

*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

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:  
д.х.н., в.н.с. Польшаков В.И.  
д.х.н., член-корр. РАН Сергиев П.В.



Москва - 2022

# Оглавление

Список используемых сокращений.....	5
Введение.....	7
Актуальность проблемы.....	7
Цели и задачи исследования.....	8
Объект исследования.....	8
Предмет исследования.....	8
Научная новизна исследования.....	8
Научная и практическая значимость исследования.....	9
Методология диссертационного исследования.....	10
Основные положения, выносимые на защиту.....	10
Степень достоверности результатов.....	11
Апробация работы.....	11
Публикации.....	12
Личный вклад автора.....	15
Структура и объём диссертации.....	15
Глава 1. Обзор литературы.....	16
1.1 Биологическое метилирование.....	16
1.1.1 Кофактор метилирования SAM.....	17
1.1.2 Ко-продукт метилирования SAH.....	19
1.1.3 Структурные классы МТаз.....	19
1.1.4 ДНК-МТазы.....	22
1.1.5 РНК-МТазы.....	26
1.1.6 Белковые МТазы.....	28
1.1.7 МТазы малых молекул.....	33
1.1.8 МТазы и болезни человека.....	36
1.1.9 МТазы в медицине.....	38
1.2 Синдром Вильямса.....	39
1.3 Белок WBSCR27.....	43
1.4 Методы изучения МТаз.....	45
1.4.1 Определение связанного лиганда в комплексе с МТазой.....	45
1.4.2 Выделение индивидуального белка из ткани по активности.....	46
1.4.3 Использование радиоактивных изотопов.....	47
1.4.4 Использование стабильных изотопов.....	48
1.4.5 Использование синтетических аналогов SAM.....	49
Глава 2. Экспериментальная часть.....	52
2.1 Реактивы и биопрепараты.....	52
2.1.1 Синтез $^{13}\text{C}_3\text{-SAM}$ .....	53
2.1.2 Получение изотопно-меченных образцов белка WBSCR27.....	54
2.1.3 Рефолдинг WBSCR27 для получения апо-формы.....	55
2.1.4 Получение $^{13}\text{C}\{\text{U}\}\text{-SAH}$ .....	56
2.2 Клеточные линии.....	57
2.2.1 Линии клеток, использованные в ходе работы.....	57
2.2.2 Получение клеточных линий.....	58
2.2.3 Культивирование эукариотических клеток.....	62
2.3 Ко-иммунопреципитация.....	62

2.4 BioID.....	63
2.5 Панорамная протеомика.....	63
2.5.1 Подготовка образцов.....	64
2.5.2 Анализ данных.....	65
2.6 <i>In vitro</i> метилирование.....	65
2.7 Анализ удлинения праймера.....	66
2.8 Анализ модифицированных оснований в тРНК.....	66
2.9 Регистрация ЯМР-спектров.....	67
2.9.1 Условия измерения спектров белка WBSCR27.....	67
2.9.2 Измерение спектров.....	68
2.9.3 Процессинг спектров.....	70
2.10 Идентификация лигандов, совыделяющихся с WBSCR27.....	70
2.11 Отнесение сигналов на спектрах ЯМР.....	70
2.12 ЯМР-титрование.....	72
2.12.1 Взаимодействие с фрагментами потенциальных субстратов.....	72
2.12.2 ЯМР-титрование SAM, SAH и продуктами их метаболизма.....	72
2.12.3 Расчёт $K_d$ .....	73
2.13 Кинетические ЯМР-эксперименты.....	73
2.13.1 Наблюдение за состоянием белка.....	73
2.13.2 Наблюдение за состоянием лиганда.....	74
2.14 Изотермическая калориметрия титрования.....	74
2.15 Определение структуры WBSCR27.....	75
2.15.1 Межатомные расстояния.....	75
2.15.2 Торсионные углы.....	78
2.15.3 Ориентация NH-связей.....	78
2.15.4 Водородные связи.....	81
2.15.5 Расчёт структур.....	81
2.16 Определение динамических параметров WBSCR27.....	83
2.16.1 Скорость релаксации.....	83
2.16.2 Защитные факторы амидных протонов.....	83
Глава 3. Результаты.....	85
3.1 Аминокислотная последовательность WBSCR27 имеет сходство с МТазами.....	85
3.2 Функции WBSCR27 в клетке не ясны.....	87
3.2.1 Инактивация гена WBSCR27 не летальна.....	87
3.2.2 WBSCR27 не обуславливает метилирование 28S рРНК.....	87
3.2.3 WBSCR27 не образует комплексы с белками и РНК.....	89
3.2.4 WBSCR27 не катализирует метилирование макромолекул в реакциях <i>in vitro</i> .....	93
3.2.5 Инактивация гена WBSCR27 не влияет на количество модифицированных нуклеотидов в тРНК.....	94
3.2.6 WBSCR27 не распознает фрагменты потенциальных субстратов.....	94
3.2.7 WBSCR27 не катализирует метилирование низкомолекулярных веществ.....	94
3.3 WBSCR27 взаимодействует с низкомолекулярными веществами.....	97

3.3.1 Окислительная агрегация.....	97
3.3.2 WBSCR27 выделяется из бактериальных клеток в комплексе с SAM или SAH.....	98
3.3.3 Апо-форма WBSCR27 может быть получена с помощью рефолдинга.....	99
3.3.4 Отнесение сигналов на спектрах ЯМР.....	100
3.3.5 Стабильность бинарных комплексов WBSCR27 с SAM и SAH.....	103
3.3.6 Взаимодействие WBSCR27 с SAM и продуктами его расщепления.....	104
3.3.7 WBSCR27 предпочтительно связывает биологически активный (S,S)-SAM.....	110
3.3.8 Нуклеозидазная активность WBSCR27.....	111
3.4 Пространственная структура белка WBSCR27.....	114
3.5 Динамические свойства белка WBSCR27.....	116
Глава 4. Обсуждение результатов.....	120
4.1 Связывание SAH вызывает структурные перестройки в белке WBSCR27.....	120
4.2 Сайт связывания кофактора.....	121
4.3 Сравнение структуры WBSCR27 с другими МТазами класса I.....	122
4.4 Возможные субстраты WBSCR27 и его потенциальная функция.....	124
Заключение.....	126
Выводы.....	127
Благодарности.....	128
Библиографический список.....	129

## Список используемых сокращений

а.о.	аминокислотный остаток
АДМА	Асимметричный ДиМетилАргинин
Да, кДа	Дальтон, килоДальтон
ДТТ	ДиТиоТреитол
ИКТ	Изотермическая Калориметрия Титрования, ИТС
ИПТГ	изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид
ОКДЦВ	Остаточные Константы Диполь-Дипольного Взаимодействия, RDC
м.д.	миллионные доли, ppm, parts per million
ММА	МоноМетилАргинин
мРНК	матричные РНК
МТаза	МетилТрансфераза
мякРНК	малые ядрышковые РНК
мяРНК	малые ядерные РНК
ПААГ	ПолиАкрилАмидный Гель
рРНК	рибосомные РНК
СДМА	Симметричный ДиМетилАргинин
тРНК	транспортные РНК
ЯМР	Ядерный Магнитный Резонанс
ЯЭО	Ядерный Эффект Оверхаузера
Ad	Аденин
AdoVin	S-аденозил-винтионин
AS3MT	As(III)-МТаза
BioID	Proximity-dependent Biotin Identification
C'	Карбонильный атом углерода основной цепи
C $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ - атомы углерода белковой цепи
1D, 2D, 3D	одно-, дву-, трехмерный (-ая)
5'dAdo	5'-дезоксаденозин (5'-deoxyadenosine)
H $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$	Протоны $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ - атомов углерода
H <sub>N</sub>	Амидный протон основной цепи белка
HPMT	Метилтрансфераза остатков лизина в белках (Histidine Protein Methyltransferase)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
KMT	Метилтрансферазы остатков лизина в белках

LCR	Low Copy Repeat, низкокопийный повтор
MAT	S-аденозилметионинсинтетаза (S-adenosylmethionine synthetase)
MeCP2	Метил-CpG-связывающий белок 2
METTL27	Methyltransferase-Like protein 27
MNAN	N1-метилникотинамид
MTA	5'-дезоксид-5'-метилтиоаденозин (5'-deoxy-5'-methylthioadenosine)
N	Атом азота амидной группы основной цепи белка
NAN	Никотинамид
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NNMT	Никотинамид N-метилтрансфераза
PCMT	L-изоаспаргат (D-аспаргат) O-метилтрансфераза
PF	Protection Factors, защитные факторы
PNMT	Фенилэтаноламин N-метилтрансфераза
ppm	parts per million (м.д. - миллионные доли)
PRMT	Метилтрансферазы остатков аргинина в белках
SAA	Область, доступная растворителю, Solvent Accessible Area
SAH	S-аденозил-L-гомоцистеин
SAM	S-аденозил-L-метионин
SB	Транспозаза Sleeping beauty
<sup>13</sup> CH <sub>3</sub> -SAM	S-[метил- <sup>13</sup> C]-S-аденозил-L-метионин
<sup>14</sup> CH <sub>3</sub> -SAM	S-[метил- <sup>14</sup> C]-S-аденозил-L-метионин
SRH	S-рибозилгомоцистеин
TOCSY	TOTAL Correlated Spectroscopy
TPMT	Тиопурин S-метилтрансфераза
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
WBS	Синдром Вильямса, Синдром Вильямса-Бойрена
WBSCR	Williams-Beuren Syndrome Chromosomal Region
WBSCR27	Williams-Beuren Syndrome Chromosomal Region 27 protein
WT	Wild Type

# Введение

## 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 — МТаза, вовлечённая в биосинтез убихинона/менахинона из термофильных граммотрицательных бактерий *Thermotoga maritima* (код PDB 2AVN, E-value =  $6e^{-10}$ ) и МТаза 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 с 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 метилтиаденозин (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 WBSR27 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.

### 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)

### Тезисы докладов на конференциях

1. **Марьясина С.С.**, Петрова О.А., Chang C.-F., Osterman И.А., Манцызов А.Б., Сергиев П.В., Польшаков В.И. «Отнесение сигналов  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  полипептидной цепи метилтрансферазы WBSCR27, ассоциированной с синдромом Вильямса» в сборнике материалов 12-й Зимней молодежной школы-конференции “Магнитный резонанс и его приложения (Санкт-Петербург, 15-21 ноября 2015)”, Санкт-Петербург, 2015. - с. 193-196.
2. **Mariasina S.S.** , Petrova O.A., Chang C.-F., Huang T.-H., Osterman I.A., Mantsyzov A.B., Sergiev P.V. , Polshakov V.I. «Backbone NMR assignment and secondary structure of the Williams Syndrome Related Methyltransferase WBSCR27» в сборнике материалов Международного симпозиума "Магнитный резонанс: от фундаментальных

- исследований к практическим приложениям (Казань, 21-23 апреля 2016 г)”, Казань, 2016. - с. 152-153.
3. **Mariasina S.S.**, Petrova O. A., Chang C.-F., Huang T.-H., Osterman I. A., Mantsyzov A. B., Sergiev P. V., and Polshakov V. I. «Bioinformatics approaches in NMR structure determination of methyltransferase WBSCR27» в сборнике тезисов конференции “*International Conference SocBiN Bioinformatics 2016 (Moscow, June 14–16 2016)*”, Москва, 2016. - P. 28.
  4. **Марьясина С.С.**, Петрова О.А., Chang C.-F., Huang T.-H., Остерман И.А., Манцызов А.Б., Сергиев П.В., Польшаков В.И. «ЯМР-исследования метилтрансферазы WBSCR27, ассоциированной с синдромом Вильямса» в сборнике научных трудов V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, конференции ADFILM (4-8 октября 2016, Сочи – Дагомыс). Acta Naturae, спецвыпуск, том 2, Москва, 2016. - с. 88.
  5. **Mariasina S. S.**, Petrova O. A., Chang C.-F., Huang T.-H., Osterman I. A., Mantsyzov A. B., Sergiev P. V., Polshakov V. I. «*NMR Study of the Williams Syndrome Related Methyltransferase WBSCR27*» в сборнике материалов 13-й Международной школы-конференции молодых учёных “Magnetic resonance and its applications (20-26 ноября 2016 г)“, Санкт-Петербург, 2016. - P. 111.
  6. **Mariasina S.S.**, Petrova O.A., Chang C.-F., Huang T.-H., Osterman I.A., Mantsyzov A.B., Sergiev P.V., Polshakov V.I. «*Cofactor-binding studies of the Williams Syndrome related methyltransferase WBSCR27 in solution*» в сборнике “Proceedings of the Moscow Conference on Computational Molecular Biology (Москва, 27-30 июля 2017)”, ИТР RAS, Москва, 2017. - с. 176.
  7. **Марьясина С.С.**, Лаптев Г.Ю., Пищенко И.М. «*Предсказание структуры и динамических свойств биомолекул по данным о химических сдвигах ЯМР*» в сборнике тезисов выступлений участников Второй Школы молодых учёных “Компьютерное моделирование структуры и динамики биомолекул MolMod-2018 (Новосибирск, 28-30 апреля 2018 г)”, Новосибирск, 2018. - с. 28-29.
  8. **Mariasina S.** «Cofactor binding to methyltransferase WBSCR27» в сборнике материалов научной школы “V School for young scientists, Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics (St. Petersburg, Russia, 15-20 Sept, 2018): abstract book”, Санкт-Петербург, 2018. - P. 25.
  9. **Mariasina S.S.**, Petrova O.A., Chang C.-F., Sergiev P.V., Dontsova O.A., Polshakov V.I. «*NMR solution studies of the WBSCR27 protein*» в сборнике материалов конференции “AILM2019 Advanced Isotopic Labelling Methods for Integrated Structural Biology (March 26-29<sup>th</sup>, Grenoble – France”, Гренобль, 2019. - P.108.
  10. **Марьясина С.С.**, Chang C.F., Сергиев П.В., Польшаков В.И. «*Структура и функции метилтрансферазы WBSCR27, ассоциированной с синдромом Вильямса*» в сборнике тезисов докладов Пятой Междисциплинарной конференции “Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии, серия МОБИ-ХимФарма, издательство «Перо» (Москва), с. 58-58.
  11. Михайлов С.Е., **Марьясина С.С.** «Определение констант связывания метилтрансферазы WBSCR27 с синтетическими аналогами SAM» в сборнике *Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2021»*, с. 1181-1181.

## **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 страницах и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Список литературы». Работа содержит 13 таблиц и 73 рисунка. Библиография включает 184 источника литературы.

# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1 Биологическое метилирование

Присоединение метильной группы к биологическим молекулам, таким как гормоны, нейромедиаторы, липиды, белки и нуклеиновые кислоты, приводит к изменению их физико-химических свойств. С биологической точки зрения функции метилирования очень разнообразны: метилирование играет значимую роль в процессах биосинтеза, метаболизма, детоксикации, передачи сигнала, процессинга нуклеиновых кислот, выработки бактериями резистентности к антибиотикам, регуляции экспрессии генов и многих других.

Реакцию присоединения метильной группы осуществляют ферменты МТазы (EC 2.1.1). Подавляющее большинство известных МТаз используют в качестве донора метильной группы SAM, который после отщепления  $\text{CH}_3$ -группы превращается в SAH [1], (рис. 1):

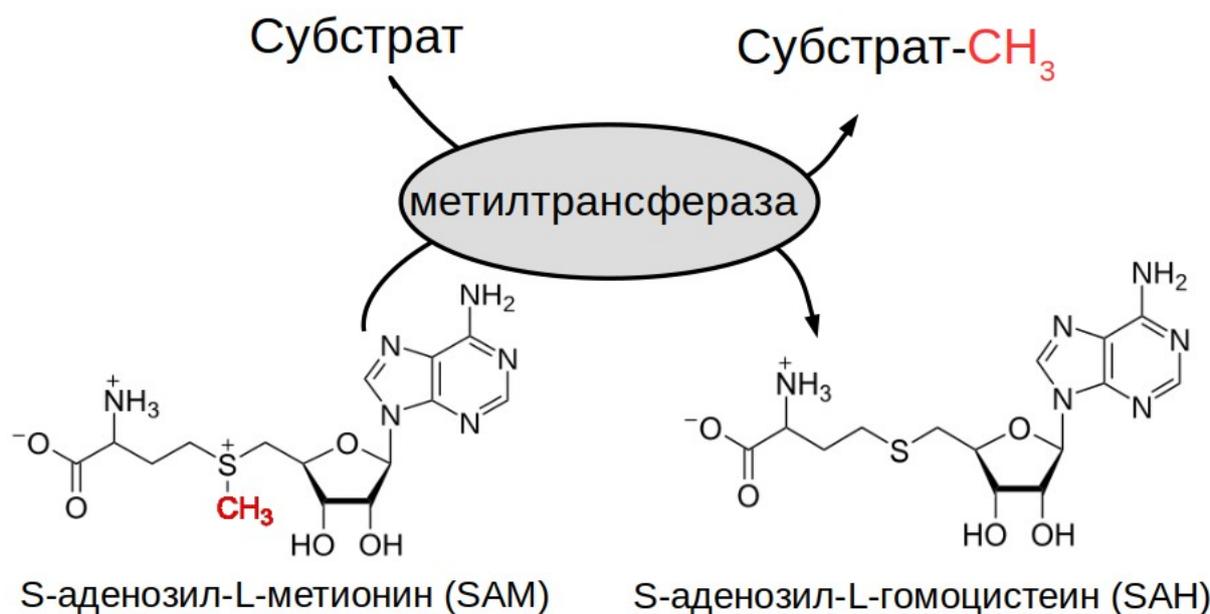


Рис 1. Перенос метильной группы SAM-зависимой МТазой: SAM отдаёт  $\text{CH}_3$ -группу, превращаясь в SAH

На данный момент в человеческом протеоме аннотировано около 300 SAM-зависимых МТаз, из которых примерно для 120 членов известен тип субстрата (малые молекулы, липиды, белки или нуклеиновые кислоты) и тип метилируемого атома (как правило, азот, кислород, углерод или сера) [2,3]. Исходя из природы субстрата и типа метилируемого атома они имеют коды EC 2.1.1.X [2].

### 1.1.1 Кофактор метилирования SAM

SAM – кофактор почти всех известных МТаз [1]. Он является вторым по распространённости кофактором органической природы после АТФ [4]. Главной особенностью молекулы SAM является трёхвалентный атом серы, который обеспечивает его очень высокую реакционную способность в реакциях метилирования, обычно протекающей по S<sub>N</sub>2-механизму.

Асимметрически замещённый ион сульфония в молекуле SAM представляет собой хиральный центр. S- и R-эпимеры оптически стабильны и могут быть разделены. Показано, что реакция метилирования стереоспецифична, причём предпочтительно в реакцию вступает только природный S-эпимер, тогда как R-эпимер, связываясь в том же активном центре, не переносит метильную группу на субстрат [5,6].

SAM также используется в качестве источника метиленовых групп (в биосинтезе циклопропил-жирных кислот), аминогрупп (в синтезе 7,8-диаминопеларгоновой кислоты, предшественника биотина), рибозильных фрагментов (в биосинтезе эпоксикевозина, модифицированного нуклеотида тРНК) и аминопропильных групп (при синтезе этилена и полиаминов) [7].

В живых системах SAM как правило образуется из АТФ и L-метионина при каталитическом участии метионин-аденозилтрансферазы (MAT, S-adenosylmethionine synthetase) [8,9]. Эту ферментативную реакцию используют и для синтеза SAM в препаративных количествах из АТФ и метионина [10,11]. Для увеличения конверсии в реакционную смесь иногда добавляют неорганическую пирофосфатазу, утилизирующую образующийся пирофосфат [12]. Также применяется синтетический способ получения SAM, основанный на взаимодействии метилгалогенида с SAH в кислой среде [6]. В последнем случае, однако, образуется рацемическая смесь S- и R-эпимеров (рис. 2).

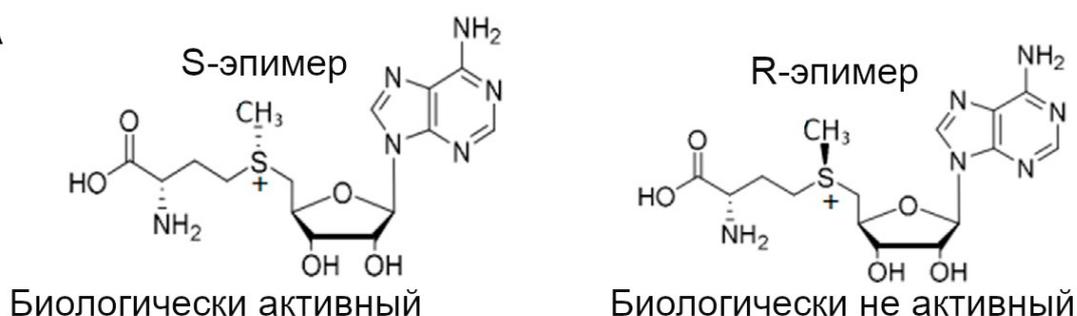


Рис 2. S- и R-эпимеры SAM, получающиеся в результате химического синтеза

В нейтральной и щелочной среде SAM подвергается самопроизвольному разложению по двум параллельным направлениям: расщеплению до метилтиоаденозина (МТА) и гомосеринлактона, а также гидролизу до аденина и S-рибозилметионина [13].

Наличие трёхвалентного атома серы определяет четыре основных пути метаболизма SAM в клетках [7,14] (рис. 3):

1. удаление метильной группы в реакции метилирования с образованием SAH;
2. разрыв связи сера-углерод метиониновой цепи с образованием МТА и гомосеринлактона;
3. радикальное катализируемое ферментами расщепление связи между серой и рибозой с образованием реакционноспособного 5'-дезоксаденозильного радикала [15];
4. радикальное расщепление с образованием 3-амино-3-карбоксипропильного радикала (АСР) и МТА.

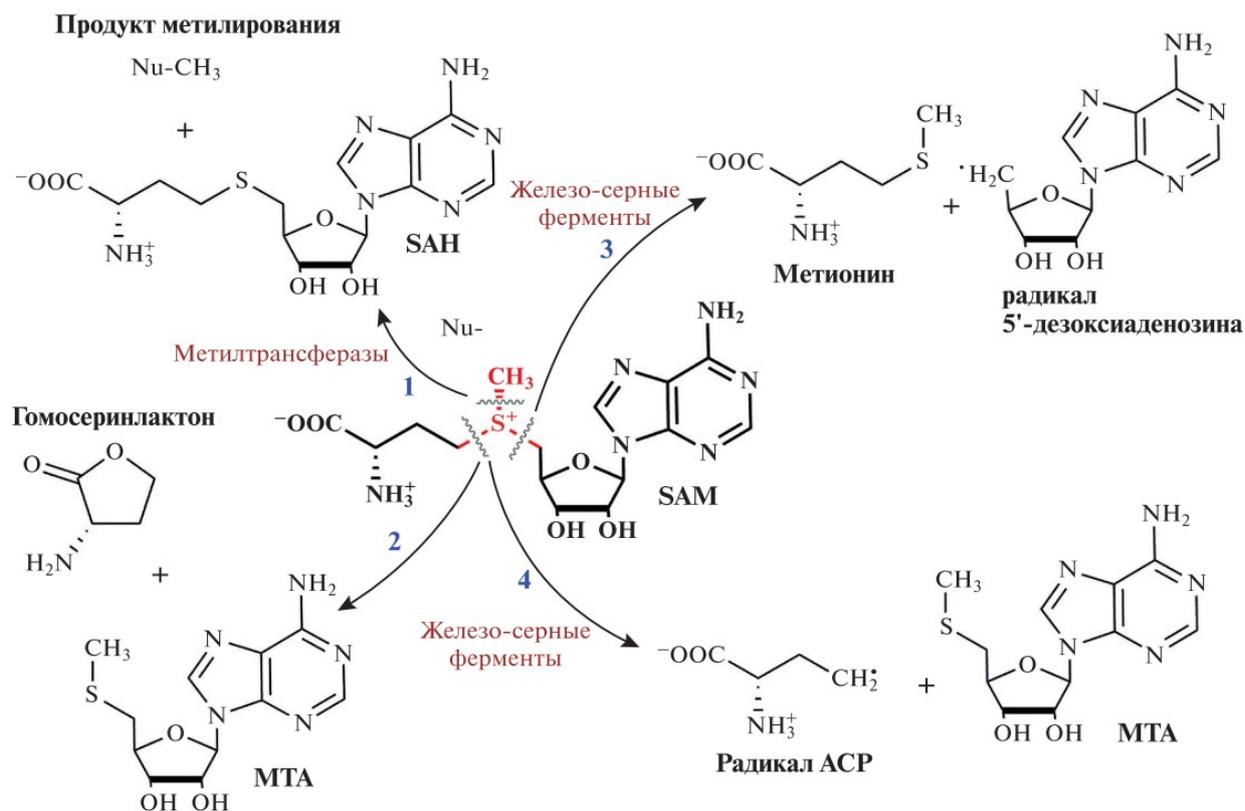


Рис 3. Схема разложения SAM. Путь 1 — катализируемый МТазами перенос метильной группы; путь 2 — неферментативное отщепление гомосеринолактона; пути 3 и 4 — радикальное расщепление, катализируемое железосерными ферментами

### 1.1.2 Ко-продукт метилирования SAH

В результате переноса МТазми метильной группы с SAM на субстрат образуется молекула SAH. Для большинства МТаз SAH является конкурентным ингибитором, причём иногда прочность связывания SAH с МТазми оказывается даже выше, чем у кофактора SAM [8]. Поэтому поддержание клеточного гомеостаза SAM и SAH должно точно регулироваться деградацией SAH после реакции метилирования. В клетках эукариот SAH распадается с образованием гомоцистеина и аденозина в реакции, катализируемой SAH-гидролазой (3.3.1.1) (рис. 4) [8]. В клетках прокариот SAH расщепляется иначе — в реакции, катализируемой МТА/SAH-нуклеозидазой (EC 3.2.2.9) от него отщепляется аденин с образованием S-рибозилгомоцистеина (SRH) [9], который далее под действием фермента LuxS (EC 4.4.1.21) расщепляется до L-гомоцистеина [16]. Все известные прокариотические МТА/SAH-нуклеозидазы относятся к трёхсубстратным ферментам, способным отщеплять аденин не только от SAH, но также от МТА и 5'dAdo [16].

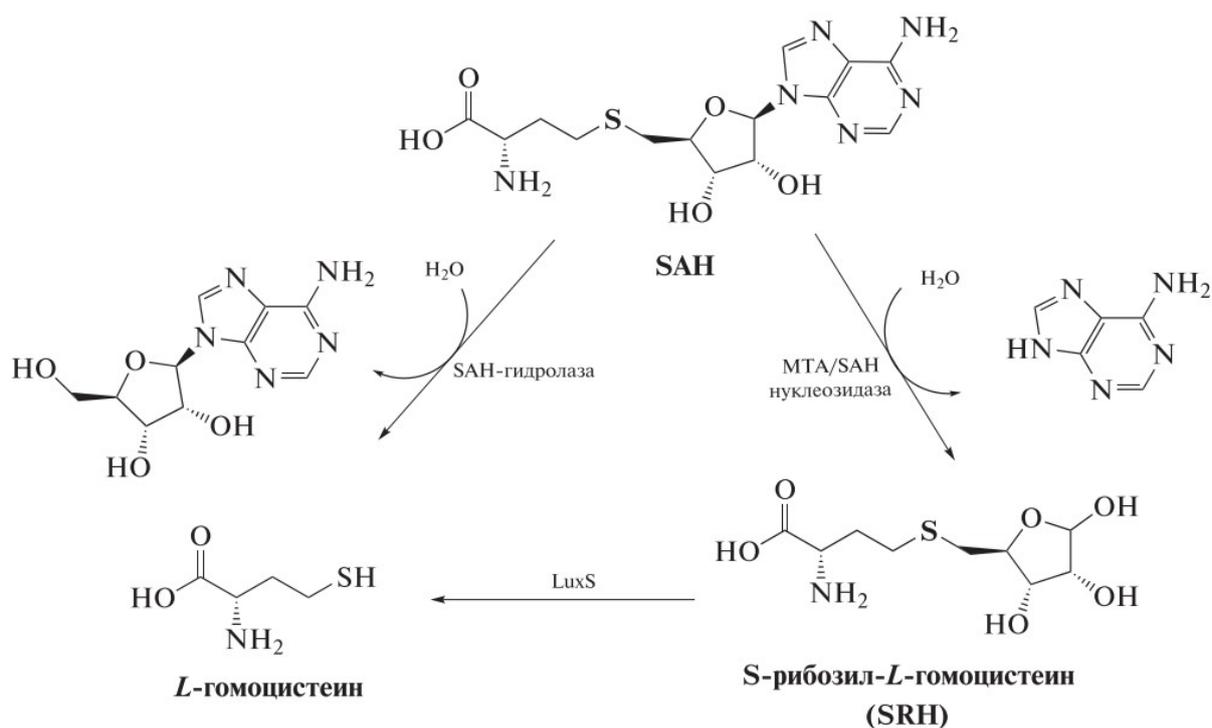


Рис 4. Пути ферментативного расщепления SAH

### 1.1.3 Структурные классы МТаз

Существует пять основных классов (I – V) SAM-зависимых МТаз [17]. Они различаются укладкой белковой цепи. Пространственные структуры и общая топология каждого из пяти классов МТаз приведены на рис. 5.

Наиболее крупной группой являются белки класса I (рис. 5A), имеющие каноническую укладку Россмана, содержащую  $\beta$ -лист, окружённый двумя слоями  $\alpha$ -спиралей и образующий  $\alpha\beta$  сэндвич.  $\beta$ -Лист состоит из семи  $\beta$ -цепей ( $\beta 1 - \beta 7$ ), которые чередуются с шестью  $\alpha$ -спиральями ( $\alpha Z$  и  $\alpha A - \alpha E$ ), расположенными по три спирали на каждой стороне листа. Порядок нитей обычно составляет  $\beta 6 \uparrow \beta 7 \downarrow \beta 5 \uparrow \beta 4 \uparrow \beta 1 \uparrow \beta 2 \uparrow \beta 3 \uparrow$  со спиральями  $\alpha Z, \alpha A, \alpha B$  на одной стороне листа и  $\alpha C, \alpha D, \alpha E$  на другой [2]. В некоторых МТазах класса I происходит циклическая перестановка  $\beta$ -цепей, но при этом топология вторичной структуры сохраняется [18]. Структурное ядро укладки Россмана в основном участвует в связывании молекулы кофактора SAM, тогда как распознавание субстрата, подвергающегося метилированию, обычно осуществляется вспомогательными доменами или дополнительными  $\alpha$ -спиральями [17].

Все МТазы класса I связывают SAM в пространственно стереотипном кармане в верхней части домена укладки Россмана. Существует два консервативных мотива, общих для всех МТаз класса I: фрагмент GxG, расположенный между  $\beta 1$  и  $\alpha A$ , и остаток аспарагиновой или глутаминовой кислоты, расположенный в строго консервативном положении на конце цепи  $\beta 2$ , который образует водородные связи с двумя гидроксильными группами рибозного фрагмента SAM [19]. Другие аминокислотные остатки, участвующие в связывании SAM, варьируются от одной подгруппы МТаз класса I к другой, обеспечивая корректную ориентацию реакционноспособной метильной группы молекулы SAM в направлении её акцептора-субстрата [20]. Это свойство вместе с наличием дополнительных доменов распознавания субстрата определяет чрезвычайно высокую субстратную специфичность, обеспечивающую уникальную биологическую функцию каждой МТазы.

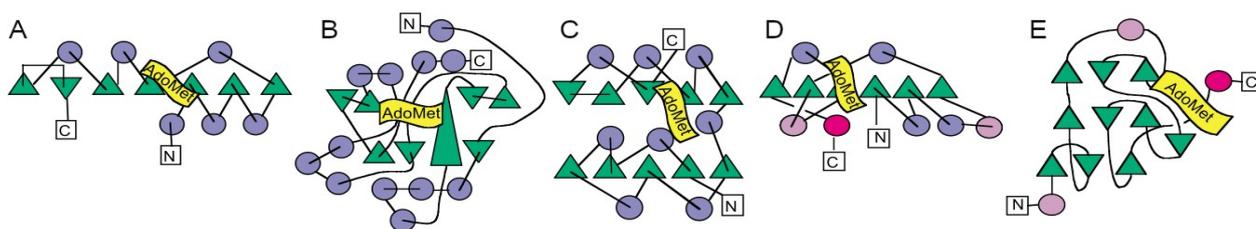


Рис 5. Структурные классы МТаз: А — Е классы I — V [17]. Фиолетовыми кружочками обозначены  $\alpha$ -спирали, зелёными треугольниками показаны  $\beta$ -цепи. Расположение молекулы SAM обозначено жёлтыми прямоугольниками «AdoMet». Бледно-розовые кружочки обозначают спирали, не консервативные в семействе; красные кружочки — структура псевдоузла. Отмечены C- и N-концы белков

МТазы класса II имеют длинный центральный антипараллельный  $\beta$ -лист, окружённый группами спиралей с обеих сторон (рис. 5B). Ни по общей архитектуре, ни по способу связывания SAM они не имеют ничего общего с МТазами класса I: SAM связывается в этих белках в вытянутой конформации с помощью неглубокой бороздки вдоль концов  $\beta$ -цепей,

образуя водородные связи с консервативным мотивом RxxxGY [21]. К этому классу относится первая обнаруженная МТаз, имеющая структуру отличную от укладки Россмана, — кобаламин-зависимая метионин-синтаза, MetH. Этот белок катализирует реакцию получения метионина из гомоцистеина, перенося сначала метильную группу с производного фолата на связанный кобаламин, а затем на гомоцистеин [21]. В процессе работы фермента кобальт в кобаламине периодически окисляется до неактивной формы, после чего необходима его реактивация. Она осуществляется с помощью восстановительного метилирования под действием SAM и флаводоксина дополнительным структурным доменом белка. Этот реактивирующий домен стал родоначальником класса II SAM-зависимых МТаз [17].

У МТаз класса III активный сайт расположен между двумя  $\alpha\beta$ -доменами, каждый из которых состоит из пяти-цепочечного  $\beta$ -листа и четырёх  $\alpha$ -спиралей (рис. 5C). Вблизи С-конца первой  $\beta$ -цепи имеется мотив GxGxG, сходный с аналогичным у МТаз класса I, но, в отличие от них, не участвующий в связывании SAM. В случае этих белков SAM плотно связывается в щели между двумя доменами. Класс III МТаз довольно малочисленный, на данный момент насчитывает всего несколько белков.

Класс МТаз IV носит название SPOUT — по названию первых двух отнесённых к нему белков: SpoU (в современной терминологии TgmH), который присоединяет метильную группу к 2'-О-атому рибозы гуанозина-18 в тРНК [22], и TgmD, который метилирует гуанозин-37 в тРНК бактерий, превращая его в m<sup>1</sup>G [23]. Остальные МТазы, обнаруженные и отнесённые к этому классу впоследствии, также отвечают за метилирование различных молекул РНК. МТазы SPOUT имеют необычный узел в районе С-конца, который участвует в связывании SAM (рис. 5D). Ядро этих белков составляет  $\beta$ -лист, состоящий из шести параллельных цепей, окружённый семью  $\alpha$ -спиралями, причём первые три цепи  $\beta$ -листа напоминают половину укладки Россмана [24].

Класс V МТаз называется МТазы с SET-доменом. Они содержат серию из 8-ми искривлённых  $\beta$ -цепей, формирующих три небольших листа (рис. 5E). С-конец этих белков подвёрнут под поверхностную петлю, образуя узловую структуру, напоминающую узел у МТаз IV класса, но имеющий совсем другую топологию. Связывание SAM происходит подобно МТазам класса III — на вогнутой поверхности возле консервативного остатка тирозина, участвующего в катализе. SET-домен у МТаз класса V окружен различными последовательностями, которые называются пред-SET и пост-SET областями. Как правило, они отвечают за активность МТаз, участвуя в узнавании субстрата [25]. Этот класс очень

многочисленный, он насчитывает несколько сотен белков. Большинство МТаз класса V метилируют белки, преимущественно N-концевые остатки и боковые группы лизина в гистонах.

Несмотря на то, что все МТазы можно отнести к одному из 5-ти классов, с точки зрения субстратной специфичности они очень разнообразны. Субстратами МТаз может быть широкий спектр различных веществ, от небольших молекул до ДНК, РНК и белков. Далее будут рассмотрены МТазы в соответствии с их субстратной специфичностью.

#### 1.1.4 ДНК-МТазы

Метилирование ДНК увеличивает разнообразие четырёхбуквенного кода. С помощью метилирования происходит эпигенетическая регуляция экспрессии генов эукариот. Кроме того, метилирование ДНК играет важную роль в эмбриональном развитии многоклеточных, участвует в импринтинге генома и канцерогенезе [26]. В прокариотических клетках метилирование используется для контроля репарации и времени репликации ДНК, а также в системах рестрикции-модификации для защиты от чужеродных генетических элементов [27].

У бактерий и низших эукариот преобладает метилирование ДНК по аминокетонам: в 6-м положении аденина ( $m^6A$ ) и 4-м положении цитозина ( $m^4C$ ) [28]. В геноме животных чаще всего метилированию подвергается цитозин. Он модифицируется по атому углерода в 5-м положении, образуя  $m^5C$ . [29]. У человека около 1% всех нуклеотидов генома представляют собой  $m^5C$ . Большая часть метилированных остатков цитозина предшествует гуанину, образуя метилированные CpG сайты. У позвоночных >80% всех динуклеотидов CpG содержат метильную группу [30]. Метилирование цитозина в других контекстах (non-CpG) встречается гораздо реже. У позвоночных оно в основном обнаруживается в клетках мозга и эмбриональных стволовых клетках [31].

В последние годы появляется всё больше данных о наличии модификация  $m^6A$  в ДНК высших эукариот. Так, недавно было обнаружено наличие  $m^6A$  у *C.elegans* [32], у дрозофилы [33], а затем и у позвоночных — в ДНК лягушек [34] и в стволовых клетках млекопитающих [35]. Функции этих модификаций в настоящее время интенсивно изучаются.

Тем не менее, основной модификацией ДНК млекопитающих является  $m^5C$ , и на этой модификации следует остановиться подробнее. Метилирование цитозина в ДНК млекопитающих происходит под действием трёх МТаз: DNMT1, DNMT3A и DNMT3B [27]. DNMT1 отвечает за поддержание паттернов метилирования в ходе репликации: когда происходит полуконсервативная репликация ДНК, материнская цепь содержит исходные

метильные группы, а вновь синтезированная дочерняя цепь — нет. DNMT1 связывается с репликационной вилкой и точно копирует паттерны метилирования, добавляя метильные группы на вновь синтезированную дочернюю цепь (рис. 6А). МТазы DNMT3А и DNMT3В устанавливают модификации m<sup>5</sup>C в немодифицированной ДНК, то есть осуществляют метилирование *de novo* (рис. 6В). Чаще всего под действием этих МТаз происходит метилирование CpG островков, однако они способны также метилировать цитозин в поп-CpG-контексте. В этих случаях модификация не поддерживается после репликации МТазой DNMT1 [31].

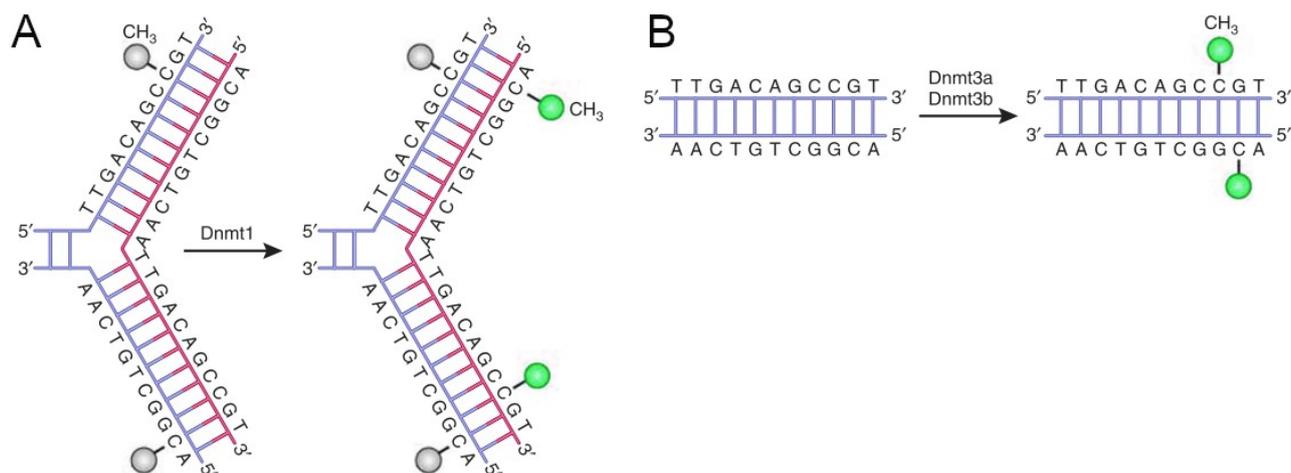


Рис 6. Метилирование ДНК под действием ДНК-МТаз [27]. **А.** Под действием DNMT1 происходит поддержание паттернов метилирования при репликации. Серым обозначены метильные группы родительской цепи; зелёным — вновь установленные с помощью DNMT1 метильные группы на дочерней цепи. **В.** Под действием DNMT3А и DNMT3В происходит *de novo* метилирование — метильные группы устанавливаются одновременно на обе комплементарные цепи в CpG участке. Вновь установленные метильные группы отмечены зелёным

Все эукариотические ДНК-МТазы — довольно крупные ферменты. В отличие от бактериальных МТаз, эукариотические МТазы являются мультидоменными белками. Доменная организация ДНК-МТаз человека приведена на рис. 7 [36]. С-концевой домен эукариотических МТаз каталитический. Он имеет укладку Россмана, вследствие чего ДНК-МТазы относят к классу I МТаз. Остальные домены отвечают за регуляцию метилирования: субстратную специфичность и ферментативную активность.

**DNMT1** — крупный и очень динамичный фермент, включающий около 1600 аминокислот (183 кДа), рис. 8а. Две трети белка составляет N-концевой регуляторный участок, одну треть занимает С-концевой МТазный домен (рис. 7). N-концевой домен включает различные сайты связывания белков и ДНК, после чего следует фрагмент узнавания репликационной вилки (RFTS), цинковый палец CXXC и два домена ВАН.

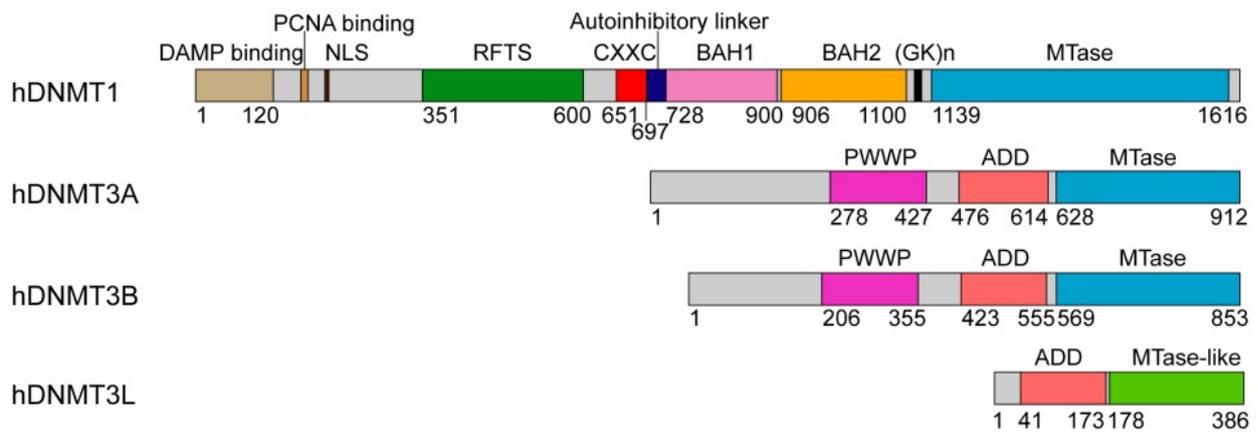


Рис 7. Доменная организация ДНК-МТаз человека [34]. DNMT1, DNMT3A и DNMT3B содержат С-концевой МТазный домен (показан синим цветом). DNMT3L содержит домен подобный МТазному, однако напрямую в катализе метилирования не участвует

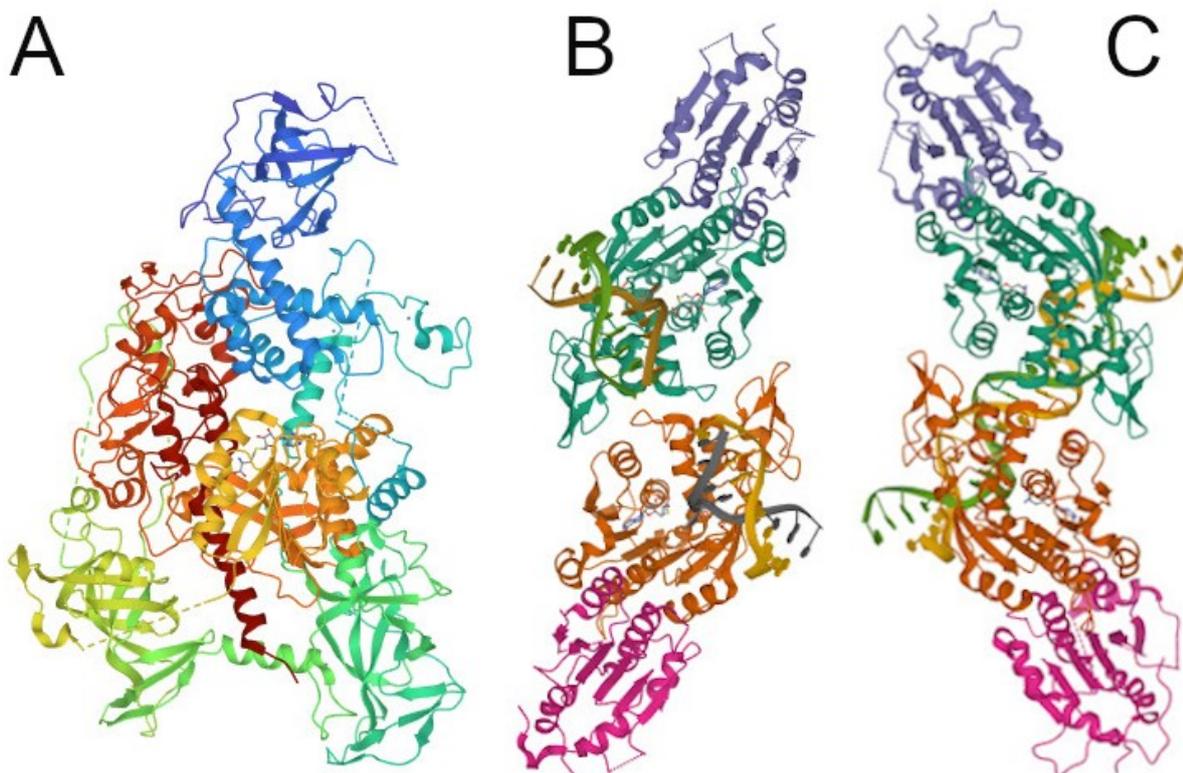


Рис 8. Кристаллические структуры ДНК-МТаз человека. А. DNMT1 (PDB 4WXX); В. Комплекс DNMT3A/DNMT3L с ДНК (PDB 6F57); С. комплекс DNMT3B/DNMT3L с ДНК (PDB 6KDA)

МТазы DNMT1 имеет множество аллостерических сайтов. В регуляции её активности участвует по меньшей мере 31 молекула, среди которых белки, некоторые РНК, поли(АДФ-рибоза) (полимер, состоящий из двух или более молекул АДФ, присоединяющийся к белкам

в ходе пост-трансляционных модификаций для регуляции внутриклеточных процессов) [37]. Все эти регуляторные молекулы связывают регуляторный N-концевой домен, за исключением шаперона p23, связывающего C-концевой домен [38]. Связывание регуляторных молекул, а также фосфорилирование DNMT1, приводят к различным ответам с точки зрения белка [37]:

1. стимулируют или ингибируют активность;
2. направляют DNMT1 к сайтам метилирования;
3. облегчают диссоциацию комплекса с ДНК;
4. регулируют способность DNMT1 взаимодействовать с другими регуляторными молекулами.

