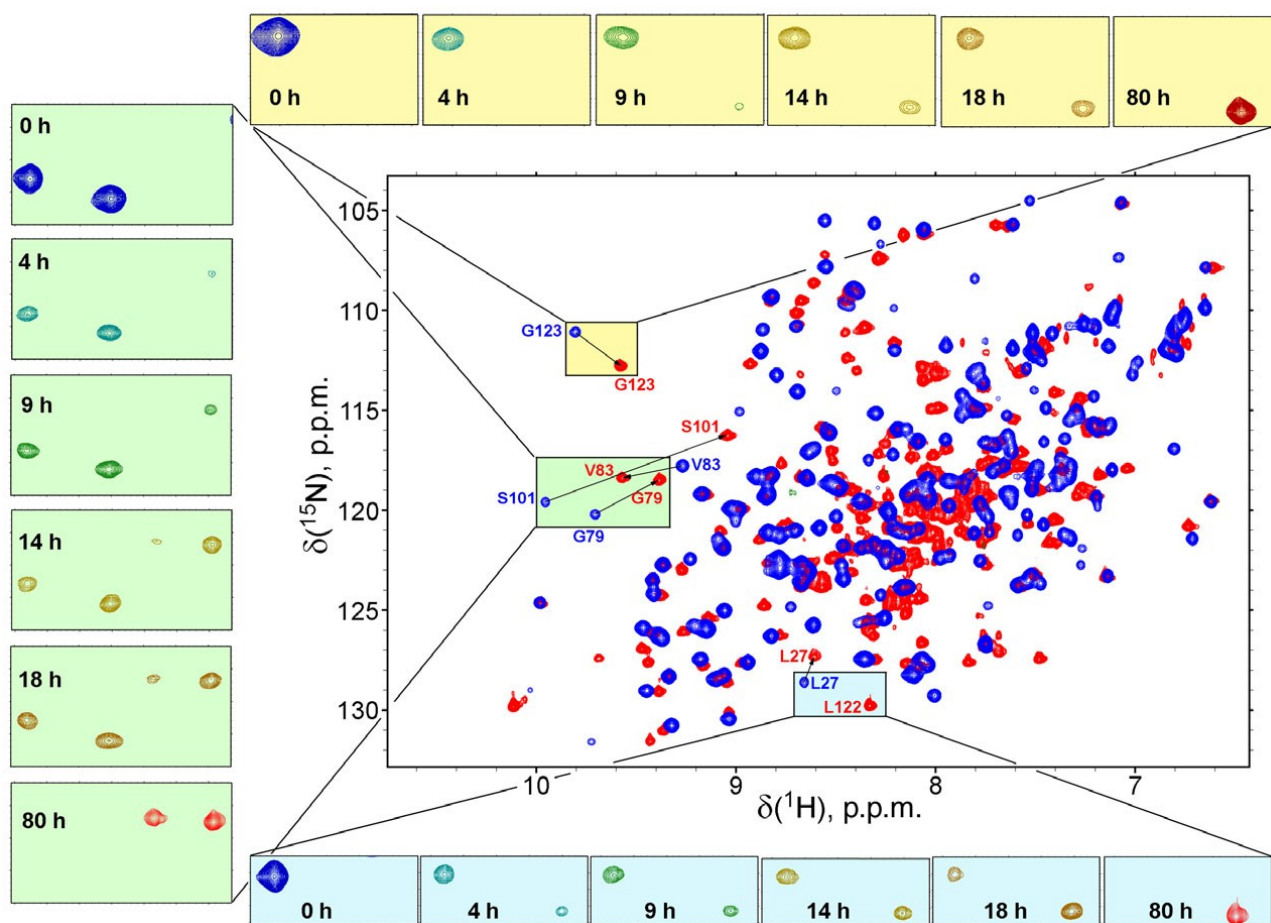


Рис 6. Превращение комплекса WBSCR27/SAH в апо-форму с течением времени. В центре — наложение спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC WBSCR27/SAH (синий) и апо-WBSCR27 (красный). На вставках по периметру показаны отдельные фрагменты спектров, измеренные через определённые промежутки времени при температуре 35 °C. Исчезновение характерных сигналов комплекса и появление сигналов апо-формы указывает на то, что комплекс медленно превращается в апо-WBSCR27.

Комплекс WBSCR27/SAM гораздо менее устойчив, чем WBSCR27/SAH: SAM, связанный с белком, подвергается деметилированию, превращаясь в SAH. Это сопровождается накоплением комплекса WBSCR27/SAH, который можно наблюдать на спектрах уже спустя 1

час инкубации при 37°C после приготовления комплекса WBSCR27/SAM (рис. 7). Время полужизни кофактора в связанном с белком состоянии оценивается в диапазоне от 4 до 5 ч.

### Взаимодействие WBSCR27 с SAM и SAH продуктами его расщепления

Для детального изучения взаимодействия SAM, SAH, МТА, 5'dAdo и аденина с WBSCR27 использовали гетероядерную спектроскопию ЯМР и изотермическую калориметрию титрования (ИКТ). Для выполнения ЯМР-экспериментов апо-форму  $^{15}\text{N}$ -WBSCR27 титровали увеличивающимся количеством исследуемых лигандов.