Как уже было сказано выше, DNMT1 преимущественно отвечает за поддерживающее метилирование ДНК, то есть метилирование цитозина в полуметилированных CpG сайтах. Тем не менее, установлено, что связывание с определёнными регуляторными молекулами в сайтах аллостерической регуляции активирует у DNMT1 способность к *de novo* метилированию [39].

МТазы **DNMT3A** и **DNMT3B** управляют метилированием в ходе гаметогенеза и эмбриогенеза — они участвуют в поддерживающем метилировании. DNMT3A в первую очередь метилирует набор генов и последовательностей на поздней стадии развития эмбриона, а также после рождения. DNMT3B модифицирует более широкий набор областей геномных последовательностей на ранних стадиях эмбриогенеза [40].

Оба белка (DNMT3A/3B) достаточно велики, они содержат около 900 аминокислот (~100 кДа) (рис. 8B и C). DNMT3A/3B имеют высокое сходство аминокислотных последовательностей: оба содержат большой разупорядоченный N-концевой домен, за которым следует домен Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP), домен Atrx-Dnmt3-Dnmt3l (ADD) и МТазный домен [36] (рис. 7). С-концевой МТазный домен DNMT3A образует тетрамерный комплекс с С-концевым доменом DNMT3L в порядке 3L-3A-3A-3L, в результате чего создаётся два интерфейса DNMT3A/DNMT3L и один контакт DNMT3A/DNMT3A. Активные сайты двух мономеров DNMT3A оказываются расположенным на расстоянии 40 Å друг от друга — расстоянии, соответствующем одному витку ДНК [36]. В результате оказывается, что DNMT3A способна метилировать два CpG-сайта, находящихся на противоположных цепях ДНК, разделённых ~10-ю парами оснований [41]. Аналогичная тетрамерная структура также характерна и для белка DNMT3B.

Белок **DNMT3L** образует комплексы с DNMT3A и DNMT3B, регулируя их активность. Сам по себе этот белок не имеет ДНК-МТазной активности, поэтому не рассматривается как МТазы [42]. Он содержит N-концевой ADD-домен, за которым расположен МТазы-подобный домен (MTase-like), который каталитически не активен в силу отсутствия мотивов, важных для катализа [36].

### 1.1.5 РНК-МТазы

Метилированию подвержены все виды РНК: тРНК, рРНК, мРНК, тмРНК (транспортно-матричная РНК — небольшая РНК длиной от 260 до 430 нуклеотидов, которая участвует в высвобождении рибосом, «застывших» во время трансляции проблемных участков мРНК, а также в разрушении получившихся в ходе неполной трансляции дефектных пептидов [43]), мяРНК (малые ядерные РНК), мякРНК (малые ядрышковые РНК), микроРНК и вирусные РНК.

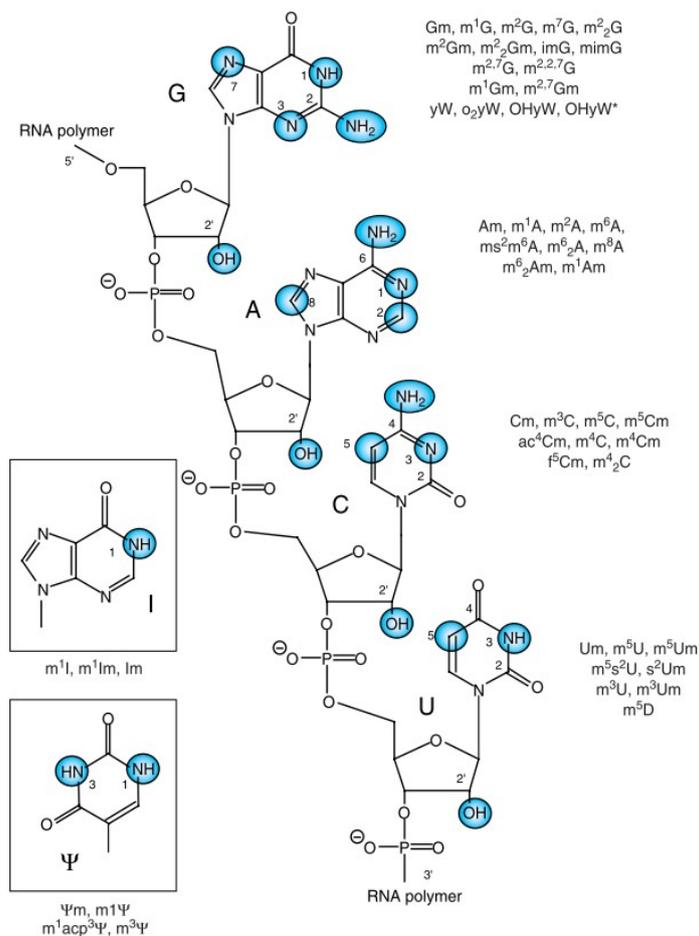


Рис 9. Разнообразие позиций метилирования РНК [43]. Синими кружочками выделены атомы, по которым возможно введение метильной группы под действием МТаз

Метилирование РНК обеспечивает биофизическую, биохимическую и метаболическую стабилизацию РНК, контроль ее качества, устойчивость к антибиотикам, поддержание рамки считывания мРНК, регуляцию сплайсинга, внутриклеточный транспорт, иммунный ответ и другие функции [44,45].

Метилирование РНК дополняет четырёхбуквенный генетический код нуклеотидами, содержащими модифицированные основания или 2'-метилгидроксильные группы. Сайты метилирования РНК очень разнообразны: метилированию подвергается большинство атомов азота (за исключением только тех, которые участвуют в образовании гликозидных связей); 2'-ОН-группы рибозы, атомы углерода в 5-й позиции пиримидинов и атомы углерода в позициях 2 и 8 аденозина [45] (рис 9).

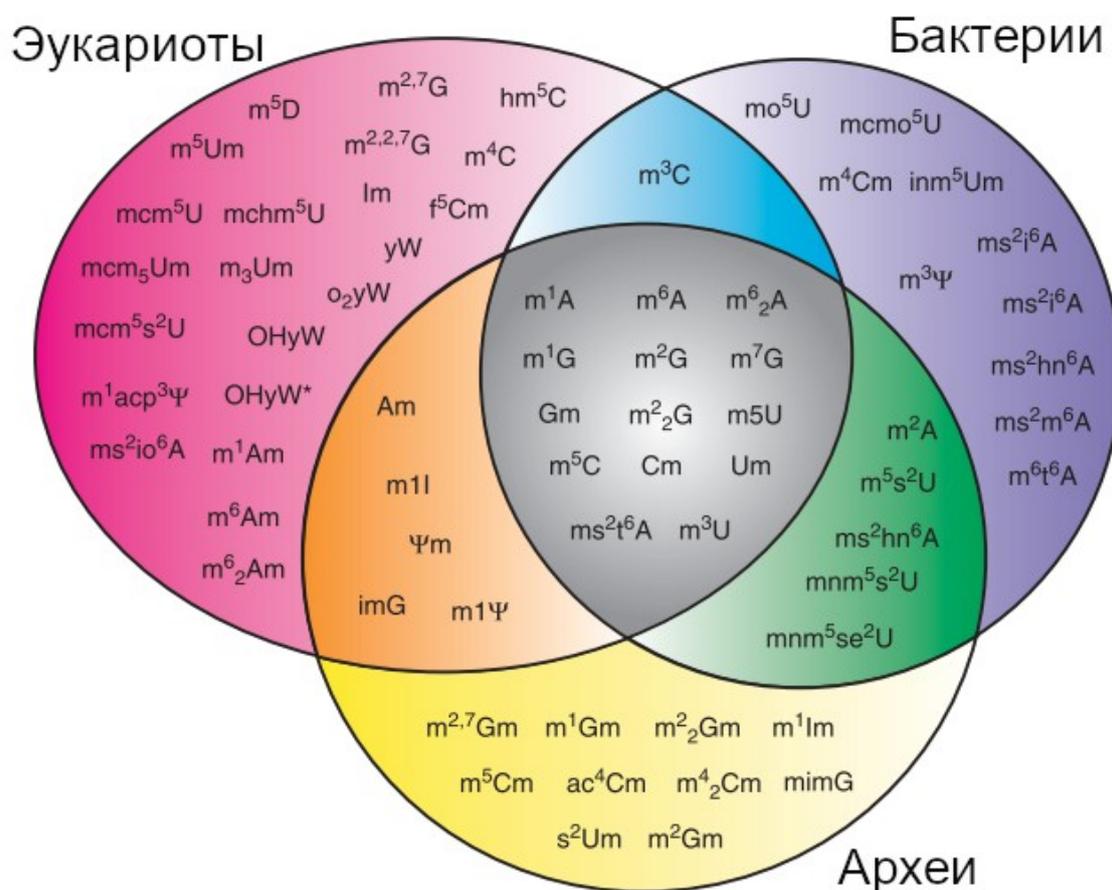


Рис 10. Филогенетическое распределение метилированных нуклеозидов (во всех видах молекул РНК) [43]

Метилирование РНК встречается во всех царствах живых организмов, однако распределение определённых видов метилированных нуклеотидов различается: только модификации m<sup>1</sup>A, m<sup>6</sup>A, m<sup>6</sup><sub>2</sub>A, m<sup>1</sup>G, m<sup>2</sup>G, m<sup>7</sup>G, G<sub>m</sub>, m<sup>2</sup><sub>2</sub>G, m<sup>5</sup>U, m<sup>5</sup>C, C<sub>m</sub>, U<sub>m</sub>, ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A и m<sup>3</sup>U характерны для всех видов организмов [45] (рис. 10).

С точки зрения структуры РНК-МТазы делят на 4 группы. Большая часть РНК-МТаз относится к классу I — МТазы с укладкой Россмана. Чаще всего они мономерны, однако встречаются ди-, три- и тетрамеры [45]. Второй по численности структурный класс РНК-МТаз — суперсемейство SPOUT. К этому классу относятся МТазы, катализирующие образование  $m^3U$ ,  $m^3\psi$ ,  $m^1\psi$ ,  $m^1G$ ,  $m^1A$  и 2'-О-метилованных по рибозному гидроксилу нуклеозидов. Все РНК-МТазы этого семейства образуют димеры, в которых каталитический сайт расположен на интерфейсе двух мономеров [45]. Третье суперсемейство РНК-МТаз — радикальные SAM-МТазы [46]. К четвертому классу относят только одно семейство МТаз — ФАД/НАД(ф)-зависимые МТазы [47,48].

### 1.1.6 Белковые МТазы

Метилирование белков участвует в регуляции почти каждого аспекта клеточной биологии путём изменения функциональных свойств белков. Например, метилирование белков играет важную роль в процессах внутриклеточной передачи сигналов и регуляции транскрипции [49].

Метилирование белков – одна из важнейших пост-трансляционных модификаций этих молекул. Метилирование позволяет существенно расширить 20-аминокислотный “алфавит”, внося большее разнообразие в аминокислотный состав белков и изменяя их функциональные свойства. Чаще всего метилированию подвергаются аминокислоты лизина и гуанидиновый фрагмент аргинина, реже – гидроксильные группы серина и тирозина, и карбоксильные группы боковых цепей глутаминовой и аспарагиновой кислот [50]. Кроме того, метилированию могут подвергаться N- и C-концевые группы любых аминокислотных остатков в белках, а также амидные фрагменты боковых цепей глутамин и аспарагин [51]. На данный момент в базе данных «PhosphoSitePlus» по пост-трансляционным модификациям белков имеется информация о 18617 позициях метилирования в белках [52].

Наиболее изучено и представлено в клетках метилирование лизина и аргинина в молекулах гистонов. Эти модификации регулируют транскрипцию генов [53].

#### Метилирование лизина

Метилирование лизина осуществляется под действием лизиновых МТаз, имеющих обозначение KMT. Атом азота лизина, находящийся в  $\epsilon$ -положении, может принимать от одной до трёх  $CH_3$ -групп, превращаясь в моно-, ди- или триметиллизин (рис. 11).

Интересно отметить, что наряду с МТазами лизина, существуют лизиновые деметилазы, которые снимают  $\text{CH}_3$ -группу с  $\epsilon$ -N-атома лизина [54], что делает возможным динамическую регуляцию метилирования.

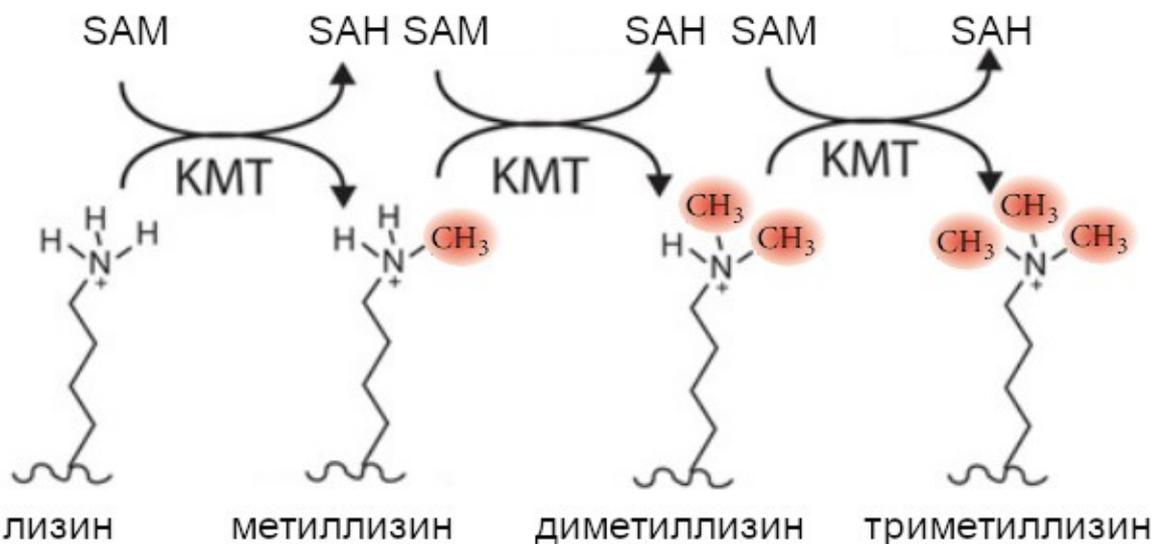


Рис 11. Метилирование остатков лизина в белках под действием KMT [54]

На данный момент в человеческом протеоме описано около 2000 метилированных лизинов, распределенных между 1200 белков [52]. Для большинства из них МТазы, устанавливающие модификации, не установлены.

Все известные на данный момент МТазы лизина относятся либо к структурному классу МТаз с SET-доменом (класс V), либо к классу I — с укладкой Россмана. У этих двух классов лизиновых МТаз различается способ узнавания субстрата: МТазы с SET-доменом распознают субстрат через взаимодействие с неструктурированной пептидной последовательностью, включающей целевой лизин и несколько соседних аминокислотных остатков. Благодаря этому они, как правило, сохраняют активность на небольших синтетических пептидах. В противоположность к ним, МТазы лизина класса I узнают субстрат по трёхмерной структуре. При этом зачастую мутации соседних остатков с метилируемым лизином не оказывают никакого влияния на его способность подвергаться метилированию [55].

МТазы лизина, относящиеся к классу I, высокоспецифичны, чаще всего они метилируют белки, участвующие в биосинтезе белков или процессах фолдинга. Большинство лизиновых МТаз метилируют только один остаток лизина в определённом белке [56], хотя есть и исключения: например, МТаза PrmA, относящаяся к классу I, три-метилирует несколько остатков в своём субстрате — рибосомном белке L11, а также терминальный атом азота в N-концевом остатке аланина [57].

## Метилирование аргинина

Метилирование остатков аргинина — распространённая пост-трансляционная модификация белков эукариот [58]. Боковые группы остатков аргинина могут подвергаться метилированию по атомам  $\epsilon$ -N, давая один из трёх продуктов: монометиларгинин (ММА), симметричный диметиларгинин (СДМА) и асимметричный диметиларгинин (АДМА). Также имеются сведения о существовании остатков аргинина, монометилованных по атому  $\delta$ -N [59]. Все эти модификации происходят под действием МТаз аргинина (общее название PRMT).

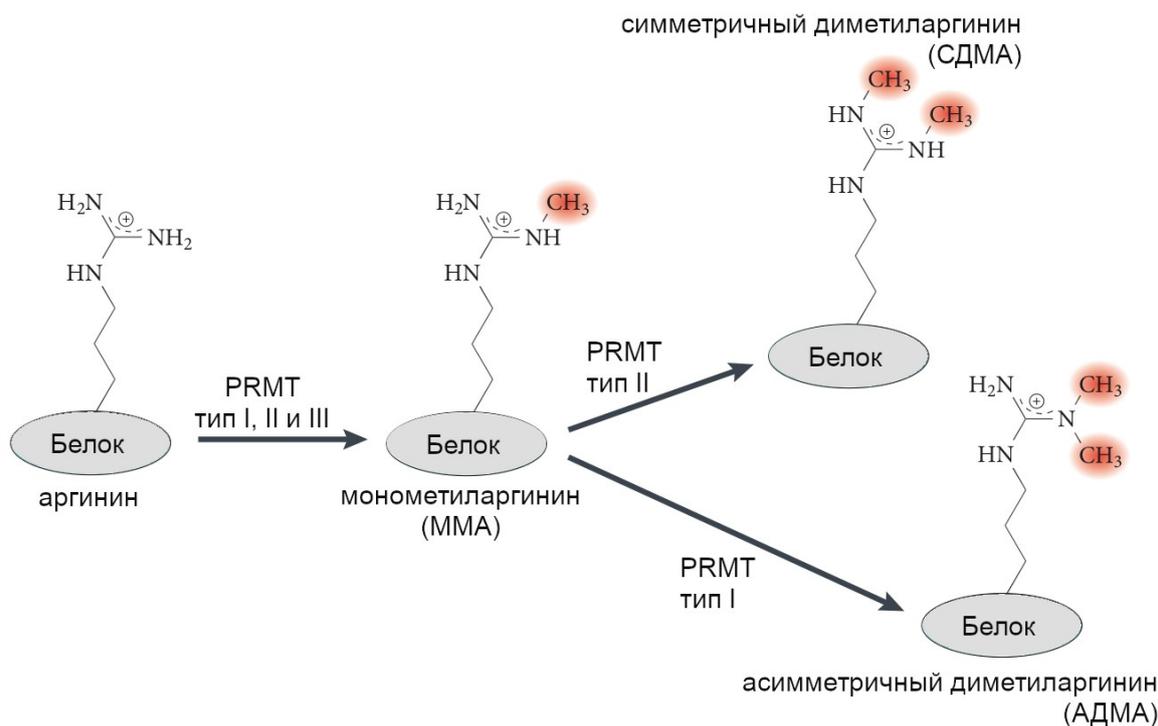


Рис 12. Метилирование остатков аргинина в белках под действием МТаз PRMT разного типа [62]

На данный момент известно девять МТаз аргинина, они делятся на три типа, в соответствии с конечной формой продукта метилирования: белки, катализирующие получение MMA и АДМА выделяют в тип I – это белки PRMT-1, 2, 3, 4, 6 и 8; к типу II относят белки PRMT5 и PRMT9, катализирующие образование MMA и СДМА; тип III на данный момент включает только один белок – PRMT7, способный катализировать получение только MMA [60,61] (рис. 12, [62]).

Как и в случае метилирования остатков лизина, метилирование аргинина обратимо: существуют аргининовые деметилазы, способные снимать метильную группу с остатков аргинина, осуществляя таким образом динамическую регуляцию этой модификации [60].

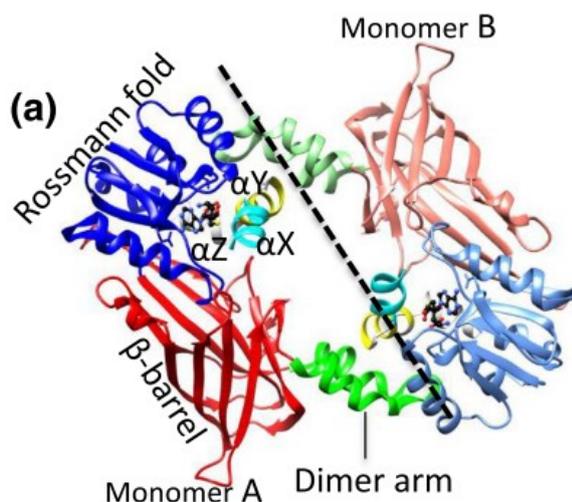


Рис 13. Структура типичной МТазы аргинина на примере PRMT2 из *Danio Rerio* (PDB 5FUB) [59]

На данный момент получены структуры восьми из девяти МТаз аргинина. Показано, что все аргининовые МТазы имеют уникальный механизм катализа и узнавания субстрата [59]. Канонический структурный каркас PRMT включает два домена: N-концевой домен с укладкой Россмана, отвечающий за связывание SAM, и C-концевой домен, имеющий структуру  $\beta$ -бочонка. От N-конца  $\beta$ -бочонка до N-конца домена с укладкой Россмана протянута  $\alpha$ -спиральная «рука», отвечающая за димеризацию (рис. 13, [59]).

Подвижные  $\alpha$ -спирали на N-конце домена с укладкой Россмана участвуют в узнавании SAM. Они присутствуют у аргининовых МТаз типов I и III.

### Метилирование глутамата и аспартата

Метилирование аспартата и глутамата (D/E-метилирование) менее распространено и изучено значительно меньше, чем метилирование остатков лизина и аргинина в белках [63]. Модификации подвергается карбоксильная группа боковой цепи этих остатков, поэтому соответствующие ферменты носят общее название белковых карбоксиметилтрансфераз. Замена карбоксильной группы на сложноэфирную, происходящая в результате метилирования, приводит к нейтрализации отрицательного заряда и повышает гидрофобность, что позволяет обеспечивать тонкую настройку взаимодействий между макромолекулами.

Метилирование аспартата и изоаспартата задействовано в системе репарации белков для защиты от старения [64]. В результате старения происходят спонтанные посттрансляционные модификации белков, в том числе изомеризация остатков L-аспартата до изоаспартата, рацемизация до D-аспартата, а также дезаминирование с последующей изомеризацией L-аспарагина до изоаспартата (рис. 14). Накопление таких модифицированных остатков может приводить к потере функции белка и последующим нарушениям функционирования клетки. Для предотвращения этого процесса служит L-изоаспартат (D-аспартат) O-МТазы (PCMT, 2.1.1.77), метилирующая изоаспартат и D-аспартат, инициируя их превращение в

нормальную форму аспартата (рис. 14). Таким образом, эта МТаза действует как фермент репарации белка. PCMT очень консервативна она встречается почти у всех живых организмов: эукариот, архей и грамотрицательных бактерий [65].

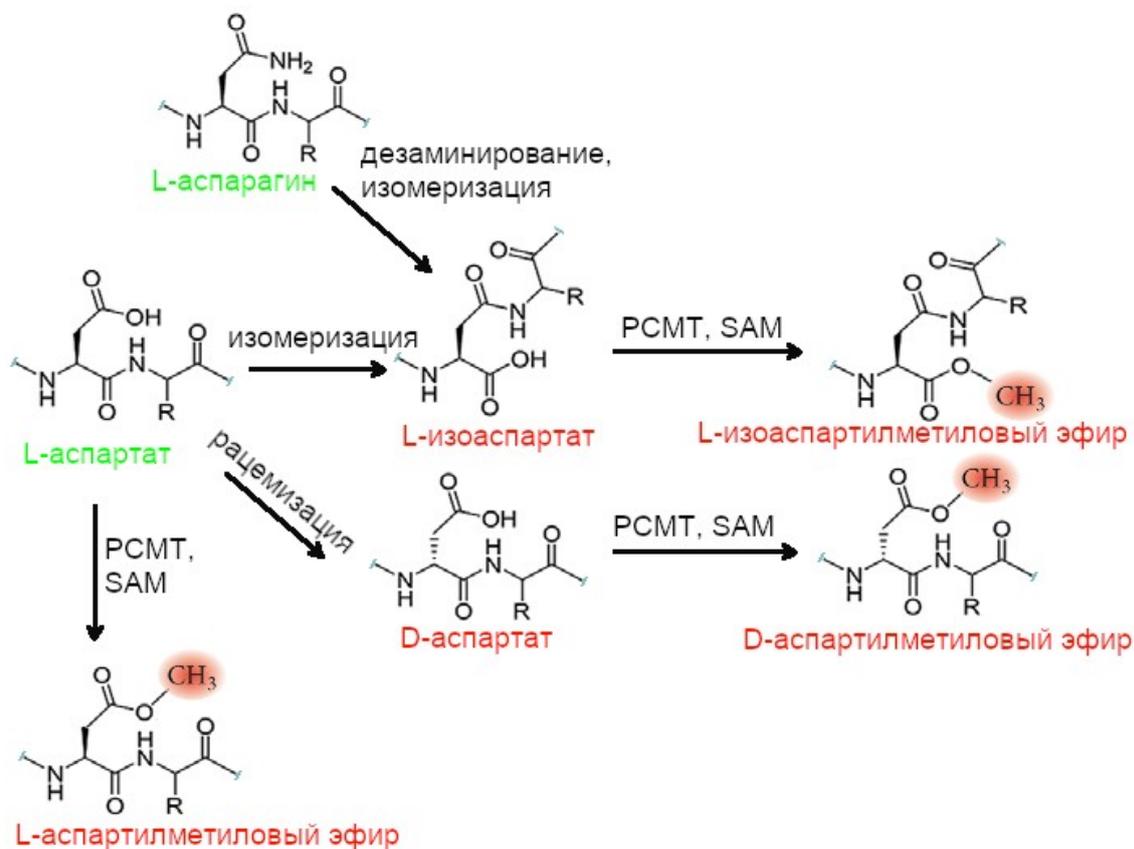


Рис 14. Метилирование остатков аспартата и изоаспартата под действием PCMT

Метилирование аспартата, наряду с метилированием аргинина и лизина, встречается в гистонах. Так, было показано, что аспартат 24 в гистоне 4 метилируется (образуя H4D24me) под действием МТазы PCMT1 [66]. Эту модификацию тоже связывают с противодействием старению — в данном случае, гистоновых белков, и гомеостазом гистонов.

Метилирование боковых групп остатков глутамата осуществляется под действием глутамат О-МТаз (2.1.1.80). В качестве примера биологической системы, в которой метилирование глутамата играет ключевую роль, можно привести систему хемотаксиса бактерий. У *Escherichia coli* хемотаксис инициируется четырьмя близкородственными рецепторными белками: Tsr, Tar, Trg и Tap, каждый из которых распознаёт свой набор аттрактантов или репеллентов. Связывание аттрактанта или репеллента производит возбуждающий сигнал, который изменяет фосфорилирование других белков хемотаксиса, что приводит к временным изменениям плавательного поведения бактерии [67]. Решающее

значение для хемотаксиса играет способность адаптироваться к широкому диапазону концентраций аттрактанта и репеллента. Она построена на основе обратимого O-метилирования остатков глутамата белков Tsg, Tar, Trg и Tap. На цитоплазматических доменах этих белков располагается метилакцепторный сайт, в котором находится от 4 до 6 остатков глутамата (некоторые из них возникают в результате деамидирования глутамина). Эти остатки метилируются под действием МТазы CheR или деметилируются по действием деметилазы CheB. Аттрактанты увеличивают общий уровень метилирования, а репелленты уменьшают [68].

### **Метилирование гистидина**

Метилирование гистидина — очень редкая модификация. В литературе имеется всего несколько примеров метилированных по гистидину белков. В работе [69] обнаружен 3-метилгистидин в белке Rpl3 большой субъединицы рибосомы дрожжей. Помимо него известны позиции метилирования гистидинов в актине, миозине и метил-кофермент А-редуктазе [69].

В случае модификации рибосомного белка Rpl3 установлена МТаза, создающая эту модификацию – белок HPMT1 (Histidine Protein Methyltransferase 1). В работе [70] показано, что этот белок отвечает за все возможные случаи метилирования гистидина в дрожжах.

### **Субстратная специфичность белковых МТаз**

Субстратная специфичность белковых МТаз неоднозначна. Некоторые сайты метилирования белковых МТаз модифицируются только одним ферментом: например, модификация метилирование гистона в положении H3K79 происходит только под действием МТазы DOT1L. Другие, напротив, являются субстратами сразу для нескольких МТаз: например, метилирование H3K9 может происходить под действием как минимум восьми МТаз, а белок p53 является мишенью пяти МТаз лизина [50]. Для белковых МТаз наблюдается также множественность субстратов, например для SETD7 известно 11 негистоновых субстратов метилирования [50]. Таким образом, белковые МТазы и их субстраты находятся в сложной взаимосвязи, что существенно осложняет их изучение.

## **1.1.7 МТазы малых молекул**

Метилирование малых молекул является частью биосинтеза и модификации биологически активных эндогенных соединений, включая мембранные компоненты,

кофакторы белков, простетические группы, пигменты, сигнальные и защитные соединения [71].

В отличие МТаз макромолекул, у МТаз малых молекул нет общих структурных особенностей, определяющих специфичность к определённому атому-акцептору [71]. Всё, что можно сказать об их общности – NMT (метилирующая атомы азота) и СМТ (метилирующая атомы углерода), как правило, не бывают металл-зависимыми, в то время как многим другим МТазам требуется ион  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$  для связывания субстрата и осуществления ферментативной реакции. Для координирования  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  используется мотив [DD(D/N)], а для связывания ионов  $Zn^{2+}$  используются остатки цистеина [71].

### Отдельные представители МТаз малых молекул

*As(III)-МТаз* (*AS3MT*) переносит метильную группу с SAM на соединения трёхвалентного мышьяка, приводя к получению метилированных и диметилированных производных (рис. 15) [72,73]. Этот процесс необходим для выведения соединений мышьяка с мочой.

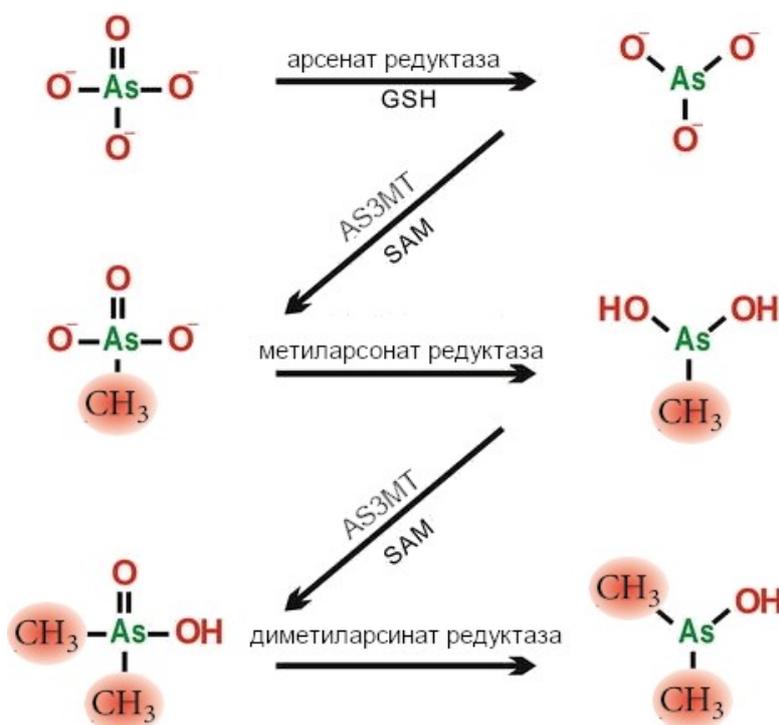


Рис 15. Метилирование соединений трёхвалентного мышьяка под действием AS3MT [73]

*Тиопурин-S-МТаз* (*TPMT*) — цитоплазматический белок, катализирующий S-метилование ароматических и гетероциклических сульфгидрильных соединений, включая клинически-значимые лекарственные препараты, в т.ч. 6-меркаптопурин и

азатиопурин [74] (рис. 16). Активность этого белка сильно варьирует у различных людей, вызывая острую лекарственную токсичность у отдельных пациентов [74].

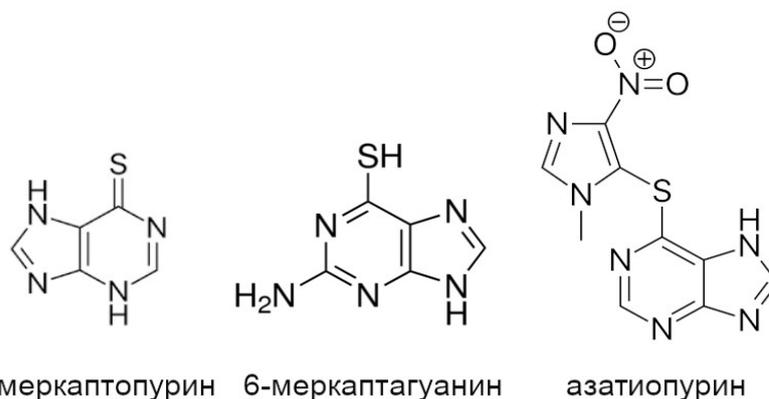


Рис 16. Некоторые субстраты тиопурин-S-МТазы (ТРМТ)

Фенилэтаноламин N-МТазы (PNMT) катализирует метилирование фенилэтанолamina и ряда его производных, как эндо-, так и экзогенных. В том числе этот белок осуществляет последний шаг в синтезе адреналина — метилирование норадреналина [75] (рис. 17).

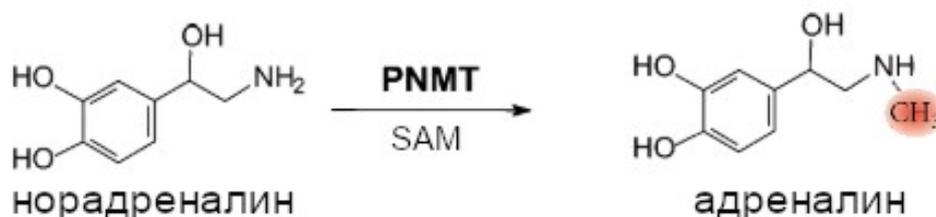


Рис 17. Метилирование норадреналина под действием фенилэтаноламин N-МТазы (PNMT) — заключительный шаг в синтезе адреналина [75]

Никотинамид N-МТазы (NNMT) катализирует N-метилирование никотинамида (NAN) (рис. 18) и других пиридинов до пиридиниевых солей. Этот белок в основном присутствует в клетках печени и жировой ткани животных [76].

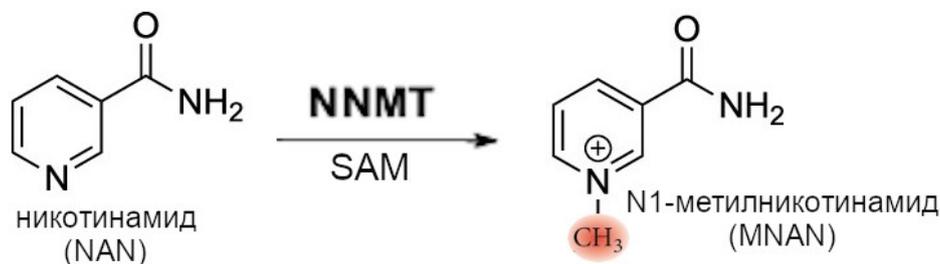


Рис 18. Метилирование никотинамида под действием никотинамид N-МТазы (NNMT)[77]

В результате метилирования NAN превращается в N1-метилникотинамид (MNAN). NAN — одна из форм витамина B<sub>3</sub>, прекурсор для синтеза кофермента NAD<sup>+</sup> важного кофермента, участвующего в окислительно/восстановительном метаболизме. Впервые каталитическая

активность NNMT была обнаружена и охарактеризована в препаратах частично очищенных белков из печени животных [77].

### 1.1.8 МТазы и болезни человека

МТазы отвечают за корректное функционирование большинства ключевых процессов в организме, поэтому нарушения в их работе могут вызывать тяжёлые заболевания.

#### Генетические заболевания связанные с МТазами

Мутации в генах МТаз ответственны за проявление некоторых генетических заболеваний. Классический пример — синдром Боуэна-Конради: аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся нарушением пренатального и постнатального роста, глубокой задержкой психомоторного развития и смертью в раннем детстве. Установлено, что это заболевание возникает из-за точечной мутация в гене МТазы EMG1 [78]. EMG1 необходим для созревания малой субъединицы рибосомы — он отвечает за метилирование положения N<sup>1</sup> остатка m<sup>1</sup>аср<sup>3</sup>Ψ1248 в 18S рРНК. Точечная мутация в гене приводит к замене D86G в этой МТазе. В норме остаток D86 образует солевой мостик с остатком R84. Замена на глицин разрушает этот мостик, нарушая структуру белка [79]. Установлено, что это приводит к потере его ядрышковой локализации, накоплению в ядерных центрах и последующей протеасомной деградации [80].

Другой пример — возникновение диабета II типа из-за мутации в гене тРНК МТазы Cdkal1. Эта МТаза отвечает за биосинтез 2-метилтио-N<sup>6</sup>-треонилкарбамоиладенозина (ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A) в тРНК-Lys<sup>UUU</sup>. Данная модификация необходима для точной трансляции кодонов AAA и AAG: в клетках с дефицитом Cdkal1 происходит неправильное прочтение этих кодонов. Два таких кодона (Lys<sup>AAG</sup>) содержатся в белке проинсулине, причём один из них располагается в сайте расщепления проинсулина до инсулина в ходе его созревания. Неправильное прочтение этого кодона приводит к неправильному сворачиванию и нарушению созревания инсулина. В результате происходит снижение секреции инсулина в клетках поджелудочной железы и нарушение контроля уровня глюкозы в крови [81].

Также с развитием диабета II типа связана другая МТаза — TFB1M. Она диметилирует два высококонсервативных аденина, присутствующих в структуре «стебель-петля» на 3'-конце митохондриальной 12S рРНК [82]. Показано, что уменьшение количества TFB1M нарушает образование комплексов в митохондриальной системе окислительного фосфорилирования. В результате, стимулируемое питательными веществами образование АТФ снижается, что приводит к нарушению секреции инсулина [83].

Мутации в гене МТазы NSUN2, отвечающей за метилирование цитозина-5 в тРНК, приводят к возникновению нейропатологий. Так, установлено, что точечные мутации в этом гене вызывают умственную отсталость у человека [84]. Описаны также мутации в гене NSun2, приводящие к нарушению сплайсинга. Они вызывают синдром, подобный синдрому Дубовица: сочетание лёгкой микроцефалии, задержки роста и умственного развития, экземы и своеобразного лица с опущенным подбородком. В результате нарушения сплайсинга происходит замена канонического акцепторного сайта сплайсинга экзона 6 на альтернативный. Это приводит к нестабильности мРНК и отсутствию белка NSUN2 в клетках больных. Как следствие, происходит потеря метилирования m<sup>5</sup>C в C47 и C48 Asp<sup>GTC</sup>-тРНК — известных мишенях NSUN2 [85].

### **Нарушение метилирования ДНК**

Некорректное метилирование ДНК приводит к проявлению целого ряда различных заболеваний, среди которых аутоиммунные заболевания, нарушения обмена веществ и неврологические расстройства. Также метилирование ДНК играет важную роль в возникновении рака и старении [86].

Среди аутоиммунных заболеваний, вызванных неправильным метилированием ДНК, можно отметить ревматоидный артрит, системную красную волчанку и рассеянный склероз. Ревматоидный артрит — хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание. Полногеномный анализ метилирования ДНК показал, что генетический риск развития ревматоидного артрита вызван изменённым метилированием ДНК в двух кластерах в области главного комплекса гистосовместимости [87]. Другой пример — системная красная волчанка. Это аутоиммунное заболевание, при котором иммунная система ошибочно атакует здоровые ткани во многих частях тела. Полногеномная оценка метилирования ДНК выявила различие в метилировании у пациентов с системной красной волчанкой в генах, участвующих в продукции аутоантител [88]. Ещё один пример — рассеянный склероз: хроническое воспалительное и нейродегенеративное аутоиммунное заболевание. Хотя этиология рассеянного склероза остаётся в значительной степени неизвестной, есть исследования, показавшие изменения в метилировании ДНК во многих типах иммунных клеток [74].

Неврологические расстройства — это другой тип заболеваний, в развитии которых метилирование ДНК играет важную роль. Одним из таких заболеваний является синдром Ретта — психоневрологическое наследственное заболевание, приводящее к тяжёлой форме умственной отсталости, в основном встречающееся у девочек. Причиной синдрома являются

мутации в гене метил-СрG-связывающего белка 2 (MeCP2), расположенного на X-хромосоме [89]. Белок MeCP2 связывается с метилированными цитозинами в ДНК, активируя или подавляя транскрипцию.

Нарушение метилирование ДНК встречается при некоторых формах рака. Например, одной из причин онкогенеза при трижды негативном раке молочной железы (наиболее агрессивный подтипе этой формы рака) является изменённая эпигенетическая регуляция вследствие гиперметилирования ДНК под действием МТазы DNMT1 [91].

### 1.1.9 МТазы в медицине

МТазы находят применение в медицине. Во-первых, они могут выступать в роли мишеней действия лекарственных препаратов, предотвращающих генетические заболевания. Во-вторых, некоторые МТазы могут рассматриваться как биомаркеры раковых заболеваний, что даёт возможность использовать их в диагностических целях. Кроме того, некоторые МТазы ответственны за выработку резистентности бактерий к антибиотикам, что также важно учитывать при разработке антибактериальных препаратов.

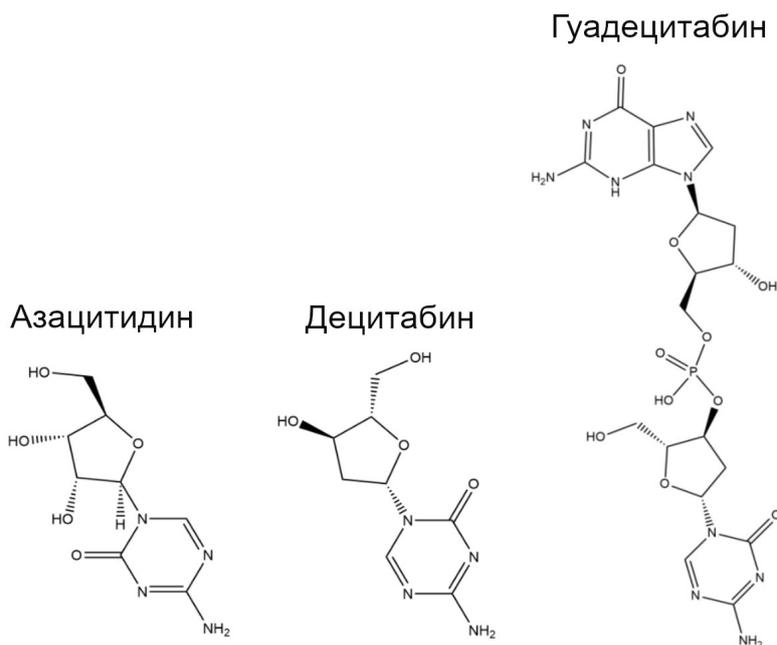


Рис 19. Ингибиторы DNMT1, используемые в качестве противоопухолевых препаратов [91]

#### МТазы как мишени действия лекарственных препаратов

Будучи причиной возникновения некоторых заболеваний, МТазы могут выступать в роли мишеней действия лекарственных препаратов, предотвращающих эти заболевания. Как уже было упомянуто выше, при трижды негативном раке молочной железы происходит гиперметилирование ДНК вследствие избыточной активности DNMT1. При этой форме рака

ингибиторы DNMT1 оказывают противоопухолевое действие на клетки. К ним относятся гипометилирующие агенты азацитидин, децитабин и гуадецитабин (рис. 19) [90].

### **МТазы как биомаркеры рака**

Некоторые МТазы нашли применение непосредственно в медицинских препаратах. Один из таких примеров – препарат Mammostrat®. Он используется в качестве теста на рак молочной железы: в основе препарата лежит гомолог тРНК МТазы 2А (hTRMT2A), являющийся биомаркером этой формы рака [91]. Данный препарат используют для оценки вероятности рецидивов.

### **МТазы и устойчивость бактерий к антибиотикам**

Многие рРНК МТазы ответственны за выработку у бактерий устойчивости к антибиотикам. Присутствие гидрофобной метильной группы в 16S или 23S рРНК изменяет физико-химические свойства и в целом форму поверхности бактериальной рибосомы. Это приводит к изменению аффинности антибиотиков, нацеленных на связывание с рибосомой [45]. Так, например, моно- и диметилирование положения N6 в основании A2058 23S рРНК МТазой Erm-типа обеспечивает устойчивость к макролидам, линкозаминам и стрептограмминам группы В; метилирование позиции С8 нуклеотида A2503 в 23S рРНК МТазой Cfr обеспечивает устойчивость к широкому кругу антибиотиков, включая фениколы, линкозамиды, оксазолидиноны, плевромутилины и стрептограммины группы А, а метилирование нуклеотидов G1405 и A1408 на 16S рРНК обеспечивает резистентность к аминогликозидным антибиотикам [44].

## **1.2 Синдром Вильямса**

Синдром Вильямса (или синдром Вильямса-Бойрена, WBS) – сравнительно редкое генетическое нарушение, сопровождающееся многочисленными физиологическими и психическими проблемами [92]. Пациенты с WBS имеют нарушения сердечно-сосудистой, эндокринной и нервной систем, которые влияют на заболеваемость и смертность [93]. Помимо патологий сердечно-сосудистой системы, заболевание сопровождается необычным лицевым фенотипом (т.н. «лицо эльфа»), а также специфическими психическими и когнитивными расстройствами.

Причиной заболевания является гемизиготная делеция участка 7-й хромосомы в области 7q11.23 (рис. 20 А). Область делеции принято называть WBSCR (Williams-Beuren Syndrome Chromosomal Region). Она состоит из последовательности длиной ~1.2 Мп.о., окружённой

три протяжёнными блоками низко-копийных повторов (LCR): А, В и С, длиной около 320 Кп.о., причём каждый из блоков повторяется 3 раза (рис. 20 В) [94]. Делеция возникает спонтанно в результате неаллельной гомологичной рекомбинации между блоками LCR. Чаще всего происходит рекомбинация между генами STF2IP1 (обозначен В) и GTF2I (обозначен В'), имеющими 99.6% идентичности, хотя встречаются и другие варианты [58].

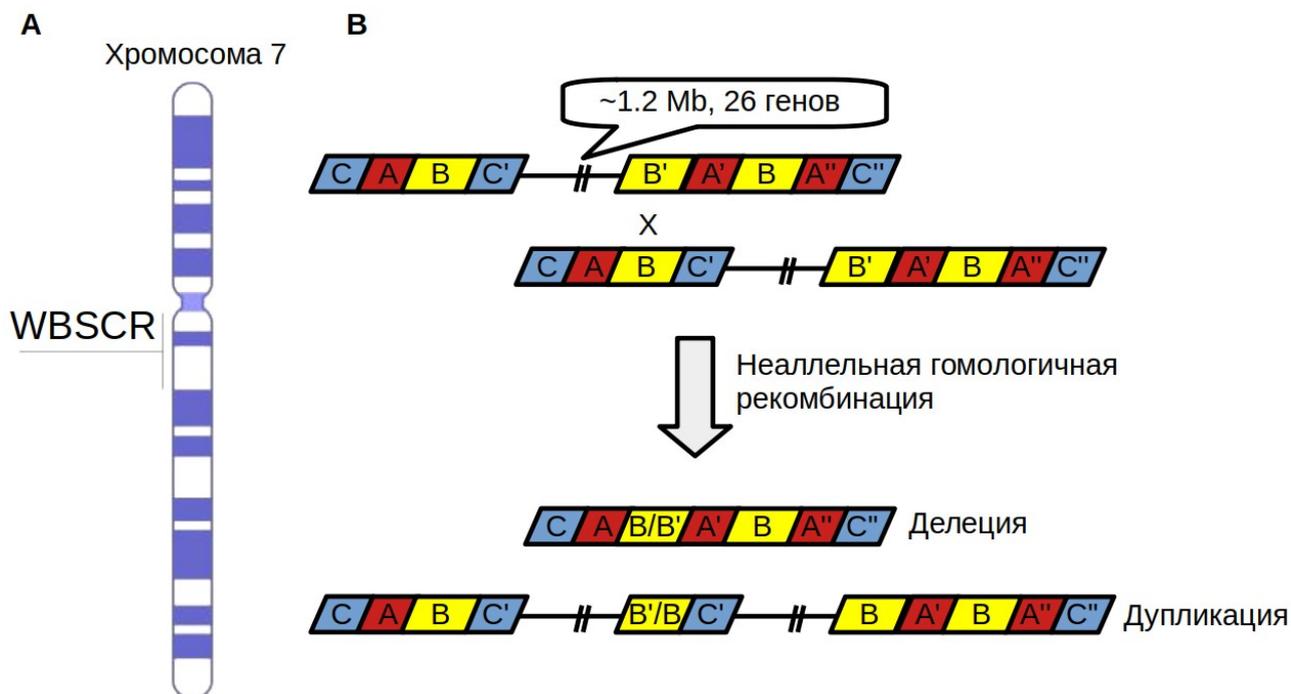


Рис 20. А. Хромосома 7. Обозначена область, подвергающаяся делеции при синдроме Вильямса (WBSCR). В. Схема неаллельной гомологичной рекомбинации, провидящей к синдрому Вильямса

Делеция, вызывающая синдром Вильямса у 98% пациентов, приводит к исчезновению приблизительно 1,5 миллиона пар оснований ДНК, в том числе 26 кодирующих генов: NSUN5, TRIM50, FKBP6, FZD9, BAZ1B, BCL7B, TBL2, MLXIPL, VPS37D, DNAJC30, WBSCR22, STX1A, ABHD11, CLDN3, WBSCR27, WBSCR28, ELN, LIMK1, ELF4H, LAT2, RFC2, CLIP2, GTF2IRD1, WBSCR23, GTF2I, NCF1, GTF2IRD2 и WBSCR16 [94] (рис. 21).

Многие, хотя и не все, продукты экспрессии генов в области WBSCR аннотированы, для некоторых из них установлены внутриклеточные функции [93,94]. Например, делеция гена ELN, находящегося в области WBSCR, приводит к недостатку белка эластина. Эластин — белок внеклеточного матрикса. Полипептидные цепи эластина связаны друг с другом поперечными шивками и образуют резиноподобные эластичные волокна. Молекулы эластина принимают более вытянутые конформации, когда волокно растягивают, и самопроизвольно скручиваются обратно после снятия растягивающей силы (рис. 22А) [95].

Позиция в 7й хромосоме	Блок LCR	Гены	цепь	тип
5'	3'			
71.936	71.677	<i>TYW1B</i>	-	unknown
71.938	71.942	<i>SBDSP</i>	+	non-coding
71.977	71.971	<i>WBSCR19</i>	-	non-coding
71.988	72.057	<i>POM121</i>	+	coding
72.063	72.057	<i>NSUN5C</i>	-	coding?
72.078	72.068	<i>TRIM74</i>	-	coding
72.078	72.080	<i>FKBP6-like</i>	+	non-coding
72.114	72.107	<i>STAG3L3</i>	+	non-coding
72.115	72.122	<i>PMS2L</i>	+	non-coding
72.138	72.128	<i>WBSCR19</i>	-	non-coding
72.146	72.150	<i>PMS2L</i>	+	non-coding
72.164	72.156	<i>WBSCR19</i>	-	non-coding
72.207	72.259	<i>GTF2IP</i>	+	non-coding
72.273	72.282	<i>NCF1B</i>	+	non-coding
72.324	72.295	<i>GTF2IRD2P</i>	-	non-coding
72.347	72.356	<i>POM121B</i>	+	non-coding
72.361	72.355	<i>NSUN5</i>	-	coding
72.380	72.364	<i>TRIM50</i>	-	coding
72.380	72.411	<i>FKBP6</i>	+	coding
72.486	72.488	<i>FZD9</i>	+	
72.575	72.492	<i>BAZ1B</i>	-	
72.610	72.589	<i>BCL7B</i>	-	
72.631	72.621	<i>TBL2</i>	-	
72.677	72.645	<i>MLXIPL</i>	+	
72.720	72.724	<i>VPS37D</i>	+	
72.736	72.733	<i>DNAJC30</i>	-	
72.736	72.750	<i>WBSCR22</i>	+	
72.772	72.751	<i>STX1A</i>	+	
72.791	72.788	<i>ABHD11</i>	-	
72.823	72.821	<i>CLDN3</i>	-	coding
72.883	72.885	<i>CLDN4</i>	+	
72.795	72.887	<i>WBSCR27</i>	+	
72.913	72.918	<i>WBSCR28</i>	+	
73.080	73.122	<i>ELN</i>	+	
73.136	73.175	<i>LIMK1</i>	+	
73.227	73.249	<i>EIF4H</i>	+	
73.262	73.282	<i>LAT2</i>	+	
73.307	73.284	<i>RFC2</i>	+	
73.342	73.458	<i>CLIP2</i>	-	
73.506	73.655	<i>GTF2IRD1</i>	+	
73.585	73.585	<i>WBSCR23</i>	+	unknown
73.710	73.812	<i>GTF2I</i>	+	coding
73.826	73.842	<i>NCF1</i>	+	coding
73.906	73.848	<i>GTF2IRD2</i>	-	coding
73.945	73.937	<i>STAG3L2</i>	-	non-coding
73.945	73.960	<i>PMS2L5</i>	+	non-coding
73.976	74.077	<i>GATS-L</i>	+	non-coding
74.128	74.094	<i>WBSCR16</i>	-	coding
74.146	74.203	<i>GTF2IRD2B</i>	+	coding
74.226	74.210	<i>NCF1C</i>	-	non-coding
74.291	74.239	<i>GTF2IP1</i>	-	non-coding
74.333	74.342	<i>WBSCR19</i>	+	non-coding
74.353	74.339	<i>PMS2L</i>	-	non-coding
74.604	74.628	<i>RCC1L</i>	+	non-coding
74.706	74.646	<i>GATS-L</i>	-	non-coding
74.749	74.757	<i>WBSCR19</i>	+	non-coding
74.783	74.774	<i>WBSCR19</i>	-	non-coding
74.795	74.791	<i>PMS2L</i>	-	non-coding
74.805	74.813	<i>WBSCR19</i>	+	non-coding
74.823	74.819	<i>PMS2L</i>	-	non-coding
74.826	74.835	<i>STAG3L1</i>	+	non-coding
74.863	74.859	<i>FKBP6-like</i>	+	non-coding
74.863	74.873	<i>TRIM73</i>	+	coding
74.877	74.884	<i>NSUN5B</i>	+	coding?
74.953	74.884	<i>POM121C</i>	-	coding
74.962	74.972	<i>WBSCR19</i>	+	non-coding
74.995	74.975	<i>PMS2L3</i>	-	non-coding
75.206	75.001	<i>HIP</i>	-	coding

Рис 21. Карта генов в области WBSCR. Приведены название гена, позиции в 7-й хромосоме, направление транскрипции (цепь ДНК) и тип гена. Вертикальными стрелками показаны наиболее распространённый вариант делеции ~1,5 Мб (происходит при внеаллельной рекомбинации блоков В/В', приводит к удалению 26 генов) и более редкий вариант ~1,8 Мб (происходит при внеаллельной рекомбинации блоков А/А", приводит к удалению 28 или более генов — в зависимости от локуса в блоке В") [58]

Эластин входит в состав органов, подверженных постоянному растяжению и сжатию: лёгких, кожи, сухожилий и артерий. В артериях эластин входит в состав эластического волокна, которое обеспечивает эластичность и позволяет крупным артериям обратимо расширяться и расслабляться при каждом сердечном цикле (рис. 22В). Недостаток эластина изменяет пассивное механическое поведение крупных артерий и нарушает сердечно-сосудистую механику [96,97]. Именно недостаток эластина вызывает характерные для синдрома Вильямса патологии сердечно-сосудистой системы, включающие суправальвулярный стеноз аорты (supravalvular aortic stenosis, SVAS), то есть сужение аорты и других крупных сосудов, гипертонию и повышенный риск внезапной смерти от остановки сердца [98,99].

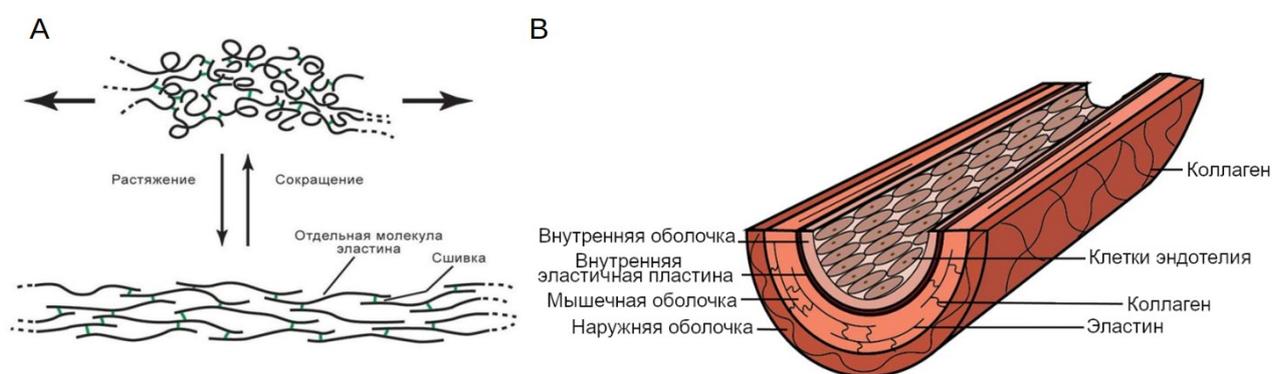


Рис 22. Эластин — белок внеклеточного матрикса, входящий в состав кожи, кровеносных сосудов, лёгких, сухожилий и других эластичных тканей. **А.** Уникальная биохимическая структура эластина обеспечивает эластичность ткани при растяжении, за счёт образования резиноподобных эластичных волокон из связанных поперечными шивками полипептидных цепей [59]. **В.** Структура артерии. Эластин содержится во внутренней эластичной пластинке, где он ориентирован продольно, а также в мышечной оболочке, где он ориентирован по окружности [84]

Также в область делеции WBSCR попадают транскрипционные факторы GTF2I и GTF2IRD1, про которые известно, что они оказывают влияние на интеллектуальные способности и социальные функции [100].

Делеция гена LIMK1, кодирующего LIM-киназу 1, вызывает нарушение наглядно-образного мышления [101]. Гаплонедостаточность белка BAZ1B вызывает изменения экспрессии генов в клетках-предшественниках нервной системы и объясняет нарушение транскрипции в нейронах. Предполагают, что недостаток BAZ1B является вероятным фактором, влияющим на неврологические проявления при синдроме Вильямса [102].

Для некоторых генов из области делеции известно, какие функции они выполняют в клетке, но не ясно — как это влияет на фенотип. Одним из таких генов является WBSCR22, кодирующий SAM-зависимую рНК МТазу [103,104]. Белок WBSCR22 необходим для пре-

рибосомного процессинга РНК — он обеспечивает N7-метилирование основания G1639 в 18S рРНК человека [105,106].

Выявление физиологических последствий потери генов, приводящих к характерному поведенческому фенотипу больных, является одним из наиболее сложных направлений в исследованиях WBS. Интересно, что домашние собаки проявляют некоторые поведенческие черты, типичные для людей с WBS [107]: по сравнению со своим предком, серым волком, домашние собаки обладают повышенной склонностью к иницированию социальных контактов, демонстрируя «сверхдружелюбность». При сравнении генома собаки с йеллоустонским серым волком были обнаружены вставки мобильных элементов, влияющие на регуляцию транскрипции в генах, ответственных за WBS [108]. Секвенирование транскриптома подтвердило, что уровень экспрессии шести генов, расположенных в области WBSCR (WBSCR17, LIMK1, GTF2I, WBSCR27, BAZ1B и BCL7B), различаются у этих животных, что, вероятно, и объясняет разные модели поведения.

Как следует из упомянутого выше исследования, одним из возможных белков-кандидатов, потенциально причастных к регуляции поведенческих аспектов больных синдромом Вильямса, является WBSCR27. Интересно отметить работу, в которой сравнили последовательности геномов человека и шимпанзе, в результате чего идентифицировали девять специфичных для человека мутаций, сдвигающих рамку считывания [109]. Одна из этих мутаций находится в кодирующей последовательности гена WBSCR27: у человека в этом гене имеется вставка длиной 11 п.н. Вставка произошла специфически в человеческой линии и, вероятно, могла каким-то образом повлиять на функционирование белка; и тем самым прямо или косвенно изменить социальное поведение человека по сравнению с шимпанзе. Однако прямого экспериментального подтверждения этой гипотезы пока нет.

### **1.3 Белок WBSCR27**

Белок WBSCR27 (Williams-Beuren Syndrome Chromosomal Region 27 protein) – продукт одного из генов, подвергающихся делеции при синдроме Вильямса. Известен также как METTL27 (Methyltransferase-Like protein 27). Этот белок изучен очень мало. На данный момент в литературе имеется всего четыре экспериментальных факта об WBSCR27. Три из них посвящены экспериментам по измерению дифференциальной экспрессии генов: в них сообщается, что уровень экспрессии WBSCR27 изменяется в ответ на различные внешние условия. В четвёртой работе описаны эксперименты, проведённые на рекомбинантном белке WBSCR27, не приведшие к какому-либо результату.

Так, гиперэкспрессия WBSCR27 обнаружена в трёх типах опухолей: карциноме пищевода, аденокарциноме желудка и почечной папиллярной карциноме [110] с помощью биоинформатического анализа данных, доступных в TCGA (Атлас генома рака). Кроме того, гиперэкспрессия WBSCR27 наблюдается при раке кишечника, что может быть использовано в качестве биомаркера этого заболевания [111].

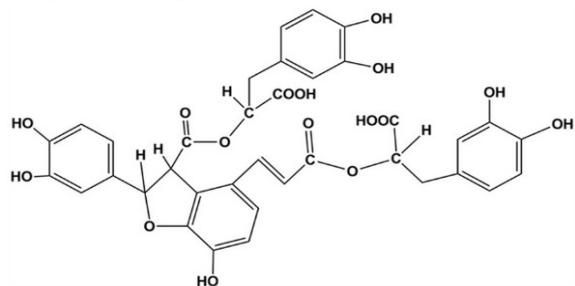


Рис 23. Сальвианоловая кислота В

В другой работе [112], упоминающей WBSCR27, изучали влияние сальвианоловой кислоты В (рис. 23) на ожирение, вызванное высококалорийной диетой у мышей. В рацион мышей добавляли сальвианоловую кислоту и измеряли возникающие изменения в экспрессии генов методом RNA-Seq. Было найдено, что при воздействии сальвианоловой кислоты на таких мышей наибольшим образом повышается экспрессия гена WBSCR27 (в 2.053 раза). Данный результат подтвердили методом количественного ПЦР в реальном времени. Среди других РНК, количество которых изменялось в зависимости от наличия сальвианоловой кислоты, — мРНК и длинные некодирующие РНК, связанные с процессами дифференцировки адипоцитов, метаболизма липидов, воспаления и устойчивостью к инсулину. Тем не менее, все эти данные не проливают света на возможную роль WBSCR27 в синдроме Вильямса, как и на его биологическую функцию в целом.

Другая экспериментальная работа [113], в которой упоминался белок WBSCR27, посвящена изучению метилазы лизина-12 в гистоне H4 — гетеродимеру KMT9, состоящему из двух белков: C21orf127, типичного представителя МТаз класса I (с укладкой Россмана), отвечающего за связывание с SAM и катализ, и вспомогательного белка TRMT112. В этой работе впервые обнаружена МТазы класса I, участвующая в метилировании лизина гистонов — все другие известные на тот момент примеры МТаз лизина гистонов относились к МТазам класса V (с SET-доменом) [114]. В связи с обнаружением МТазы гистонов класса I, авторы предположили, что среди оставшихся 131 предположительных МТаз класса I с неизвестными субстратами могут быть и другие белки, отвечающие за метилирование гистонов. Авторы сделали множественное выравнивание аминокислотных последовательностей неизвестных МТаз и белка C21orf127 и провели кластерный анализ. При этом WBSCR27 оказался одним из семи наиболее близких белков. Для этих белков были проведены эксперименты по *in vitro* метилированию гистонов радиоактивным <sup>3</sup>H-SAM, однако, в отличие от KMT9, ни один из них МТазной активности на гистонах не проявлял.

## 1.4 Методы изучения МТаз

МТазы весьма разнообразны по структуре и свойствам, однако почти все они используют в качестве донора метильной группы одну и ту же молекулу — SAM. МТазы обладают строгой субстратной специфичностью, поэтому для большинства видов метилируемых молекул имеется своя собственная МТаза. Поиск МТаз, катализирующих те или иные реакции метилирования, также как и поиск субстрата для определённой МТазы — сложная задача. В этом разделе описаны методы определения связанного с МТазой лиганда, а также приведены способы определения конкретных биологических мишеней метилирования.

### 1.4.1 Определение связанного лиганда в комплексе с МТазой

Многие МТазы прочно связывают кофактор и ко-продукт метилирования. Зачастую они со-выделяются с ним при выделении из клеток. Например, МТаза DENV-3 (МТаза вируса Денге) совыделяется только с SAM [115], а белковая L-изоаспартил (D-аспартил) МТаза — с SAH [116].

В литературе описано несколько способов определения совыделяющегося с белком лиганда. Так, в работе [117] выполняли эксперименты по изотермической калориметрии титрования белка лигандами (SAM и SAH) и сравнивали энергию, выделяющуюся при титровании рекомбинантно полученного белка, с энергией, выделяющейся при титровании белка в апо-форме и в виде комплексов с SAM и SAH. Другой способ предложен в работе [116], где провели денатурацию рекомбинантно полученного белка, отделили осадок и установили состав супернатанта методом HPLC, сравнивая время удерживания со стандартами. Также возможно определение состава комплекса при изучении белков методом рентгеновской кристаллографии — если в процессе кристаллизации не добавляется дополнительно лиганд, то наличие сигналов метильной группы в структуре говорит о том, что исходный комплекс содержал SAM [118]. Ещё один вариант, описанный в работе [115], основан на денатурации белка мочевиной с последующей обработкой смеси антителами анти-SAH и проведением эксперимента по конкурентной поляризации флуоресценции для определения относительной концентрации SAH.

Способность белка связывать SAM или SAH может служить подтверждением его МТазной активности и предпосылкой к дальнейшему поиску молекулярной мишени метилирования.

## 1.4.2 Выделение индивидуального белка из ткани по активности

Для большинства МТаз малых молекул субстратная специфичность была установлена последовательным фракционированием органов и тканей, проявляющих соответствующую ферментативную активность. Ткани животных разделяли на фракции, отбирая те, в которых сохранилась ферментативная активность, постепенно доходя таким образом до индивидуального белка, отвечающего за эту активность. Строение индивидуально выделенного белка устанавливали, как правило, масс-спектрометрически. Таким методом были найдены многие МТазы малых молекул, в том числе упомянутые выше AS3MT, TPMT и PNMT.

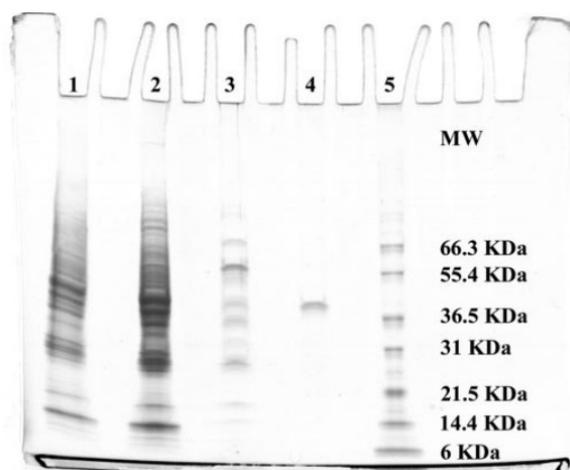


Рис 24. Поиск белка, отвечающего за метилирование арсенитов [119]. 1 — цитоплазма клеток крысиной печени; 2 — цитоплазма после подкисления; 3 — активные фракции после хроматофокусирования гель-хроматографии; 4 — активные фракции после выделения за SAM-сефарозу; 5 — маркер молекулярной массы

МТаза AS3MT (As(III)-МТаза) впервые описана в работе [119]. Изначально была обнаружена каталитическая активность цитоплазмы клеток по отношению к реакции метилирования арсенитов (III), а далее с помощью комбинации обработки цитоплазмы клеток печени крыс кислотой, хроматофокусирования и аффинной хроматографии на SAM-сефарозе выделили единственный белок, отвечающий за эту активность (рис. 24).

В случае МТазы TPMT (тиопурин-S-МТаза) изначально была известна активность печени и почек мышей по метилированию тиопуринов, после чего был выделен белок, отвечающий за указанную активность из печени и почек мышей и крыс путём кислотного осаждения неактивных белков из 34000g-фракции с последующей очисткой целевого белка осаждением сульфатом аммония [120]. Однако в данной работе не было установлено — выделен ли индивидуальный белок, отвечающий за активность, или это два разных белка. В

последующей работе [121] белок выделили с помощью гель-фильтрации и проверки различных фракций на каталитическую активность.

Ещё один пример — поиск МТазы, отвечающей за N-метилирование фенилэтанолamines. Соответствующая МТаза (PNMT, фенилэтаноламин N-МТаза) была впервые установлена и выделена в работе [122] фракционированием гомогенизата надпочечников обезьян.

### 1.4.3 Использование радиоактивных изотопов

С помощью изотопно-замещённой по метильной группе молекулы SAM в субстрат МТаз можно внедрять радиоактивные изотопы:  $^{14}\text{C}$  и  $^3\text{H}$ . Для этого проводят реакцию *in vitro* метилирования рекомбинантной МТазой или клеточным экстрактом [123] в присутствии молекулы SAM, содержащей соответствующие изотопы в метильной группе.

Протекание реакции метилирования под действием SAM-зависимых МТаз сопровождается образованием SAH, ингибирующего реакцию, поэтому для увеличения числа оборотов МТазы в реакционную смесь часто добавляют SAH-нуклеозидазу — фермент, расщепляющий SAH [124].

Количество введённой в макромолекулы радиоактивной метильной группы оценивают с помощью сцинтилляционного счётчика [125] или измеряют автордиографически после разделения в полиакриламидном геле [126]. Перед подсчётом радиоактивности необходимо отделить непрореагировавший радиоактивный SAM и низкомолекулярные радиоактивные продукты его распада от меченого субстрата. При изучении ДНК-МТаз классическим считается использование фильтровальной бумаги DE-81 для связывания ДНК после окончания реакции [127]. В случае метилирования белков предложено выделять белки и пептиды из реакционной смеси с помощью ZipTip-C4 — наконечников для пипеток, содержащих сорбент C4, селективно связывающий пептиды [128]. При проведении *in vitro* метилирования РНК продукт отделяют, осаждая РНК из реакционной смеси этанолом после фенол-хлороформенной экстракции белков [126]. Ещё один вариант детекции меченого продукта реакции в присутствии избытка радиоактивного SAM основан на использовании метода SPA (Scintillation Proximity Assay). В этом методе используют шарики микроскопического размера, содержащие внутри микро-сцинтиллятор, излучающий свет при стимуляции. Стимуляция происходит, когда молекулы с радиоактивной меткой взаимодействуют и связываются с поверхностью шарика. Это взаимодействие заставит шарик излучать свет, который можно обнаружить с помощью фотометра. В случае изучения

МТаз этим методом предлагается использовать предварительно биотинилированные субстраты, например, модифицированные пептиды, взаимодействующие с содержащими микро-сцинтиллятор шариками, покрытыми стрептавидином [129].

Изучение процессов метилирования с использованием радиоактивных меток *in vitro* позволяет идентифицировать и подтверждать макромолекулярные субстраты МТаз. Например, этим способом установлено, что МТаза YbeA метилирует псевдоурдин в позиции 1915 23S рРНК *Escherichia coli* [130], а МТаза YfiC *E. coli* отвечает за модификацию m<sup>6</sup>A37 в валиновой тРНК [125].

#### 1.4.4 Использование стабильных изотопов

С помощью изотопнозамещённой молекулы SAM можно ввести в субстрат МТазы стабильные изотопы <sup>2</sup>H и/или <sup>13</sup>C. Этот приём используется как для идентификации субстратов МТаз, так и для оценки их активности методами масс-спектрометрии и ЯМР.

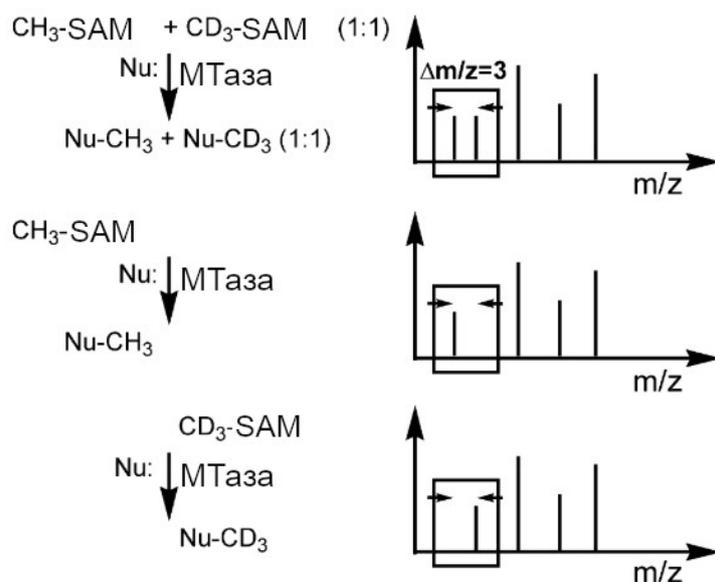


Рис 25. Схема масс-спектрометрического определения субстратов белковых МТаз [131]

Так, в работе [131] предложено использовать подход, основанный на изотопном мечении *in vivo* с последующим масс-спектрометрическим анализом, для идентификации продуктов биологического метилирования. Метод основан на параллельном выращивании клеток в трёх разных средах, содержащих а) CH<sub>3</sub>-метионин, б) CD<sub>3</sub>-метионин и в) смесь 1:1 CH<sub>3</sub> и CD<sub>3</sub>-метионина. В результате в клетках генерируется CH<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>- и 1:1 CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>-содержащий SAM, поскольку весь клеточный SAM синтезируется из метионина. После этого из клеток выделяют малые молекулы и проводят масс-спектрометрический анализ. Наличие

различающихся на 3 единицы  $m/z$  сигналов указывает на продукт действия МТазы (рис. 25) [131].

Метка стабильными изотопами позволяет проводить не только качественную, но и количественную оценку содержания продукта метилирования с помощью масс-спектрометрических методов. Например, *in vitro* метилирование РНК с помощью SAM-d<sub>3</sub> с последующим анализом РНК в экспериментах LC-MS/MS было использовано для определения активности МТазы METTL14. Этот белок связывает МТазу-партнёр METTL3 и в составе прочного гетеродимерного комплекса METTL3-METTL14 осуществляет модификацию m<sup>6</sup>A в мРНК млекопитающих [132].

Кроме того, введение изотопа <sup>13</sup>C открывает возможности изучения метилирования с помощью метода ЯМР, поскольку этот изотоп углерода имеет ненулевой спиновый магнитный момент и может быть детектирован в эксперименте ЯМР. Например, методом твердотельного ЯМР анализировали опухолевые ткани, выращенные с добавлением <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-метионина [133]. Попадая в клетки, меченый метионин превращается в <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-меченный SAM, который далее служит субстратом МТаз. В указанной работе с помощью измерения спектров ЯМР <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H HSQC метильных групп изучали различия в распределении <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-групп в опухолях и нормальных тканях, которые могут быть связаны с нетипичным метаболизмом метионина, в частности, вследствие некорректной работы МТаз.

### 1.4.5 Использование синтетических аналогов SAM

Способность МТаз «ошибаться» и узнавать разнообразные синтетические аналоги SAM нашла применение во многих областях молекулярной биологии и в том числе может быть использована для поиска неизвестных субстратов МТаз.

#### **Замена CH<sub>3</sub> на биоортогональную группу**

Описано множество случаев успешного переноса под действием МТаз заместителей, содержащих азидную группу или концевую тройную связь. Для этого в качестве кофакторов используются аналоги SAM с соответствующими заместителями при атоме серы, вместо CH<sub>3</sub>-группы. В результате получают функционализированные макромолекулы, способные вступать в «клик»-реакцию.

Полученные функционализированные субстраты МТаз могут быть биотинилированы с помощью клик-реакции, что делает возможным как их аффинное выделение из сложных биологических смесей, так и визуализацию методами вестерн-блоттинга стрептавидиновыми

конъюгатами. Серьёзной проблемой этого подхода является наличие в клеточном лизате большого количества других МТаз, каждая из которых может также узнавать аналог SAM. На данный момент нет примеров успешного поиска новых субстратов с помощью такого метода, но этот подход успешно используется для введения флуоресцентных меток в ДНК, РНК [45] или белки [134]

### Реагенты, ковалентно сшивающиеся с субстратом

Другой вариант захватывания субстратов МТаз — получение бисубстратных аддуктов с помощью ковалентной сшивки между синтетическим кофактором (аналог SAM) и природным субстратом. Во многих случаях МТазы связывают свои субстраты недостаточно прочно для того, чтобы их можно было бы выделить с помощью ко-иммунопреципитации с МТазой. Между тем, известно, что большинство МТаз связывают свой кофактор крайне прочно. Поэтому ковалентная сшивка субстрата с кофактором позволяет прочно связать субстрат с МТазой, что даёт возможность совыделения субстрата за МТазу, содержащую аффинный довесок. Полученные аддукты имеют повышенное сродство к конкретной МТазе, поскольку связываются с ней сразу в двух сайтах, из-за чего диссоциация продукта от фермента затрудняется, приводя к одноразовому срабатыванию фермента.

Один из вариантов ковалентно-сшивающегося реагента — S-аденозил-винтионин, предложенный в работе [135]. Авторы показали, что этот реагент может быть синтезирован ферментативно — с помощью SAM-синтазы (фермент, под действием которого получается SAM и метионина) и продемонстрировали его эффективность для алкилирования ароматических тиолов под действием МТазы тиопуринов TPMT *in vitro* (рис. 27, [135]).

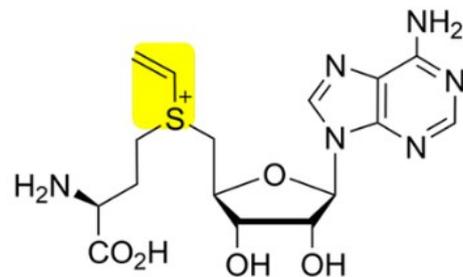


Рис 26. S-аденозилвинтионин (AdoVin)

Продукт реакции выделяли с помощью аффинной хроматографии за гистидиновый (6-His) фрагмент, причём было показано полное отсутствие ковалентно-сшитого бисубстратного аддукта где-либо в реакционной смеси, кроме как в комплексе с белком, что говорит о чрезвычайно высокой аффинности полученного реагента к МТазе. Более того, даже в присутствии большого избытка конкурирующих за сайт связывания молекул SAM и SAH, полученный аддукт оставался связанным с белком.

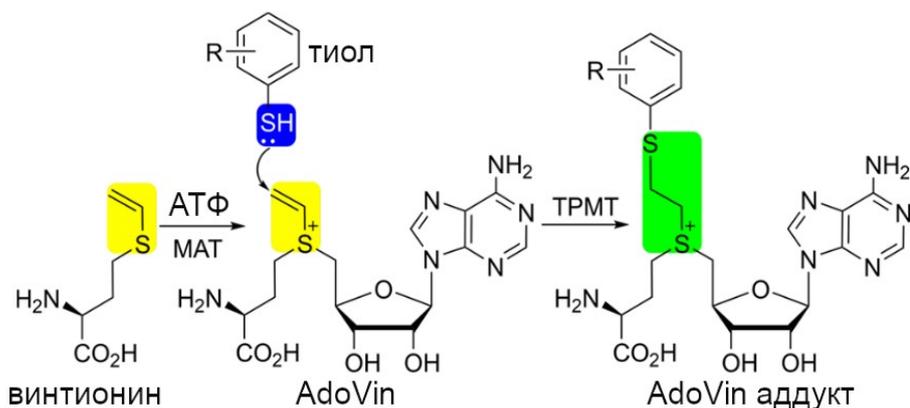


Рис 27. Схема получения ковалентного аддукта SAH с субстратом МТазы [135]

В рамках настоящей работы некоторые из описанных выше методов используются для идентификации потенциального субстрата МТазы WBSCR27, ассоциированной с синдромом Вильямса. Также проводится поиск субстрата метилирования более общими методами, имеющимися в арсенале молекулярной биологии, — не специфическими именно для класса МТаз. Кроме того, изучается структура, динамические свойства белка WBSCR27 и его взаимодействия с различными низкомолекулярными веществами.

## Глава 2. Экспериментальная часть

### 2.1 Реактивы и биопрепараты

В работе были использованы следующие реактивы:

**Химмед:** гидроксид натрия, гидроксид калия, метанол, соляная кислота, уксусная кислота, хлороформ.

**Sigma:** аденин, ампициллин, ацетонитрил, биотин, бромфеноловый синий, бромистый этидий, канамицин, ксиленцианол, нитрат серебра, формальдегид, хлорид марганца (II), 5'dAdo, MTA, SAH, SAM.

**Helicon:** агар, агароза для электрофореза, акриламид, ацетат аммония, ацетат натрия, борная кислота, гидрофосфат натрия, глюкоза, дигидрофосфат натрия, 1,4-дитиотреитол (ДТТ), додецилсульфат натрия, дрожжевой экстракт, 2-меркаптоэтанол, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES), N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония, Triton X-100, Tween 20, ТЕМЕД, сахароза, изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид (ИПТГ), хлорид аммония, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид магния, хлорид натрия, ЭДТА.

**Amresco:** ДМСО, мочеви́на, среда LB, трис(оксиметил)аминометан (Tris), таблетки PBS 100 и 500 мл, бычий сывороточный альбумин, глицерин,

**Ферейн:** этанол

**Thermo Scientific:** генетицин G418, нуклеозидтрифосфаты, РНКазы А, эндонуклеазы рестрикции, G418, GlycoBlue, PCR Master Mix, Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit, Maxima Reverse Transcriptase, T4 ДНК-лигаза, T4 РНК, Trizol, стрептавидиновые шары Dynabeads M-280, липофектамин 3000.

**NEB:** Q5 ДНК-полимераза.

**Евроген:** набор реагентов для выделения ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей Cleanup mini и набор реагентов для выделения плазмид Plasmid miniprep.

**Lumiprobe:** олигодезоксирибонуклеотиды.

**Roche:** Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail.

**Gibco:** среда DMEM/F12, 2,5% трипсин (10x), эмбриональная телячья сыворотка FBS, аланил-глутамин GlutaMAX (100x), смесь антибиотиков пенициллина (10000 ед/мл) и стрептомицина (10000мкг/мл).

**ПанЭко:** среда RPMI без метионина с аланилглутамином.

**Promega:** набор реагентов для выделения плазмид PureYield Plasmid Miniprep System.

**Calbiochem:** Phosphatase Inhibitor Cocktail

**GE Healthcare Life Sciences:** Streptavidin Sepharose High Performance.

**Cambridge Isotope Laboratories:** S-[метил-<sup>13</sup>C]-S-аденозил-L-метионин (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-SAM), S-[метил-<sup>13</sup>C]-L-метионин (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-L-метионин), <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-D-глюкоза (99 ат %), <sup>13</sup>C-метилйодид и <sup>15</sup>N-сульфат аммония (95 ат. % и 98 ат. %)

**solvex-d:** тяжелая вода-d2

**PerkinElmer:** S-[метил-<sup>14</sup>C]-S-аденозил-L-метионин (<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>-SAM), 10 мкКю (370 кБк)

### 2.1.1 Синтез <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-SAM

SAM, содержащий изотоп <sup>13</sup>C, был получен синтетическим путём по описанной в литературе методике [136] с использованием <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>I для включения <sup>13</sup>C-углерода в молекулу:



15 мг SАН растворили в 500 мкл муравьиной кислоты, добавили 300 мкл <sup>13</sup>C-метилюдида, перемешали на вортексе в течение двух часов и оставили при комнатной температуре в темноте. По прошествии 5 дней добавили 1 мл воды и проэкстрагировали непрореагировавший метилиодид 2 мл диэтилового эфира дважды. рН водной фазы довели до 7.15, после чего образец нанесли на ионо-обменную хроматографическую колонку (картридж 732-0003 BioRad), предварительно уравновешенную 0,01 М натрий-фосфатным буферным раствором (рН 7.15). Колонку промыли 55 мл того же буферного раствора. При этом сначала смывался незаряженный непрореагировавший SАН и продукт расщепления SAM – МТА, затем начинал смываться положительно заряженный SAM. Далее колонку промыли 20 мл 0,1 М уксусной кислоты и 20 мл 4 М уксусной кислотой. Основная часть

продукта сходила с колонки с 13 по 26 мл. Дополнительно небольшое количество SAM собрали на 56-61 мл.

Чистоту полученного продукта определили методами спектроскопии ЯМР, концентрацию определили с помощью УФ-спектрофотометрии ( $\epsilon_{260} = 16$ ).

## 2.1.2 Получение изотопно-меченных образцов белка WBSCR27

Для выполнения работы использовали образцы белка WBSCR27 различного изотопного состава: равномерно меченные  $^{15}\text{N}$ , равномерно дважды меченные ( $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$ ), а также полностью дейтерированные образцы, специфически меченные  $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$  по метильным группам треонина и метионина.

Бактерии *E. coli* штамма BL21 (DE3 pLysS) трансформировали вектором pET30aTEV, содержащим 6His-тэг для аффинного выделения, S-тэг для повышения растворимости белка и сайт расщепления TEV-протеазой на N-конце белка WBSCR27 (рис. 28). Ночную культуру получали в среде LB, содержащей канамицин (50 мкг/мл) при 37 °С.

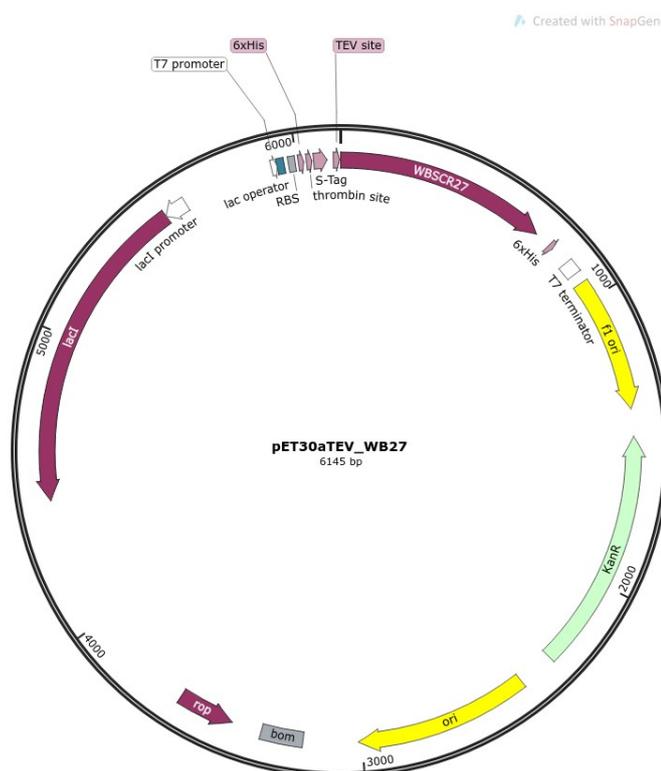


Рис 28. Карта плазмиды pET30aTEV-WBSCR27 для экспрессии рекомбинантного белка WBSCR27 в *E. coli*

Для приготовления среды M9 в воде растворяли 2 г/л D-глюкозы и 1 г/л сульфата аммония и другие компоненты, перечисленные в [137], но без витаминов. Предварительную культуру готовили путём смешивания ночной культуры в LB и свежей среды M9 в соотношении 1:100. Далее предварительную культуру смешивали со средой M9 в соотношении 1:100 и выращивали при 37 °С до достижения оптической плотности  $OD_{600}=0,6$ . Затем индуцировали экспрессию с помощью 1М ИПТГ и выдерживали в течение 16-23 часов при 17°С. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием, после чего ресуспендировали в 4 объемах охлаждённого лизирующего буфера (2x PBS, 10% глицерин, 20 мМ имидазол, 0,1 мг/мл лизоцим, 10 мМ 2-меркаптоэтанол и смесь ингибиторов протеаз cOmplete от Roche). Затем клетки лизировали ультразвуком и удаляли дебрис центрифугированием (15 000 g, 30 минут).

Супернатант помещали в колонку со смолой Ni-NTA-сефароза (Qiagen, Hilden, Германия) и промывали промывочным буфером (2x PBS, 10% глицерин, 20 мМ имидазол, 10 мМ 2-меркаптоэтанол). Белок элюировали буфером для элюции (2x PBS, 10% глицерин, 250 мМ имидазол, 10 мМ 2-меркаптоэтанол) и подвергали диализу в течение ночи в диализном буфере (50 мМ фосфатного буфера, 50 мм NaCl, 1 мМ ДТТ, 0,2% NaN<sub>3</sub>). Хранили образцы в лиофилизированном виде при -60 °С.

При получении <sup>15</sup>N-WBSCR27 среду M9 готовили с использованием (<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, содержащего 95 ат. % <sup>15</sup>N. Для приготовления образцов <sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C-WBSCR27 использовали (<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 ат. % <sup>15</sup>N) и глюкозу-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (99 ат. % <sup>13</sup>C). Белок, селективно меченный <sup>13</sup>CH<sub>3</sub> по метильным группам остатков треонина и метионина, экспрессировали в среде <sup>15</sup>N M9, содержащей 100% D<sub>2</sub>O, коммерческую добавку ISOGRO, Met-ε-<sup>13</sup>CH<sub>3</sub> и Thr-γ-<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, а также полностью дейтерированные 2-кетобутират и Gly-d<sub>2</sub> для предотвращения включения изотопов в другие аминокислоты [138].

### 2.1.3 Рефолдинг WBSCR27 для получения апо-формы

Для получения апо-формы образцы белка в комплексе с SAM или SAH растворяли в 8 М мочеvine и диализовали в течение ночи против 1 л 8 М мочевины для удаления SAM/SAH из диализного мешка. Затем диализный мешок перемещали в 250 мл рефолдирующего буфера (50 мМ фосфата натрия, 50 мМ NaCl, 3 мМ ДТТ и 0,02% NaN<sub>3</sub> при pH 7,0). Буфер для рефолдинга меняли четыре раза в течение 16 ч (последний раз с 10 мМ ДТТ). Все процедуры диализа проводили при 4 °С.

## 2.1.4 Получение $^{13}\text{C}\{\text{U}\}$ -SAH

Для получения  $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$  равномерно меченого SAH разработан протокол, основанный на склонности WBSCR27 к со-выделению в виде комплекса с SAH. Для этого бактерии *E. coli*, оверэкспрессирующие белок WBSCR27 выращивали на изотопно-меченой среде  $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$  M9, как описано в предыдущем разделе.

После выделения белка с помощью аффинной хроматографии и диализа в буфер для диализа провели денатурацию белка и экстракцию SAH путём добавления одного объёма смеси 1:1 холодного метанола и хлороформа. После интенсивного перемешивания и инкубации в течение 10 мин при 5 °C пробирки центрифугировали (1400 g, 30 минут, 5 °C). Водный (верхний) слой отбирали, выпаривали растворитель на вакуумном концентраторе SpeedVac при комнатной температуре в течение 3 ч, а затем дополнительно высушивали методом лиофилизации.

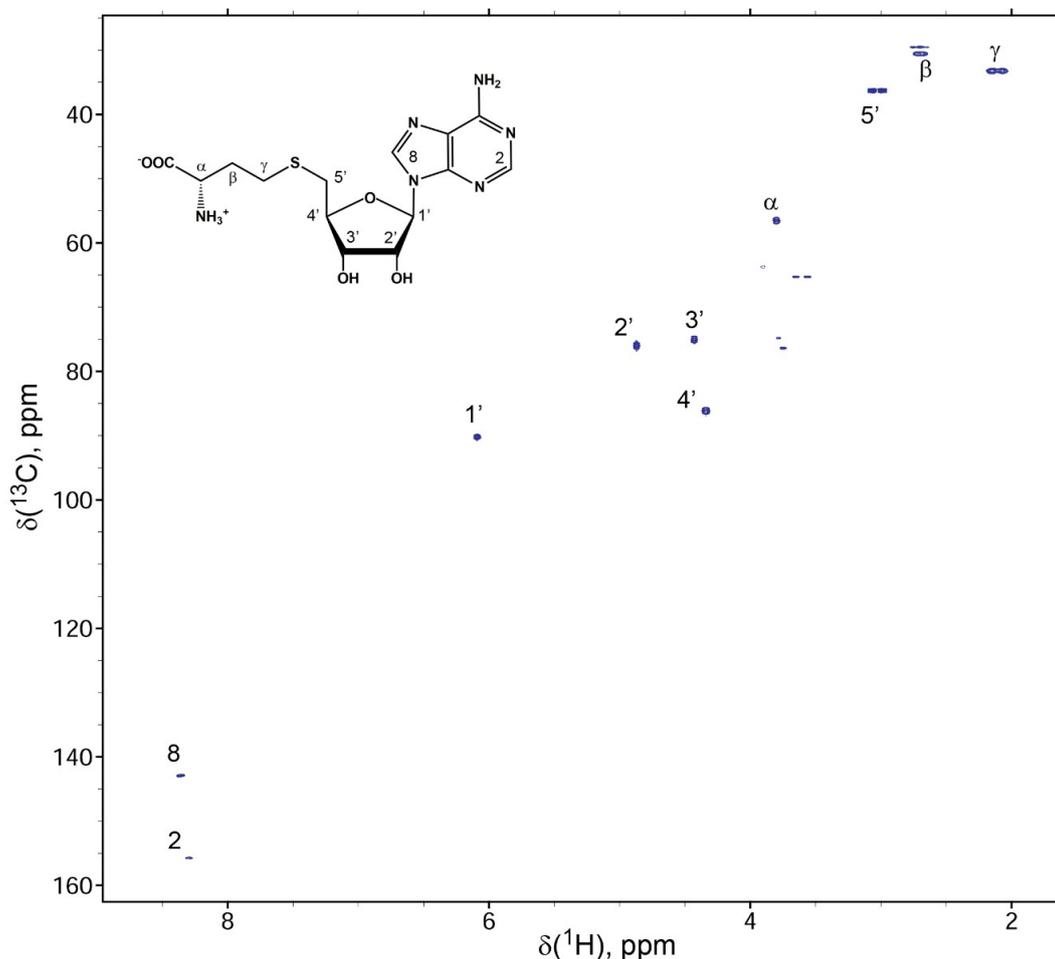


Рис 29.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC спектр меченого  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  SAH, выделенного из культуры клеток *E. coli* BL21 (DE3 *rLysS*), выращенной на минимальной среде M9, содержащей изотопы  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ . Отнесение сигналов показано цифрами. Спектр зарегистрирован в присутствии 50 мМ фосфатного буфера (pH 7,0), при 35 °C на ЯМР-спектрометре с резонансной частотой 600 МГц

Концентрацию  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -SAH измеряли спектрофотометрически ( $\epsilon_{260} = 16000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Чистоту подтверждали по спектрам ЯМР 1D и 2D (рис. 29) Образец содержал ДТТ в качестве примеси, которая, однако, не мешает последующим экспериментам. В результате данной процедуры получили 3,2 мкмоль  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -SAH из 2 л среды  $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$  M9.

## 2.2 Клеточные линии

Для экспериментов по поиску белковых партнёров WBSCR27 потребовалось выращивать эукариотические клетки. Для этой цели выбрана адгезивная клеточная линия NIH3T3 — линия фибробластов, выделенная из эмбриона мыши. Эти клетки популярны в лаборатории, они быстро растут и хорошо восприимчивы к трансфекции.

### 2.2.1 Линии клеток, использованные в ходе работы

Клеточные линии, созданные для выполнения задач настоящего исследования, схематично показаны на рис. 30.