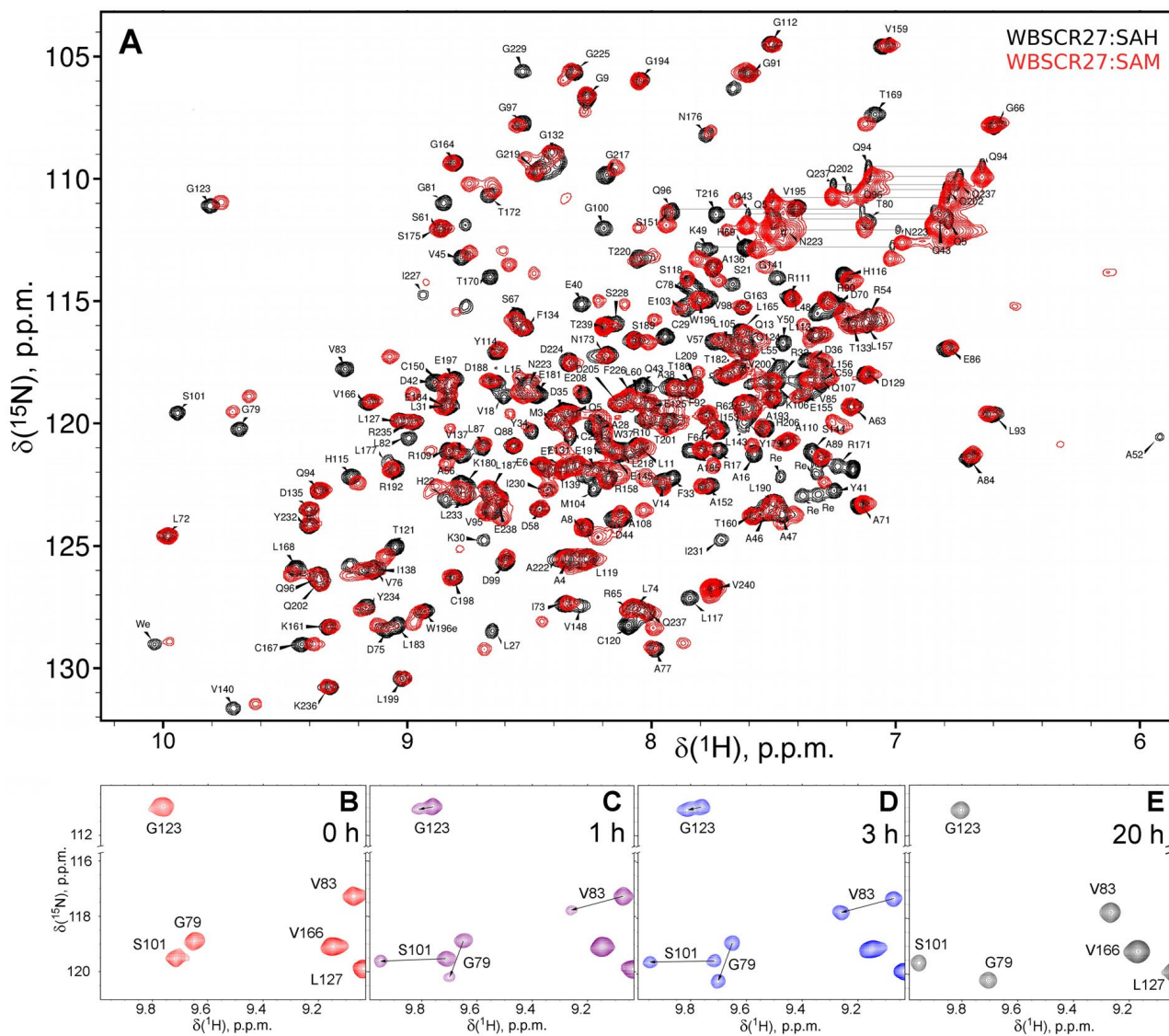


Рис 7. Превращение комплекса WBSCR27/SAM в комплекс WBSCR27/SAH. (A) Наложение спектров  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC комплекса WBSCR27/SAM (красный) и WBSCR27/SAH (черный). (B–E) Репрезентативные фрагменты спектров  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC WBSCR27/SAM, измеренных сразу после добавления эквимольного количества SAM к белку (B) и через 1, 3 и 20 ч инкубации при 35 °C (C, D и E, соответственно). Появление сигналов комплекса WBSCR27/SAH указывает на деметилирование SAM

Мы обнаружили, что комплексы WBSCR27 с SAM и SAH находятся в состоянии медленного обмена (в шкале времени ЯМР): при избытке белка на спектрах присутствуют два набора сигналов — апо-формы белка и комплекса.

С помощью ИКТ получили термодинамические характеристики взаимодействия WBSCR27 с SAM и SAH при 15, 25 и 37 °С. Стехиометрия связывания обоих лигандов составила 1:1. Термодинамические параметры, полученные в результате обчёта кривых титрования, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Термодинамические параметры взаимодействия белка WBSCR27 с SAM, SAH (определены с помощью ИКТ), MTA и 5'dAdo (определены с помощью ЯМР).

	$K_a \times 10^{-6}, M^{-1}$			$\Delta H, \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$			$\Delta S, \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$			$\Delta C_p, \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
	15°C	25°C	37°C	15°C	25°C	37°C	15°C	25°C	37°C	
SAM	2,33	0,93	0,55	-19,2	-26,2	-39,6	-10,8	-18,0	-31,6	-530
SAH	12,2	4,7	0,57	-22,3	-28,7	-38,7	-12,9	-19,6	-30,5	-660
MTA			40							
5'dAdo			60							

Таким образом показано, что белок WBSCR27 прочно связывает молекулы SAM и SAH, что подтверждает предположение о его MТазной функции. Интересно отметить, что SAH, копродукт реакции метилирования, связывается с белком прочнее, чем SAM, кофактор данной реакции. Подобная ситуация является довольно редкой, хотя и не уникальной для MТаз. Тем не менее, в большинстве случаев продукт реакции связывается с белком менее прочно, для того, чтобы иметь возможность покинуть реакционный центр после протекания реакции.

С помощью метода ЯМР-титрования установлена способность белка WBSCR27 образовывать комплексы не только с молекулами SAM и SAH, но и с MTA, 5'dAdo и аденином. 5'dAdo и MTA, также как и SAH, являются природными метаболитами SAM. Связывание этих молекул с WBSCR27 происходит менее прочно, чем SAM и SAH: при титровании наблюдается постепенное смещение сигналов апо-формы белка в сторону комплекса. Рассчитанные по данным титрования значения  $K_d$  для 5'dAdo и MTA приведены в табл. 1.

На рис. 8 показаны результаты картирования изменений, происходящих с белком WBSCR27 при связывании упомянутых низкомолекулярных лигандов, на его аминокислотную последовательность. Видно, что все лиганды, включая аденин, вызывают изменения в петлях, расположенных между  $\beta$ -цепочками и  $\alpha$ -спиралями, причём максимально велики эти изменения при связывании SAM и SAH, меньше при взаимодействии с MTA и 5'dAdo, при взаимодействии с аденином они невелики. Можно заключить, что MTA, 5'dAdo и аденин узнаются белком в сайте связывания SAM/SAH,

образуя связи с теми же аминокислотными остатками белка, однако связывание происходит менее прочно и, в отличие от SAM/SAH не вызывает изменений в N-концевом участке.