Для поиска потенциальных субстратов WBSCR27 мы инактивировали ген *Wbscr27* с помощью системы CRISPR/Cas9. Для этого во второй экзон внесли мутацию, нарушающую рамку считывания на обоих аллелях, что привело к возникновению преждевременного стоп-кодона (рис. 30A).

Для экспериментов по ко-иммунопреципитации получены клеточные линии, экспрессирующие белок WBSCR27 слитый с эпитопом гемагглютинаина YPYDVPDYA, известного также как HA-метка [139]. В одном случае в клеточную ДНК неспецифически встроили ген WBSCR27 с N-концевой меткой HA под регулируемым промотером (рис. 30B) — в результате получили клетки с эктопической экспрессией HA-WBSCR27. В другом — направленно, с помощью системы CRISPR/Cas9, встроили фрагмент ДНК, кодирующий метку HA, на C-конец гена WBSCR27 (рис. 30C). Так получили линию, экспрессирующую WBSCR27-HA с природным уровнем экспрессии.

Ещё две клеточные линии были созданы на основе нокаутной по *Wbscr27* линии для идентификации белков-партнёров WBSCR27 методом BioID [140]. Эти клеточные линии эктопически экспрессировали мутантную биотинлигазу из *E.coli* BirA R118G (обозначается как BirA\*), слитую с HA и WBSCR27 (HA-BirA\*-WBSCR27, рис. 30D) или только с HA — в качестве контроля (HA-BirA\*, рис. 30F).

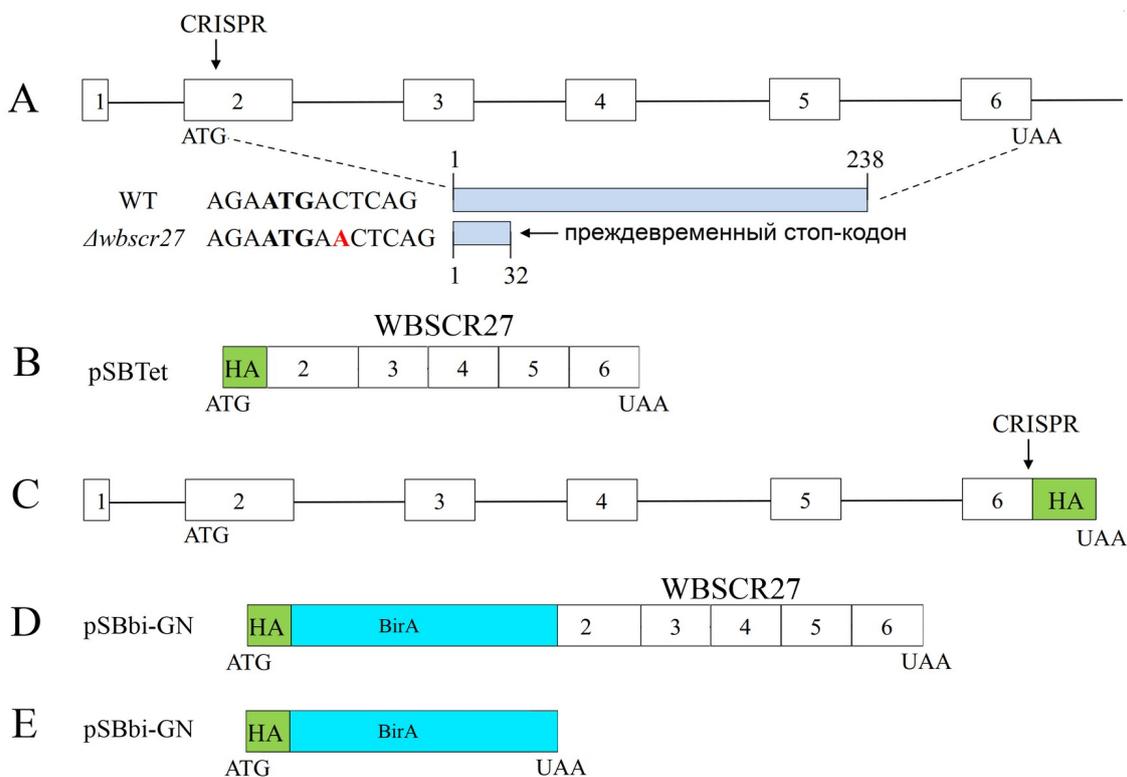


Рис 30. Клеточные линии на основе NIH3T3, созданные в рамках настоящего исследования. **A.** Нокаутная линия, содержащая биаллельную точечную мутацию во 2-м экзоне, используемая для изучения фенотипических последствий инактивации гена *Wbscr27*. Преждевременный стоп-кодон, появляющийся из-за сдвига рамки 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

## 2.2.2 Получение клеточных линий

Клеточные линии, необходимые для выполнения задач данного проекта, создавали совместно с к.х.н. Чугуновой А.А. и Новолаевым Т.И.

### Инактивация гена *Wbscr27*

Для инактивации гена *Wbscr27* внесли инактивирующие мутаций во второй экзон. Последовательность гидовой РНК, нацеленной на второй экзон, клонировали в вектор pX458 [141]. Полученную плазмиду трансфецировали в клетки NIH3T3 липофектаминоом 3000 в соответствии с протоколом производителя. Трансфецированные клетки рассеяли в отдельные лунки 96-луночных планшетов с помощью клеточного сортера FACSAria III и выращивали в течение 2-3 недель. Полученные моноклональные клеточные линии анализировали путём амплификации и секвенирования целевой области генома. В табл. 1

приведены олигонуклеотидные последовательности, использованные для инактивации гена и проверки полученных нокаутных линий.

*Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для инактивации гена Wbscr27*

Название	Последовательность (5'-3')
WBSCR27_3_F	CACCGCCCCCGCAGGAGAATGACTC
WBSCR27_3_R	AAACGAGTCATTCTCCTGCGGGGGC
Human_U6_Seq_Fw_Insert	ACTATCATATGCTTACCGTAAC
WBSCR27_RT_F	GCACTGATAACCTCCTCCGCCGGG
WBSCR27_RT_R	CCGGAGCCCAGTCGTCATAGAAGC

### **Клеточная линия с эктопической экспрессией HA-WBSCR27**

Для создания клеточной линии с эктопической экспрессией HA-WBSCR27 клонировали кДНК, кодирующую мышиный WBSCR27, в вектор pSBTet-Neo [142]. Чтобы добавить к N-концу WBSCR27 метку HA, эту плазмиду амплифицировали, используя праймеры с кодирующими HA довесками, после чего циркуляризовали полученный ПЦР-продукт путём самолигирования. В результате получили плазмиду pSBTet-Neo-HA-WBSCR27. Олигонуклеотиды, использованные для её создания перечислены в табл. 2.

*Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные для получения линии, экспрессирующей HA-WBSCR27*

Название	Последовательность (5'-3')
WB27-pSBtet-fwd	AAAAAAAGGCCTCTGAGGCCATGGCTCAGGAGGAGGCTGG
WB27-pSBtet-rev	AAAAAAAGGCCTGACAGGCCTCATACTGTCTCCTGCTTCCGGT AAAGGT
WB27-pSBtet-HA-fwd	GAACATCATATGGATATACTGTCTCCTGCTTCCGGTAAAGG
WB27-pSBtet-HA-rev	CAGATTATGCTTAGGGTGAGAGAGGGAGGTTTCAGTATC

Для получения линии, стабильно экспрессирующей гибрида HA-WBSCR27, плазмиду pSBTet-Neo-HA-WBSCR27 котрансфецировали в клеточную линию NIH3T3, совместно с плазмидой pCMV(CAT)T7-SBX100, содержащей транспозазу, позволяющую встраивать целевой ген в произвольное место генома [143]. Трансфекцию выполняли с помощью липофектамина 3000 в соответствии с протоколом производителя. Стабильные клеточные линии были получены через 7 дней селекции на генетичине G418 (1 мг/мл).

### **Клеточная линия, экспрессирующая WBSCR27-HA на природном уровне**

Для направленного встраивания C-концевой HA-метки в ген Wbscr27, находящийся на хромосоме клеток линии NIH3T3, мы клонировали гидовую РНК, нацеленную на область

стоп-кодона гена, в вектор pX458, а также получили плазмиду pUC19, содержащую HA-метку с плечами гомологии к целевому контексту гена Wbscr27. Олигонуклеотиды, используемые для получения этой клеточной линии, перечислены в табл. 3.

*Таблица 3. Олигонуклеотиды, использованные для получения линии, экспрессирующей WBSCR27-HA на природном уровне*

Название	Последовательность (5'-3')
WB-Cterm1-fwd	CACCGCCGGAAGCAGGAGACAGTAT
WB-Cterm1-rev	AAACATACTGTCTCCTGCTTCCGGC
WB-Cterm2-fwd	CACCGCCGGAAGCAGGAGACAGTATA
WB-Cterm2-rev	AAACTATACTGTCTCCTGCTTCCGC
Human_U6_Seq_Fw_Insert	ACTATCATATGCTTACCGTAAC
WB27Cterm_check_F	ACCAACCCATCCAACCTTCC
WB27Cterm_check_R	GAGCCCTGGGTCCAAAGAAA
HA-ins-fwd	CAGATTATGCTTAGGGTGAGAGAGGGAGGTTTCAGTATC
HA-ins_rev	GAACATCATATGGATATACTGTCTCCTGCTTCCGGTAAAGG
pUC_Fw	GTAACACGACGGCCAGT
pUC_Rev	CAGGAAACAGCTATGAC
WB27_C-term_HA_ins_check_Rev	TCGGTACCTGCTGAGTGACC
WB27_C-term_HA_ins_check_Rev	GATGTCTCAATAGCGCCTCCTG

Обе плазмиды котрансфецировали в клетки линии NIH3T3. Успех двуаллельной вставки подтвердили с помощью ПЦР, секвенирования по Сэнгеру и иммуноблоттинга.

### **Клеточные линии для эксперимента BioID**

Для получения клеточной линии, экспрессирующей гибридный белок HA-BirA\*-WBSCR27 и контрольной линии, экспрессирующей HA-BirA\*, создали две плазмиды на основе вектора pSBbi-GN (Addgene #60517).

Для получения плазмиды pSBbi-GN-HA-BirA\*-WBSCR27 кодирующую область BirA\* амплифицировали из плазмиды BirA\*-eGFP-Мус с использованием праймеров, содержащих SfiI-сайты, для последующей вставки в вектор pSBbi-GN. На следующем этапе с помощью ПЦР добавили HA-метку и второй SfiI-сайт. Ген Wbscr27 амплифицировали из ранее созданной плазмиды pSBTet-Neo-HA-WBSCR27 с использованием праймеров, содержащих довески, совпадающие с матрицей BirA\*. Соединения кодирующих частей Wbscr27 и HA-BirA\* сделали методом безрестриктного клонирования. Контрольную плазмиду,

несущую HA-BirA\*, получали из pSBbi-GN-HA-BirA\*-WBSCR27. Для этого амплифицировали плазмиду праймерами, фланкирующими ген Wbscr27, а затем циркуляризовали полученный продукт путём самолигирования. Олигонуклеотиды, использованные для конструирования этих плазмид, приведены в табл. 4.

Таблица 4. Олигонуклеотиды, использованные для получения клеточных линий для эксперимента BioID

Название	Последовательность (5'-3')
After_eGFP_SfiI_ins_Fw	GGCCTGTCAGGCCGCGCGCCACTTCTAAATAAG
BirA_C-term_Rev	CTTCTCTGCGTTTCTCAGGGA
ADH1_terminator_seq	CCGGTAGAGGTGTGGTCAAT
BirA_N-HA_ins_Fw	ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGACA AGGACAACACCGT
BirA_N-HA_SfiI_ins_Rev	GGCCTCAGAGGCCTTTAATTAACCAGCACCGTCAC CG
HA-tag_Fw	TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT
BirA_N- HA_SfiI_ins_check_Rev	TGCCAGCCTGCTGGTACTC
N-HA_BirA-WBSCR27_Fw	CTCCCTGAGAAGCGCAGAGAAGGCCATGGCTCAGG AGG
N-HA_BirA-WBSCR27_Rev	GCGCGCCGGCCTGACAGGCCTCATACTGTCTCCTGC TTCCG
N-HA_BirA- WBSCR27_check_Fw	AGGAGGGACTGGCTCCTTAC
N-HA_BirA- WBSCR27_check_Rev	TGCTTCAGCATTTCTGGGCTT
pSBbi-GN_WBSCR27_BirA_N- HA_seq_Fw_1	AACAGATGGCTGGCAACTAGA
pSBbi-GN_WBSCR27_BirA_N- HA_seq_Fw_2	TGTCTTGCCTGTCAGCTCC
pSBbi-GN_WBSCR27_BirA_N- HA_seq_Fw_3	GCTCGCCAGAGTGGAАCT
pSBbi-GN_WBSCR27_BirA_N- HA_seq_Fw_4	TGCAGCTCCACAGCTACCAG
BirA_fwd	TgAggCCTgTCaggCCAАg
BirA_rev	CTTCTCTgCgCTTCTCAgggAg

Полученные плазмиды (pSBbi-GN-HA-BirA\*-WBSCR27 или pSBbi-GN-HA-BirA\*) котрансфекции в клетки линии NIH3T3 ΔWBSCR27 совместно с pCMV(CAT)T7-SBX100 с

помощью липофектамина 3000 в соответствии с инструкциями производителя. Стабильность экспрессии оценивали через 7 дней селекции в среде, содержащей генетицин G418.

### 2.2.3 Культивирование эукариотических клеток

Эукариотические клетки выращивали в среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS, антибиотики (стрептомицин и пенициллин) и GlutaMAX. При выращивании клеток, имеющую ген под доксициклин-регулируемым промотером, в среду добавляли доксициклин до концентрации 1 мкг/мл для индукции экспрессии.

При выращивании клеток для эксперимента по *in vivo* <sup>13</sup>C-метилированию вместо среды DMEM/F12 использовали среду RPMI без метионина, в которую добавляли 0,2 мМ метионина (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-L-метионин или метионин с естественным изотопным содержанием в качестве контроля). Раствор FBS для этих экспериментов предварительно диализовали в течение ночи через мембрану с отсечкой 10 kDa. В экспериментах BioID перед сбором клеток проводили мечение биотином. Для этого при достижении ~80% конfluenceности среду меняли на свежую, содержащую 50 мкМ биотина, и инкубировали в течение 16-18 часов.

Клетки выращивали CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo) при температуре 37 °C и содержании CO<sub>2</sub> 5% на чашках диаметром 15 см в 35 мл питательной среды. Клетки пересеивали 1:5 или 1:10 каждые 3-4 дня. Для пересева отбирали среду, промывали клетки 5 мл стерильного раствора PBS, инкубировали 5 минут при 37 °C в 5 мл раствора трипсина с ЭДТА, а затем разбавляли свежей средой.

Клетки собирали при достижении 80-95% конfluenceности. Перед сбором отбирали среду, промывали 5 мл PBS и собирали клетки скребком под слоем свежей порции из 5 мл PBS. Клетки помещали в 15 или 50 мл фалькон, осаждали центрифугированием (500 об/мин, 5 минут), отбирали супернатант, ресуспендировали в 1 мл PBS и переносили в 1.5 мл пробирки. Затем снова осаждали центрифугированием (1000 об/мин, 5 минут) и удаляли супернатант. Хранили клетки при -80 °C, предварительно замораживая жидким азотом.

## 2.3 Ко-иммунопреципитация

Эксперименты по ко-иммунопреципитации выполнены к.х.н. Чугуновой А.А. и Новолаевым Т.И.

Замороженные клетки (1 г) ресуспендировали в буфере для лизиса (100 мМ HEPES-KOH pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,05% Triton X-100, 1 мМ ДТТ и ингибитор протеаз cOmplete (Roche)), инкубировали 30 минут и центрифугировали (13000 g, 30 минут). Супернатант переносили в

новую пробирку, добавляли 100 мкл анти-НА-шариков и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Промывали 5 раз буфером для лизиса, затем элюировали буфером Laemmli (95 °С, 5 минут). Элюаты белка анализировали методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием серебром и вестерн-блоттингом. Полосы, потенциально отличающие опыт от контроля, анализировали с помощью MALDI в соответствии со стандартным протоколом [144].

В случае экспериментов с белковыми кросс-сшивками клетки ресуспендировали в 1% формальдегида в 1xPBS, перемешивали (7 минут при комнатной температуре), затем осаждали (500 g, 3 минуты) и дважды промывали 1,25 М глицином в 1xPBS для инактивации непрореагировавшего формальдегида. Далее клетки лизировали и анализировали как описано выше. Контрольный образец обрабатывали по такому же протоколу, но без добавления формальдегида.

## 2.4 BioID

Эксперимент BioID (Proximity-dependent Biotin Identification) проводили в соответствии с протоколом [140]. В эксперименте использовали три клеточные линии на основе NIH3T3  $\Delta$ WBSCR27: экспрессирующие НА-BirA\*-WBSCR27, НА-BirA\* и исходную культуру  $\Delta$ WBSCR27.

Для каждой линии выращивали десять 15-сантиметровых чашек клеток (0.8 — 1 г клеточной массы) в среде, содержащей биотин. Клетки лизировали в 6 мл лизирующего буфера и проводили аффинную очистку с помощью стрептавидиновых шаров Dynabeads M-280. Белки элюировали с шаров с помощью буфера Laemmli, вгоняли в ПААГ и анализировали методами панорамной протеомики.

## 2.5 Панорамная протеомика

Эксперименты по панорамной протеомике проводили в лаборатории Протеомики и масс-спектрометрии в Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича в коллаборации с д.б.н. В.Г. Згодой. Для измерений использовался LC-MS/MS масс-спектрометр для высокоточных измерений (QtoF) Agilent Technologies, сопряжённый с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 6550 в соответствии с опубликованным протоколом [145].

## 2.5.1 Подготовка образцов

Подготовка образцов для масс-спектрометрического эксперимента включала 4 этапа:

1. Белковый гель-электрофорез в ПААГ;
2. Вырезание фрагмента геля, содержащего белки;
3. Расщепление белков на пептиды трипсином;
4. Промывка и выделение пептидов.

Электрофорез на первом этапе требовался для лучшей доступности белков при проведении трипсинолиза: будучи включёнными в полиакриламидный гель, белки становятся более доступными для расщепления трипсином, в то время как при нахождении в растворе многие глобулярные белки оказываются защищены от его действия. Для каждого образца использовали отдельный гель. Фрагменты геля, содержащие белки, вырезали (рис. 31).

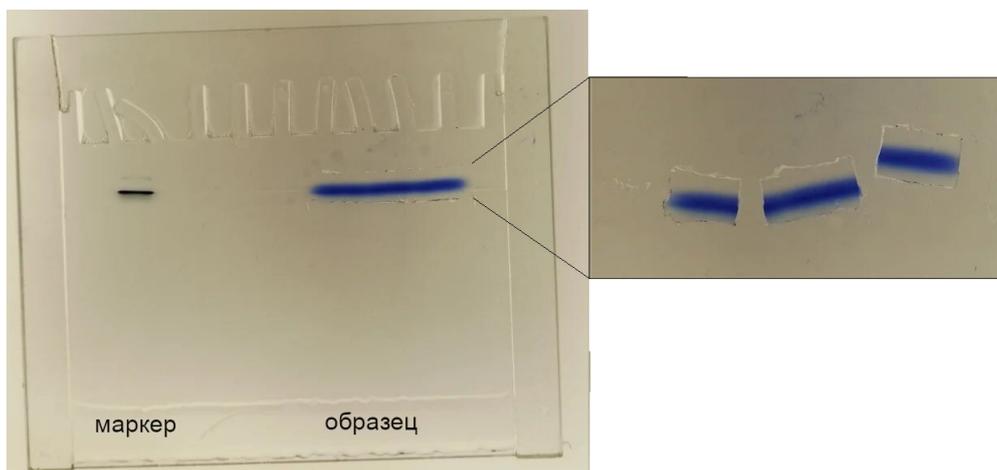


Рис 31. Подготовка белков для трипсинолиза на полиакриламидном геле

Вырезанные фрагменты геля обрабатывали трипсином для расщепления на небольшие пептиды: под действием трипсина происходит специфический гидролиз полипептидной цепочки после положительно заряженных остатков – лизина и аргинина. Полученные пептиды обладают небольшой молекулярной массой, они способны ионизироваться и попадать на детектор масс-спектрометра.

Для отмывки полученных пептидов от раствора, в котором проводился гидролиз, и очистки их от фрагментов геля проводили процедуру ZipTip, включающую связывание пептидов со смолой C18 с последующей элюцией их ацетонитрилом.

## 2.5.2 Анализ данных

Анализ данных, полученных на тандемном масс-спектрометре, выполняли с использованием бесплатных программ msconvert (из пакета ProteoWizard), SearchGui, PeptideShaker, а также коммерческого пакета Mascot.

Программа msconvert использована для преобразования файлов из формата raw в универсальный формат mgf (Mascot Generic Format), подходящий для программы SearchGui.

В Программе SearchGui [146] выполняли идентификацию пептидов. На вход программе давали файл, содержащий вторичные масс-спектры и времена удерживания ионов, после чего выполняли биоинформатический поиск пептидов, которые могли содержаться в исходной смеси. Для идентификации пептидов использовали поисковые системы X! Tandem, MS Amanda, OMSSA и Comet. Для идентификации белков использованы последовательности полного протеома мыши из базы Uniprot (август 2019 года). В качестве переменных модификаций для поиска пептидов устанавливали N-концевое ацетилирование и окисление метионина. Допускали до двух пропусков при расщеплении трипсином на пептиды. Частоту ложных обнаружений для идентификации пептидов и белков устанавливали на уровне 1%.

Дальнейший анализ выполнили с помощью программы PeptideShaker, которая позволяет картировать найденные с помощью SearchGUI пептиды на базу данных белков интересующего организма и графически анализировать полученные данные.

## 2.6 *In vitro* метилирование

Для поиска субстрата метилирования проведены эксперименты по *in vitro* метилированию лизатов нокаутных по гену WBSCR27 клеток. В качестве донора метильных групп использовали  $^{14}\text{CH}_3\text{-SAM}$ .

Рекомбинантно полученный белок WBSCR27 переводили в апо-форму для удаления совыделяющегося с ним эндогенного SAM и инкубировали с эквимольным количеством  $^{14}\text{CH}_3\text{-SAM}$  в течение 60 минут при 37°C.

Клетки лизировали в лизирующем буфере (HEPES-KOH pH 7.5, 50 mM, KCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Nonidet P-40 0.1%, глицерин 10%, EGTA 1 mM, PMSF 1 mM, ДТТ 0.35 mM) и разделяли на две части. Одну часть добавляли к комплексу WBSCR27/ $^{14}\text{CH}_3\text{-SAM}$ , вторую смешивали с таким же количеством  $^{14}\text{CH}_3\text{-SAM}$  для получения отрицательного контроля, после чего инкубировали реакционные смеси в течение 2 часов при 37°C для проведения МТазной реакции.

Полученную реакционную смесь разделяли на белковую фракцию и фракцию РНК с помощью реагента Trizol (ThermoFisher) и разделяли в ПААГ (12%). После завершения электрофореза гели тщательно промывали от остатков непрореагировавшего радиоактивного SAM. В случае белковых гелей промывку выполняли 2-3 часа в фиксирующем растворе (20% этанола, 10% уксусной кислоты в воде), а в случае гелей РНК — 5 минут в 50% спирте в 1хТВЕ. Затем гели высушивали в вакууме на ватмане и проявляли методом автордиографии.

## 2.7 Анализ удлинения праймера

Эксперимент по анализу удлинения праймера проводили для проверки состояния метилирования U4530 в 28S рРНК по описанной в литературе методике [147]. Суммарную РНК выделяли из клеток NIH3T3 (WT и ΔWBSCR27) с использованием реагента Trizol. Обратную транскрипцию проводили с помощью Maxima Reverse Transcriptase с использованием олигонуклеотида, комплементарного фрагменту 28S рРНК 4537-4551, содержащего радиоактивную метку. Метку вводили кинированием дезоксиолигонуклеотида РНК-киназой в присутствии  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-АТФ в соответствии с протоколом производителя.

Продукты обратной транскрипции разделяли с помощью электрофореза в 10% (в/в) денатурирующем полиакриламидном геле, высушивали на ватмане и визуализировали методом автордиографии.

## 2.8 Анализ модифицированных оснований в тРНК

Для сравнения количества модифицированных оснований в тРНК в клетках NIH3T3 дикого типа и нокаутных по гену WbscrR27 определили состав модифицированных оснований тРНК. Суммарную РНК выделяли из клеток с помощью реагента Trizol. Далее выделяли фракцию тРНК с помощью ПААГ (рис. 32). После этого образцы передали коллегам из лаборатории Т. Сузуки, которые расщепили РНК на отдельные основания и провели масс-спектрометрическую оценку

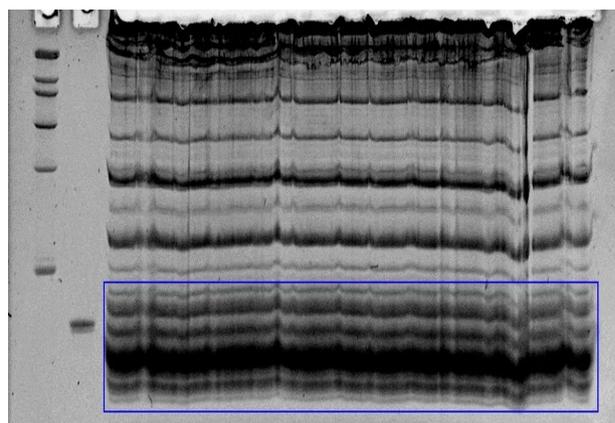


Рис 32. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле суммарной РНК, использованной для выделения тРНК-содержащей фракции. Синим прямоугольником обведен фрагмент, вырезанный из геля для извлечения тРНК

содержания общего количества 34-х модифицированных нуклеотидов в двух повторах из каждой группы образцов.

## 2.9 Регистрация ЯМР-спектров

Методы спектроскопии ЯМР использованы в настоящей работе для выполнения следующих задач:

- получение экспериментальных ограничений на межатомные расстояния, торсионные углы, водородные связи и относительную ориентацию NH-связей для определения структуры белка WBSCR27 и комплекса WBSCR27-SAH;
- определение подвижности белка WBSCR27;
- изучение взаимодействия WBSCR27 с низкомолекулярными веществами.

### 2.9.1 Условия измерения спектров белка WBSCR27

Во всех экспериментах белок WBSCR27 находился в буферном растворе, содержащем 50 мМ фосфатного буфера для поддержания стабильного рН 7.0, 50 мМ NaCl для создания необходимой ионной силы, 5 мМ ДТТ для предотвращения окислительной агрегации белка и 0.2% азида натрия для защиты образцов от бактериального загрязнения. В ходе ЯМР-экспериментов было установлено, что белок также стабилен при разбавлении указанного буфера в 2-3 раза, что благоприятно сказывалось на измерении спектров на ЯМР-спектрометре, оборудованном крио-датчиком, поскольку приводило к снижению концентрации соли и, следовательно, повышению чувствительности крио-датчика. Поэтому некоторые спектры были измерены в этих условиях. После приготовления образцов их хранили в лиофилизированном состоянии при температуре  $-60^{\circ}\text{C}$ .

В некоторых случаях перед растворением лиофилизированного образца белка проводили дегазирование воды с помощью перемешивания в вакууме для снижения концентрации растворённого кислорода. Эта процедура позволяла снизить скорость окисления ДТТ, предохраняющего белок от агрегации.

При измерениях большинства спектров белка в качестве растворителя использовали смесь 95% $\text{H}_2\text{O}$ /5% $\text{D}_2\text{O}$ :  $\text{D}_2\text{O}$  служит для настройки дейтериевого лока,  $\text{H}_2\text{O}$  предотвращает обмен  $\text{H} \rightarrow \text{D}$  в ходе эксперимента. В тех случаях, когда регистрация сигналов амидных атомов водорода не предполагалась — образцы растворяли в чистой  $\text{D}_2\text{O}$ .

Для измерений использовали либо стандартные пробирки ЯМР диаметром 5 мм, вмещающие 550 мкл образца, либо пробирки Шигеми, позволяющие снизить объём исследуемого раствора до 320 мкл. Дополнительным преимуществом использования пробирок Шигеми оказалась изоляция образца от окружающего воздуха, что снижало скорость окисления ДТТ и увеличивало время жизни образцов белка при проведении длительных кинетических экспериментов.

Все измерения проводили при температуре 35 °С, поскольку при этой температуре белок оказался устойчивым в течение недели. Понижение температуры измерения приводило к существенному ухудшению качества спектров вследствие увеличения скорости релаксации из-за увеличения времени корреляции вращательной диффузии белковых молекул.

## 2.9.2 Измерение спектров

Для выполнения задач исследования потребовалась регистрация шести типов ЯМР-спектров:

1.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры с подавлением воды с помощью импульсной последовательности *zgpgw5*. Эти спектры измеряли непосредственно перед регистрацией всех остальных спектров для контроля за качеством образца: содержанием в нём восстановленной формы ДТТ и избытка лиганда (при измерении спектров комплекса WBSCR27/SAH).
2. 2D-спектры гетероядерной корреляции атомов  $^{15}\text{N}$  с  $^1\text{H}$ :  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC и  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  SOFAST-NMQC [148]. Эти эксперименты использовали для изучения белок-лигандных взаимодействий в экспериментах по ЯМР-титрованию при выполнении кинетических измерений, предполагающих наблюдение за изменениями, происходящими в структуре белка. Также эти спектры измеряли для оценки чистоты образцов на всех этапах выполнения работы с белком.
3. 3D-спектры для отнесения резонансов основной цепи белка: HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)HN, HNCO, HN(CA)CO, HNHAHB, HBHA(CO)HN; 3D-спектры HCCH-TOCSY для отнесения резонансов боковых групп.
4. 3D  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY и  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY для определения дистанционных ограничений.
5. Спектры IPAP в экспериментах по измерению остаточных констант диполь-дипольного взаимодействия (ОКДДВ) для получения экспериментальных ограничений на относительное расположение амидных NH-связей;

6. 2D-спектры гетероядерной корреляции атомов  $^{13}\text{C}$  с  $^1\text{H}$ :  $^{13}\text{C},^1\text{H}$ -HSQC. Они использовались для определения химических сдвигов молекулы SAH в связанном с белком виде, а также для измерения спектров метаболитов при поиске низкомолекулярного субстрата метилирования белка WBSCR27.

Все спектры, необходимые для выполнения отнесения резонансов в белке, а также для извлечения структурных ограничений, были измерены как для белка в апо-форме, так и для комплекса WBSCR27/SAH. При измерении спектров комплекса WBSCR27/SAH в образец добавляли 10-кратный избыток лиганда, чтобы предотвратить возможность образования апо-формы из-за расщепления лиганда белком. Перед измерением каждого длительного спектра комплекса проверяли наличие в образце лиганда по  $^1\text{H}$ -спектрам.

Спектры ЯМР, необходимые для выполнения задач проекта, регистрировали на ЯМР-спектрометрах, расположенных в четырёх лабораториях.

- Все эксперименты по изучению белок-лигандных взаимодействий, а также оценку качества полученных образцов белка, проверку стабильности образцов и кинетические измерения проведены на ЯМР-спектрометре Bruker Avance с рабочей частотой 600 МГц, оборудованным датчиками тройного резонанса PATXI, двойного резонанса DUL и VBI в лаборатории Магнитной томографии и спектроскопии факультета фундаментальной медицины МГУ.
- Измерение большинства 3D-спектров, необходимых для выполнения отнесения и для получения дистанционных ограничений, выполняли на ЯМР-спектрометре с рабочей частотой 850 МГц, расположенном в лаборатории Academia Sinica (Тайвань). На этом же приборе выполнено измерение временных серий спектров  $^{15}\text{N},^1\text{H}$  HSQC, необходимых для оценки скорости разрушения комплексов WBSCR27/SAM и скорости обмена H→D. Некоторые 3D-спектры для выполнения отнесения сигналов измерены на ЯМР-спектрометре Bruker Avance с рабочей частотой 700 МГц, оборудованном крио-датчиком, расположенном в Институте Физики Казанского Федерального Университета.
- Спектры IPAP для выполнения экспериментов по измерению остаточных констант диполь-дипольного взаимодействия зарегистрированы на приборе Bruker Avance с рабочей частотой 800 МГц, оборудованном крио-датчиком, расположенном в лаборатории Academia Sinica (Тайвань).

- 2D спектры  $^{13}\text{C},^1\text{H}$ -HSQC для поиска низкомолекулярного субстрата метилирования измеряли на приборе Bruker Avance с рабочей частотой 600 МГц, оборудованном крио-датчиком, расположенном в лаборатории Academia Sinica (Тайвань).
- 2D спектры  $^{13}\text{C},^1\text{H}$ -HSQC для отнесения сигналов SAH в комплексе WBSCR27/SAH измеряли на приборе Bruker Avance с рабочей частотой 700 МГц, оборудованном датчиком Prodigy, расположенном в Российском университете дружбы народов (Москва).

### 2.9.3 Процессинг спектров

Преобразование 2D и 3D ЯМР спектров выполняли с помощью программ NMRPipe [149] и TopSpin (Bruker, Inc). Для оптимизации качества спектра использовали взвешивающие функции и процедуру заполнения нулями (zero filling). Также в большинстве случаев применялись методы линейного предсказания и коррекции базовой линии преобразованных спектров. Для визуализации и интерпретации 2D и 3D ЯМР спектров использовали программы NMRFAM Sparky [150] и NMRDraw [149]. Одномерные  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектры преобразовывали и анализировали с помощью программы Mnova (Mestrelab Research [151]).

## 2.10 Идентификация лигандов, совыделяющихся с WBSCR27

Для идентификации совыделяющихся с белком WBSCR27 лигандов разработан оригинальный протокол. 320 мкл полученного после диализа лиофилизированного образца белка WBSCR27 в буферном растворе (50 мМ фосфат натрия, pH 7.0, 50 мМ хлорид натрия, 10 мМ ДТТ, 0.2% азида натрия) растворяли в  $\text{D}_2\text{O}$  и денатурировали прикапыванием концентрированной кислоты DCI в  $\text{D}_2\text{O}$  до pH 1. Через 24 ч инкубации при комнатной температуре выпавший в осадок денатурированный белок удаляли центрифугированием и измеряли спектр  $^1\text{H}$  ЯМР. Для отнесения сигналов низкомолекулярных веществ провели сравнение со спектрами  $^1\text{H}$  ЯМР чистых SAM и SAH, измеренными в тех же условиях. Соотношение SAM и SAH определили с помощью интегрирования сигналов.

## 2.11 Отнесение сигналов на спектрах ЯМР

В ходе выполнения работы потребовалось сделать отнесение сигналов белка WBSCR27 в апо-форме, белка WBSCR27 в комплексе с SAH, а также SAH, в комплексе с белком.

Для отнесения сигналов атомов белка (основной цепи и боковых групп аминокислотных остатков) применяли классические стратегии, основанные на регистрации 3D-спектров [152].

**Отнесение сигналов атомов основной цепи** проводили с помощью подхода, основанного на использовании методов гетероядерной спектроскопии переноса намагниченности по непрямому спин-спиновому взаимодействию через одну или две химические связи. Для этих целей записывали серию 3D спектров ЯМР: HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)HN, HNCO, HN(CA)CO, HNHAHB, HBHA(CO)HN. Также регистрировали набор 2D экспериментов: DQF-COSY,  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC и  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQC. Отнесение выполняли с помощью комбинации автоматизированного подхода с помощью алгоритма PINE, реализованного в программе Sparky [153], и анализа спектров вручную. Для выполнения отнесения потребовалось проведение около 10 стадий «до-отнесения», когда на вход алгоритма PINE отсылали данные с частично выполненным и проверенным вручную отнесением сигналов.

**Отнесение сигналов боковых групп** аминокислотных остатков выполнили с помощью спектров HCCN-TOCSY. В этом эксперименте намагниченность передаётся по всей спиновой системе боковой цепи аминокислотного остатка, содержащей ковалентно-связанные C- и H-атомы.

Спектры белка в виде комплекса с SAH и в виде апо-формы различаются настолько сильно, что для существенной доли аминокислотных остатков невозможно определить — какие сигналы белка в комплексе соответствуют им на спектрах апо-формы белка. По этой причине отнесение большей части сигналов в апо-форме белка потребовалось сделать заново с использованием 3D-спектров.

### **Отнесение сигналов SAH в комплексе WBSCR27/SAH**

Для выполнения отнесения сигналов SAH в комплексе с белком WBSCR27 использовали полученный по оригинальной методике полностью меченный изотопами  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  SAH. Комплексы  $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -SAH с  $^{15}\text{N}$ -меченным белком WBSCR27 получали, смешивая апо-форму  $^{15}\text{N}$ -WBSCR27 с избытком  $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -SAH. Далее проводили диализ для удаления избытка лиганда и измеряли спектр  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC. Аналогичным образом готовили контрольный образец  $^{15}\text{N}$ -WBSCR27 с SAH, имеющим природное изотопное содержание. Этот образец был необходим для того, чтобы вычленить сигналы, принадлежащие SAH, среди сигналов боковых групп белка и малых молекул, содержащихся в буферном растворе. Для отнесения

сигналов SAH к конкретным атомам лиганда проводили сравнение с имеющимися в литературе данными для свободного лиганда.

## 2.12 ЯМР-титрование

Эксперименты по ЯМР-титрованию проводили для исследования взаимодействия WBSCR27 с низкомолекулярными веществами двух категорий:

1. низкомолекулярные вещества, имитирующими фрагменты высокомолекулярных соединений — потенциальных субстратов метилирования (белков и нуклеиновых кислот);
2. кофактор SAM, ко-продукт SAH и родственными молекулы: MTA, 5'dAdo, аденин.

Во всех случаях использовали образцы  $^{15}\text{N}$ -меченного белка WBSCR27, для которых регистрировали спектры  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  SOFAST-HMQC или  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC при возрастающей концентрации лигандов.

### 2.12.1 Взаимодействие с фрагментами потенциальных субстратов

В экспериментах по проверке взаимодействия WBSCR27 с фрагментами потенциальных субстратов первоначально готовили комплекс WBSCR27/SAM, содержащий 0,3 мМ  $^{15}\text{N}$ -WBSCR27 и 1,2 мМ SAM в 320 мкл смеси 95%  $\text{H}_2\text{O}/5\% \text{D}_2\text{O}$ .

Для проверки возможного связывания аминокислот приготовили смесь семи аминокислот (Thr, Ser, Arg, Tyr, Cys, Glu и Lys) в эквимолярном соотношении. Эту смесь добавляли к образцам WBSCR27/SAM, получая молярные соотношения WBSCR27:SAM:аминокислоты 1:4:5 и 1:4:10. Для проверки возможных взаимодействий WBSCR27 с фрагментами нуклеиновых кислот смешивали каждый из нуклеозидов (гуанозин, уридин, цитидин, тимидин) с комплексом WBSCR27/SAM по отдельности до получения молярных соотношений WBSCR27:SAM:нуклеозид = 1:4:10. Для проверки возможного связывания фрагмента ДНК к комплексу WBSCR27/SAM добавляли дезоксиолигонуклеотид AAACTCGCATTACGAACGGCTCC до достижения соотношения WBSCR27:SAM:ДНК = 1:4:1.

### 2.12.2 ЯМР-титрование SAM, SAH и продуктами их метаболизма

Также с помощью ЯМР-титрования изучали взаимодействие белка WBSCR27 с SAM, SAH, MTA, 5'dAdo и аденином. Использовали образцы апо- $^{15}\text{N}$ -WBSCR27 в концентрации

0,2–0,4 мМ. Соотношение лиганда к белку увеличивали от 1 : 0 до 1 : 20. Для каждой точки титрования регистрировали спектр  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  SOFAST-HMQC. Отнесение резонансов в комплексах выполнено на основании отнесения комплекса WBSCR27/SAM и апо-WBSCR27. Изменение химических сдвигов при связывании лигандов рассчитали по формуле:

$$((\Delta\delta(^1\text{H}_i))^2 + (\Delta\delta(^{15}\text{N}_i)/25)^2)^{1/2},$$

где  $\delta$  — химический сдвиг, а  $\Delta$  — разница между величиной химического сдвига на спектрах комплекса и апо-формы белка.

### 2.12.3 Расчёт $K_d$

По данным ЯМР-титрования для лигандов МТА или 5'dAdo, показавших высокую скорость обмена между свободным и связанным с белком состоянием, определили  $K_d$  белок-лиганд методом нелинейной регрессии по резонансам  $^1\text{H}$  амидных протонов остатков G79, V83, S101 и V166 по уравнению

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\Delta\delta_{\text{max}}}{2[P]_0} \left[ (K_d + [P]_0 + [L]_0) - \sqrt{(K_d + [P]_0 + [L]_0)^2 - 4[P]_0[L]_0} \right],$$

где  $P_0$  и  $L_0$  — суммарные концентрации WBSCR27 и лиганда (МТА или 5'dAdo) на каждой стадии титрования,  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  — изменение значения химического сдвига при данной концентрации лиганда, а  $\Delta\delta_{\text{max}}$  — максимальное изменение химического сдвига, оценённое как разница между сигналом в свободном белке и белке в присутствии 20-кратного избытка лиганда (белок в состоянии насыщения).

## 2.13 Кинетические ЯМР-эксперименты

Измерение скорости протекания процессов с помощью спектроскопии ЯМР проводили, наблюдая за состоянием белка — для оценки устойчивости его комплексов с SAN и SAM, а также, наблюдая за состоянием лигандов — для определения скорости их расщепления белком WBSCR27.

### 2.13.1 Наблюдение за состоянием белка

В экспериментах с наблюдением за состоянием белка важно было регистрировать спектры достаточно быстро, чтобы получить временную зависимость с минимально возможным шагом, поэтому измерения проводили на ЯМР-спектрометре, оборудованном крио-датчиком, с использованием образцов, содержащих высокую концентрацию белка

(0,1-0,4 мМ). Максимального сокращения скорости измерения спектров удалось достичь с использованием импульсной последовательности SOFAST-HMQC. Для изучения разложения связанного SAH с течением времени эксперименты проводили в течение 17 дней. Образец находился в пробирке Шигеми для предотвращения контакта с воздухом. Между измерениями образцы термостатировали при 35 °С. Перед каждым измерением проводили контроль концентрации ДТТ. Для изучения разложения связанного SAM с течением времени измерения проводили в течение 4 часов с частотой семплирования 20 минут.

### 2.13.2 Наблюдение за состоянием лиганда

Эксперименты по изучению скорости реакций расщепления SAM, SAH, MTA и 5'dAdo проводили с помощью <sup>1</sup>H ЯМР. Для этого готовили смеси белка WBSCR27 и лигандов в различных соотношениях (1:5, 1:10 и 1:20) и термостатировали в отсутствие доступа кислорода (в ампулах Шигеми, при постоянном контроле за наличием в смеси восстановленной формы ДТТ, поддерживающего стабильность белка) в течение длительного времени, измеряя спектры <sup>1</sup>H ЯМР через каждые 2-3 дня.

## 2.14 Изотермическая калориметрия титрования

Эксперименты по изотермической калориметрии титрования (ИКТ) выполняли в ИМБ имени Энгельгардта в коллаборации с д.х.н., член-корр. РАН Митькевичем В.А. Для измерений использовали белок WBSCR27 в апо-форме. Для того, чтобы иметь возможность контролировать получение апо-формы белка с помощью измерения <sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H HSQC спектров в эксперименте использовали <sup>15</sup>N-меченный белок.

Измерения проводили с помощью прибора MicroCal iTC200 (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США), как описано в работе [154]. Эксперименты проводили при 15, 25 и 37 °С в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 50 мМ NaCl, 10 мМ ДТТ и 0,2% азида натрия. Аликвоты (2 мкл) SAM или SAH в концентрации 200 мкМ вводили в ячейку объёмом 0,2 мл, содержащую раствор апо-WBSCR27 (20 мкМ). Теплоту разбавления измеряли введением лиганда в буферный раствор или дополнительным введением лиганда после насыщения; полученные значения вычитали из теплоты реакции, чтобы получить эффективную теплоту связывания. Полученные кривые титрования аппроксимировали с использованием программного обеспечения MICROCAL ORIGIN (Нортгемптон, Массачусетс, США), предполагая наличие одного набора сайтов связывания. Константы сродства ( $K_d$ ) и изменения энтальпии ( $\Delta H$ ) определили экспериментально, а энергию Гиббса ( $\Delta G$ ) и изменение энтропии ( $\Delta S$ ) рассчитали по уравнению

$$-RT\ln K_a = \Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

Значения изменения теплоемкости рассчитали как  $d(\Delta H)/dT$ .

Изменения поверхности, доступной растворителю (SAA), оценили по формуле

$$\Delta C_p = 0,27\Delta A_{\text{аром}} + 0,4\Delta A_{\text{неаром}},$$

где  $\Delta A_{\text{аром}}$  и  $\Delta A_{\text{неаром}}$  — защищённые ароматическими и неароматическими аминокислотами области [155].  $SAA_{\text{min}}$  и  $SAA_{\text{max}}$  рассчитаны в предположении, что все изменения обусловлены неароматическими и ароматическими остатками, соответственно.

## 2.15 Определение структуры WBSCR27

Анализ спектров ЯМР позволил получить четыре типа экспериментальных параметров, необходимых для расчёта структур белка WBSCR27. В их числе:

1. ограничения на межатомные расстояния;
2. ограничения на торсионные углы;
3. ориентация NH-связей;
4. водородные связи.

### 2.15.1 Межатомные расстояния

Ограничения на расстояния между атомами водорода в белке получены с помощью ЯЭО, определённых с помощью 3D спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY и  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY.

Спектры измеряли отдельно для апо-формы белка и для комплекса WBSCR27/SAH. Для каждой формы белка измеряли два спектра  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY: в чистой  $\text{D}_2\text{O}$  для получения наиболее качественного спектра сигналов алифатической области, а также в смеси 95%  $\text{H}_2\text{O}/5\%$   $\text{D}_2\text{O}$  для регистрации контактов между амидными атомами водорода и другими атомами белка. Спектры  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY регистрировали только в смеси 95%  $\text{H}_2\text{O}/5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ , поскольку ключевыми атомами в нём являются именно амидные протоны. На рис. 33 в качестве иллюстрации приведены фрагменты двухмерных срезов 3D спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY (A) и  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY (B) для комплекса WBSCR27/SAH.

Отнесение ЯЭО комплекса WBSCR27/SAH проводили с помощью программы ARIA и далее вручную в программе NMRFAM Sparky.