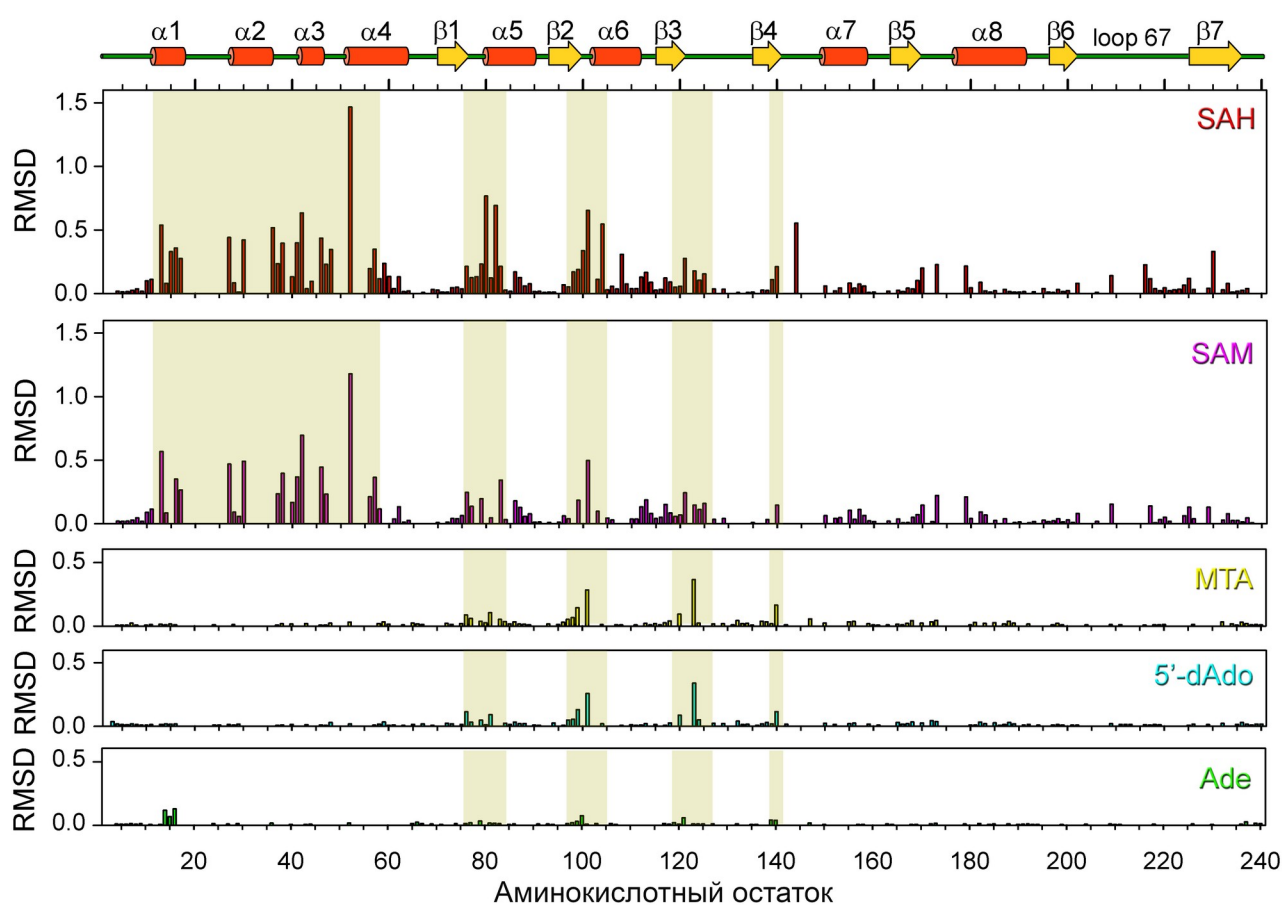


Рис 8. Гистограммы изменений химического сдвига атомов  $1\text{H}$  и  $15\text{N}$  амидных групп между apo-WBSCR27 и его комплексами: WBSCR27/SAH, WBSCR27/SAM, WBSCR27/MTA, WBSCR27/5'dAdo и WBSCR27/аденин. Изменения химических сдвигов для каждого  $i$ -го остатка (RMSD) рассчитывали с использованием уравнения:  $RMSD_i = ((\Delta\delta(^1\text{H}_i))^2 + (\Delta\delta(^{15}\text{N}_i)/25)^2)^{1/2}$

### WBSCR27 предпочтительно связывает биологически активный (S,S)-SAM

Атом серы в SAM представляет собой хиральный центр, причём оба эписмера (R и S) стабильны (рис. 9А). В клетках природный SAM, (S,S)-эписмер, биосинтезируется из L-метионина и АТФ с помощью метионин-аденозилтрансферазы. Химически синтезированный SAM содержит оба эписмера в равных количествах. С помощью 2D-ЯМР с использованием химически синтезированного  $^{13}\text{CH}_3$ -меченого рацемического (S,S/R,S)-SAM мы продемонстрировали, что WBSCR27 предпочтительно связывает (S,S)-эписмер. При избытке рацемического SAM с белком связывается только (S,S)-SAM, тогда как (R,S)-эписмер остаётся в свободной форме (рис. 9В, слева). При увеличении содержания WBSCR27 появляются сигналы связанной формы (R,S)-SAM, но их интенсивность значительно ниже,

чем у сигналов комплекса (S,S)-SAM-WBSCR27 (рис. 9В, справа). Это указывает на более низкую аффинность (R,S)-эпимера к белку, по сравнению с (S,S)-эпимером.

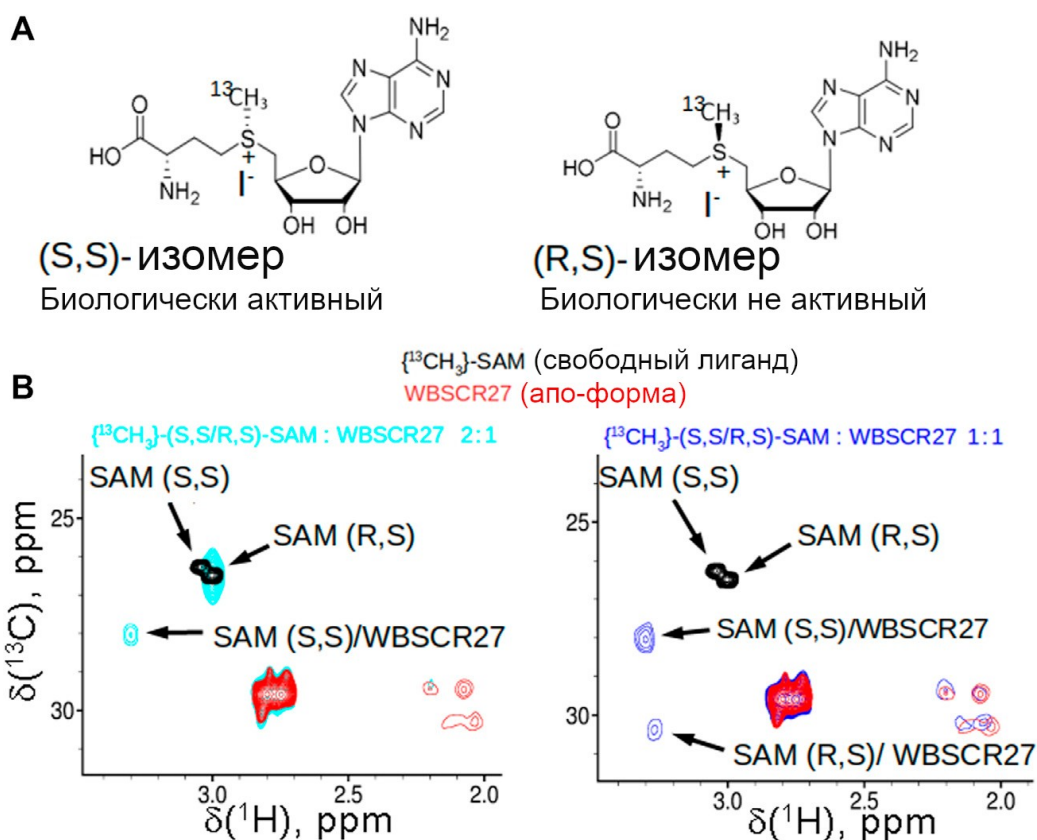


Рис 9. Стереоизомеры SAM и их связывание с WBSCR27. **A.** Два стабильных эпимера SAM: биологически активный (S,S)-SAM, синтезируемый ферментативно из АТФ и метионина в клетках, и (R,S)-SAM, который получается в качестве побочного продукта синтетическим путем. **B.** Суперпозиция фрагментов  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-спектров рацемического  $^{13}\text{CH}_3$ -меченого (R,S/S,S)-SAM (черный), апо-WBSCR27 (красный) и смеси SAM и белка в соотношении 2:1 (голубой, слева) или 1:1 (синий, справа)

#### 4. Нуклеозидазная активность WBSCR27

Обнаружена способность WBSCR27 катализировать отщепление аденина от молекулы SAH. Эксперименты по изучению скорости реакции расщепления SAH показали, что реакция протекает очень медленно — полупревращение SAH при соотношении WBSCR27:SAH 1:10 достигается за 14 дней.

С помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР показано, что WBSCR27 катализирует отщепление аденина не только от SAH, но и от двух других продуктов метаболизма SAM — MTA и 5'dAdo, являясь таким образом трёхсубстратным ферментом (рис. 10). Схемы реакций приведены на рис. 11. При этом отщепление аденина от аденозина, имеющего близкую структуру, не происходит.

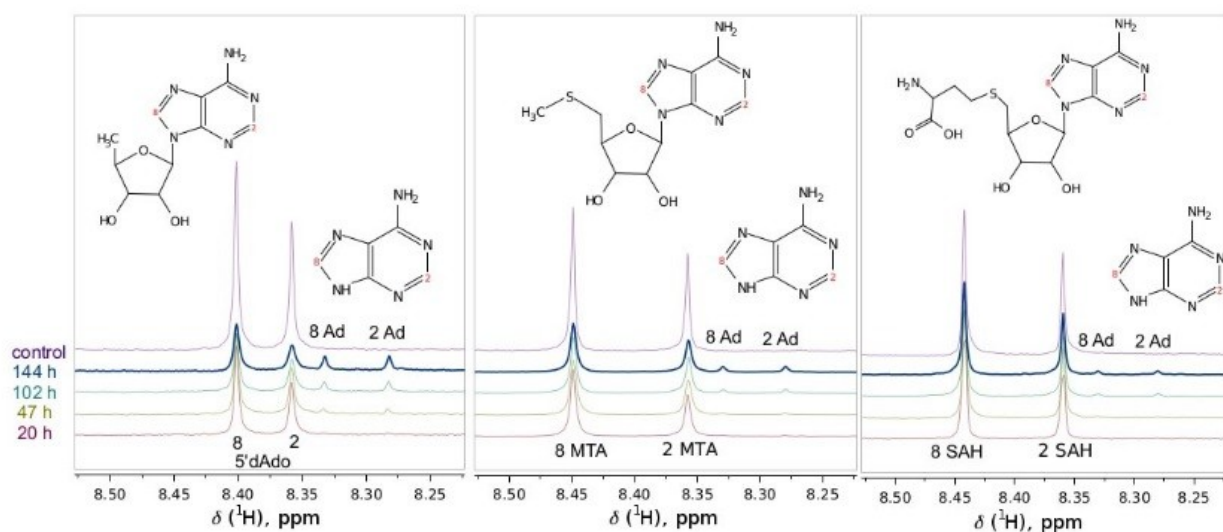


Рис 10. Отщепление аденина от 5'dAdo, MTA и SAH, катализируемое белком WBSCR27. Приведены фрагменты  $^1\text{H}$ -ЯМР спектров 5'dAdo, MTA и SAH в присутствии белка WBSCR27. С течением времени происходит постепенное снижение концентрации нуклеозидов и образование аденина