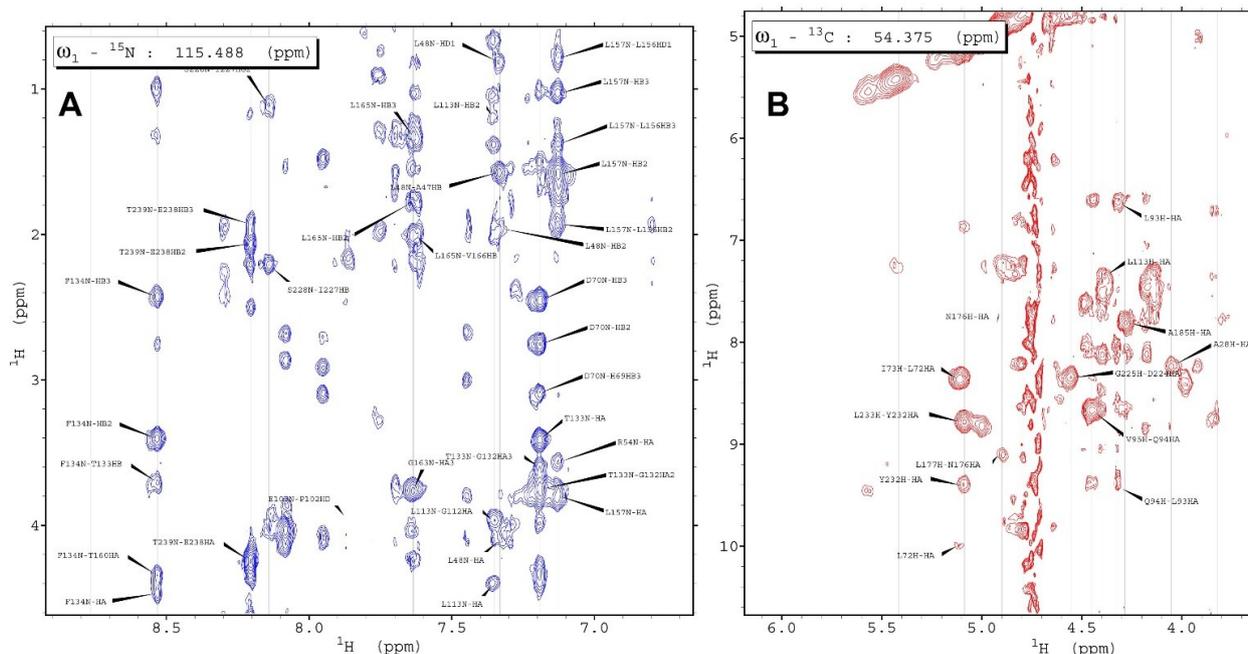


Рис 33. Фрагменты двумерных срезов 3D спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY (A) и  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY (B) комплекса WBSCR27/SAH. Отмечено отнесение резонансов

Высокая подвижность белкового остова апо-формы WBSCR27 ухудшает качество спектров NOESY по сравнению с комплексом SAH/WBSCR27. Поэтому для **отнесения ЯЭО апо-WBSCR27** воспользовались методом сдержанного докинга. Этот подход был апробирован ранее при расчёте структуры комплексов одного и того же белка с разными лигандами [156]. Исходный набор ЯЭО для расчёта структуры апо-WBSCR27 извлекли из списка ЯЭО комплекса для атомов тех аминокислотных остатков, в которых химические сдвиги не изменяются при переходе от апо-формы к комплексу (остатки 59-70, 85-96, 106-117, 127-145 и 146-240). Эти ЯЭО проверили в 3D спектрах  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY и  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY апо-WBSCR27 и дополнили ЯЭО от протонов недостающих остатков.

Таблица 5. Количество ограничений на межатомные расстояния, полученных в результате анализа спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY и  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY для апо-формы белка и для комплекса WBSCR27-SAH.

	апо-WBSCR27	WBSCR27-SAH
Дальнего порядка ( $ i-j  \geq 4$ )	430	471
Среднего порядка ( $1 >  i-j  > 4$ )	264	317
Между соседними остатками	668	691
Внутри одного остатка	881	966
Белок-лиганд	-	21
Всего	2243	2466

**Расстояния между атомами белка и SAH** рассчитали исходя из ЯЭО между атомами белка и лиганда, которые определили по спектрам NOESY. Для отнесения этих сигналов на NOESY-спектрах потребовались данные о химических сдвигах SAH в связанном состоянии. Суммарно в расчётах структуры был использован 21 белок-лигандный ЯЭО, большинство из которых относятся к аденозиновому фрагменту SAH.

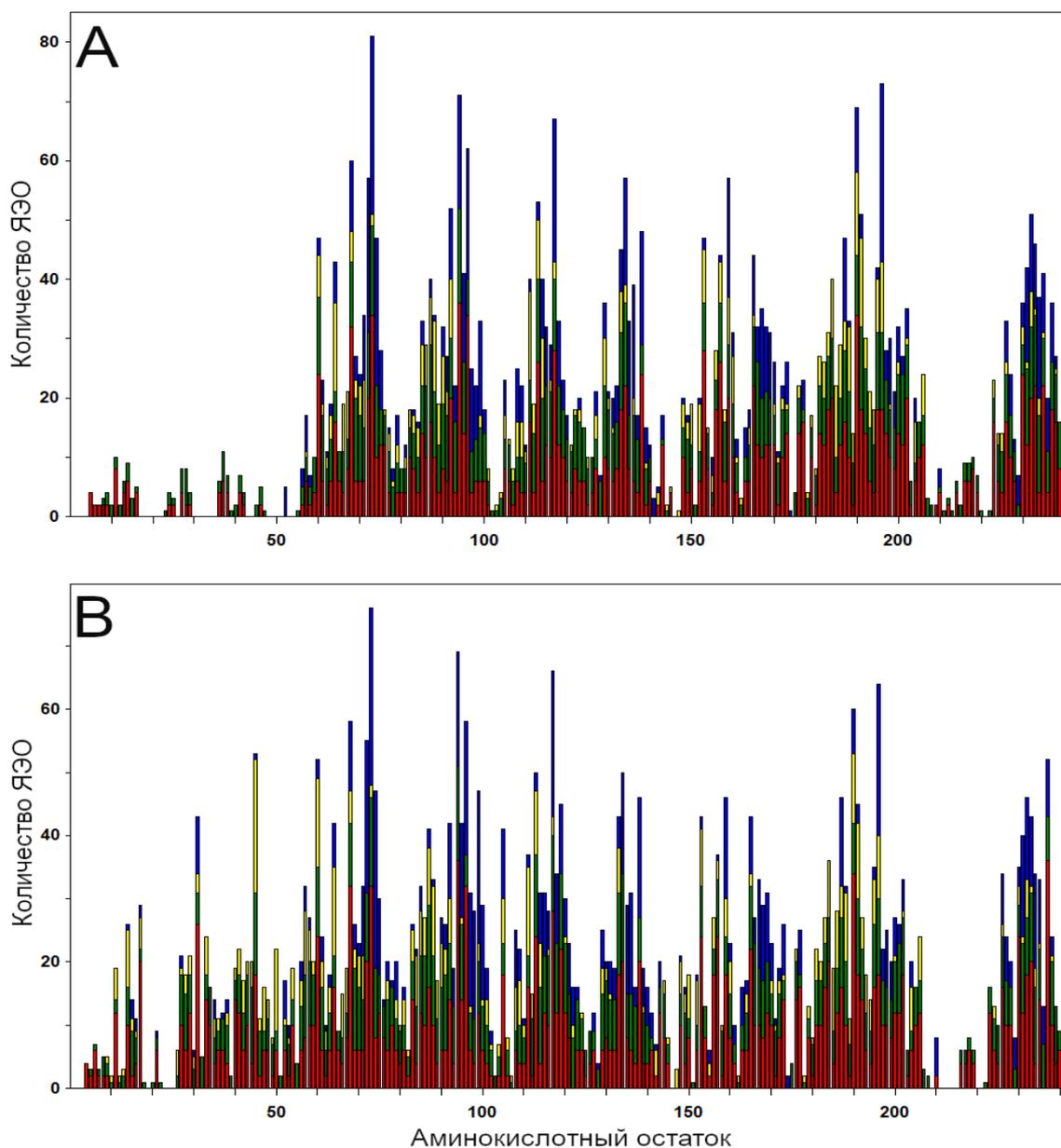


Рис 34. Гистограммы, показывающие количество ЯЭО дальнего порядка (синий), среднего порядка (жёлтый), между соседними аминокислотными остатками (зелёный) и внутри одного остатка (красный) для каждого аминокислотного остатка белка, использованные при расчёте структуры апо-формы WBSCR27 (А) и комплекса WBSCR27/SAH (В)

В общей сложности с помощью NOE удалось получить 2243 и 2466 пространственных ограничения для белка в апо-форме и для комплекса WBSCR27/SAH, соответственно. Детализация полученных ограничений приведена в табл 5. Количество различных типов ЯЭО, полученных для каждого аминокислотного остатка, отражено в виде гистограммы на рис. 34.

### 2.15.2 Торсионные углы

Ограничения на торсионные углы в основной цепи белка ( $\phi$  и  $\psi$ ) получили в результате анализа химических сдвигов атомов  $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\beta$ ,  $^{13}\text{CO}$ ,  $^1\text{Ha}$ ,  $^1\text{H}_\text{N}$  и  $^{15}\text{N}$  для апо-формы белка и для комплекса WBSCR27/SAH с использованием программы TALOS+ [157]. Количество определённых торсионных углов для каждого варианта структуры приведено в табл. 6.

Таблица 6. Количество ограничений на торсионные углы  $\phi$  и  $\psi$ , полученных в результате анализа химических сдвигов основной белковой цепи для апо-формы белка и для комплекса WBSCR27/SAH.

	апо-WBSCR27	WBSCR27/SAH
Угол $\phi$	148	172
Угол $\psi$	147	172
Всего	295	344

### 2.15.3 Ориентация NH-связей.

Ограничения на ориентацию NH-связей в белке получали с помощью экспериментов по измерению ОКДДВ. Этот тип экспериментальных параметров чрезвычайно ценен со структурной точки зрения, поскольку несёт информацию об ориентации групп и связей относительно внешнего магнитного поля, в то время как остальные параметры содержат лишь локальную структурную информацию. Для проведения таких экспериментов образцы белка растворяли в ориентирующей анизотропной среде и измеряли спектры IPAP, затем по расщеплению сигналов на этих спектрах определяли направления NH-связей в белке [158]. На первом этапе проводили подбор оптимальных условий для выполнения измерений с белком WBSCR27.

**Оценка устойчивости белка WBSCR27 в анизотропных средах** показала, что белок стабилен в трёх ориентирующих средах:

- (1) разбавленная жидкокристаллическая среда, состоящей из бицелл DMPC/DHPC [159];
- (2) смесь *n*-додецилпентаэтиленгликоля с *n*-гексиловым спиртом;

(3) нематическая фаза коллоидной суспензии нитевидных фагов Pf1 [160].

Во всех трёх ориентирующих средах проведено измерение спектров на ядрах дейтерия для оценки степени анизотропности, контролируемой по квадрупольному расщеплению сигнала ДНО. Расщепление сохранялось постоянным в течение часа при использовании среды, содержащей фосфолипидные бицеллы DHPC/DMPC в соотношении 1:3 (7.3 Гц, рис. 35А), в случае среды, полученной из 4% *n*-додецилпентаэтиленгликоля с *n*-гексильовым спиртом (11 Гц, рис. 35В), и в среде с бактериофагами (10 Гц).

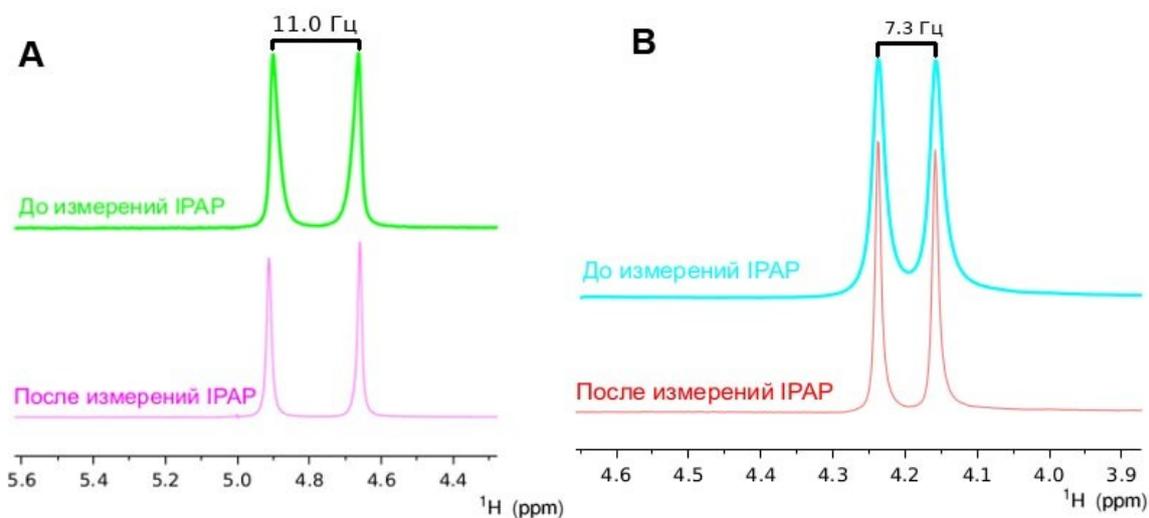


Рис 35. Результат подбора анизотропных условий для измерения ОКДДВ по расщеплению сигнала дейтерия в молекуле ДНО до и после записи спектров IPAP. А. Анизотропный раствор бицелл DHPC/DMPC. В. Смесь 4% *n*-додецилпентаэтиленгликоля с *n*-гексильовым спиртом

Во всех подобранных ориентирующих средах провели измерения спектров IPAP образцов  $^{15}\text{N}$ -меченного белка WBSCR27 в апо-форме и в комплексе с SAH. На рис. 36 приведено наложение фрагментов спектров IPAP, измеренных в анизотропных средах, на спектр IPAP, измеренный в изотропной среде. Видно, что расщепление различается для разных аминокислотных остатков. Наиболее качественными получились спектры IPAP в среде, полученной с использованием фагов Pf1 и в жидкокристаллической среде из бицелл DMPC/DHPC, поэтому именно они использованы для извлечения ОКДДВ и определения направления NH-связей в белке. Количество ограничений на относительные направления NH-связей, использовавшихся при расчёте структуры, приведено в табл. 7.

Таблица 7. Количество ограничений на относительные направления NH-связей, полученных с помощью экспериментов по измерению ОКДВ для апо-формы белка и для комплекса WBSCR27/SAH.

	апо-WBSCR27	WBSCR27-SAH
Количество ОКДВ в фагах Pf1	143	173
Количество ОКДВ в бицеллах DMPC/DHPC	-	135
Всего	143	308

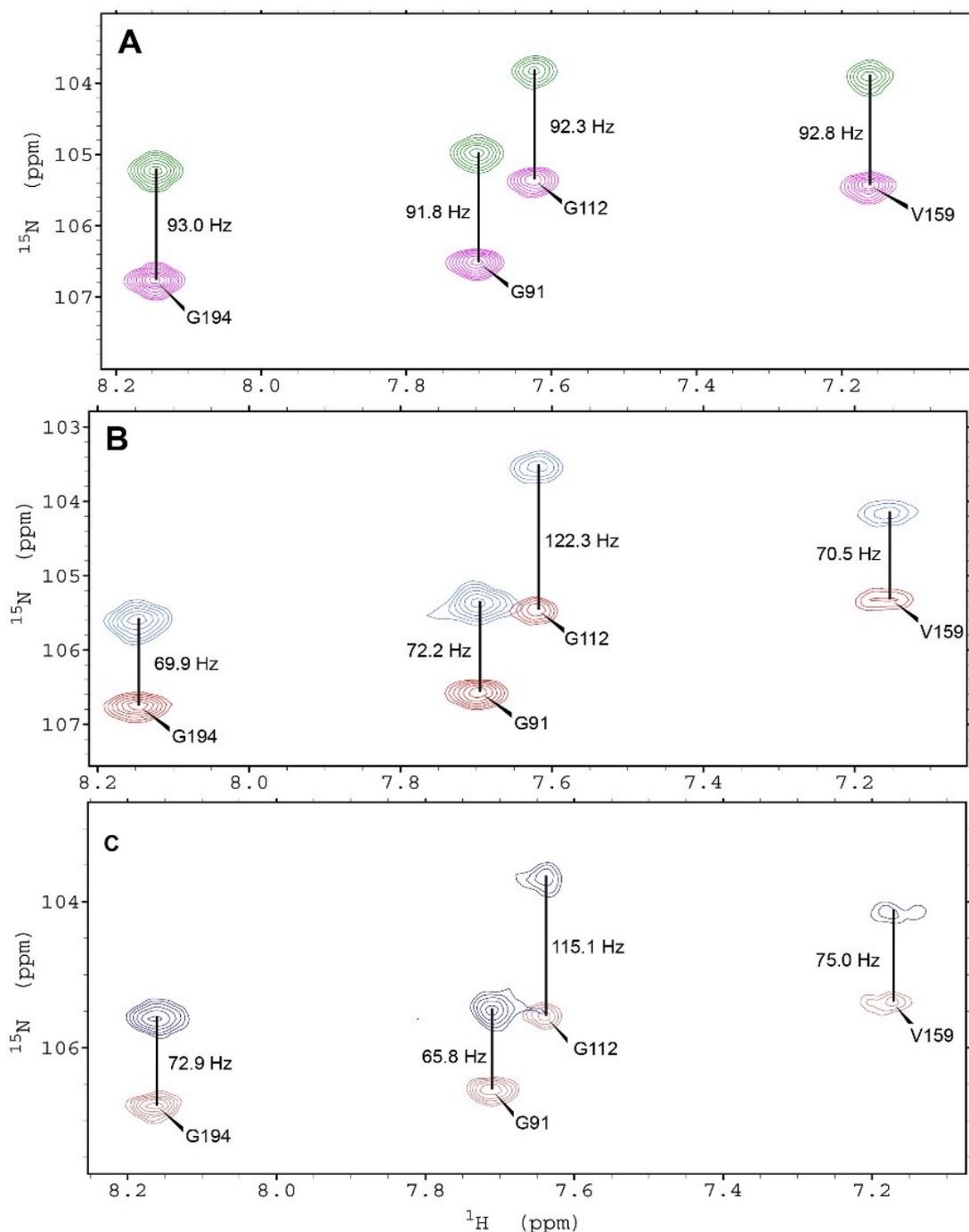


Рис 36. Фрагменты спектров IPAP комплекса белка WBSCR27 с SAH, измеренных в изотропной среде (А), анизотропном 5% растворе фосфолипидных бицелл DHPC/DMPC (В) и среде, содержащей смесь n-додецилпентаэтиленгликоля с n-гексильным спиртом (С)

## 2.15.4 Водородные связи

Для определения водородных связей в белке проводили измерения скорости обмена атомов водорода амидных групп на дейтерий. Атомы водорода, участвующие в образовании водородной связи, медленнее обмениваются с растворителем, поэтому при растворении лиофилизированного образца белка в D<sub>2</sub>O сигналы амидных групп, участвующих в образовании прочных водородных связей, медленнее исчезают со спектров.

Измерения выполняли отдельно для апо-формы белка и для комплекса WBSCR27/SAH. Интересно отметить, по прошествии 16 часов в комплексе WBSR27/SAH 116 амидных атома водорода не были заменены на дейтерий, в то время как в апо-форме — только 56. Это говорит о том, что в комплексе большее число групп участвуют в образовании прочных водородных связей. Из данных по обмену водорода на дейтерий извлекли ограничения на расстояния между атомами, вовлечёнными в водородные связи (табл. 8).

Таблица 8. Количество ограничений на водородные связи, полученных с помощью экспериментов по измерению скорости обмена H → D для апо-формы белка и для комплекса WBSCR27/SAH.

	апо-WBSCR27	WBSCR27/SAH
Водородные связи	112	232

## 2.15.5 Расчёт структур

Расчет структур выполнен с помощью протокола имитации отжига в декартовом пространстве координат с использованием программы CNS 1.2 [161]. На заключительных этапах уточнения структур дополнительно подключали псевдопотенциалы конформационных торсионных углов [162]. Конечные силовые константы для ограничений ЯЭО составляли 75 ккал·моль<sup>-1</sup>·Å<sup>2</sup>, для ограничений на торсионные углы — 200 ккал·моль<sup>-1</sup>·рад<sup>2</sup>, ОКДВ — 30 ккал·моль<sup>-1</sup>·Гц<sup>2</sup>. Нарушения ограничений отслеживали после каждого цикла уточнения с помощью программы NMRest [126]. В случае нарушений ограничения проверяли по соответствующим спектральным данным и по результатам проверки либо исправляли, либо отклоняли данное ограничение. Качество структур анализировали с помощью программного пакета Procheck-NMR [163]. Исходя из минимального количества нарушений ограничений и статистики Рамачандрана выбрали 20 лучших структур из 200. Они приняты в качестве окончательного ансамбля для апо-формы WBSCR27 и для комплекса с SAH. Среди отобранных структур отсутствовали нарушения дистанционных ограничений более 0,5 Å и нарушения торсионных углов более 5°. Детализация нарушений в итоговых ансамблях

структур приведена в табл 9. На рис. 37 приведены карты Рамачандрана для 20-ти лучших структур апо-формы (А) и комплекса WBSCR27/SAH (В).

Таблица 9. Количество ограничений на межатомные расстояния, полученных в результате анализа спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY и  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-NOESY для апо-формы белка WBSCR27 и для комплекса WBSCR27/SAH.

Среднее отклонение от экспериментальных ограничений	апо-WBSCR27		WBSCR27/SAH	
	$\langle S \rangle^a$	$S_{\text{rep}}$	$\langle S \rangle^a$	$S_{\text{rep}}$
Расстояние (Å)	$0,0268 \pm 0,0008$	0,0260	$0,0304 \pm 0,0015$	0,0310
Торсионные углы (°)	$1,1901 \pm 0,0901$	1,1840	$1,6718 \pm 0,1814$	1,7120
Отклонение от идеальной геометрии				
Связи (Å)	$0,0036 \pm 0,0002$	0,0035	$0,0047 \pm 0,0002$	0,0045
Углы (°)	$0,5773 \pm 0,0122$	0,5780	$0,8323 \pm 0,0130$	0,8400
Стандартные торсионные углы (impropers) (°)	$0,6023 \pm 0,0168$	0,6050	$0,9045 \pm 0,0231$	0,9020
Статистика карты Рамачандрана				
% остатков в наиболее благоприятной области	87,2	87,2	84,4	85,7
% остатков в запрещённой области	0,0	0,0	0,0	0,0

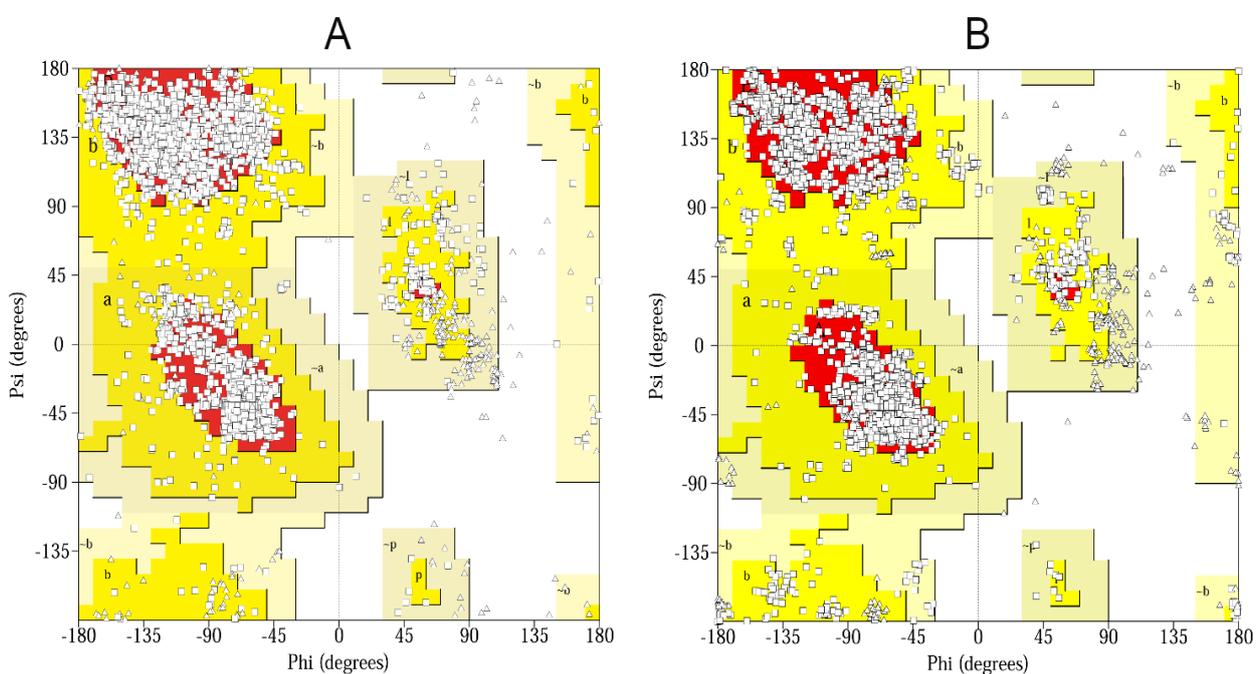


Рис 37. Карты Рамачандрана для 20-ти лучших структур апо-формы белка WBSCR27 (А) и комплекса WBSCR27/SAH (В). В наиболее благоприятные области попадает 87,2% аминокислотных остатков апо-формы и 84,4% — в комплексе WBSCR27/SAH. В запрещённой области аминокислотные остатки отсутствуют

Визуализацию и анализ белковых структур проводили с использованием программных пакетов PyMOL (DeLano Scientific LLC), InsightII (Accelrys Software Inc.) и Discovery Studio Visualizer v. 20 от Dassault Systemes Biovia Co. (Сан-Диего, Калифорния, США).

## 2.16 Определение динамических параметров WBSCR27

Для определения динамических параметров белка WBSCR27 в апо-форме, а также в комплексе с SAH, провели эксперименты по измерению скорости релаксации и определили скорость обмена H-D.

### 2.16.1 Скорость релаксации

Для измерения скорости релаксации определяли  $R_1$ ,  $R_2$ , а также  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  гетероядерные эффекты оверхаузера для атомов амидных групп белка. Задержки в экспериментах по скорости релаксации  $R_1$  составляли 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,58, 0,64, 0,8, 1,0, 1,3, 1,8 и 2,5 с для WBSCR27/SAH и 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1,0, 2,0 и 3,0 с для апо-формы WBSCR27. Задержки в экспериментах по скорости релаксации  $R_2$  составили 0, 17, 33,9, 50,9, 67,8, 84,8, 101,8, 118,7, 135,7, 152,7, 169,6, 186,6, 203,5, 237,5, 271,4, 305,3 мс для WBSCR27/SAH и 3,97, 50,9, 67,8, 84,8, 101,8, 118,7 мс для апо-WBSCR27. Время возбуждения  $^1\text{H}$  в экспериментах по измерению гетероядерных ЯЭО $\{^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}\}$  составляло 6,0 пс, релаксационные задержки в экспериментах по измерению  $R_1$  и  $R_2$  составляли 4 с. Все спектры обработаны с использованием программы NMRPipe [149]. Нелинейную аппроксимацию интегральных объёмов пиков и расчёт стандартных отклонений выполнили с использованием процедуры nlinLS. Значения  $R_1$  и  $R_2$  рассчитывали по объёму пиков с помощью программы RelaxFit [156]. Значения стандартных отклонений ЯЭО $\{^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}\}$  рассчитаны с использованием среднеквадратичного шума фоновых областей [164] и дополнительно проверены и скорректированы с использованием двух независимо измеренных наборов экспериментальных данных. Анализ значений  $R_1$ ,  $R_2$  и ЯЭО $\{^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}\}$  для WBSCR27/SAH и апо-WBSCR27 проводили с использованием безмодельного формализма в программе RelaxFit.

### 2.16.2 Защитные факторы амидных протонов

Скорости обмена амидных протонов  $\text{H}_\text{N}$  на дейтерий определяли по серии спектров  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC, регистрируемых в виде псевдо-3D экспериментов. Измерения начинали сразу после растворения лиофилизированных образцов белка в  $\text{D}_2\text{O}$ . Регистрацию первого спектра удавалось начать примерно через 10 минут после растворения. В общей сложности измерено

46 спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC в случае SAH/WBSCR27 и 19 — в случае апо-формы. Временные интервалы между измерениями составляли 12 минут. Константы скорости обмена H/D  $k_{\text{obs}}$  для отдельных атомов  $\text{H}_\text{N}$  рассчитали по изменению во времени объёма соответствующих им сигналов, измеренного методом нелинейной подгонки формы линий с использованием процедуры nLinLS из пакета NMRPipe [149]. Расчет значений  $k_{\text{obs}}$  проводили в программе RelaxFit [156]. Погрешность измеренных значений  $k_{\text{obs}}$  оценивали по их стандартным отклонениям, полученным при нелинейной аппроксимации. Защитные факторы для отдельных атомов водорода  $\text{H}_\text{N}$  рассчитывали как отношения внутренней ( $k_{\text{int}}$ ) и наблюдаемой ( $k_{\text{obs}}$ ) констант скорости обмена [165]. Значения  $k_{\text{int}}$  рассчитывали по методике, описанной в работе Бай и соавторов [166] с использованием соответствующего модуля программы RelaxFit.

## Глава 3. Результаты

### 3.1 Аминокислотная последовательность WBSCR27 имеет сходство с МТазами

Анализ аминокислотной последовательности, проведённый с помощью pBLAST [167], позволил обнаружить МТазный домен pfam13649 (E-value  $3 \cdot 10^{-20}$ ), характерный для суперсемейства SAM-зависимых МТаз (рис. 38). Данный факт указывает на то, что белок WBSCR27 с большой вероятностью принадлежит к этому суперсемейству.

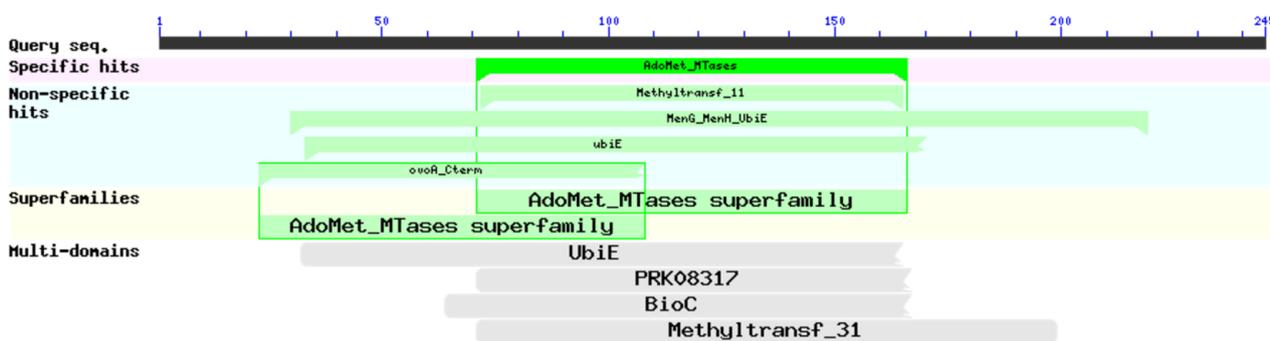


Рис 38. С помощью pBLAST в аминокислотной последовательности WBSCR27 обнаружен МТазный домен

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. Он кодирует рРНК МТазу, катализирующую метилирование седьмого атома азота гуанина в 18S рРНК [103]. Другой близкий гомолог – GNMT, это N-МТаза глицина – широко распространённый фермент, регулирующий баланс SAM/SAH в клетке [168]. Следующий гомолог – белковая МТаза METTL10. Она селективно катализирует три-метилирование лизина-318 в белке EEF1A [169]. 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. 39). Из литературы известно, что у других МТаз аминокислотные остатки, образующие эти мотивы, участвуют в связывании SAM [170].

			SAM		SAM		
MET27_MOUSE	3	MT-QEEAGRLPQVLAR <b>RV</b> ----GTSHGITDLACKLR <b>FYD</b> DWAPEYDQDVAALK <b>Y</b> RAPR----LAVDCLS-----RA					63
MET27_HUMAN	1	MA-QEEGGSLEPEVRAR <b>V</b> ----RAAHGIPDLAQKLH <b>FYD</b> RWAPDYDQDVATLL <b>Y</b> RAPR----LAVDCLT-----QA					61
BUD23_HUMAN	1	-----MASRGR <b>RPE</b> --HGGPPEL----- <b>FYD</b> -----ETEARK <b>Y</b> VRNSRMIDIQTRMAGRALELLY					48
BUD23_YEAST	1	-----MSR <b>PE</b> --ELAPPEI----- <b>FYN</b> -----DSEAHK <b>Y</b> TGSTRVQHITQAKMTLLRALELLN					44
GNMT_HUMAN	1	-----MVDSV <b>YR</b> TRSLGVAAEGLP----- <b>DQYAD</b> -GEAARVWQ <b>L</b> YIGDTRSR <b>TA</b> --EYKAWL---LG					51
EFMT2_HUMAN	1	MSSGADGGGGAAVAAR <b>SD</b> --KGSPPGEDGFVPSALG <b>TR</b> EHWDVAVYERELQ <b>T</b> FREYGD <b>T</b> GEIWFGEESMNRLIRW <b>MQ</b>					73
			SAM		SAM		
MET27_MOUSE	64	FRGSPHDAL <b>ILDVACGTGLVAVELQARG</b> FLOVQ <b>GVDGSP</b> EMLKQARARGLYHH----LSLCT <b>LGQE</b> -----					125
MET27_HUMAN	62	LPGPPHSAL <b>ILDVACGTGLVAAELRAPG</b> FLOLH <b>GVDGSP</b> GMLQEQAPGLYQR----LSLCT <b>LGQE</b> -----					123
BUD23_HUMAN	49	LPE-NKPCY <b>LLDIGCGTGLSGS</b> YLSDE <b>G</b> -HYWV <b>G</b> LD <b>I</b> SPAM <b>L</b> DEAVDREIE <b>G</b> D---LLL <b>GDMGQ</b> -----					107
BUD23_YEAST	45	LQ---PCSF <b>ILDIGCGSGLS</b> GEIL <b>TQEG</b> DHVWC <b>G</b> LD <b>I</b> SP <b>S</b> MLATGLSRELE <b>G</b> D---LML <b>QDMGT</b> -----					102
GNMT_HUMAN	52	LLRQHGCQ <b>RVL</b> DVAC <b>GTG</b> VSIM <b>LVEE</b> G <b>F</b> S-V <b>T</b> SVD <b>S</b> DK <b>M</b> LKYALKERWNR <b>R</b> HEPA <b>F</b> DKW <b>V</b> IEEANWMT <b>L</b> DKD-					124
EFMT2_HUMAN	74	KHKIPLDAS <b>VLDIGTGN</b> GVFL <b>VE</b> LAK <b>F</b> GF <b>S</b> NI <b>T</b> <b>GIDY</b> SP <b>S</b> AT <b>QL</b> LSGS <b>I</b> IEKE <b>G</b> ---LS <b>NI</b> KL <b>K</b> VED <b>F</b> LN <b>L</b> ST <b>QL</b>					144
MET27_MOUSE	126	---PLDP <b>EGT</b> FD <b>AV</b> IIVGAL <b>S</b> EQVPC <b>S</b> A----- <b>I</b> PE <b>L</b> LRV <b>T</b> K <b>P</b> GLV <b>CL</b> T <b>TR</b> T <b>N</b> PS-----					175
MET27_HUMAN	124	---PLPS <b>EGT</b> FD <b>AV</b> LIVGAL <b>S</b> DGQVPC <b>N</b> A----- <b>I</b> PE <b>L</b> -H <b>V</b> T <b>K</b> P <b>G</b> L <b>V</b> CL <b>T</b> TR <b>T</b> NS <b>S</b> -----					172
BUD23_HUMAN	108	---G <b>I</b> PF <b>K</b> P <b>G</b> T <b>FD</b> GC <b>I</b> S <b>I</b> SA <b>V</b> ---Q <b>W</b> LC <b>N</b> ANK <b>S</b> EN <b>PA</b> K <b>R</b> LY <b>C</b> FF <b>A</b> S <b>L</b> F <b>S</b> V <b>L</b> V <b>R</b> G <b>S</b> RA <b>V</b> L <b>Q</b> LY <b>P</b> EN <b>S</b> -----					168
BUD23_YEAST	103	---G <b>I</b> PF <b>R</b> A <b>G</b> S <b>FD</b> AA <b>I</b> S <b>I</b> SA <b>I</b> ---Q <b>W</b> LC <b>N</b> AD <b>T</b> S <b>Y</b> ND <b>P</b> K <b>Q</b> RL <b>M</b> RF <b>F</b> NT <b>L</b> YA <b>A</b> L <b>K</b> K <b>G</b> G <b>F</b> V <b>A</b> Q <b>F</b> Y <b>P</b> K <b>N</b> D-----					163
GNMT_HUMAN	125	---VPQ <b>S</b> A <b>E</b> G <b>GF</b> DA <b>V</b> IC <b>L</b> GN <b>S</b> FA <b>H</b> LP <b>D</b> CK <b>G</b> DQ <b>S</b> EH <b>R</b> L----- <b>AL</b> K <b>N</b> I <b>A</b> S <b>M</b> V <b>R</b> AG <b>L</b> L <b>V</b> I <b>D</b> H <b>R</b> N <b>Y</b> D <b>H</b> I <b>L</b> S <b>T</b> GC <b>A</b> P					190
EFMT2_HUMAN	145	SG <b>F</b> H <b>I</b> C <b>I</b> D <b>K</b> T <b>GF</b> DA <b>I</b> SL <b>N</b> PD <b>N</b> A <b>I</b> E-K <b>R</b> K <b>Q</b> Y----- <b>V</b> K <b>S</b> L <b>S</b> R <b>V</b> L <b>K</b> V <b>K</b> G <b>F</b> FL <b>I</b> T <b>S</b> C <b>N</b> -----					193
MET27_MOUSE	176	---NL <b>P</b> Y <b>K</b> E <b>L</b> E-AT <b>L</b> DR <b>L</b> E <b>Q</b> AG <b>M</b> W <b>E</b> GL <b>V</b> AW <b>P</b> DR <b>L</b> WT <b>A</b> GS <b>W</b> L <b>P</b> PS <b>W</b> R-W <b>P</b> AS <b>L</b> PR <b>M</b> AS <b>S</b> PA-----L-----					218
MET27_HUMAN	173	---NL <b>Q</b> Y <b>K</b> E <b>A</b> L-AT <b>L</b> DR <b>L</b> E <b>Q</b> AG <b>M</b> W <b>E</b> GL <b>V</b> AW <b>P</b> DR <b>L</b> WT <b>A</b> GS <b>W</b> L <b>P</b> PS <b>W</b> R-W <b>P</b> AS <b>L</b> PR <b>M</b> AS <b>S</b> PA-----L-----					231
BUD23_HUMAN	169	----- <b>E</b> Q <b>L</b> E-L <b>I</b> T <b>T</b> Q <b>A</b> T <b>K</b> AG <b>F</b> SG <b>M</b> V <b>V</b> D <b>Y</b> NS <b>A</b> K <b>A</b> K <b>F</b> Y <b>L</b> C <b>L</b> F <b>S</b> G--P <b>S</b> T <b>F</b> I <b>P</b> E <b>G</b> L <b>S</b> EN <b>Q</b> D <b>E</b> V <b>E</b> P <b>R</b> E <b>S</b> V <b>F</b> T <b>N</b>					232
BUD23_YEAST	164	----- <b>D</b> Q <b>V</b> D-D <b>I</b> L <b>Q</b> S <b>A</b> K <b>V</b> AG <b>F</b> SG <b>L</b> V <b>V</b> D <b>D</b> P <b>E</b> S <b>K</b> N <b>K</b> K <b>Y</b> L <b>V</b> L <b>S</b> S <b>G</b> --A <b>P</b> P <b>Q</b> G <b>E</b> E <b>Q</b> V <b>N</b> L <b>D</b> G <b>V</b> T <b>M</b> D-E <b>E</b> N <b>V</b> N <b>L</b> K					226
GNMT_HUMAN	191	PG <b>K</b> N <b>I</b> Y <b>Y</b> K <b>S</b> D <b>L</b> T <b>K</b> D <b>V</b> T <b>T</b> S <b>V</b> -----L <b>I</b> V <b>N</b> N <b>K</b> A <b>H</b> -----M <b>V</b> T <b>L</b> D <b>Y</b> T---V <b>Q</b> V <b>P</b> ---G <b>A</b> G <b>Q</b> D <b>G</b> S <b>P</b> G <b>L</b> S <b>K</b> F <b>R</b> L					243
EFMT2_HUMAN	194	---W <b>T</b> K <b>E</b> L <b>L</b> N-----E <b>F</b> --S <b>E</b> G <b>W</b> S-----T <b>V</b> AG <b>F</b> W <b>L</b> T <b>A</b> A <b>L</b> T <b>S</b> W <b>A</b> Q <b>A</b> I <b>F</b> S <b>T</b> S <b>A</b> S <b>R</b> -----V-----					234
MET27_MOUSE	219	-----G <b>T</b> C <b>A</b> N <b>D</b> G <b>F</b> I <b>S</b> G <b>I</b> I <b>Y</b> L-----Y <b>R</b> K <b>Q</b> E <b>T</b> V-----					240
MET27_HUMAN	232	-----S <b>T</b> C <b>T</b> E <b>S</b> G <b>R</b> R <b>P</b> R <b>L</b> R <b>K</b> -----					245
BUD23_HUMAN	233	-----E <b>R</b> F <b>P</b> L <b>R</b> M <b>S</b> R <b>R</b> G <b>M</b> V <b>R</b> K <b>S</b> R <b>A</b> W <b>L</b> E <b>K</b> K <b>E</b> R <b>H</b> R <b>R</b> Q <b>G</b> R <b>E</b> V <b>R</b> P <b>D</b> T <b>Q</b> Y <b>T</b> G <b>R</b> K <b>R</b> K <b>P</b> R <b>F</b> -----					281
BUD23_YEAST	227	-----K <b>Q</b> L <b>R</b> Q <b>R</b> L <b>K</b> G <b>G</b> D <b>K</b> E <b>S</b> A <b>K</b> S <b>F</b> I <b>L</b> R <b>K</b> K <b>E</b> L <b>M</b> K <b>R</b> R <b>G</b> R <b>K</b> V <b>A</b> R <b>D</b> S <b>K</b> F <b>T</b> G <b>R</b> K <b>R</b> R <b>H</b> R <b>F</b> -----					275
GNMT_HUMAN	244	S <b>Y</b> Y <b>P</b> H <b>C</b> L <b>A</b> S <b>F</b> T <b>E</b> L <b>L</b> Q <b>A</b> A <b>F</b> G <b>G</b> K <b>C</b> Q <b>H</b> S <b>V</b> L <b>G</b> D <b>F</b> K <b>P</b> YK-----P <b>Q</b> G <b>T</b> Y <b>I</b> P <b>C</b> Y <b>F</b> I <b>H</b> V <b>L</b> K <b>R</b> T <b>D</b> --					295
EFMT2_HUMAN	235	-----G <b>G</b> T <b>T</b> G <b>T</b> H <b>H</b> H <b>A</b> W <b>I</b> F <b>V</b> F <b>L</b> A <b>E</b> T <b>R</b> F <b>C</b> H <b>V</b> V <b>Q</b> A <b>G</b> L <b>E</b> L <b>L</b> G <b>S</b> S <b>D</b> S <b>P</b> T <b>W</b> P <b>K</b> V <b>L</b> G <b>L</b> Y <b>H</b> A <b>R</b> P <b>S</b> L <b>A</b>					290

Рис 39. 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 4QTU)

Также стоит отметить, что в непосредственной близости к гену WBSCR27 в геноме расположено несколько генов рНК МТаз. Так, упомянутый выше WBSCR22 участвует в образовании m<sup>7</sup>G1639 в 18 S рНК. 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 рНК. Исходя из геномного контекста можно было бы ожидать, что WBSCR27 тоже участвует в метилировании рНК 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.

## 3.2 Функции WBSCR27 в клетке не ясны

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

### 3.2.1 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 мутации, нарушающие рамку считывания WBSCR27 на обоих аллелях (рис. 30С). Клетки оказались жизнеспособными, фенотипические проявления у нокаутных клеток отсутствовали.

Кроме того, в параллельном эксперименте в нашем коллективе силами научного руководителя, д.х.н., член-корр. РАН Сергиева П.В., и Авериной О.А. 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.

### 3.2.2 WBSCR27 не обуславливает метилирование 28S рРНК

В настоящее время для большинства метилированных нуклеотидов в рРНК известны ферменты, ответственные за их модификацию [44]. Единственный метилированный нуклеотид рРНК млекопитающих, для которого фермент, ответственный за модификацию, ещё не установлен, — это  $m^3U4530$  в 28S рРНК (нумерация рРНК человека). Этот нуклеотид расположен в пептидилтрансферазном центре большой субъединицы рибосомы [44]. Чтобы проверить, связана ли данная модификация с ферментативной активностью WBSCR27 мы использовали метод остановки обратной транскрипции. Ранее этим методом были успешно идентифицированы некоторые МТазы, например, так была обнаружена бактериальная МТаза, модифицирующая G2445 в 23S рРНК [132]. Метод основан на том, что  $m^3U$  вызывает остановку обратной транскрипции. Эксперимент показал, что остановка обратной транскрипции наблюдается как в случае РНК из нокаутных клеток, так и в случае РНК из контрольных клеток дикого типа (рис 40). Эти данные ясно указывают на то, что WBSCR27 не отвечает за модификацию U4530 и, следовательно, рРНК не может быть субстратом метилирования для этого фермента.

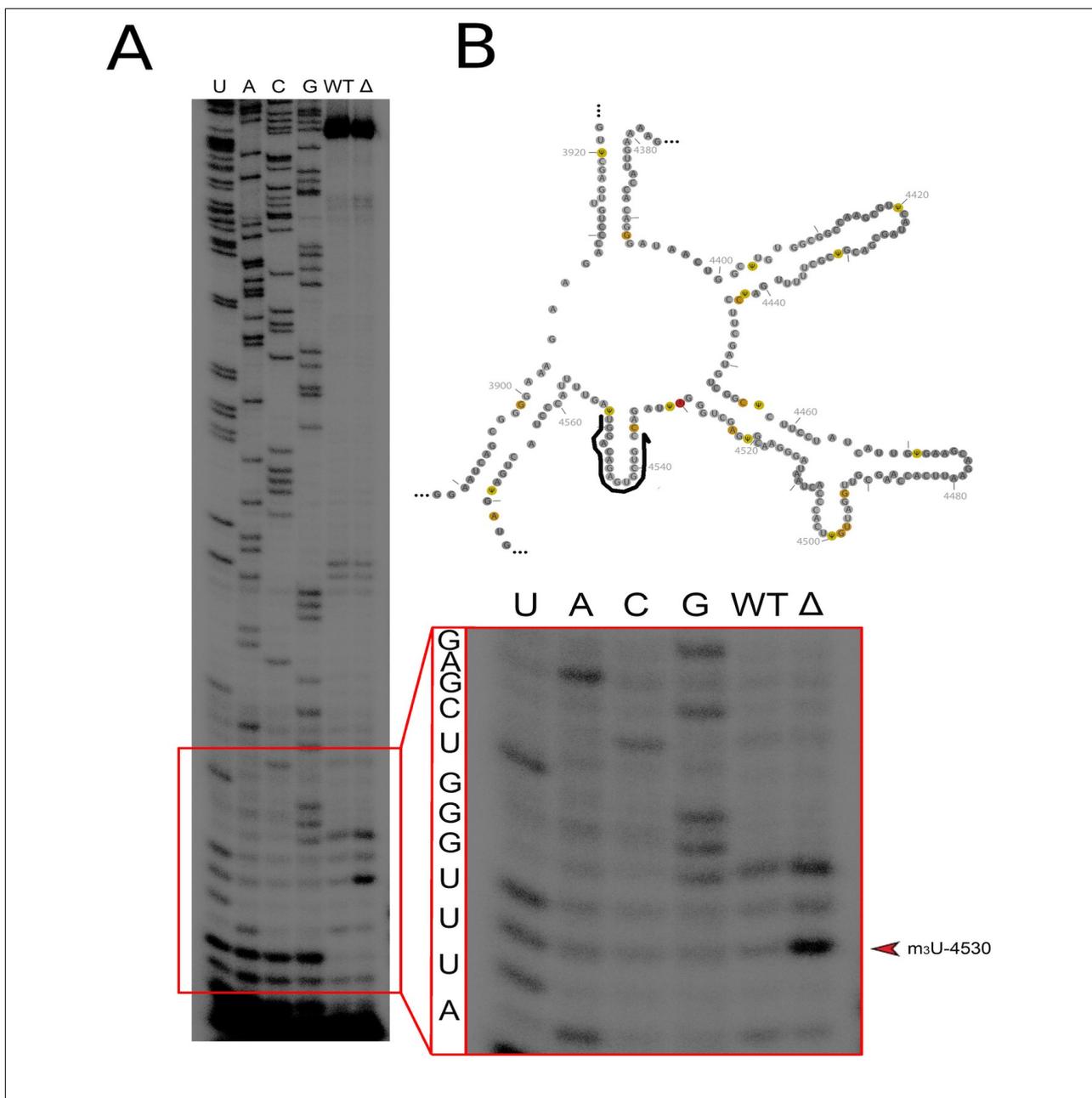


Рис 40. Проверка WBSCR27 на активность по отношению к метилированию U4530 в 28S рРНК. **А.** Гель-электрофорез в 10% денатурирующем полиакриламидном геле с последующей авторадиографической визуализацией продуктов обратной транскрипции РНК из клеток NIH3T3 дикого типа (WT) и нокаутных по WBSCR27 клеток ( $\Delta$ ) с использованием праймера, комплементарного положению 4537-4551 28S рРНК. U, A, C, G соответствуют сиквенсным дорожкам. **В.** Схема вторичной структуры фрагмента 28S рРНК. Модифицированные нуклеотиды выделены цветом: красным обозначен  $m^3U$ , для которого ещё не установлен фермент, вносящий эту модификацию; оранжевым обозначены другие метилированные основания; жёлтым обозначен псевдоуридин (не вызывающий остановки обратной транскрипции). Стрелкой показан праймер, использованный для обратной транскрипции

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

#### Ко-иммунопреципитация.

Для того, чтобы определить предполагаемые партнёры, с которыми взаимодействует белок WBSCR27, мы получили клеточную линию NIH3T3 с эктопической экспрессией HA-WBSCR27 под регулируемым промотером (рис. 30A). После индукции экспрессии гибридного гена доксициклином проводили иммунопреципитацию с помощью иммобилизованных антител анти-HA (рис. 41A). В то время как белок с массой 27 кДа, идентифицированный с помощью иммуноблоттинга как HA-WBSCR27 (рис. 41B), явно присутствовал в иммунопреципитате, дополнительных полос его предполагаемых белковых партнёров не наблюдалось. Для того, чтобы исключить возможность отсутствия идентифицируемых белков-партнёров в иммунопреципитате в результате оверэкспрессии HA-WBSCR27 (из-за уменьшения доли комплекса WBSCR27 с его потенциальным партнёром на фоне свободного белка), а также для исключения вероятности того, что N-концевая метка HA препятствует взаимодействию с белками-партнёрами, мы получили клеточную линию, в которой присоединили довесок, кодирующий HA-метку, на С-конец белка (рис. 30B). Таким образом была получена линия NIH3T3 с естественным уровнем экспрессии WBSCR27-HA. К сожалению, иммунопреципитация WBSCR27-HA из этой клеточной линии также не привела к идентификации потенциальных белков-партнёров WBSCR27 (рис. 41 C).