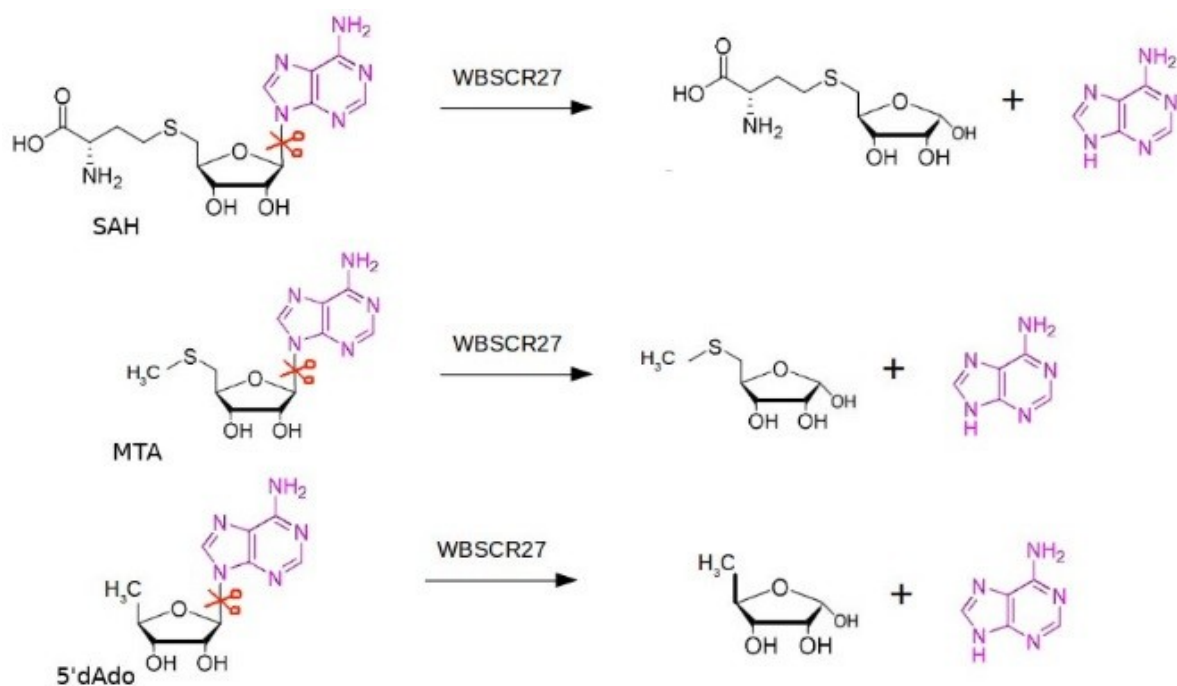


Рис 11. Отщепление аденина от SAH, MTA и 5'dAdo, катализируемое белком WBSCR27

Во всех случаях отщепление аденина протекает очень медленно, что указывает на то, что эта реакция скорее всего является лишь побочной активностью изучаемого белка.

### 5. Пространственная структура белка WBSCR27

Пространственная структура белка WBSCR27 в апо-форме, а также в виде комплекса WBSCR27/SAH определена с использованием традиционных методов гетероядерного ЯМР и молекулярной динамики, использующей ограничения на межъядерные расстояния, диэдральные углы и ориентации связей, полученные из ЯМР-экспериментов. Расстояния между атомами белка и лиганда в комплексе WBSCR27/SAH измерили по белок-лигандным ЯЭО, определенным с помощью полученного по оригинальной методике комплекса  $^{15}\text{N}$ -WBSCR27 с  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -SAH.

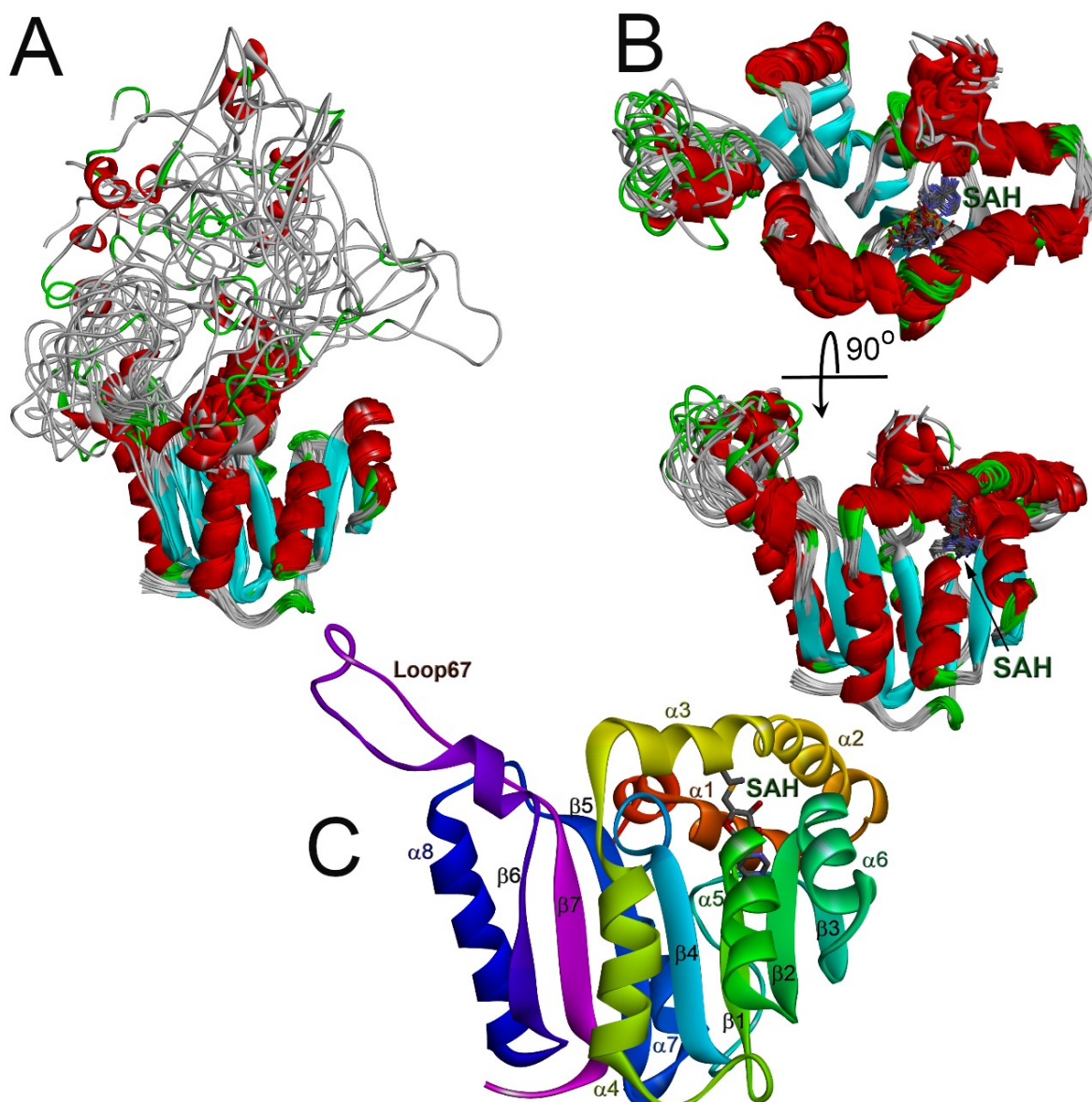


Рис 12. Структура WBSCR27 в апо-форме (A) и в комплексе с SAH (B, C). Показаны семейства из 20 конформеров (A, B) и окрашенная по цветам радуги структура комплекса WBSCR27/SAH (C), на которой отмечены обозначения элементов вторичной структуры

Структура апо-формы WBSCR27 в растворе (рис. 12A) показывает, что первые 51 аминокислотный остаток белка, а также петля L67 между остатками 204 и 228, неструктурированы. Связывание SAH с WBSCR27 упорядочивает N-концевой фрагмент белка за счёт образования трёх хорошо структурированных  $\alpha$ -спиралей ( $\alpha 1$ – $\alpha 3$ ) (рис. 12 B).

Структура WBSCR27 имеет каноническую укладку Россмана, типичную для большинства МТаз класса I. Ядро белка состоит из семи  $\beta$ -цепей ( $\beta 1$  –  $\beta 7$ ), окружённых пятью  $\alpha$ -спиралями ( $\alpha 4$  –  $\alpha 8$ , рис. 12C).

SAH связывается с аминокислотными остатками, расположенными на концах трёх  $\beta$ -цепей ( $\beta 1$  –  $\beta 3$ ). Эти взаимодействия усиливаются также за счёт нескольких гидрофобных и электростатических контактов с аминокислотными остатками в спиральных  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  (рис. 13).

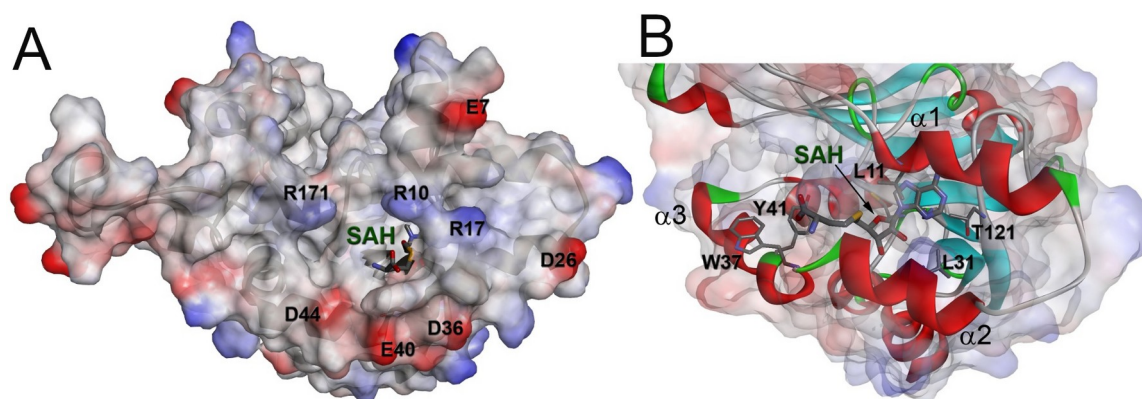


Рис 13. Сайт связывания SAH в комплексе с WBSCR27. **А.** Молекулярная поверхность белка окрашена в соответствии с электростатическим поверхностным потенциалом. Показаны аминокислотные остатки, вносящие максимальный вклад в поверхностный потенциал. **В.** Аминокислотные остатки WBSCR27, участвующие во взаимодействии с SAH

Пуриновый фрагмент SAH связывается преимущественно с аминокислотными остатками  $\beta$ -листового ядра белка, тогда как метиониновый фрагмент взаимодействует исключительно с остатками спиралей  $\alpha 1$ – $\alpha 3$ . Положение метионинового фрагмента SAH определяется менее точно. Парный RMSD координат тяжёлых атомов метионинового фрагмента SAH в конечном семействе структур составляет  $2,3 \pm 0,5$  Å. Для аденозинового фрагмента SAH это значение составляет  $2,0 \pm 0,6$  Å. Такая разница может быть связана с большей подвижностью первых трёх  $\alpha$ -спиралей относительно ядра белка.

На рис. 14 приведены элементы вторичной структуры в белке WBSCR27. Интересно отметить, что вторичная структура в основном ядре белка при связывании кофактора остаётся неизменной.