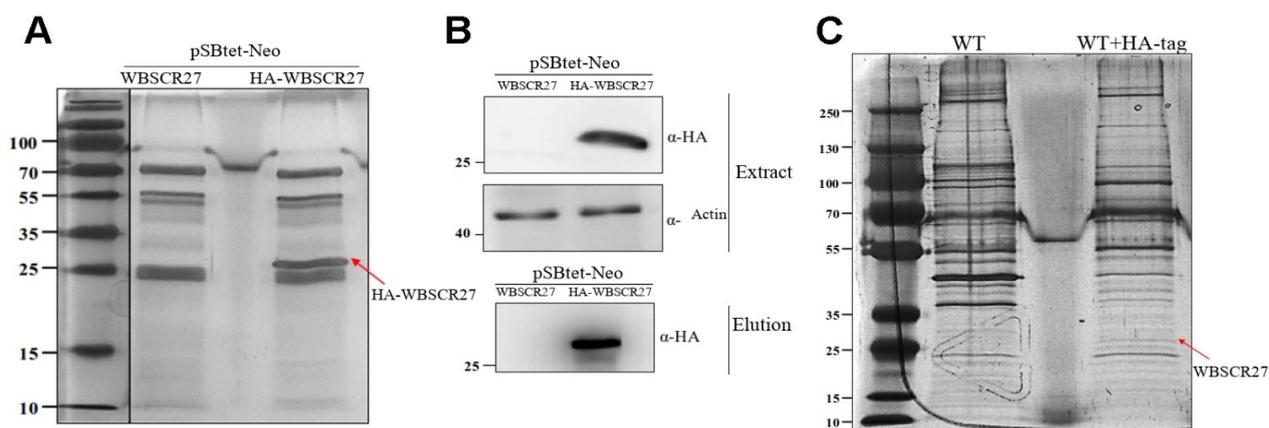


Рис 41. Отсутствие белков-партнёров, ко-иммунопреципитированных с WBSCR27. Окрашенные серебром гели (A, C) и иммуноблоттинг анти-HA антителами (B) элюатов с HA-смолы для контрольных клеток NIH3T3 и клеток NIH3T3 с эктопической экспрессией HA-WBSCR27 (A, B) и экспрессией WBSCR27-HA с природного промотора *Wbscr27* (C). Стрелками обозначены полосы WBSCR27

Известно, что близкий гомолог WBSCR27, рРНК-МТаза WBSCR22, а также ряд других МТаз работают в комплексе с TRMT112. Для проверки возможности со-выделения TRMT112

с WBSCR27 мы проанализировали иммунопреципитат HA-WBSCR27 антителами анти-TRMT112, однако сигнала, подтверждающего взаимодействие между WBSCR27 и TRMT112, не обнаружили.

### Кросс-шивки.

Многие белки устанавливают лишь временные, непрочные контакты со своими партнёрами, которые в ходе иммунопреципитации разрушаются. Для проверки такой возможности перед иммунопреципитацией клетки, эктопически экспрессирующие HA-WBSCR27, обработали формальдегидом, вызывающим кросс-сшивки белка с потенциальными партнёрами. Применение кросс-сшивки также не привело к идентификации белков-партнёров вследствие отсутствия или незначительного выхода ковалентно сшитых продуктов (рис. 42).

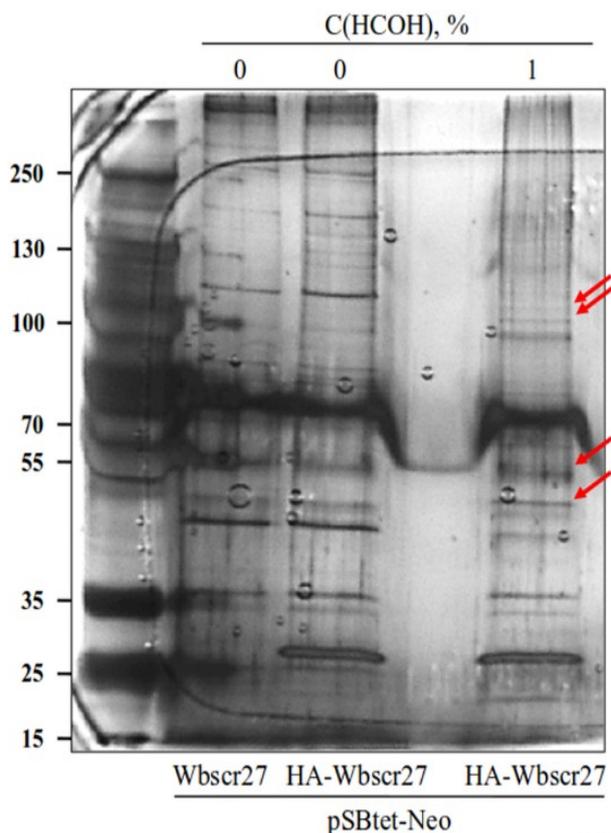


Рис 42. Отсутствие белков-партнёров, коиммунопреципитирующихся с HA-WBSCR27 после сшивания формальдегидом. Элюции с анти-HA смолы разделены в полиакриламидном геле (12%) и окрашены нитратом серебра. Дорожки соответствуют образцам контрольных клеток NIH3T3 и клеток с эктопической экспрессией HA-WBSCR27. Количество формальдегида указано над дорожками. Стрелки указывают на полосы, потенциально отличающие опыт от контроля

Альтернативным подходом к идентификации короткоживущих взаимодействий белок-белок является эксперимент **BioID** [140]. Метод основан 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 поиска белковых партнёров WBSCR27 получили клеточную линию NIH3T3 (на основе линии NIH3T3  $\Delta$ WBSCR27), экспрессирующую гибридный белок HA-BirA-WBSCR27 (рис. 30D), и линию контрольных клеток, экспрессирующих HA-BirA (рис. 30E). Также использовали клетки  $\Delta$ WBSCR27 в качестве дополнительного контроля (рис. 30C).

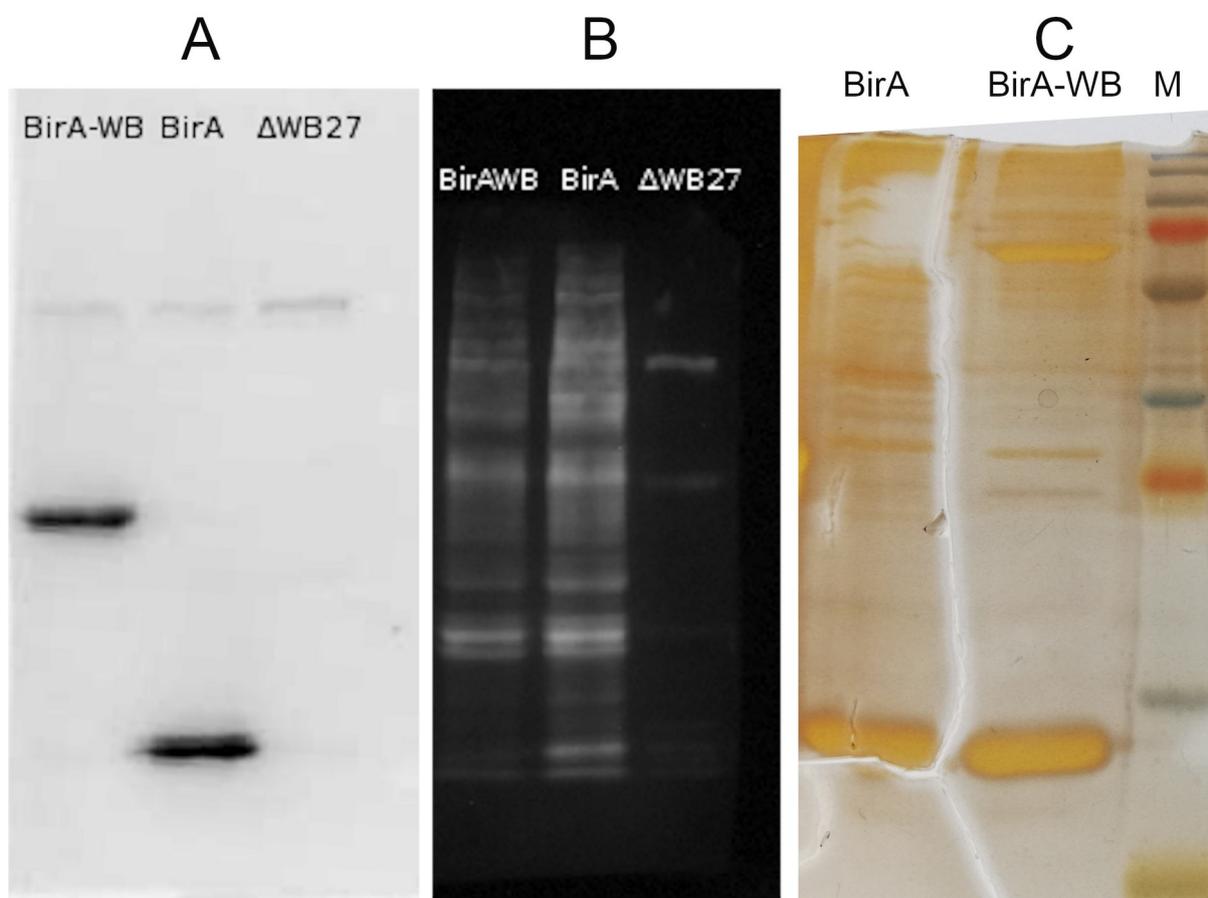


Рис 43. Проверка белковых фракций в эксперименте BioID. **А.** Вестерн-блот анализ с антителами против HA на лизатах клеток, экспрессирующих HA-BirA-WBSCR27, HA-BirA и клеток  $\Delta$ WBSCR27; **В.** Вестерн-блот анализ с пероксидазным конъюгатом стрептавидина на лизатах клеток, экспрессировавших белок HA-BirA-WBSCR27, HA-BirA и клеток  $\Delta$ WBSCR27; **С.** Гель, окрашенный нитратом серебра, содержащий выделенные на стрептавидин-сефарозе белки из клеток, экспрессировавших HA-BirA и HA-BirA-WBSCR27

Вестерн-блот анализ антителами против HA показал примерно равный уровень экспрессии белков HA-BirA-WBSCR27 и HA-BirA в соответствующих клеточных лизатах

(рис. 43А). Выявление биотинилированных белков пероксидазным конъюгатом стрептавидина показало наличие большого числа биотинилированных белков в лизате клеток, экспрессировавших белок HA-BirA-WBSCR27 или HA-BirA, в то время как лизат клеток  $\Delta$ WBSCR27 содержал намного меньше биотинилированных белков (рис. 43В). На окрашенном нитратом серебра геле, содержащем выделенные на стрептавидин-сефарозе белки, видно множество белков, как в случае клеток, экспрессировавших HA-BirA-WBSCR27, так и в случае клеток с HA-BirA (рис. 43С), однако видно, что большая часть белковых полос в опыте и контроле идентична.

Биотинилированные белки, выделенные из клеток, содержащих HA-BirA-WBSCR27 и HA-BirA, идентифицировали методом панорамной протеомики в коллаборации с В.Г. Згодой (ИБМХ имени В.Н. Ореховича). Эксперимент проводили в трёх биологических репликах. В образцах иммунопреципитатов обнаруживалось от 500 до 1500 различных белков, среди которых идентифицировали 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.

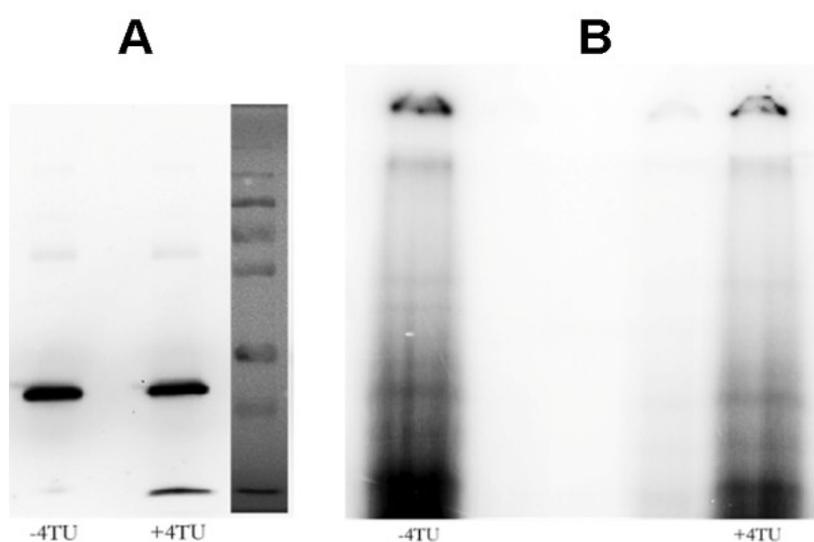


Рис 44. Результат эксперимента PAR-CLIP по поиску РНК-партнёров WBSCR27. А. Иммуноблоттинг антителами анти-НА после иммунопреципитации HA-WBSCR27. В. Визуализация сшитой РНК, меченной  $^{32}$ P, с помощью автордиографии. Видно, что присутствие 4-тиоуридина не влияет на количество сшитой с HA-WBSCR27 РНК

Чтобы идентифицировать потенциальные партнёры белка WBSCR27 среди молекул РНК мы применили протокол **PAR-CLIP** [171]. Клетки линии NIH3T3, экспрессирующие белок HA-WBSCR27, выращенные в присутствии 4-тиоуридина, подвергали умеренному

ультрафиолетовому облучению для индуцирования кросс-сшивок РНК-белок. После фрагментации РНК и иммунопреципитации НА-WBSCR27 сшитую РНК поместили изотопом  $^{32}\text{P}$  и проанализировали с помощью гель-электрофореза и автордиографии (рис. 44). Как видно из рисунка, никакие РНК-партнёры МТазы WBSCR27 не совыделяются с нею.

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

Для поиска субстрата метилирования белка WBSCR27 проведены эксперименты по *in vitro* метилированию возможных субстратов радиоактивным  $^{14}\text{CH}_3\text{-SAM}$  в присутствии рекомбинантного белка WBSCR27. Реакцию проводили на лизате клеток, нокаутных по белку WBSCR27, чтобы потенциальный субстрат не был исходно уже метилирован.

Автордиограммы фракции белков (А) и РНК (В), полученные в результате *in vitro* метилирования, приведены на рис. 45. В белковой фракции наблюдается один продукт метилирования в области коротких пептидов, однако он имеется как в опыте, так и в контроле, что говорит о протекании МТазной реакции под действием какой-то другой МТазы.

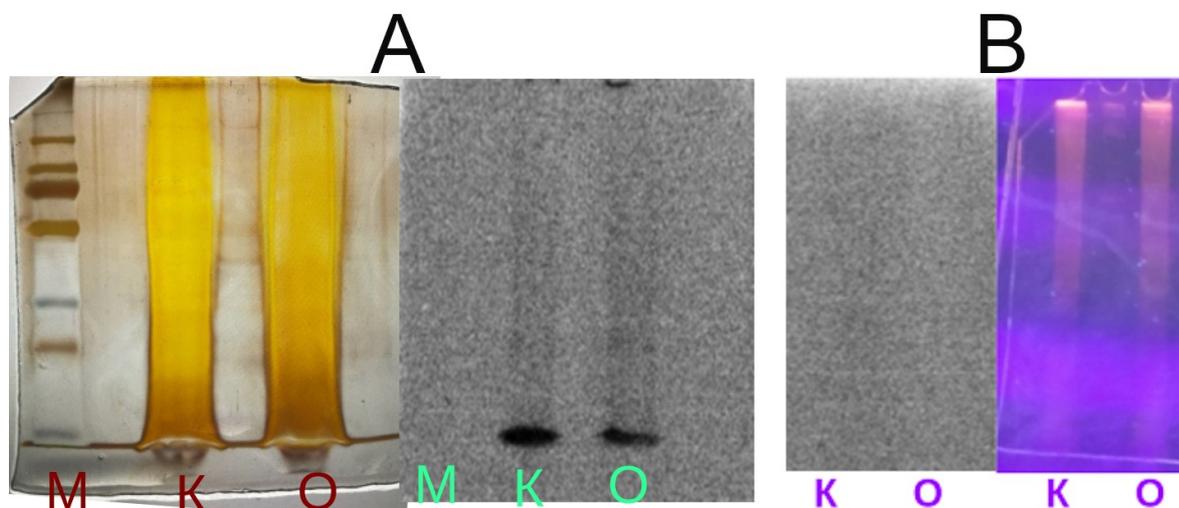


Рис 45. Результаты эксперимента по *in vitro* метилированию возможных субстратов в клеточном лизате радиоактивным  $^{14}\text{CH}_3\text{-SAM}$  в присутствии рекомбинантного белка WBSCR27. А. Белковая фракция, разделённая в полиакриламидном геле (12%), окрашенная нитратом серебра (слева), и автордиограмма (справа). В. Фракция РНК, разделённая в полиакриламидном геле (12%), окрашенная бромистым этидием (справа), и автордиограмма (слева). М — маркер; К — контроль; О — опыт

Таким образом, обнаружить субстрат МТазы WBSCR27 методом автордиографии не удалось. Вероятной причиной может быть низкое содержание субстрата в клеточном лизате или необходимость более сложных условий метилирования.

### 3.2.5 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 значительно не изменяется при инактивации гена WBSCR27.

### 3.2.6 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, [172]). В основе 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.

### 3.2.7 WBSCR27 не катализирует метилирование низкомолекулярных веществ

**Поиск низкомолекулярного субстрата *in vivo*.**

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  $^{13}\text{C}$  (рис. 46).

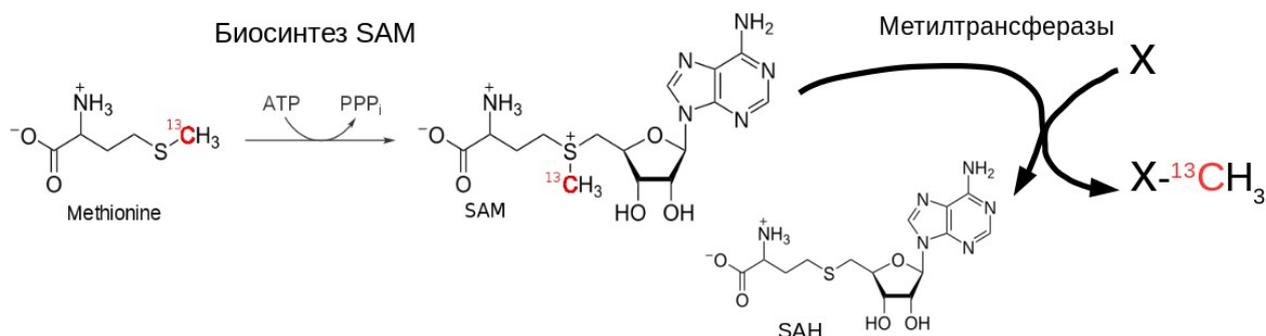


Рис 46. Выращивание клеток в среде, содержащей  $^{13}\text{C}$ -меченный метионин, приводит к внедрению изотопа  $^{13}\text{C}$  в субстраты всех МТаз

Опыт проводили параллельно на клетках с инактивированным WBSCR27, клетках дикого типа и клетках, оверэкспрессирующих WBSCR27 (рис. 47). После сбора клеток и экстракции из них метаболитов регистрировали  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC-спектры, на которых ожидали обнаружить искомую малую молекулу по разнице сигналов.

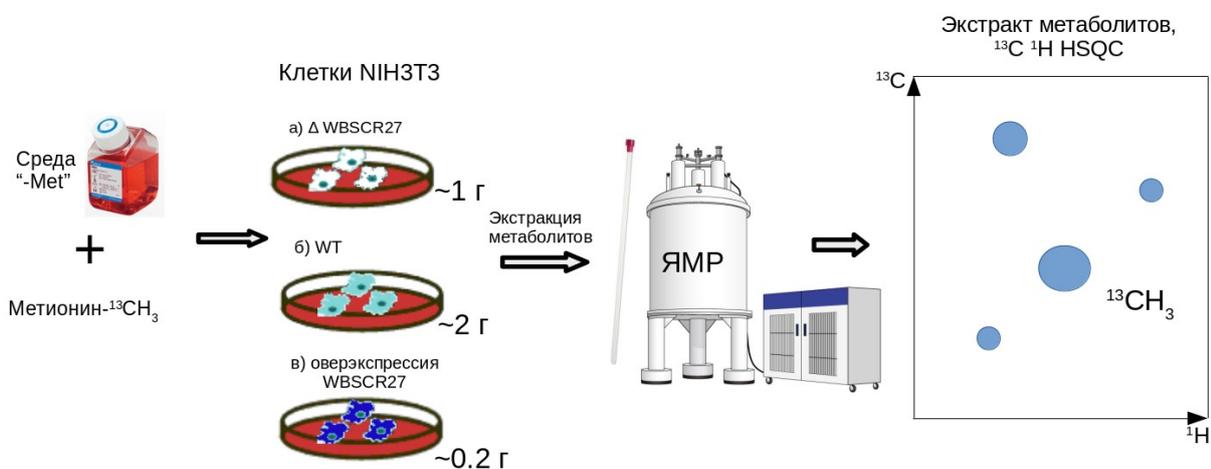


Рис 47. Схема эксперимента по *in vivo* метилированию для поиска низкомолекулярного субстрата метилирования WBSCR27

Эксперимент выполнили в 10 повторах. В результате получили серию  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC спектров метаболитов для клеток дикого типа и клеток нокаута, однако вариабельность этих спектров оказалась столь высока, что идентифицировать субстрат по ним не удалось. Репрезентативные спектры  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  HSQC метаболитов приведены на рис. 48.

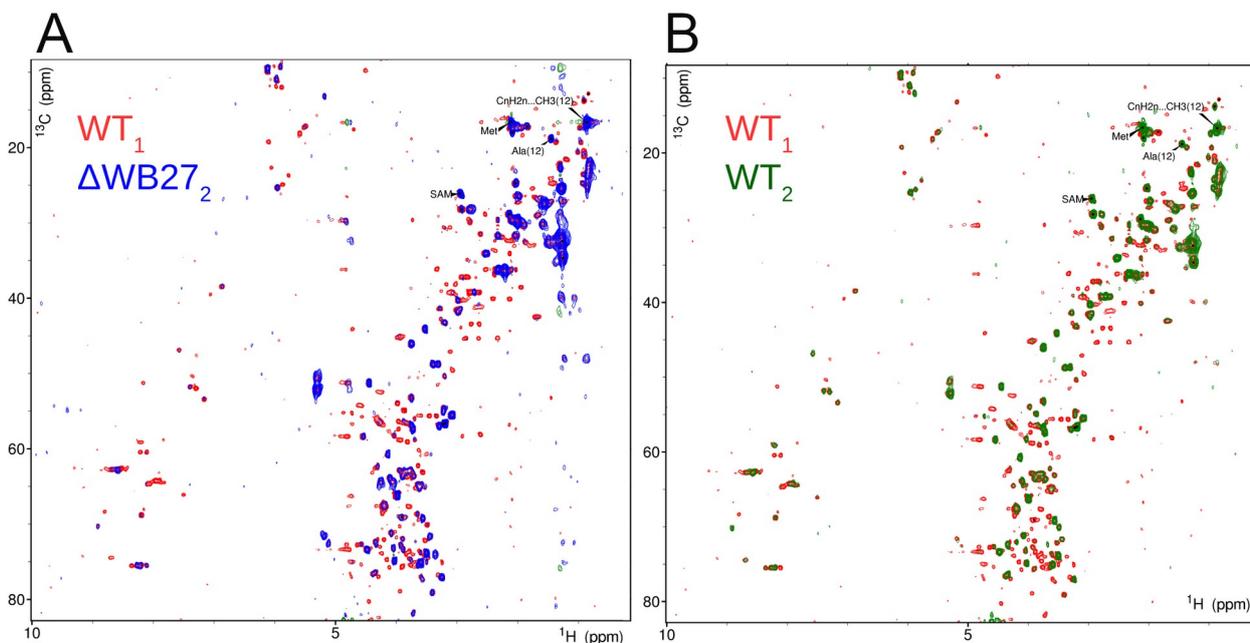


Рис 48. Поиск низкомолекулярного субстрата метилирования WBSCR27 с помощью ЯМР-спектроскопии. А.  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC-спектры метаболитов из клеток дикого типа (красным) и клеток  $\Delta\text{WBSCR27}$  (синим); В.  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC-спектры метаболитов двух биологических повторностей клеток дикого типа

### Поиск низкомолекулярного субстрата *in vitro*.

Также для поиска низкомолекулярного метаболита провели эксперимент по *in vitro* метилированию  $^{13}\text{C}$ -меченным по метильной группе SAM. Предполагалось, что в условиях *in vitro* будет устранена проблемы вариабельности метаболитов в клетках. Схема эксперимента приведена на рис. 49. Эксперимент проводили в двух вариантах — с экстракцией метаболитов до или после проведения МТазной реакции.

Полученные в результате экспериментов спектры  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC не различались, поэтому обнаружить метаболит, подвергающийся метилированию под действием белка WBSCR27 не удалось. Вероятной причиной неудачи может быть низкая чувствительность метода спектрометрии ЯМР, даже при 100%-ном обогащении магнитно-активным ядром  $^{13}\text{C}$ , отсутствие искомого метаболита в клетках или недостаточная активность рекомбинантного белка, полученного в бактериальной системе. Таким образом, несмотря на все усилия, ни одна из попыток идентификации субстрата МТазы WBSCR27 не увенчалась успехом.

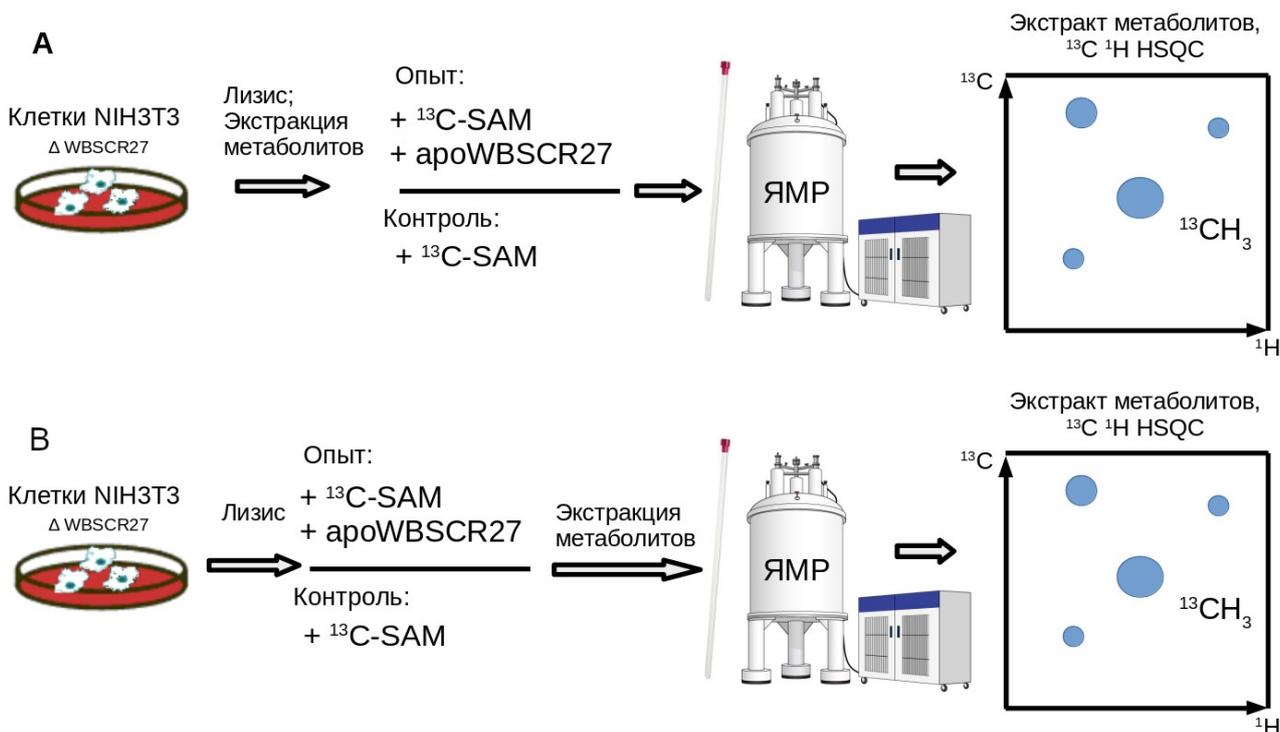


Рис 49. Схема эксперимента по поиску низкомолекулярного субстрата метилирования WBSCR27 с помощью *in vitro*  $^{13}\text{C}$ -метилирования. **А.** Выделение метаболитов проводилось перед проведением метилирования; **В.** Выделение метаболитов проводилось после проведения метилирования

### 3.3 WBSCR27 взаимодействует с низкомолекулярными веществами

В этом разделе сообщается о результатах ЯМР-исследований WBSCR27 в растворе и особенностях его взаимодействия с SAM, SAH и родственными соединениями.

#### 3.3.1 Окислительная агрегация

Белок WBSCR27 крайне неустойчив к окислительной среде. В отсутствие восстановителя в буферном растворе он быстро (в течение нескольких часов) подвергается необратимой агрегации. Этот процесс можно наблюдать по спектрам  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC: с течением времени наблюдается быстрое снижение количества сигналов, вплоть до практически полного их исчезновения спустя 14 часов (рис. 50).

Исчезновение сигналов на ЯМР-спектрах при отсутствии видимого осадка свидетельствует об образовании олигомерных форм белка, размер которых приводит к снижению подвижности молекулы в растворе, и, следовательно, скорости вращательной

диффузии, что, в свою очередь, приводит к увеличению скорости релаксации и уширению сигналов на спектрах, вплоть до невозможности их детектирования.

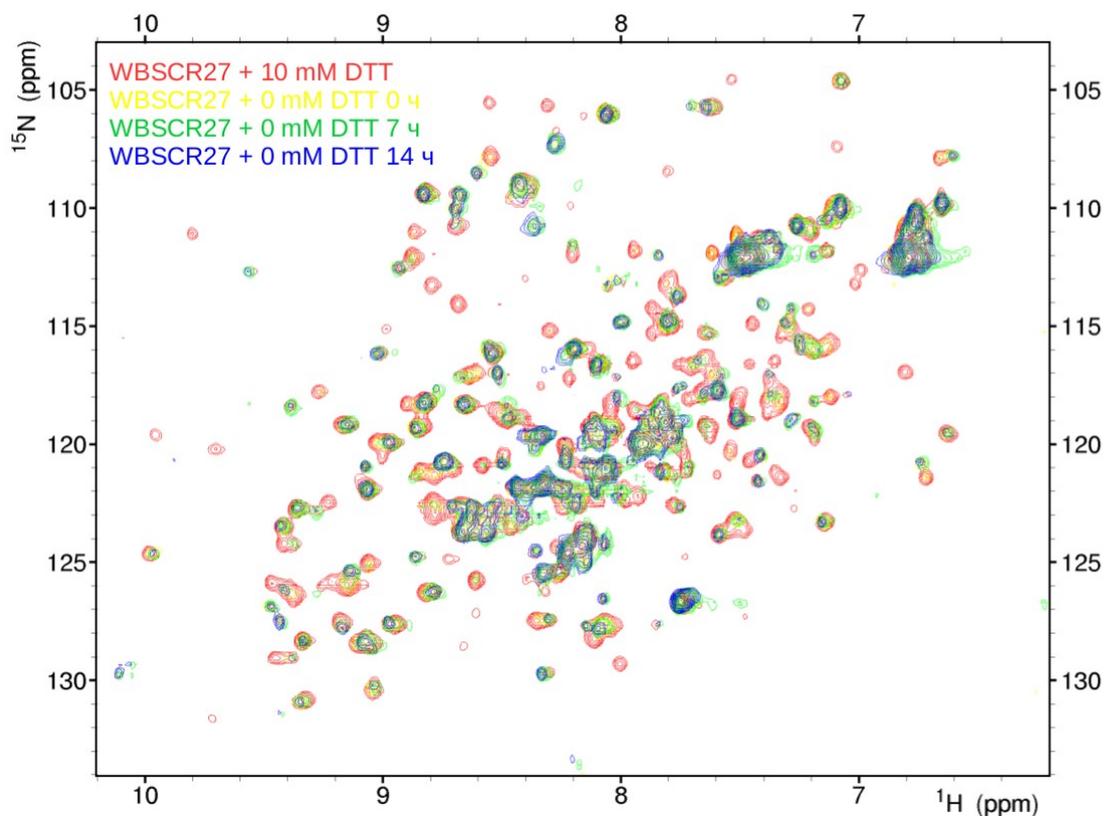


Рис 50.  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC спектры белка WBSCR27 до и после перевода в буфер, не содержащий ДТТ. После удаления ДТТ в течение 14 часов наблюдается существенное уменьшение числа сигналов на спектре, что свидетельствует об агрегации белка. Спектры измерены в фосфатном буфере (50 mM, pH 7) в присутствии азиды натрия (0.02%), хлорида натрия (50 mM) при 35°C

Подтверждение олигомеризации было также получено методом гель-фильтрации: на хроматографической кривой образца, оставленного без ДТТ, наблюдается два пика, один из которых соответствует мономеру ( $M = 27$  кДа), второй — олигомерным формам (рис. 51).

Интересно отметить, что агрегация необратима. При добавлении ДТТ и нагревании в течение нескольких суток олигомерные формы не разрушаются. Вернуть белок к состоянию мономера удавалось только с помощью полного рефолдинга в присутствии ДТТ.

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

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 дублирующихся сигналов. Всё это указывало на то, что белок WBSCR27 совыделяется с SAM или SAH.

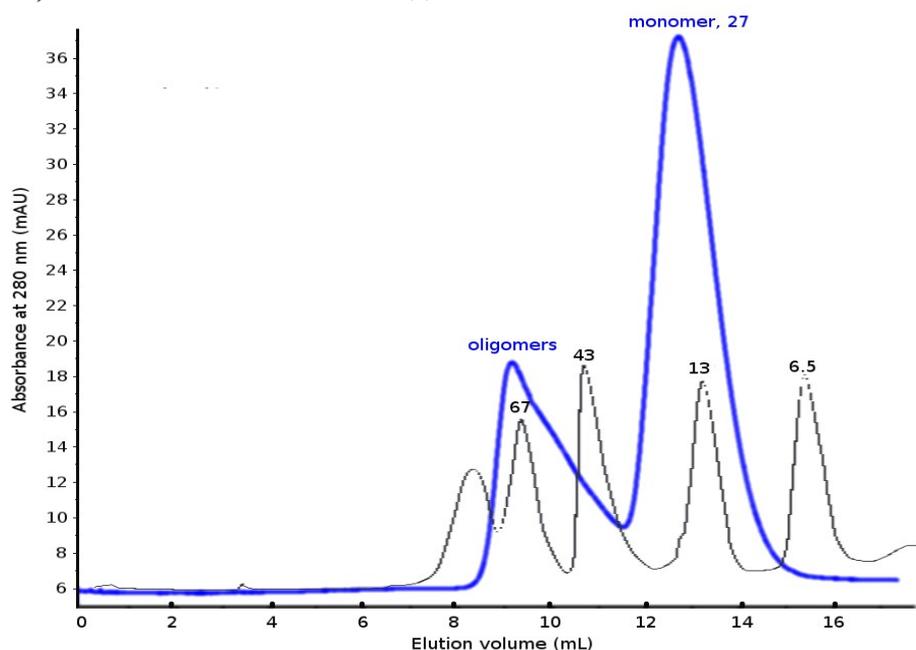


Рис 51. Кривая гель-фильтрации образца белка WBSCR27, подвергшегося окислительной агрегации (синий) и кривая гель-фильтрации для стандартного образца, содержащего 5 белков с известной молекулярной массой (чёрный). Молекулярные массы (в кДа) указаны над пиками

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 D<sub>2</sub>O и денатурировали кислотой DCl (довели pH до 1). Спустя сутки выдерживания при комнатной температуре выпавший денатурировавший белок отделили центрифугированием, а для супернатанта измеряли <sup>1</sup>H-спектр ЯМР. С помощью этого метода удалось показать, что белок WBSCR27 выделяется из клеток *E. coli* в виде смеси из двух комплексов – с кофактором (SAM) и ко-продуктом (SAH) реакции метилирования в соотношении 1:2,7 (рис. 52).

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

Для получения образцов белка в апо-форме понадобилось разработать 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,

переходя в форму комплекса. 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.

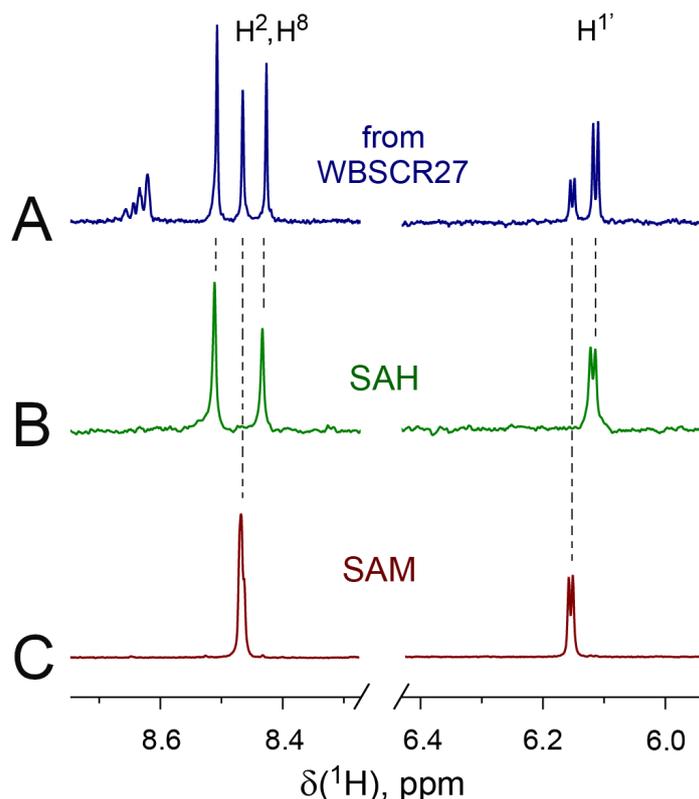


Рис 52. Определение лиганда, совыделяющегося с белком WBSCR27. Интегральная интенсивность сигналов показывает молярное соотношение 1:2,7 между концентрацией SAM и SAH

Используя этот подход удалось получить образцы <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>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.

### 3.3.4 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 выполнено отнесение сигналов <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C и <sup>15</sup>N атомов белка WBSCR27 в

свободном виде и в виде комплекса с SAH. Кроме того, сделано отнесение сигналов  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  в молекуле SAH, связанной с белком.

Полнота выполненного отнесения сигналов белка представлена в табл. 10. Некоторые сигналы не были определены из-за исчезновения их из спектров в результате уширения линий, или, в некоторых случаях, из-за перекрывания сигналов в неупорядоченных частях белковой цепи. Спектры  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC, отражающие отнесение амидных атомов NH для белка WBSCR27, приведены на рис. 53.

Таблица 10. Полнота отнесения резонансов белка WBSCR27 в апо-форме, а также в виде комплекса с SAH.

	Апо-WBSCR27	WBSCR27-SAH
Всего отнесено амидных NH	190	205
Доля отнесённых амидных NH, %	85	92
Доля отнесённых атомов основной белковой цепи, %	78	90
Доля отнесённых атомов C $\alpha$ , %	90	94
Доля отнесённых атомов C', %	85	92
Доля отнесённых атомов H $\alpha$ , %	39	88

Отнесение сигналов белка WBSCR27 депонировано в международную базу данных BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) под номерами BMRB-27578 для апо-формы белка и BMRB-27417 для комплекса WBSCR27/SAH.

Отнесение сигналов лиганда в свободном и связанном с белком виде выполнено с использованием полученного по оригинальной методике  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -меченного SAH в комплексе с  $^{15}\text{N}$ -меченым белком. Результаты отнесения приведены в табл. 11.

Таблица 11. Химические сдвиги SAH в свободном и связанном с WBSCR27 состояниях.

Позиция	Свободный SAH		SAH в комплексе с WBSCR27	
	$^1\text{H}$ , м.д.	$^{13}\text{C}$ , м.д.	$^1\text{H}$ , м.д.	$^{13}\text{C}$ , м.д.
2	8,28	155,8	8,80	156,9
8	8,36	142,9	7,69	138,5
1'	6,09	90,2	6,08	87,1
2'	4,87	76,0	4,18	76,2
3'	4,43	75,0	4,06	71,4
4'	4,34	86,2	4,02	83,9
5'	2,99; 3,07	36,3	2,78; 2,91	37,7
$\alpha$	3,80	56,5	3,81	56,7
$\beta$	2,67; 2,72	30,6	2,57; 2,95	31,0
$\gamma$	2,07; 2,15	33,2	2,02; 2,16	31,8

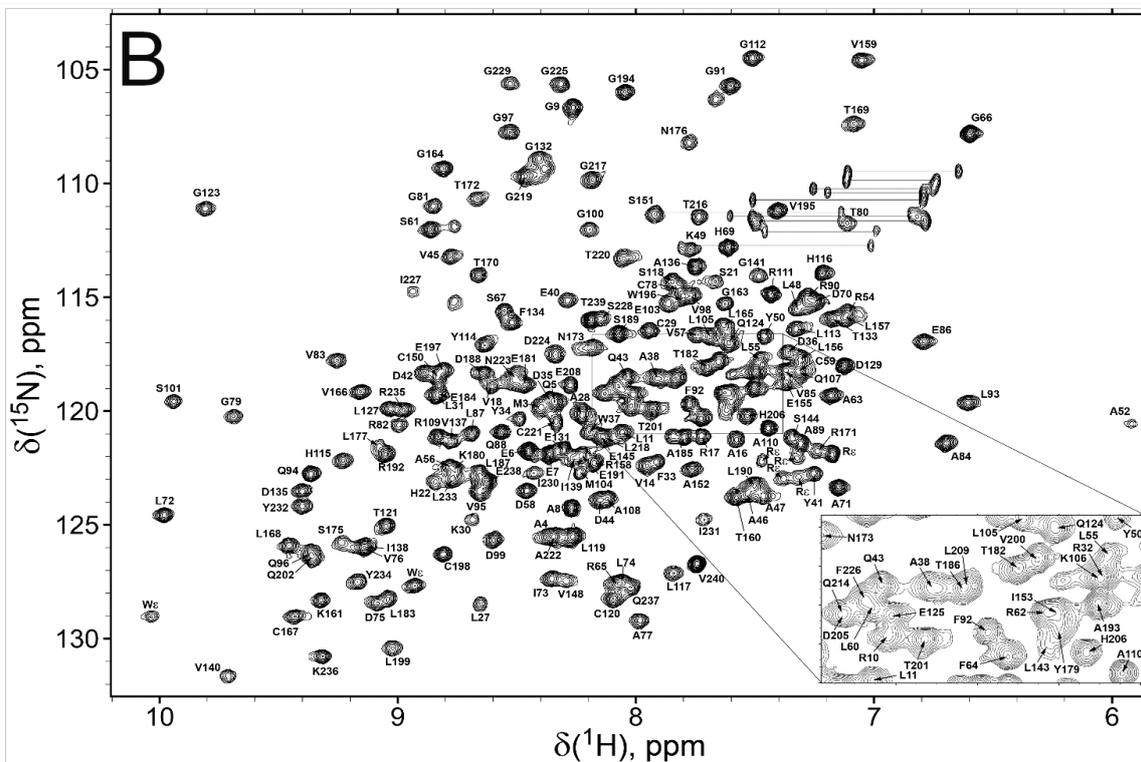
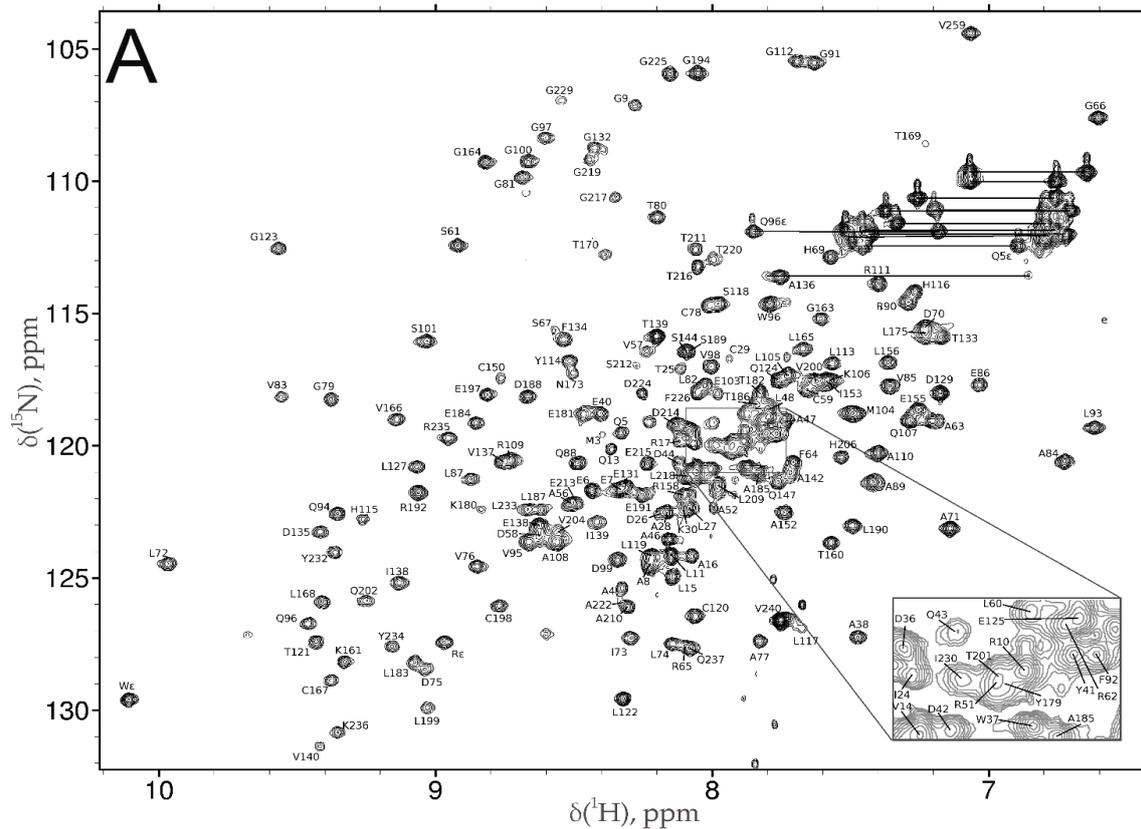


Рис 53. Спектры  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC апо-формы белка WBSCR27 (A) и белка WBSCR27 в комплексе с SAH (B). Отмечены номера аминокислотных остатков. Спектры измерены на ЯМР-спектрометре Bruker Avance с рабочей частотой 700 МГц при 35°C в 50 мМ фосфатном буферном растворе (pH 7.0), содержащем также 50 мМ NaCl, 10 мМ ДТТ и 0.2%  $\text{NaN}_3$

### 3.3.5 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 эквимольного комплекса WBSCR27 с SAH (без избытка лиганда), показали, что при 35 °C комплекс медленно превращается в апо-форму (рис. 54). Конверсия ~90% происходит за ~17 дней и сопровождается появлением на  $^1\text{H}$  ЯМР-спектрах сигналов аденина вследствие разложения SAH (см. далее).