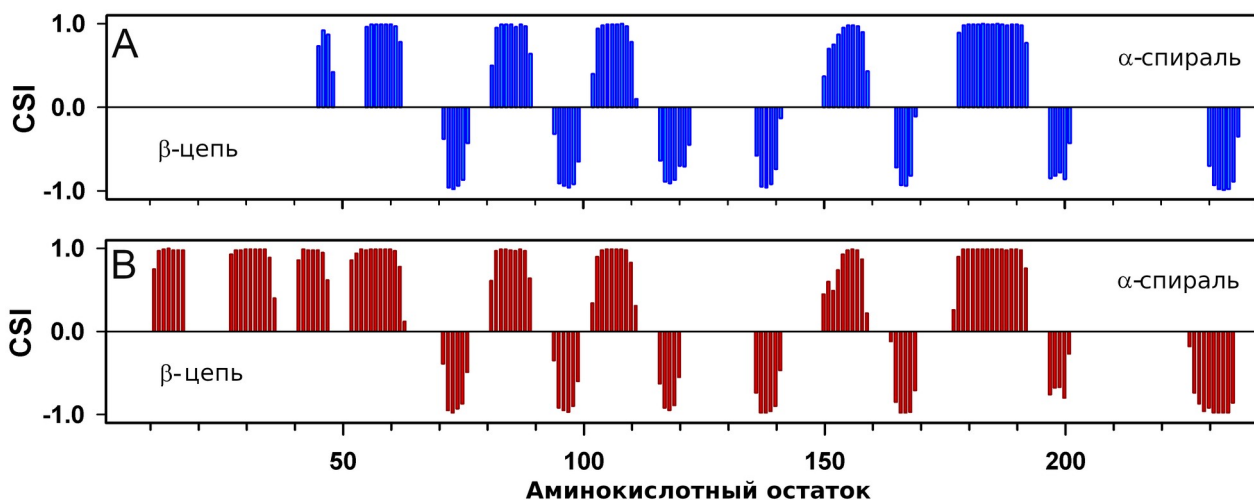


Рис 14. Вторичная структура белка WBSCR27 в апо-форме (A) и в комплексе с SAH (B)

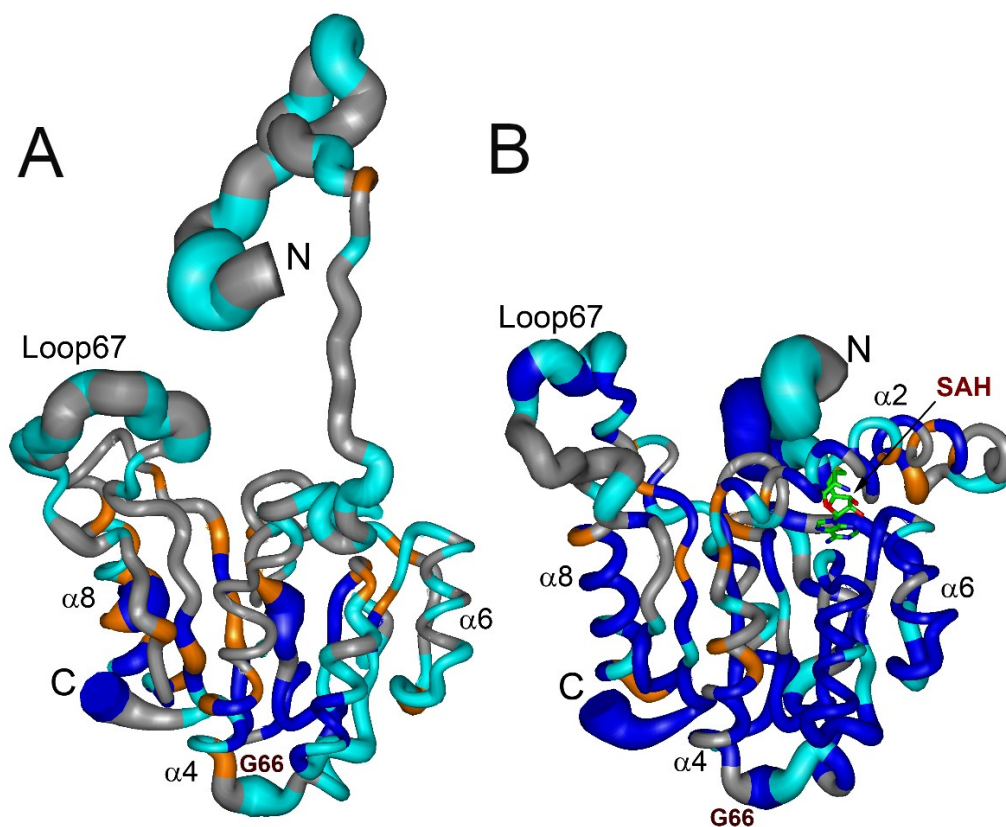


Рис 15. Обобщённое представление динамического и конформационного поведения WBSCR27 в апо-форме (A) и в комплексе с SAH (B). Толщина линий пропорциональна амплитуде движения основной белковой цепи в масштабе времени пс-нс. Фрагменты белковой цепи, содержащие аминокислоты, подвергающиеся конформационному обмену в миллисекундном временном масштабе ( $R_{ex} > 2 \text{ с}^{-1}$ ), окрашены в оранжевый цвет. Аминокислотные остатки, имеющие высокие значения защитных факторов, окрашены в синий цвет. Аминокислотные остатки, для которых не удалось получить данные о релаксации  $^{15}\text{N}$  (пролин и остатки с перекрывающимися сигналами H-N), окрашены серым. Обозначены репрезентативные элементы вторичной структуры и молекула SAH

## 6. Динамические свойства белка WBSCR27

Динамические свойства белка WBSCR27 как в апо-форме, так и в комплексе с SAH исследованы с помощью анализа параметров релаксации ядер  $^{15}\text{N}$  и скоростей обмена амидных протонов на дейтерий ( $\text{H}\rightarrow\text{D}$ ). Значения времени корреляции вращательной диффузии  $\tau_c$ , рассчитанные по данным  $T_1$  и  $T_2$ , измеренным при  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , составляют  $12,5\pm 0,2$  нс для апо-формы и  $10,4\pm 0,3$  нс для комплекса WBSCR27/SAH. Различия в значениях  $\tau_c$ , по-видимому, отражают различия в форме белковой молекулы в апо-форме и комплексе. В случае комплекса белковая глобула более компактна, в то время как длинный неструктурированный N-концевой хвост в апо-форме замедляет вращательные движения белка.

На основании экспериментов по оценке белковой динамики WBSCR27 построены обобщённые модели (рис. 15), отражающие динамическое и конформационное поведение WBSCR27 в растворе — для апо-формы (А) и для комплекса с SAH (В).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые проведено систематическое исследование белка WBSCR27, ассоциированного с синдромом Вильямса: генетическим заболеванием, вызванным гемизиготной делецией участка 7-й хромосомы, содержащего гены, кодирующие ~26 белков. Нехватка этих белков вызывает полисистемную недостаточность в организме. В то время как биологические функции большинства белков из области делеции более или менее установлены, функция WBSCR27 остаётся неясной.

Среди ближайших гомологов белка WBSCR27 обнаружены МТазы, ответственные за метилирование РНК, малых молекул или белков. Для поиска субстрата метилирования, катализируемого WBSCR27, мы сконструировали клеточные линии, нокаутные по *Wbscr27* и исследовали полученные клетки с помощью ряда методов молекулярной биологии и масс-спектрометрии. Мы попытались определить мишень метилирования среди РНК, белков, и малых молекул, но во всех случаях не был идентифицирован ни прямой субстрат, ни какие-либо макромолекулярные партнёры.

С помощью метода ЯМР мы исследовали структурные свойства WBSCR27. Удалось показать, что белок прочно связывает SAM (кофактор метилирования большинства МТаз) и SAH (ко-продукт метилирования), что может служить подтверждением его МТазной активности. Для белка в апо-форме и в комплексе с SAH сделано отнесение резонансов ЯМР и детально изучено взаимодействие с SAM, SAH и родственными соединениями: МТА,  $5'\text{dAdo}$  и аденином. Установлено, что эти молекулы узнаются белком в сайте связывания SAM/SAH. С помощью ИКТ показано, что ко-продукт метилирования SAH связывается с WBSCR27 прочнее, чем кофактор SAM, что оставляет открытым вопрос об обороте кофактора в реакции метилирования. Одним из возможных ответов на этот вопрос является

наличие слабой, но детектируемой, нуклеозидазной активности WBSCR27: мы обнаружили, что фермент катализирует отщепление аденинового фрагмента от SAH, MTA и 5'dAdo, подобно действию бактериальных SAH/MTA-нуклеозидаз.

Для выяснения природы предполагаемого субстрата метилирования мы определили структуру белка WBSCR27 в растворе и изучили его конформационно-динамические свойства в апо-форме и в комплексе с SAH. Обнаружено, что ядро белка образует каноническую укладку Россмана, типичную для MTAз класса I. N-конец белка и петля  $\beta 6$ – $\beta 7$  разупорядочены в апо-форме, но связывание SAH индуцирует конформационный переход, приводящий к структурированию этого участка, вероятнее всего служащего для узнавания субстрата метилирования.

Анализ определённой нами структуры белка WBSCR27 поможет в будущем делать новые предположения о потенциальных субстратах метилирования. Таким образом, выполненная работа является шагом, приближающим нас к пониманию функций этого белка в клетке и его роли в проявлениях патологий при синдроме Вильямса.

## ВЫВОДЫ

1. Белок WBSCR27 принадлежит к классу I SAM-зависимых MTAз, имеющих укладку Россмана.
2. Белок WBSCR27 прочно связывает SAM и SAH, а также менее прочно – MTA, 5'dAdo и аденин. Узнавание всех указанных молекул происходит в одном и том же сайте связывания.
3. Связывание кофактора модулирует сворачивание субстрат-распознающей области фермента: при связывании с SAM или SAH происходит конформационный переход, приводящий к образованию трёх дополнительных  $\alpha$ -спиралей на неупорядоченном в апо-форме N-конце белка. Расположение этих спиралей относительно молекулы связанного кофактора указывает на то, что они формируют субстрат-распознающий интерфейс белка.
4. Белок WBSCR27 обладает слабой нуклеозидазной активностью – медленно катализирует отщепление аденина от производных нуклеозидов (SAH, MTA, 5'dAdo). Эта активность может служить для диссоциации прочно связанного с белком ко-продукта метилирования после протекания реакции переноса метильной группы.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

### Статьи в рецензируемых научных журналах

1. **Mariasina S.**, Petrova O., Osterman I., Sergeeva O., Efimov S., Klochkov V., Sergiev P., Dontsova O., Huang T., Chang C.-F., and Polshakov V. "NMR assignments of the WBSCR27 protein related to Williams-Beuren syndrome" // *Biomolecular NMR assignments* 12.2 (2018): 303-308. **IF 0.58** (Web of Science), [doi:10.1007/s12104-018-9827-2](https://doi.org/10.1007/s12104-018-9827-2)
2. **Mariasina S.**, Chang C.-F., Petrova O., Efimov S., Klochkov V., Kechko O., Mitkevich V., Sergiev P., Dontsova O. and Polshakov V. "Williams–Beuren syndrome-related methyltransferase WBSCR27: cofactor binding and cleavage" // *The FEBS journal* 287.24 (2020): 5375-5393. **IF 5.54**,(Web of Science) [doi:10.1111/febs.15320](https://doi.org/10.1111/febs.15320)
3. **Mariasina S.**, Chang C.-F., Navalayeu T., Chugunova A., Efimov S., Zgoda V., Ivlev V., Dontsova O., Sergiev P. and Polshakov V. "Williams-Beuren Syndrome Related Methyltransferase WBSCR27: From Structure to Possible Function" // *Frontiers in molecular biosciences* 9 (2022). **IF 6.11** (Web of Science), [doi: 10.3389/fmolb.2022.865743](https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.865743)

### Депонирования в международных базах данных

1. Отнесение сигналов комплекса белка WBSCR27 с SAH депонировано в международный банк данных BioMagResBank под номером BMRB-27417. **Mariasina S.**, Polshakov V., Chang C.-F., [doi:10.13018/BMR27417](https://doi.org/10.13018/BMR27417)
2. Отнесение сигналов апо-формы белка WBSCR27 депонировано в международный банк данных Biological Magnetic Resonance Data Bank под номером BMRB-27578, **Mariasina S.**, Polshakov V., Chang C.-F., [doi:10.13018/BMR27578](https://doi.org/10.13018/BMR27578)
3. Структура апо-формы белка WBSCR27 депонирована в RCSB PDB под кодом 7QCC. Polshakov V., **Mariasina S.**, Chang C.-F., [doi:10.2210/pdb7QCC/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb7QCC/pdb)
4. Структура комплекса белка WBSCR27 с SAH депонирована в RCSB PDB под кодом 7QCB. Polshakov V., **Mariasina S.**, Chang C.-F., Efimov S., [doi:10.2210/pdb7QCB/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb7QCB/pdb)