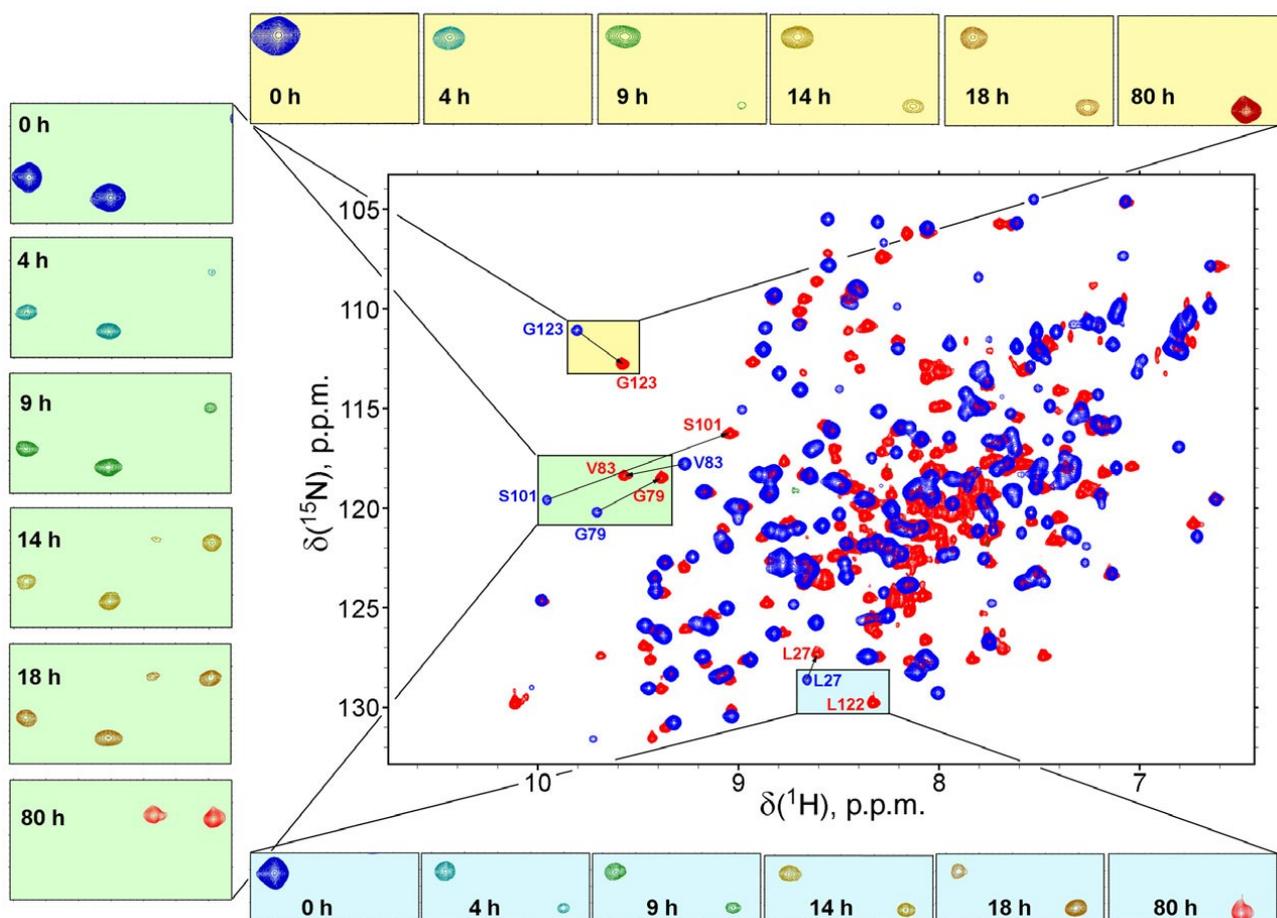


Рис 54. Превращение комплекса WBSCR27/SAH в апо-форму с течением времени. В центре — наложение спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC WBSCR27/SAH (синий) и апо-WBSCR27 (красный). На вставках по периметру показаны отдельные фрагменты спектров, измеренные через определённые промежутки времени при 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, а спустя 3 часа уже приблизительно 40% связанного с белком SAM превращается в SAH (рис. 55). Эти данные позволили оценить время полужизни кофактора в связанном с белком состоянии в диапазоне от 4 до 5 ч.

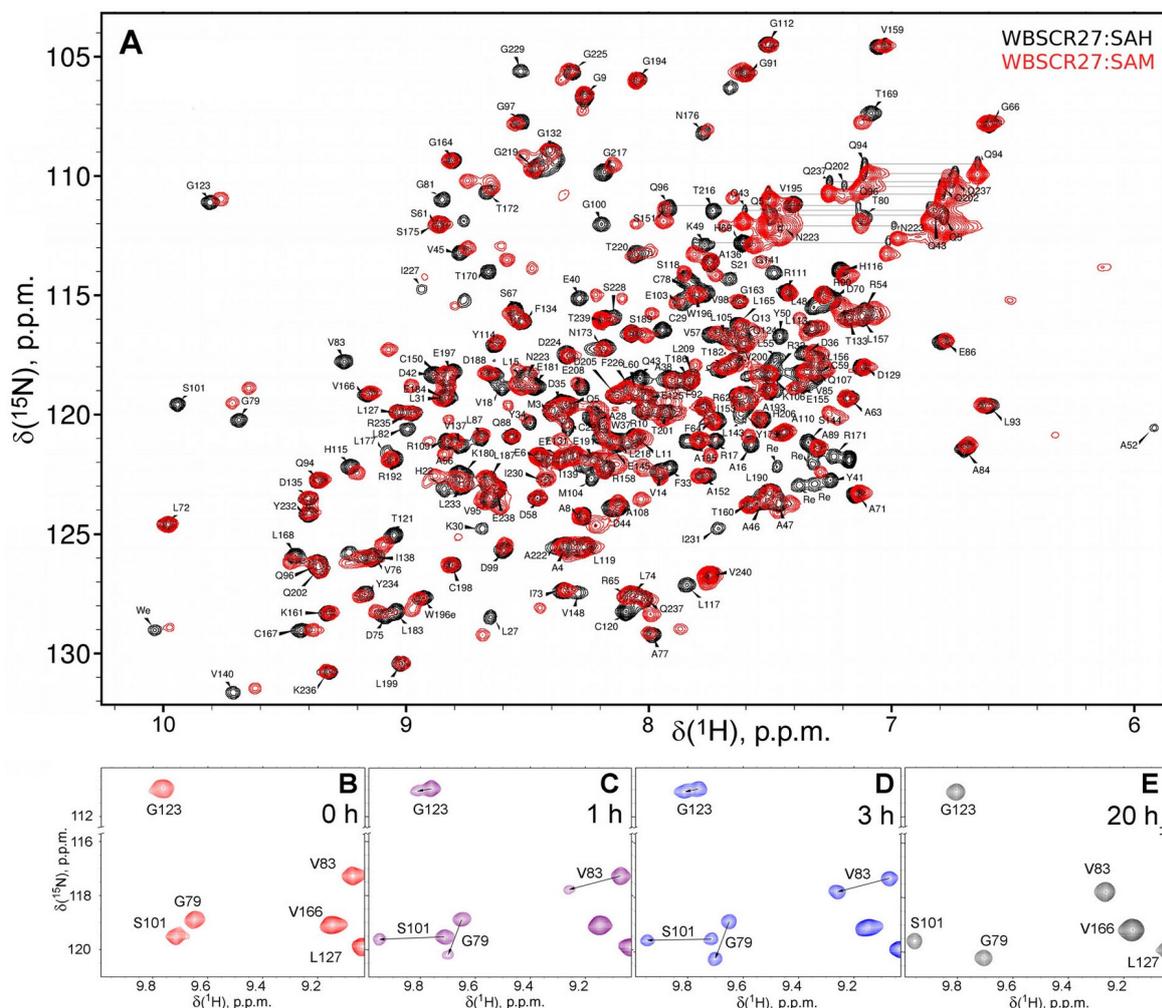


Рис 55. Превращение комплекса WBSCR27/SAM в комплекс WBSCR27/SAH. (A) Наложение спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC комплекса WBSCR27/SAM (красный) и WBSCR27/SAH (черный). (B–E) Репрезентативные фрагменты спектров  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC WBSCR27/SAM, измеренных сразу после добавления 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

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

Для изучения взаимодействия SAM, SAH, MTA, 5'dAdo и аденина с WBSCR27 использовали гетероядерную спектроскопию ЯМР и ИКТ. Для выполнения

ЯМР-экспериментов апо-форму  $^{15}\text{N}$ -WBSCR27 титровали увеличивающимся количеством исследуемых лигандов.

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 °C (рис. 56). Стехиометрия связывания обоих лигандов составила 1:1. Термодинамические параметры, полученные в результате обчёта кривых титрования, приведены в табл. 12.

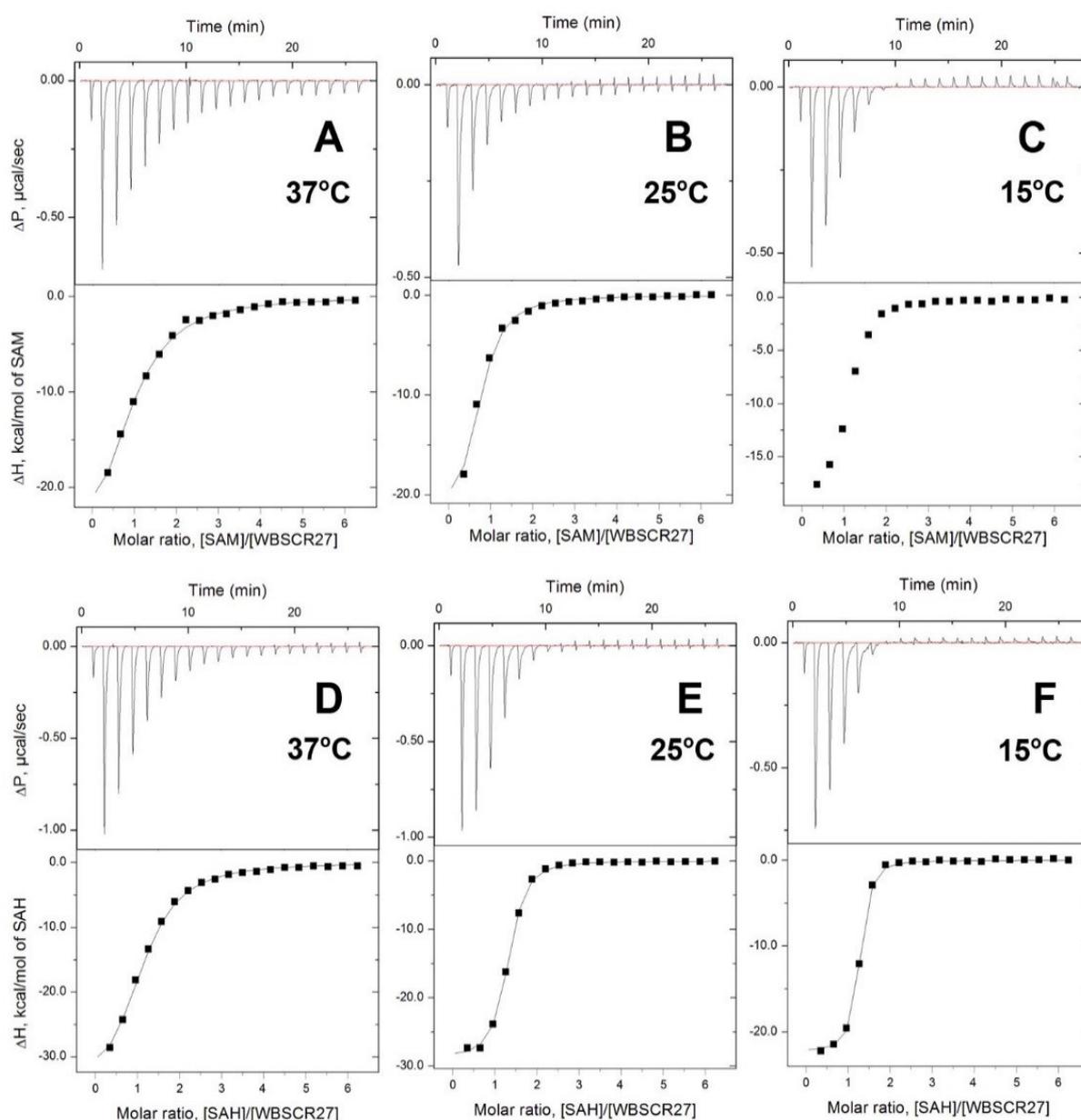


Рис 56. Кривые изотермической калориметрии титрования апо-формы белка WBSCR27 лигандами SAM (A-C) и SAH (D-F) при различных температурах

Таблица 12. Термодинамические параметры взаимодействия белка WBSCR27 с SAM и SAH.

	$K_a \cdot 10^6, M^{-1}$			$\Delta H, \text{ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$			$\Delta S, \text{кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$		
	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
SAH	12,2	4,7	0,57	-22,3	-28,7	-38,7	-12,9	-19,6	-30,5

Из приведённых в таблице данных видно, что аффинность WBSCR27 к SAM уменьшается в восемь раз при повышении температуры с 15 °С до 37 °С. Значение  $K_d$  для связывания SAH с WBSCR27 увеличивается в 20 раз. Таким образом, при повышении температуры взаимодействие белка с лигандом ослабевает, и разница в связывании SAM и SAH снижается. Это свидетельствует о большой доле энтропийной составляющей во взаимодействии.

Исходя из зависимости энтальпии взаимодействия от температуры мы получили значения изменения теплоёмкости ( $\Delta C_p$ ) для взаимодействий WBSCR27 с SAM и SAH, а также оценили площадь поверхности белковой глобулы, доступную растворителю (SAA), (табл. 13).

Таблица 13. Изменения теплоёмкости и площадь поверхности, доступной растворителю, при связывании WBSCR27 с SAM и SAH

Лиганд	$\Delta C_p, \text{кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	$SAA_{\min}^b, \text{Å}^2$	$SAA_{\max}^b, \text{Å}^2$
SAM	-530	1325	1963
SAH	-660	1650	2444

С помощью метода ЯМР-титрования установлена способность белка WBSCR27 образовывать комплексы не только с молекулами SAM и SAH, но и с МТА, 5'dAdo и аденином. 5'dAdo и МТА, также как и SAH, являются природными метаболитами SAM. Связывание этих молекул с WBSCR27 происходит менее прочно, чем SAM и SAH. Так, при титровании наблюдается постепенное смещение сигналов апо-формы белка в сторону комплекса (рис. 57), а на спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР этих молекул в присутствии WBSCR27 видно уширение линий лиганда, чего не наблюдается при добавлении белка к SAH (рис. 58). Оба эти факта свидетельствуют о наличии быстрого обмена между связанной и свободной формами белка. Рассчитанные по данным титрования значения  $K_d$  составили  $40 \pm 10$  мкМ для МТА и  $100 \pm 60$  мкМ для 5'dAdo при 35 °С.

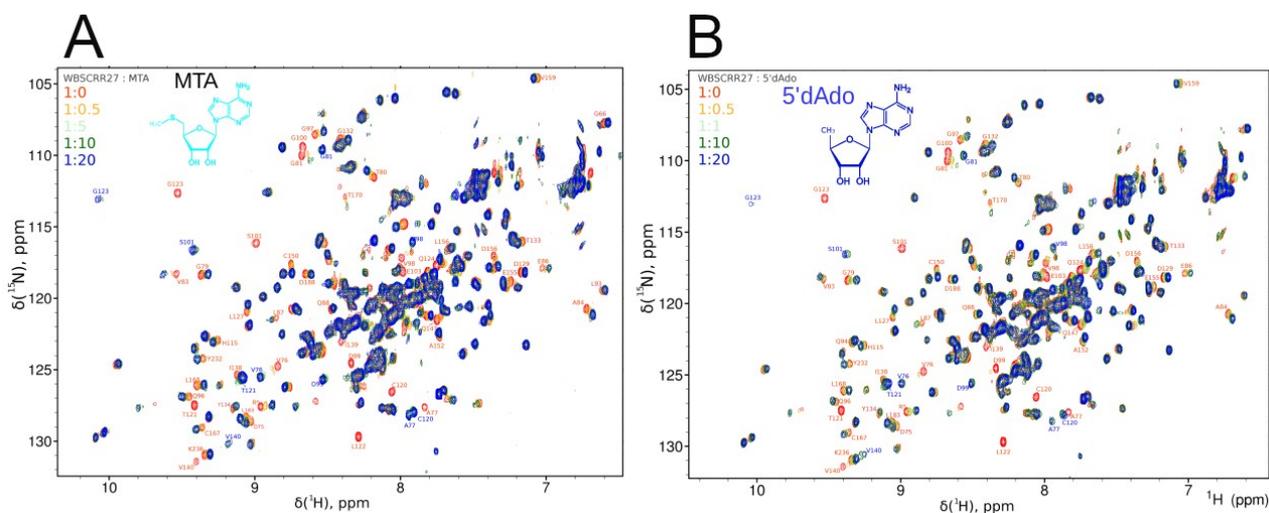


Рис 57.  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-спектры белка WBSCR27 при титровании MTA (A) и 5'dAdo (B)

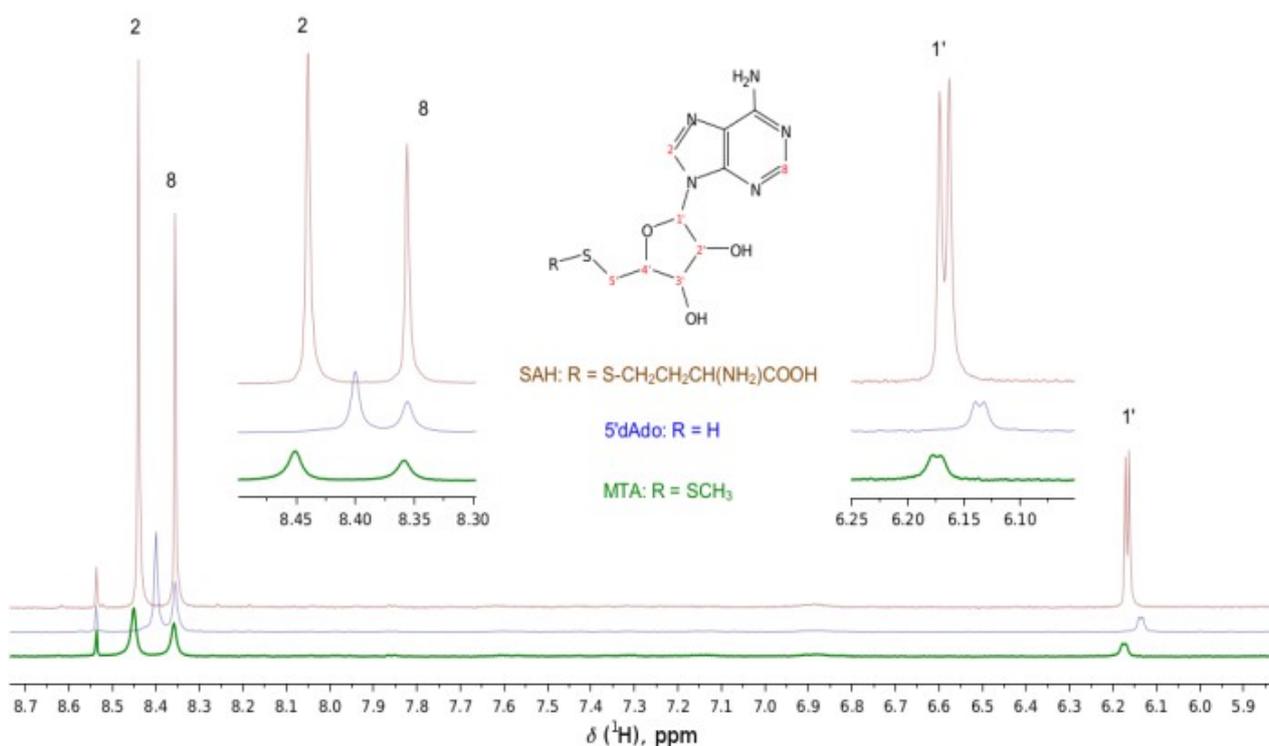


Рис 58. Фрагменты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров SAH (коричневый), 5'dAdo (синий) и MTA (зелёный) в присутствии белка WBSCR27. Цифрами указаны номера атомов водорода, дающих соответствующие сигналы на спектрах

Обнаружено также, что белок WBSCR27 способен связывать аденин. На рис. 59 приведён спектр WBSCR27 в присутствии избытка аденина, наложенный на спектры апо-WBSCR27 и WBSCR27/SAH для сравнения. Видно, что в присутствии аденина некоторые

резонансы смещаются, однако эти изменения не столь сильны, как в случае взаимодействия белка с остальными лигандами.

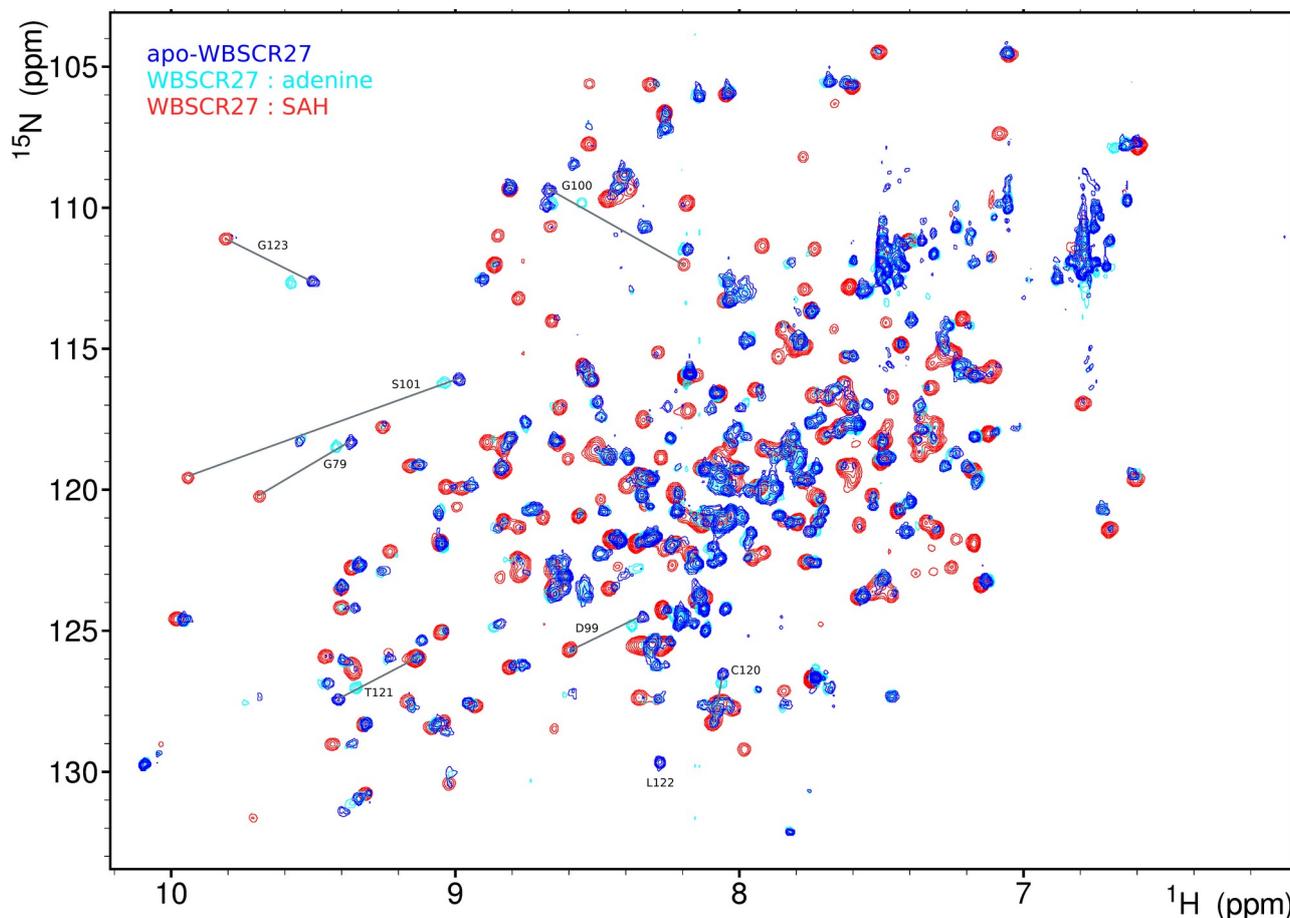


Рис 59.  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$  HSQC-спектры белка WBSCR27 в присутствии избытка аденина (голубой), в комплексе с SAH (красный) и апо-формы белка (синий). Наиболее сильно смещающиеся резонансы подписаны на спектре. Линиями соединены сигналы, соответствующие одним и тем же атомам

На рис. 60 приведены спектры  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$  HSQC белка WBSCR27 с различными лигандами в состоянии максимального насыщения. Видно, что во всех случаях при образовании комплексов изменяются химические сдвиги в целом одного и того же набора аминокислотных остатков. Кроме того, можно заметить, что смещения резонансов, возникающие при добавлении MTA и 5'dAdo, в целом происходят в том же направлении, что и при образовании комплекса WBSCR27/SAH, однако в меньшей степени. Это позволяет утверждать, что MTA, 5'dAdo и аденин взаимодействуют с белком в сайте связывания SAM/SAH, образуя связи с теми же аминокислотными остатками белка, однако связывание происходит менее прочно.



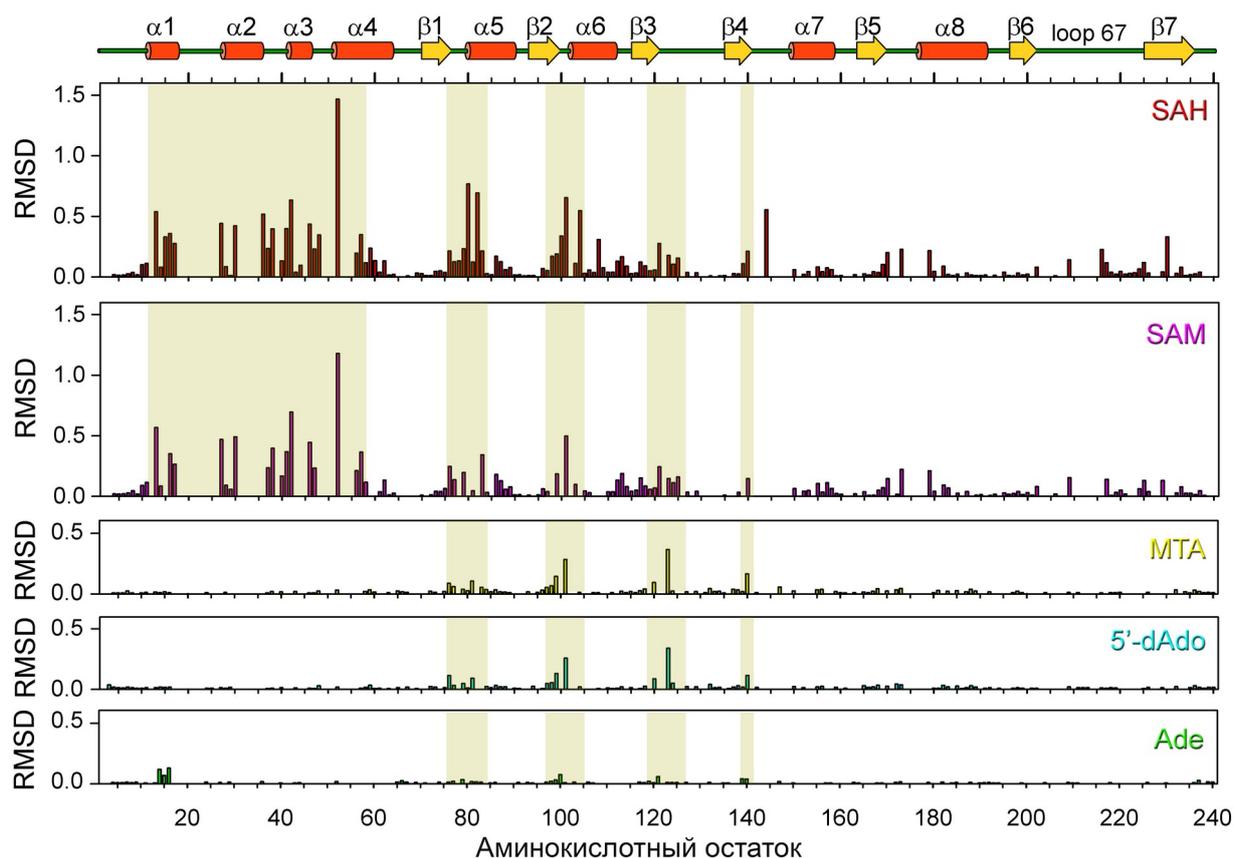


Рис 61. Гистограммы изменений химического сдвига атомов  $1\text{H}$  и  $15\text{N}$  амидных групп между apo-WBSR27 и его комплексами: WBSR27/SAH, WBSR27/SAM, WBSR27/MTA, WBSR27/5'-dAdo и WBSR27/аденин. Изменения химических сдвигов для каждого  $i$ -го остатка (RMSD) рассчитывали с использованием уравнения:  $\text{RMSD}_i = ((\Delta\delta(^1\text{H}_i))^2 + (\Delta\delta(^{15}\text{N}_i)/25)^2)^{1/2}$ . Изменения, происходящие с белком WBSR27 при связывании с лигандами: SAM, SAH, MTA, 5'-dAdo, аденином

### 3.3.7 WBSR27 предпочитительно связывает биологически активный (S,S)-SAM

Атом серы в SAM представляет собой хиральный центр, причём оба эписмера (R,S и S,S) стабильны (рис. 62A). В клетках природный SAM, (S,S)-эписмер, биосинтезируется из L-метионина и АТФ с помощью MAT [1]. Химически синтезированный SAM содержит оба эписмера в равных количествах. С помощью 2D-ЯМР с использованием синтезированного  $^{13}\text{CH}_3$ -меченого рацемического (S,S/R,S)-SAM мы продемонстрировали, что WBSR27 предпочитительно 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. 62B, слева). При увеличении содержания WBSR27 появляются сигналы связанной формы (R,S)-SAM, но их интенсивность значительно ниже, чем у сигналов комплекса WBSR27 с

природным (S,S)-SAM (рис. 62B, справа). Это указывает на значительно более низкую аффинность (R,S)-эпимера к белку, по сравнению с (S,S)-эпимером.

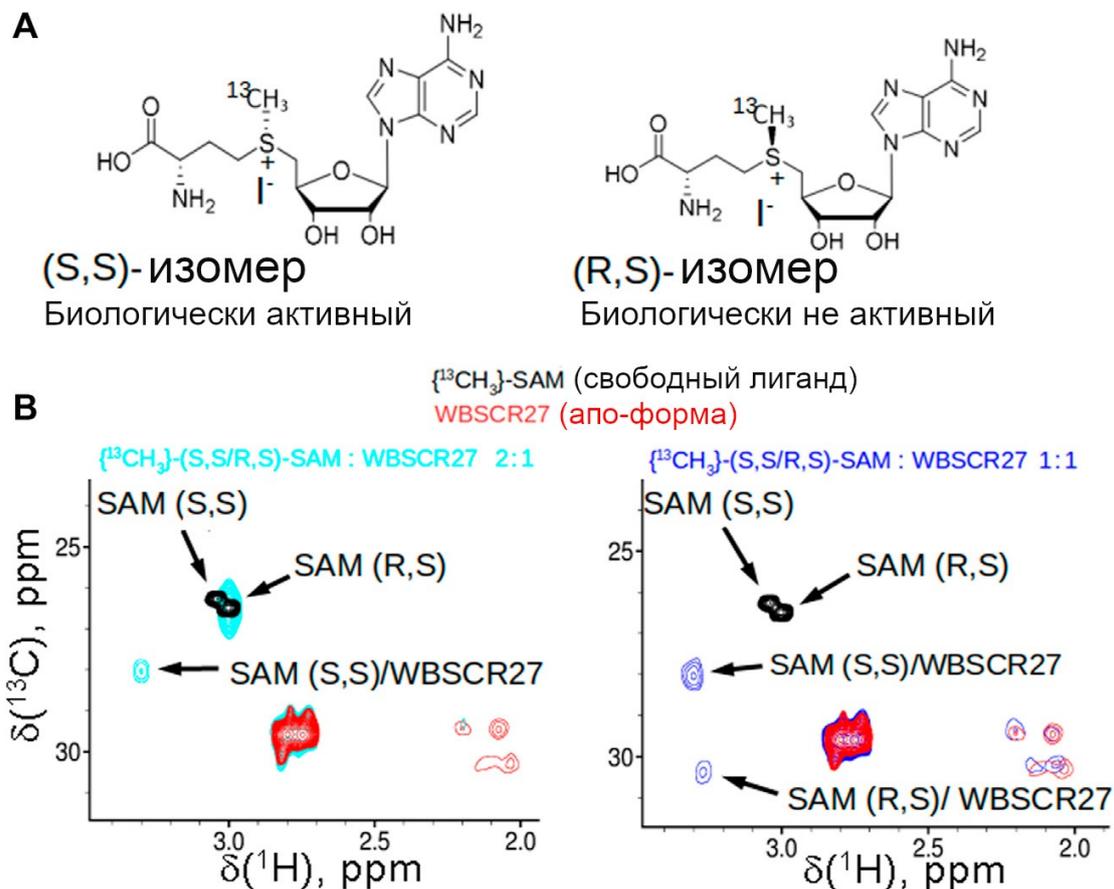


Рис 62. Эпимеры SAM и их связывание с WBSCR27. **A.** Два стабильных эпимера SAM: биологически активный (S,S)-SAM, синтезируемый ферментативно из АТФ и метионина в клетках, и (R,S)-SAM, который получается в качестве побочного продукта синтетическим путём. **B.** Суперпозиция фрагментов  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$  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)

### 3.3.8 Нуклеозидазная активность WBSCR27

В ходе проведения ЯМР-экспериментов с белком WBSCR27 была обнаружена его способность катализировать отщепление аденина от молекулы SAH (рис. 63A а) и б)). Реакция протекала очень медленно — в зависимости от концентрации белка сигналы аденина появлялись спустя часы или дни проведения реакции. Для подтверждения отнесения сигналов продукта реакции в реакционную смесь добавляли аденин (рис. 63A в). Точное совпадение сигналов свидетельствовало об образовании аденина в ходе реакции. Расщепление SAH в аналогичных условиях, но в отсутствие белка, не происходило (рис. 63B). Эксперименты по изучению скорости реакции расщепления SAH показали, что

реакция протекает весьма медленно — полупревращение SAH при соотношении WBSCR27:SAH 1:10 достигается за 336 часов (14 дней). В связи с крайне низкой скоростью протекания реакции кинетические параметры,  $K_m$  и  $V_{max}$ , измерить невозможно, поскольку для протекания реакции с заметной скоростью требуется соотношение белок:лиганд  $< 10$ , что выходит за рамки применимости модели Михаэлиса-Мэнтен. При меньших соотношениях между концентрациями белка и субстрата реакция идёт так долго, что нельзя гарантировать стабильность белка и постоянную его концентрацию.

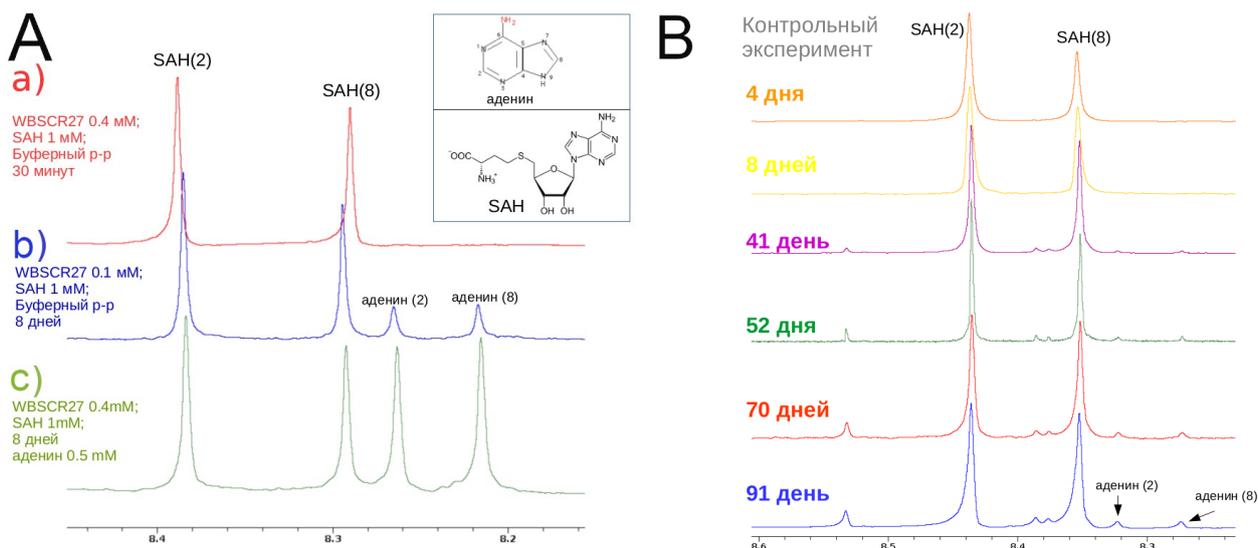


Рис 63. **A.** Белок WBSCR27 отщепляет аденин от SAH. **a)** реакционная смесь через 30 минут после смешивания; **b)** реакционная смесь спустя неделю термостатирования при 35°C; **c)** в реакционную смесь добавлено 0.5 mM аденина. **B.** В отсутствие белка WBSCR27 отщепление аденина от SAH не происходит даже в течении 3-х месяцев термостатирования при 35 °C

С помощью  $^1\text{H}$ -спектров 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. 64). Схемы реакций приведены на рис. 65. Была также проверена способность белка катализировать отщепление аденина от аденозина, имеющего близкую структуру, но в этом случае каталитической активности не наблюдалось.

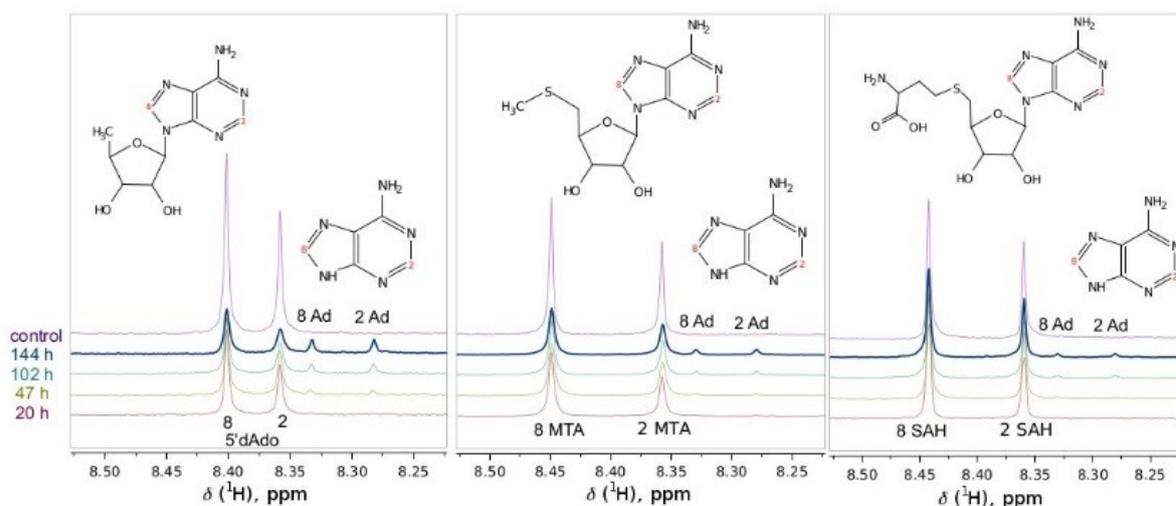


Рис 64. Отщепление аденина от 5'dAdo, MTA и SAH, катализируемое белком WBSCR27. Приведены фрагменты  $^1\text{H}$  ЯМР спектров 5'dAdo, MTA и SAH в присутствии белка WBSCR27. С течением времени происходит постепенное снижение концентрации нуклеозидов и образование аденина

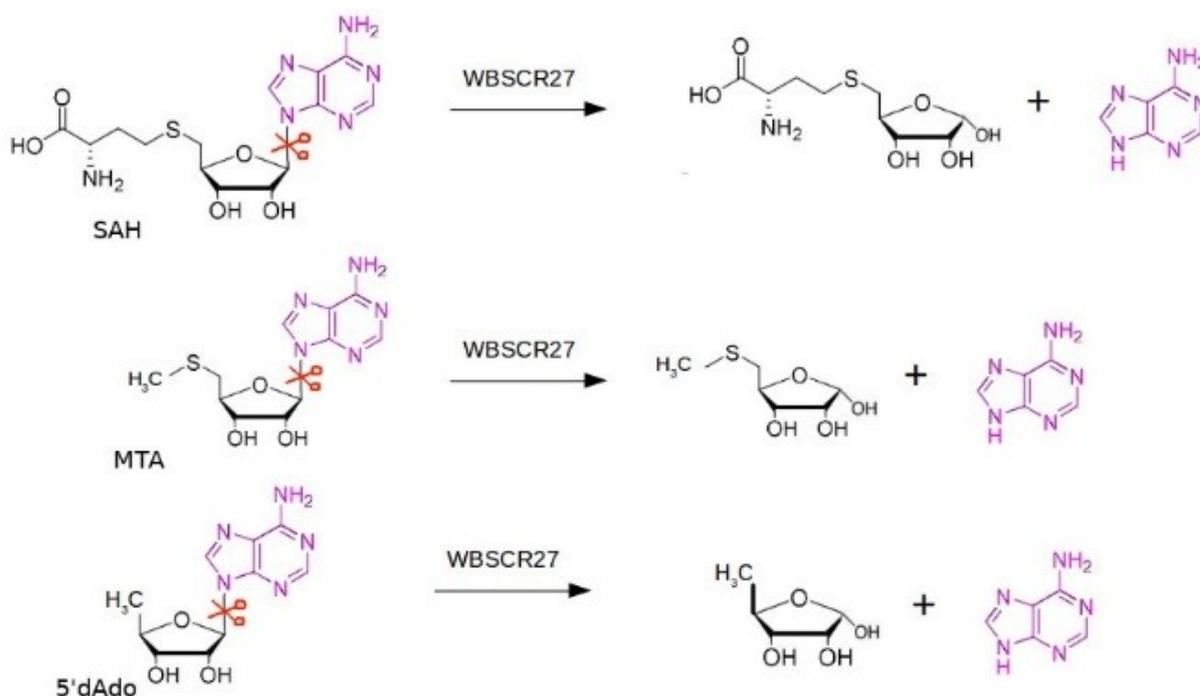


Рис 65. Отщепление аденина от SAH, MTA и 5'dAdo, катализируемое белком WBSCR27

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

### 3.4 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 общей сложности 21 значение) в комплексе WBSCR27/SAH измерили с помощью белок-лигандных ЯЭО, определенных с использованием полученного по оригинальной методике комплекса  $^{15}\text{N}$ -WBSCR27 с  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -SAH.

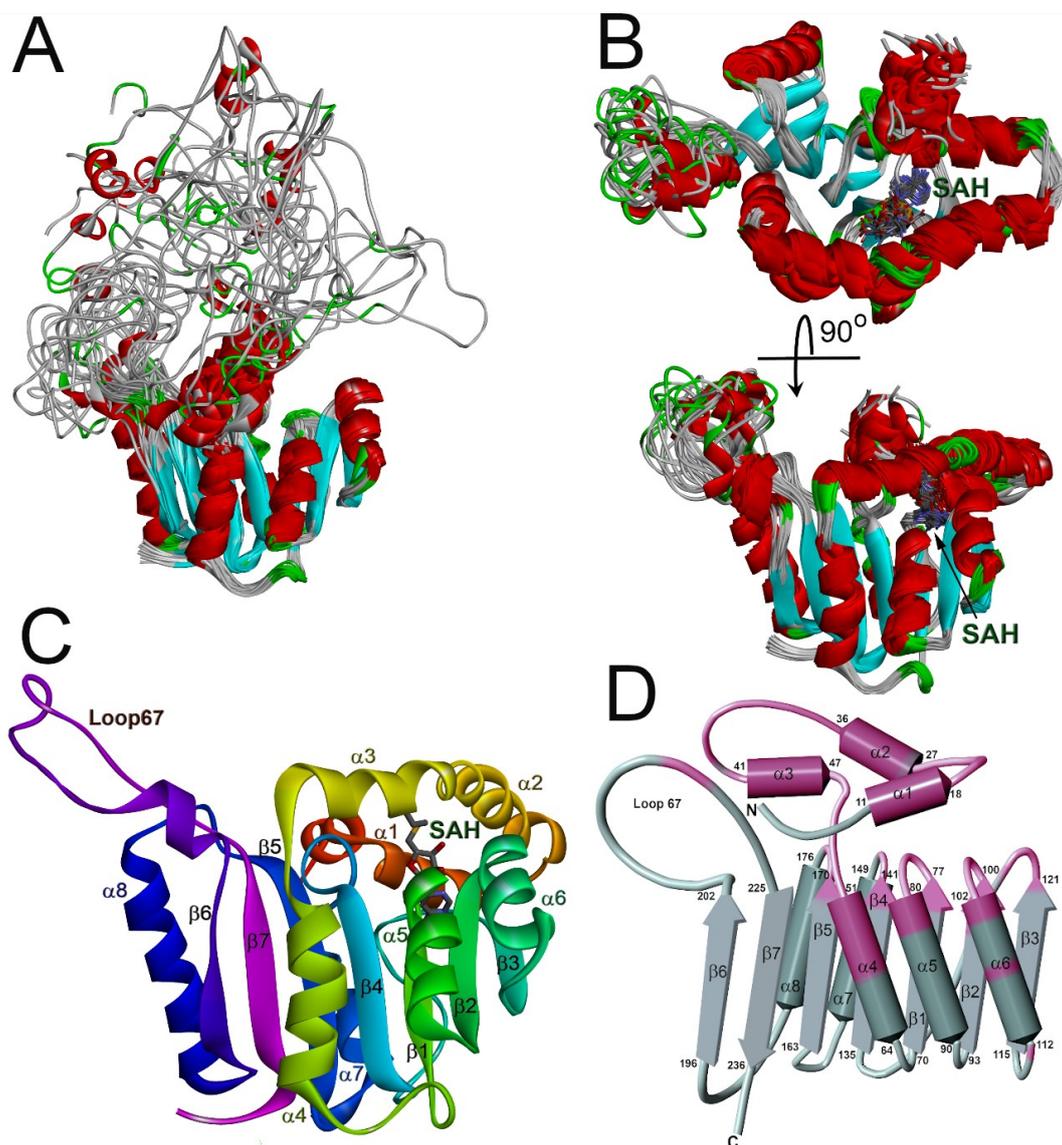


Рис 66. Структура WBSCR27 в апо-форме (A) и в комплексе с SAH (B, C). Показаны семейства из 20-ти конформеров (A, B) и окрашенная по цветам радуги структура комплекса WBSCR27/SAH, на которой обозначены элементы вторичной структуры. D. Схематичное представление белка WBSCR27 в комплексе с SAH

Структура апо-формы WBSCR27 в растворе (рис. 66А) показывает, что первые 51 аминокислотный остаток белка, а также петля 67 между остатками 204 и 228, неструктурированы. Связывание SAH с WBSCR27 упорядочивает N-концевой фрагмент белка за счёт образования трёх хорошо структурированных  $\alpha$ -спиралей ( $\alpha 1$ – $\alpha 3$ ) и короткого спирального участка в первых девяти аминокислотных остатках (рис. 66 В).

Структура WBSCR27 представляет собой 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. 66С). На рис. 66D приведена схема строения белка WBSCR27. Розовым цветом отмечены участки белка, химические сдвиги атомов которых изменяются при связывании с SAH.

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. 67).

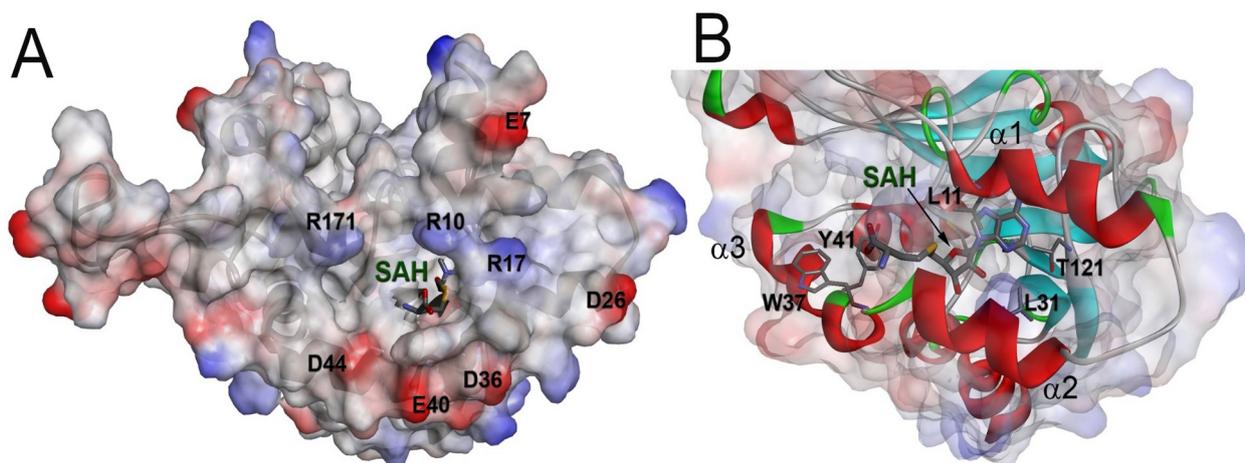


Рис 67. Сайт связывания SAH в комплексе с WBSCR27. **А.** Молекулярная поверхность белка окрашена в соответствии с электростатическим поверхностным потенциалом. Показаны аминокислотные остатки, вносящие максимальный вклад в поверхностный потенциал. **В.** Аминокислотные остатки WBSCR27, участвующие во взаимодействии с SAH

Пуриновый фрагмент SAH связывается преимущественно с аминокислотными остатками  $\beta$ -листового кора 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. 68 приведено расположение элементов вторичной структуры белка WBSCR27 в аминокислотной последовательности. Интересно отметить, что расположение  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -цепей основного структурного ядра белка не изменяется при связывании кофактора.

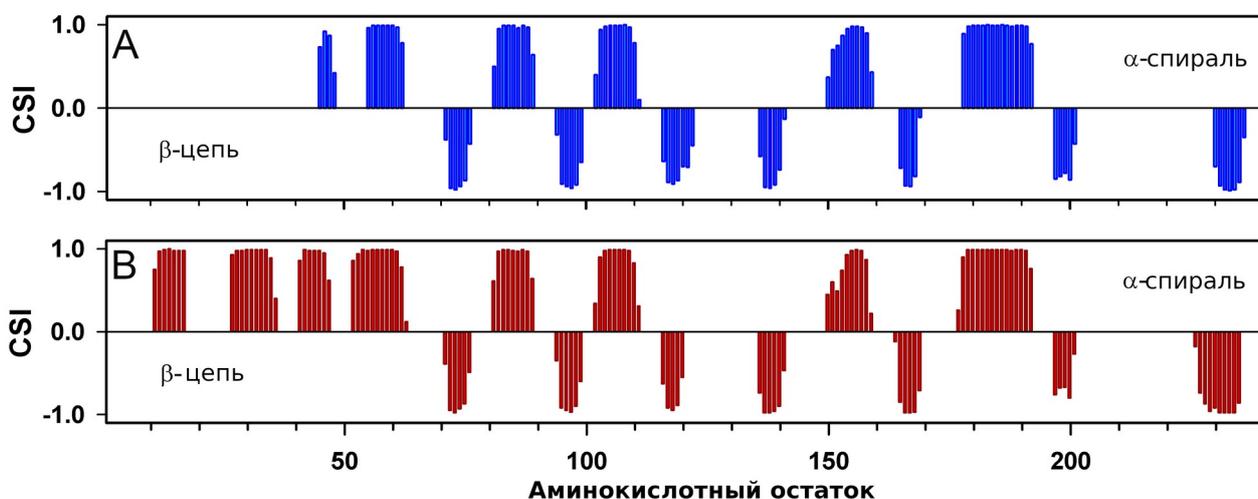


Рис 68. Вторичная структура белка WBSCR27 в апо-форме (A) и в комплексе с SAH (B)

### 3.5 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 величинам  $R_1$  и  $R_2$ , измеренным при  $35^\circ\text{C}$ , составили  $12,5 \pm 0,2$  нс для апо-формы и  $10,4 \pm 0,3$  нс для комплекса WBSCR27 с SAH. Разница в значениях  $\tau_c$ , по-видимому, отражает различия в форме белковой молекулы апо-WBSCR27 и комплекса WBSCR27/SAH. В случае комплекса белковая глобула более компактна, в то время как длинный неструктурированный N-концевой хвост в апо-форме замедляет вращательное движение белка.

Экспериментально измеренные параметры релаксации ядер  $^{15}\text{N}$  ( $R_1$ ,  $R_2$ , ЯЭО $\{^{15}\text{N}-^1\text{H}\}$ ) проанализированы с помощью безмодельного формализма [173] с дополнением для определения вклада химического обмена ( $R_{\text{ex}}$ ) в скорости поперечной релаксации [174]. На рис. 69 показаны измеренные параметры релаксации ядер  $^{15}\text{N}$ , а также вычисленные по ним параметры порядка  $S^2$  и значения вклада химического обмена  $R_{\text{ex}}$  для белка WBSCR27. Можно видеть, что подвижность цепи WBSCR27 в апо-форме значительно выше, чем в комплексе с SAH, что хорошо согласуется с наблюдаемыми результатами структурных исследований.

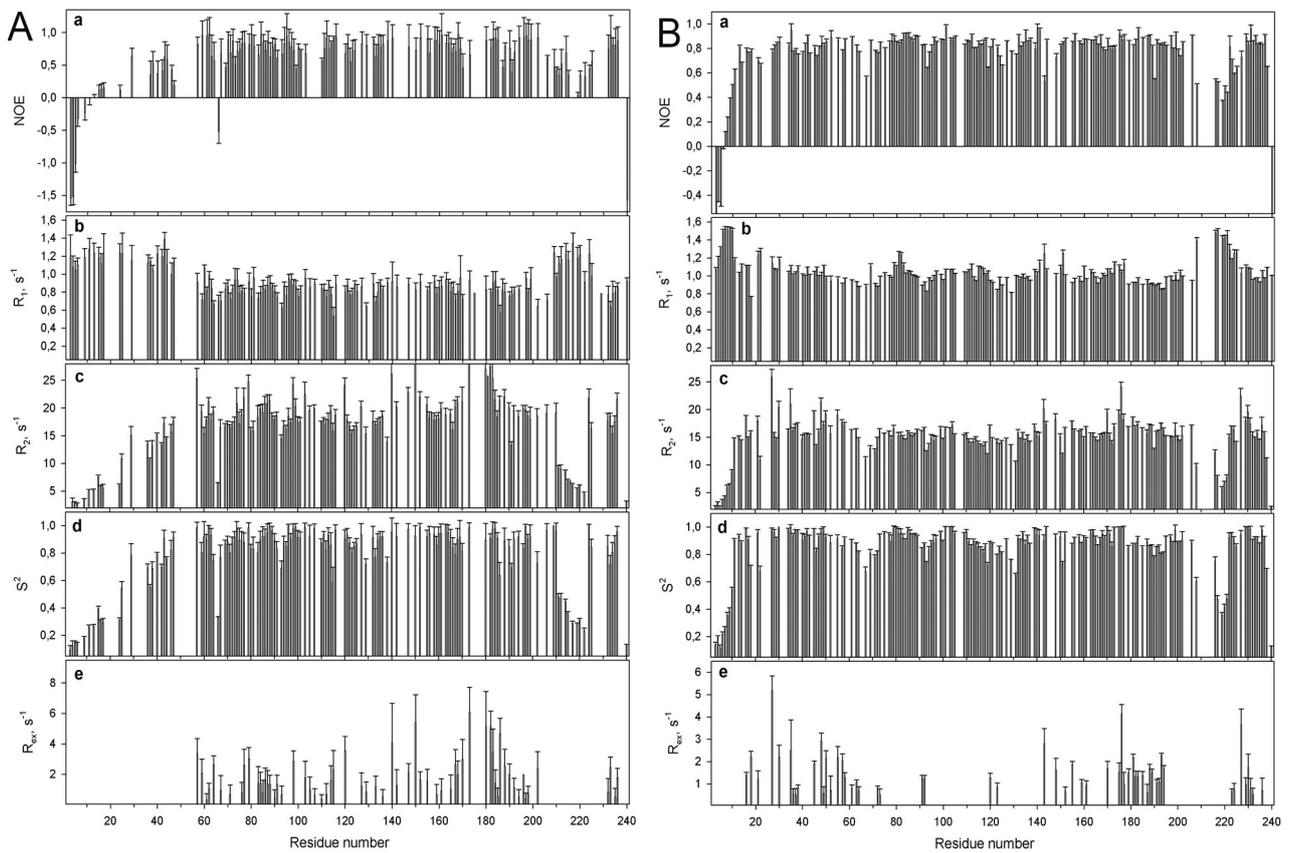


Рис 69. Параметры релаксации ядер  $^{15}N$  в амидных связях каждого остатка апо-формы WBSCR27 (A) и комплекса WBSCR27/SAH (B). а) Величины гетероядерного эффекта Оверхаузера  $^{15}N\{^1H\}$  для ядер  $^{15}N$  амидных групп; б) скорость продольной релаксации  $R_1$  ( $s^{-1}$ ); в) скорость поперечной релаксации  $R_2$  ( $s^{-1}$ ); д) параметр порядка  $S^2$ , определённый с помощью безмодельного формализма; е) вклад химического обмена в скорости поперечной релаксации ( $s^{-1}$ )

На рис. 70 показано распределение защитных факторов (PF) для аминокислотных остатков апо-формы WBSCR27 и комплекса WBSCR27/SAH, рассчитанных по скоростям обмена амидных протонов на дейтерий. Связывание SAH приводит к значительному увеличению PF большинства аминокислотных остатков WBSCR27, что отражает замедление высокоамплитудных движений остова белка при связывании лиганда и усиление сети водородных связей внутри молекулы белка.

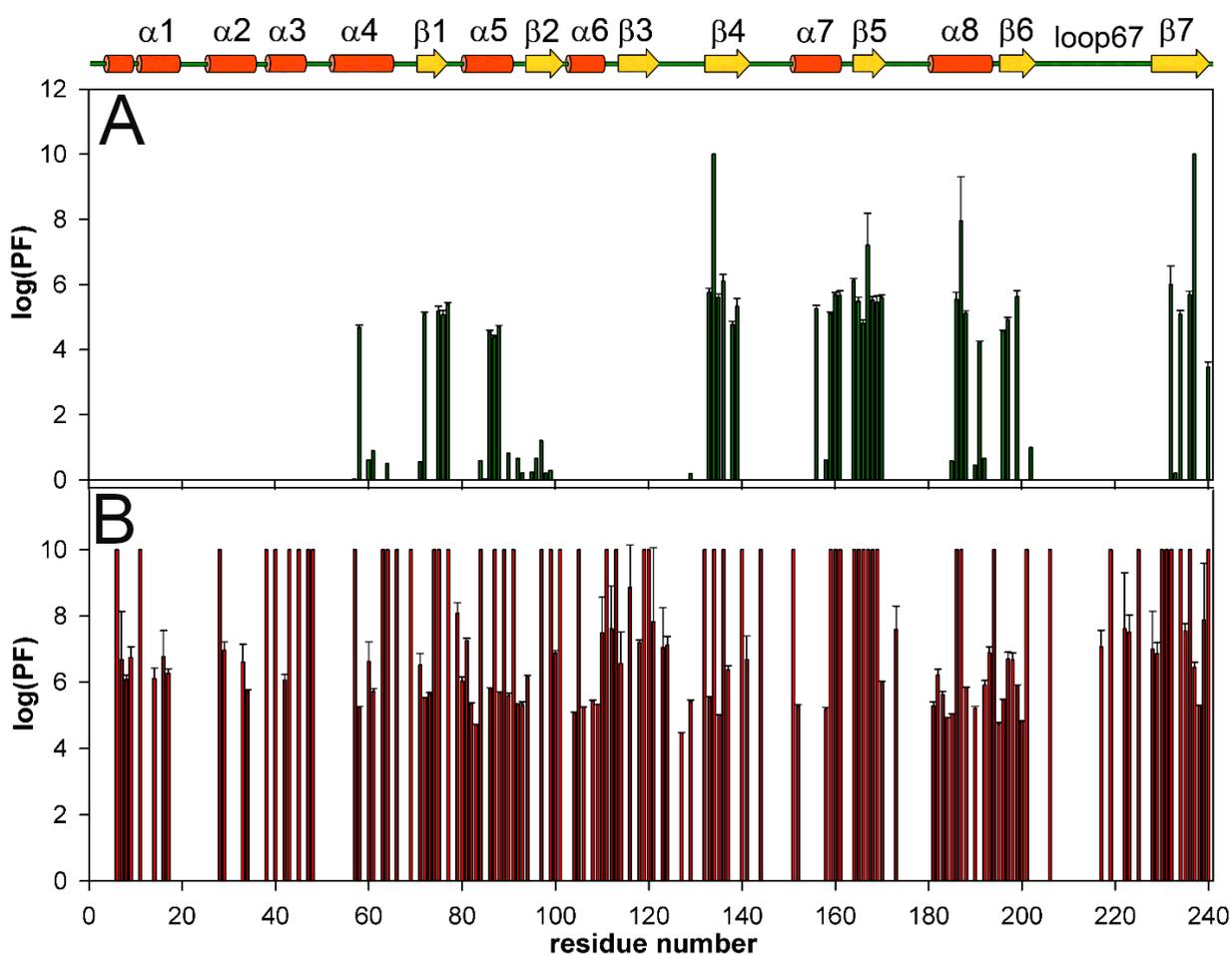


Рис 70. Защитные факторы (PF) амидных атомов  $^1H_N$  для апо-WBSCR27 (A) и комплекса WBSCR27/SAH (B). Сверху приведены элементы вторичной структуры белка в комплексе с SAH

На основании всех проведённых экспериментов по оценке белковой динамики WBSCR27 построены обобщённые модели (рис. 71), отражающие динамическое и конформационное поведение WBSCR27 в растворе — для апо-формы (A) и для комплекса с SAH (B).

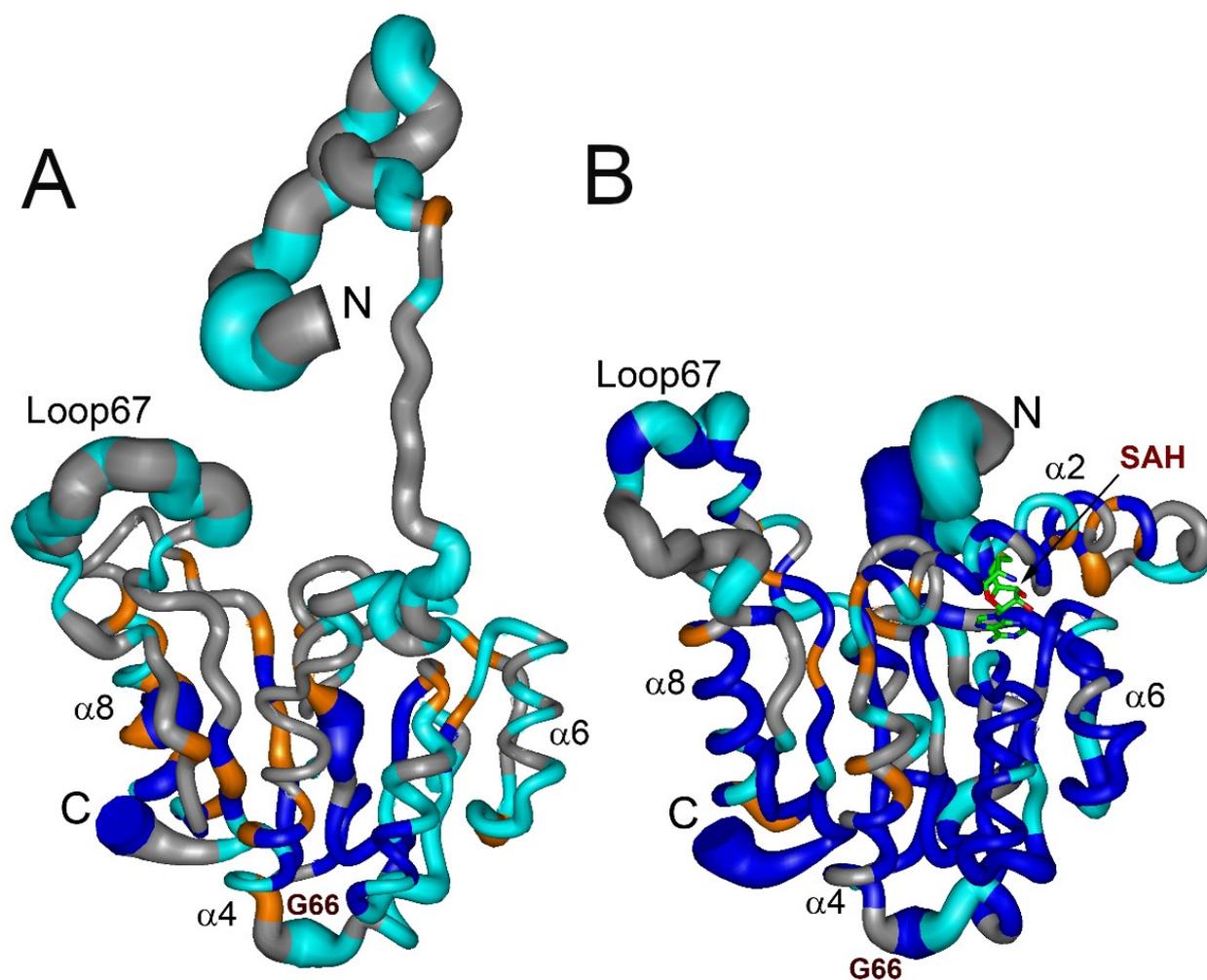


Рис 71. Обобщённое представление динамического и конформационного поведения WBSCR27 в апо-форме (A) и в комплексе с SAH (B). Толщина линий пропорциональна амплитуде движения основной белковой цепи в масштабе времени пс-нс. Фрагменты белковой цепи, содержащие аминокислоты, подвергающиеся конформационному 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), показаны серым цветом. Обозначены репрезентативные элементы вторичной структуры и молекула SAH

## Глава 4. Обсуждение результатов

Анализ структуры WBSCR27 и определение его функций могут послужить отправной точкой к пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе клинических проявлений синдрома Вильямса. В свою очередь, это может способствовать разработке терапевтических подходов, направленных на компенсацию симптомов этого генетического заболевания.

### 4.1 Связывание SAH вызывает структурные перестройки в белке WBSCR27

Сравнивая структуры апо-формы WBSCR27 и его комплекса с SAH можно обратить внимание на наличие трёх дополнительных  $\alpha$ -спиралей на N-конце белка, возникающих при связывании кофактора (рис. 66). В апо-форме первые 50 аминокислотных остатков, образующих эти спирали, оказываются неупорядоченными. Эти структурные наблюдения подтверждаются результатами исследований динамики белкового остова (рис. 69, 70 и 71). Для многих аминокислотных остатков апо-WBSCR27 параметры порядка амидных NH-связей, определённые с помощью измерений релаксации атомов  $^{15}\text{N}$ , намного ниже, чем соответствующие значения для комплекса WBSCR27/SAH (рис. 69). Эти результаты указывают на высокоамплитудное движение основной белковой цепи апо-WBSCR27 во временной шкале от пс до нс. Существуют также значительные различия в скоростях движений основной белковой цепи, происходящих в миллисекундном масштабе времени и характеризующихся конформационным обменом. Фрагменты белка, которые содержат аминокислотные остатки, участвующие в конформационном обмене, окрашены в оранжевый цвет на рис. 71.

Амплитуда быстрых движений остова белка, а также конформационных переходов, происходящих в миллисекундной временной шкале, намного больше для апо-формы, по сравнению с комплексом WBSCR27/SAH. Эта разница в динамике белка наблюдается не только для первых 50-ти аминокислотных остатков, неструктурированных в апо-форме, но и для хорошо структурированного ядра белка. Например, фрагменты  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  и  $\alpha 8$  обладают высокой подвижностью в апо-форме. Петля 67 остаётся очень подвижной, как в апо-форме, так и в комплексе. Эта петля, вероятно, участвует в распознавании молекулы субстрата, и после связывания его со спиралями  $\alpha 1$ - $\alpha 3$  петля 67 фиксирует это взаимодействие, после чего её подвижность должна исчезнуть. Примечательно, что подвижность остатка G66 высока в обеих формах — и в апо-форме и комплексе с SAH: величина ЯЭО  $\{^{15}\text{N}-^1\text{H}\}$  амидной группы G66 отрицательна. Однако подвижность этого остатка, расположенного на противоположной

от каталитического центра стороне белка (вершина петли между  $\alpha 1$  и  $\beta 1$ ), вряд ли играет какую-либо функциональную роль.

Различия в амплитуде медленных движений основной белковой цепи (от минут до часов) в апо-форме белка WBSCR27 и в его комплексе с SAH выражены ещё сильнее. Эти движения определены на основе анализа обмена H/D амидных протонов. Относительно высокие значения факторов защиты амидных групп NH для апо-формы WBSCR27 наблюдаются только для самой центральной части ядра белка (рис. 70 и 71). Интересно, что все амидные группы остатков из внешней  $\beta$ -цепи  $\beta 3$  и спиралей  $\alpha 4$  и  $\alpha 6$  не защищены в апо-форме белка, что указывает на высокую подвижность этих элементов вторичной структуры. После связывания SAH почти вся молекула белка, за исключением участков петли, оказывается хорошо защищённой от обмена с растворителем. Это следует из больших значений защитных факторов соответствующих групп NH (рис. 71).

## 4.2 Сайт связывания кофактора

Спирали  $\alpha 1$  –  $\alpha 3$ , формирующиеся в белке WBSCR27 при связывании SAH, окружают молекулу SAH и частично образуют её сайт связывания. По-видимому, эти три спирали также образуют сайт связывания для потенциального субстрата реакции метилирования, катализируемой WBSCR27. Аденозиновый фрагмент SAH связывается с концами трёх цепей  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 3$ , в то время как метиониновый фрагмент располагается между спиральями  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ . Карбонильные группы основной цепи и амидные атомы водорода остатков 100, 101 и 121 образуют несколько водородных связей с аденозиновым фрагментом. Боковые цепи остатков L11, L31, A77 и T121 образуют гидрофобные контакты с адениновой частью SAH. В области фрагмента метионина также имеются два ароматических остатка, Y41 и W37. Если роль Y41, скорее всего, связана со взаимодействием с карбоксильной или аминогруппой фрагмента метионина SAH, то W37 может участвовать во взаимодействии с потенциальным фрагментом субстрата. Он может, например, удерживать ароматическое основание РНК или ДНК путём стекинг-взаимодействия в положении, благоприятном для метилирования этого или соседнего нуклеотида. О такой возможности свидетельствует направленность боковой цепи W37 наружу от ядра белка и её близость к атому серы остатка метионина SAH.

### 4.3 Сравнение структуры WBSCR27 с другими МТазами класса I

Структура WBSCR27 представляет собой классическую укладку Россмана (рис. 66), характерную для SAM-зависимых МТаз класса I. Эта группа включает более 120 МТаз [175]. Они имеют разные субстраты метилирования и очень малую идентичность последовательностей, но высоко-консервативную структурную укладку, состоящую из центрального  $\beta$ -листа, образованного семью  $\beta$ -цепями, окружённого с двух сторон  $\alpha$ -спиралями (рис. 72).

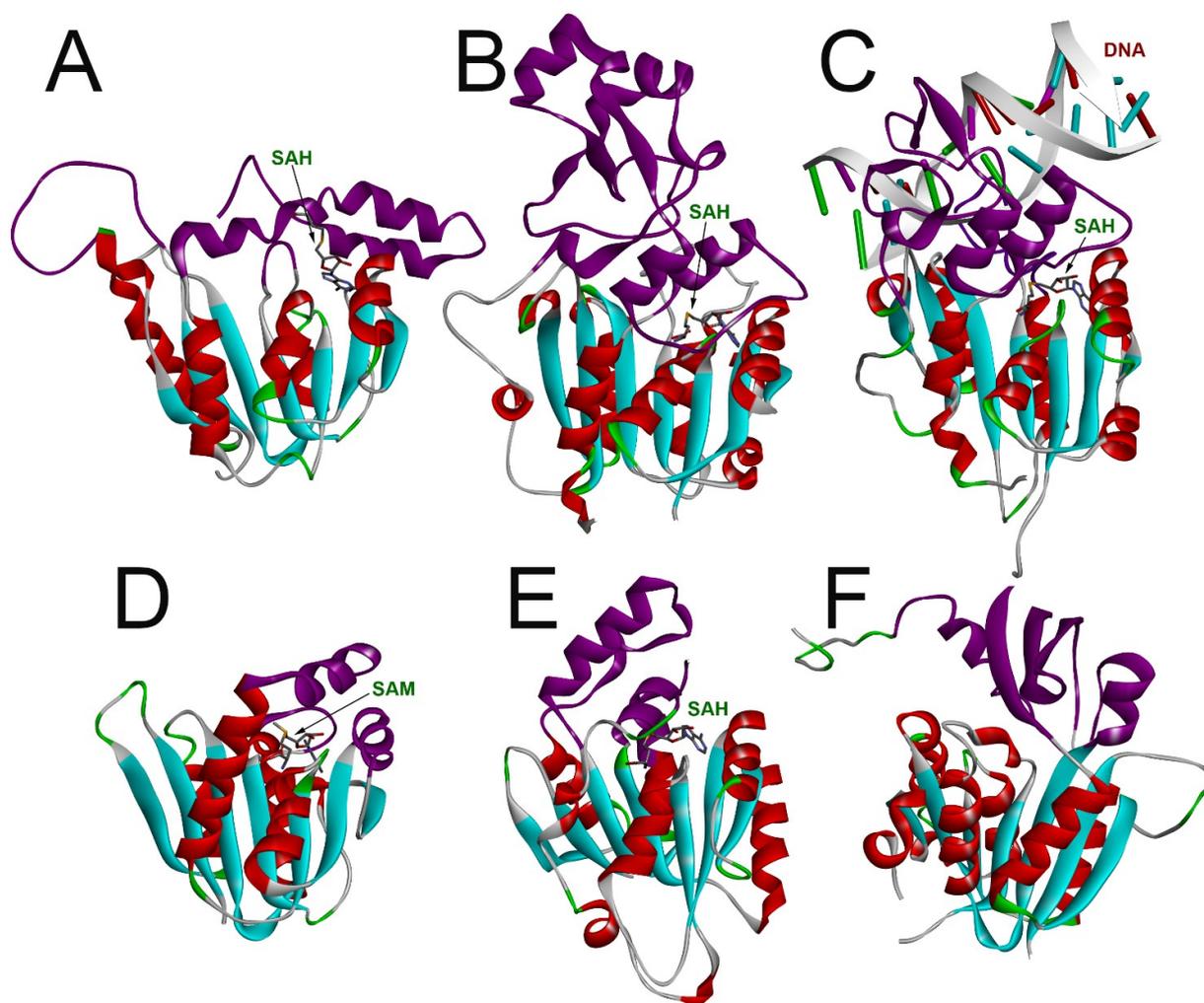


Рис 72. Структуры нескольких МТаз класса I. А. WBSCR27 в комплексе с SAH (PDB 7QCB); В. mPHK-Asp МТаз DNMT2 из *S. pombe* в комплексе с SAH (PDB 6FDF); С. ДНК-МТаз DNMT3A человека в комплексе с SAH и фрагментом ДНК (PDB 6BRR); D. pPHK-МТаз Bud23 из *S. cerevisiae* (PDB 4QTU); E. mPHK-МТаз BCDIN3D человека в комплексе с SAH (PDB 6L8U); F. глицин-МТаз человека (PDB 2AZT). Укладка Россмана ферментов окрашена в голубой ( $\beta$ -цепи) и красный ( $\alpha$ -спирали). Домены, связывающие субстрат, окрашены в фиолетовый цвет

Существуют некоторые различия в количестве, длине и ориентации  $\alpha$ -спиралей, окружающих  $\beta$ -лист, но в целом имеется довольно высокая структурная консервативность. Наибольшие различия наблюдаются в структуре областей, связывающих субстрат (окрашены в фиолетовый цвет на рис. 72), хотя молекула субстрата также может взаимодействовать с аминокислотными остатками в области ядра белка. Субстрат-связывающий домен должен обеспечивать селективность связывания молекулы субстрата и её правильное расположение относительно метильной группы кофактора. Однако варибельность структуры субстрат-связывающего домена велика даже для одного типа субстрата. На рисунках 72B, 72D и 72E показаны структуры РНК-МТаз со значительно различающимися фрагментами, связывающими субстрат. Примечательно, что в РНК-МТаз имеются две или три  $\alpha$ -спирали вблизи сайта связывания SAM. Аналогичная топология наблюдается в случае ДНК-МТаз (рис. 72C). Топология субстрат-связывающего домена МТаз малых молекул (структура МТазы глицина показана на рис. 72F в качестве примера) заметно отличается. Исходя из этих структурных соображений, нуклеиновая кислота была бы наиболее вероятным субстратом для WBSCR27, но нельзя исключать и другие варианты.

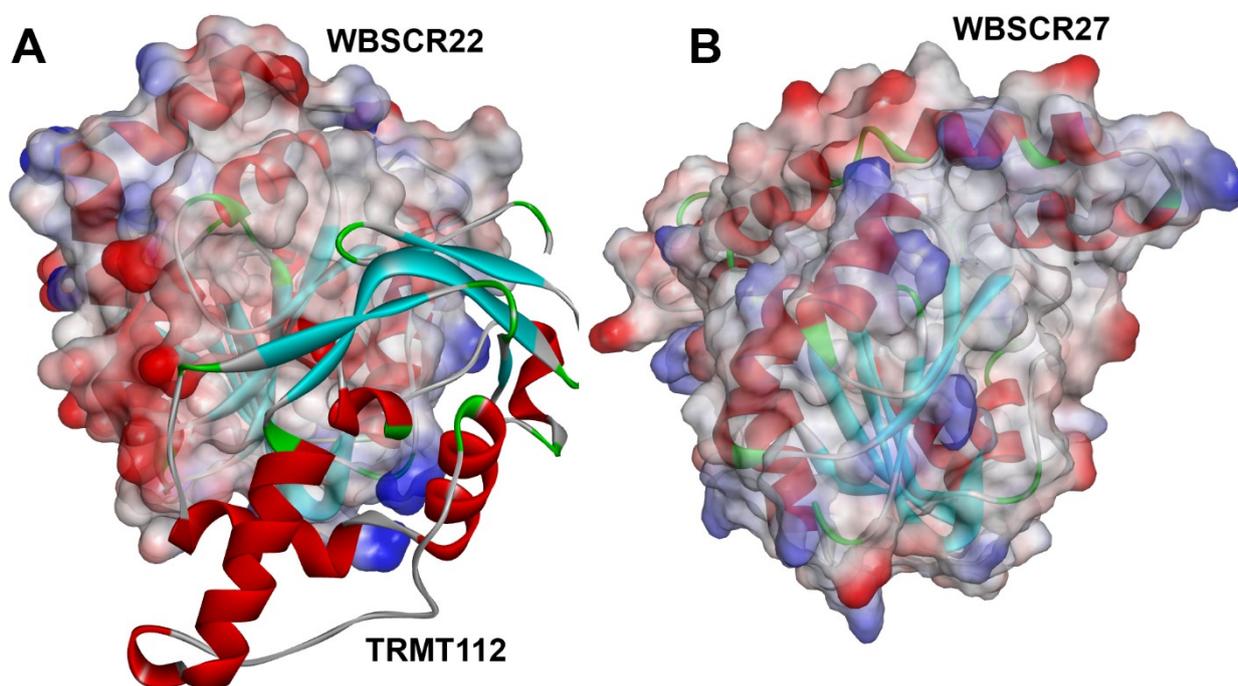


Рис 73. Доступные для растворителя молекулярные поверхности (A) WBSCR22 (*Bud23*) в комплексе с TRMT112 и SAM (PDB 4QTU) и (B) WBSCR27 в комплексе с SAH (PDB 7QCB). Молекулярные поверхности окрашены в соответствии с электростатическим поверхностным потенциалом.

Одним из ближайших гомологов WBSCR27 по аминокислотной последовательности является человеческий белок WBSCR22 и его дрожжевой ортолог *Bud23*. WBSCR22

представляет собой МТазу 18S рРНК, участвующую в процессинге пре-рРНК и биогенезе 40S субъединицы рибосомы [105]. WBSCR22, как и многие другие МТазы, имеет партнёра по взаимодействию — белок TRMT112. Этот белок обеспечивает стабильность некоторых МТаз и критически важен для проявления ими функциональной активности [176]. Структура комплекса Bud23 с TRMT112 известна [170], поэтому мы сравнили интерфейс связывания TRMT112 на поверхности Bud23, с аналогичной площадью молекулярной поверхности WBSCR27 (рис. 73). Структуры электростатических потенциалов на поверхности Bud23 и WBSCR27 сильно различаются, и маловероятно, что TRMT112 может быть функциональным партнёром WBSCR27. Однако мы проверили эту гипотезу с помощью экспериментов по ко-иммунопреципитации, анализируя элюаты антителами к TRMT112. Полученные экспериментальные данные подтверждают предположение о том, что белок WBSCR27 не связывает TRMT112.

Топология укладки и трёхмерная структура WBSCR27 аналогична топологии РНК-МТазы GidB [177]. Примечательно, что для GidB, так же как и для WBSCR27, ферментативная функция и субстрат метилирования были неизвестны, и именно установление трёхмерной структуры этой МТазы ускорило идентификацию субстрата метилирования. Недавно было показано, что этот фермент (известный также как RsmG) отвечает за метилирование N7 в G527 16S бактериальной рРНК [178].

#### **4.4 Возможные субстраты WBSCR27 и его потенциальная функция**

Несмотря на то, что в ходе наших экспериментов по изучению функции WBSCR27 нам не удалось определить субстрат его метилирования, отрицательный результат такого рода также информативен, поскольку сужает диапазон возможностей для будущих исследований. Прежде всего, WBSCR27, по-видимому, не образует прочных связей с субстратом, в отличие от МТаз, функционирующих в качестве молекулярных переключателей при сборке рибосом, например, бактериального KsgA [179] или белка млекопитающих METTL15 [180]. Ряд МТаз, ответственных за модификацию компонентов аппарата трансляции и других субстратов, образуют стабильные комплексы с белком TRMT112 [106,113,181,182], в то время как мРНК-специфическая МТаза METTL3 образует стабильный комплекс с белком METTL14 [132,183] и WTAP [184]. Результаты нашего исследования опровергают версию о том, что WBSCR27 образует стабильный функциональный комплекс с другими белками. WBSCR27, вероятно, представляет собой автономную МТазу, лишь временно взаимодействующую со

своим субстратом. Более того, маловероятно, что WBSCR27 катализирует метилирование белка, в противном случае должен существовать целевой белок, который был бы обнаружен в одном из экспериментов, описанных выше.

Наши результаты не исключают, что WBSCR27, возможно, участвует в метилировании малой молекулы, химические свойства или низкая представленность которой не позволяют идентифицировать её в клеточных лизатах методами ЯМР. Установление функциональной роли, раскрывающей назначение WBSCR27 в организме, ещё впереди, и мы надеемся, что определение трехмерной структуры этого фермента в апо-форме и в комплексе с SAH поможет в достижении этой цели.

## 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'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, МТА и 5'dAdo, подобно действию бактериальных SAH/МТА-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 МТаз класса I. N-конец белка и петля β6–β7 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 небольшим 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 MТаз, имеющих укладку Россмана.
2. Белок WBSCR27 прочно связывает SAM и SAH, а также менее прочно – MТA, 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, MТA, 5'dAdo). Эта активность может служить для диссоциации прочно связанного с белком ко-продукта метилирования после протекания реакции переноса метильной группы.

## Благодарности

Автор выражает благодарность научным руководителям: д.х.н. Польшакову В.И. за предоставленную тему и внимание к проекту на всем протяжении работы и д.х.н. член-корр. РАН Сергиеву П.В., по чьей инициативе было начато исследование белка WBSCR27 с помощью спектроскопии ЯМР, а также за руководство молекулярно-биологической стороной проекта; Dr Chi-Fon Chang за помощь в записи спектров ЯМР и обучение работе на высокопольных ЯМР-спектрометрах и к.х.н. Петровой О.А. за подготовку первых образцов белка. Автор также благодарен д.х.н. член-корр. РАН Митькевичу В.А. и Кечко Ольге за измерение ИКТ и д.б.н. Згоде В.Г. за измерение масс-спектров и обучение обработке результатов.

Кроме того, автор благодарен к.х.н. Чугуновой А.А., Новолаеву Т., д.х.н. Остерману И.А., к.х.н. Сергеевой О. и к.х.н. Головиной А. за проведение первых экспериментов по изучению белка WBSCR27 и попытке поиска субстрата метилирования, а также всем сотрудникам лаборатории Магнитной томографии и спектроскопии ФФМ МГУ за дружескую атмосферу в коллективе и сотрудникам лаборатории химии нуклеопротеидов кафедры Химии природных соединений Химического факультета МГУ за разностороннюю помощь на этапах выполнения молекулярно-биологической части проекта. Отдельная благодарность академику Донцовой О.А., за руководство лабораторией, в которой возникла идея изучать белок WBSCR27, а также за полезные советы на лабораторных семинарах.

## Библиографический список

1. Zhang J., Zheng Y.G. SAM/SAH Analogs as Versatile Tools for SAM-Dependent Methyltransferases // *ACS Chem. Biol.* 2016. Vol. 11, № 3. P. 583–597.
2. Martin J.L., McMillan F.M. SAM (dependent) I AM: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. Vol. 12, № 6. P. 783–793.
3. Cornelissen N. V et al. Nucleoside-modified AdoMet analogues for differential methyltransferase targeting // *Chem. Commun.* 2020. Vol. 56, № 14. P. 2115–2118.
4. Cantoni G.L. Biological Methylation: Selected Aspects // *Annu. Rev. Biochem.* 1975. Vol. 44, № 1. P. 435–451.
5. Borchardt R.T., Wu Y.S. Potential inhibitors of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. 5. Role of the asymmetric sulfonium pole in the enzymic binding of S-adenosyl-L-methionine // *J. Med. Chem.* 1976. Vol. 19, № 9. P. 1099–1103.
6. De La Haba G. et al. S-Adenosylmethionine: The Relation of Configuration at the Sulfonium Center to Enzymatic Reactivity1 // *J. Am. Chem. Soc.* 1959. Vol. 81, № 15. P. 3975–3980.
7. Fontecave M., Atta M., Mulliez E. S-Adenosylmethionine: nothing goes to waste. 2004. Vol. 29, № 5. P. 1–7.
8. Markham G.D., Pajares M.A. Structure-function relationships in methionine adenosyltransferases // *Cell. Mol. life Sci.* 2009. Vol. 66, № 4. P. 636–648.
9. Popadić D. et al. A bicyclic S-adenosylmethionine regeneration system applicable with different nucleosides or nucleotides as cofactor building blocks // *RSC Chem. Biol.* 2021. Vol. 2, № 3. P. 883–891.
10. Park J. et al. Enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine on the preparative scale // *Bioorganic Med. Chem.* 1996. Vol. 4, № 12. P. 2179–2185.
11. Davis T.D. et al. Preparation, assay, and application of chlorinase SalL for the chemoenzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine and analogs // *Methods in enzymology.* 2018. Vol. 604. P. 367–388.
12. Walsby C.J. et al. Electron-nuclear double resonance spectroscopic evidence that S-adenosylmethionine binds in contact with the catalytically active [4Fe-4S]<sup>+</sup> cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124, № 12. P. 3143–3151.
13. Hoffman J.L. Chromatographic Analysis of the Chiral and Covalent Instability of // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25. P. 4444–4449.
14. Giulidori P. et al. Transmethylation, transsulfuration, and aminopropylation reactions of S-adenosyl-L-methionine in vivo // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259, № 7. P. 4205–4211.

15. Layer G. et al. Structure and function of radical SAM enzymes // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004. Vol. 8, № 5. P. 468–476.
16. Parveen N., Cornell K.A. Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism // *Mol. Microbiol.* 2011. Vol. 79, № 1. P. 7–20.
17. Schubert H.L., Blumenthal R.M., Cheng X. Many paths to methyltransfer: A chronicle of convergence // *Trends Biochem. Sci.* 2003. Vol. 28, № 6. P. 329–335.
18. Bujnicki J.M. Sequence permutations in the molecular evolution of DNA methyltransferases // *BMC Evol. Biol.* 2002. Vol. 2. P. 1–11.
19. Fauman E.B., Blumenthal R.M., Cheng X. S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases: structures and functions. Structure and evolution of AdoMet-dependent methyltransferases / ed. Blumenthal R.M., Cheng X. Singapore: World Scientific Publishing, 1999. 1–38 p.
20. Gana R. et al. Structural and functional studies of S-adenosyl-L-methionine binding proteins: A ligand-centric approach // *BMC Struct. Biol.* 2013. Vol. 13, № 1.
21. Dixon M.M. et al. The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12 // *Structure.* 1996. Vol. 4, № 11. P. 1263–1275.
22. Persson B.C., Jäger G., Gustafsson C. The spoU gene of Escherichia coli, the fourth gene of the spoT operon, is essential for tRNA (Gm18) 2'-O-methyltransferase activity // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25, № 20. P. 4093–4097.
23. Björk G.R., Wikström P.M., Byström A.S. Prevention of translational frameshifting by the modified nucleoside 1-methylguanosine // *Science.* 1989. Vol. 244, № 4907. P. 986–989.
24. Anantharaman V., Koonin E. V, Aravind L. SPOUT: a Class of Methyltransferases that Includes spoU and trmD RNA Methylase Superfamilies and Novel Superfamilies of Predicted Prokaryotic RNA Methylases // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 4, № 1. P. 71–75.
25. Yeates T.O. Structures of SET domain proteins: protein lysine methyltransferases make their mark // *Cell.* 2002. Vol. 111, № 1. P. 5–7.
26. Greenberg M.V.C., Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease // *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* 2019. Vol. 20, № 10. P. 590–607.
27. Koonin E. V, Makarova K.S., Wolf Y.I. Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* 2017. Vol. 71. P. 233.
28. Malygin E.G., Hattman S. DNA methyltransferases: Mechanistic models derived from kinetic analysis // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2012. Vol. 47, № 2. P. 97–193.
29. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation // *Nature.* 2015. Vol. 517, № 7534. P. 321–326.

30. Moore L.D., Le T., Fan G. DNA methylation and its basic function // *Neuropsychopharmacology*. 2013. Vol. 38, № 1. P. 23–38.
31. Girirajan S., Campbell C., Eichler E. Non-CG Methylation in the Human Genome // *Physiol. Behav.* 2011. Vol. 176, № 5. P. 139–148.
32. Greer E.L. et al. DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans* // *Cell*. 2015. Vol. 161, № 4. P. 868–878.
33. Zhang G. et al. N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila* // *Cell*. 2015. Vol. 161, № 4. P. 893–906.
34. Koziol M.J. et al. Identification of methylated deoxyadenosines in vertebrates reveals diversity in DNA modifications // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23, № 1. P. 24–30.
35. Wu T.P. et al. DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells // *Nature*. 2016. Vol. 532, № 7599. P. 329–333.
36. Ren W., Gao L., Song J. Structural basis of DNMT1 and DNMT3A-mediated DNA methylation // *Genes (Basel)*. 2018. Vol. 9, № 12.
37. Svedružić Ž.M. Dnmt1: Structure and function // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2011. Vol. 101. 221–254 p.
38. Zhang X., Verdine G.L. Mammalian DNA cytosine-5 methyltransferase interacts with p23 protein // *FEBS Lett.* 1996. Vol. 392, № 2. P. 179–183.
39. Haggerty C. et al. Dnmt1 has de novo activity targeted to transposable elements // *Nature Structural and Molecular Biology*. 2021. Vol. 28, № 7. 594–603 p.
40. Zhang W., Xu J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis // *Biomark. Res.* 2017. Vol. 5, № 1. P. 1–8.
41. Jia D. et al. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation // *Nature*. 2007. Vol. 449, № 7159. P. 248–251.
42. Veland N. et al. DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № 1. P. 152–167.
43. Keiler K.C., Ramadoss N.S. Bifunctional transfer-messenger RNA // *Biochimie*. 2011. Vol. 93, № 11. P. 1993–1997.
44. Sergiev P. V. et al. Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation // *Nat. Chem. Biol.* 2018. Vol. 14, № 3. P. 226–235.
45. Motorin Y., Helm M. RNA nucleotide methylation // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2011. Vol. 2, № 5. P. 611–631.
46. Atta M. et al. S-Adenosylmethionine-dependent radical-based modification of biological macromolecules // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2010. Vol. 20, № 6. P. 684–692.

47. Urbonavičius J. et al. Identification of a novel gene encoding a flavin-dependent tRNA:m5U methyltransferase in bacteria - Evolutionary implications // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 13. P. 3955–3964.
48. Nishimasu H. et al. Atomic structure of a folate/FAD-dependent tRNA T54 methyltransferase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106, № 20. P. 8180–8185.
49. Murn J., Shi Y. The winding path of protein methylation research: Milestones and new frontiers // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18, № 8. P. 517–527.
50. Boriack-Sjodin P.A., Swinger K.K. Protein Methyltransferases: A Distinct, Diverse, and Dynamic Family of Enzymes // *Biochemistry.* 2016. Vol. 55, № 11. P. 1557–1569.
51. Heurgu V., Champ S. The hemK gene in *Escherichia coli* encodes the N5-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors // *EMBO J.* 2002. Vol. 21, № 4. P. 769–778.
52. Hornbeck P. V. et al. PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43, № D1. P. D512–D520.
53. Jambhekar A., Dhall A., Shi Y. Roles and regulation of histone methylation in animal development // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. Vol. 20, № 10. P. 625–641.
54. Shi Y.G., Tsukada Y. The discovery of histone demethylases // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. Vol. 5, № 9. P. 2–4.
55. Kernstock S. et al. Lysine methylation of VCP by a member of a novel human protein methyltransferase family // *Nat. Commun.* 2012. Vol. 3, № 1. P. 1–11.
56. Falnes P.O. et al. Protein lysine methylation by seven- $\beta$ -strand methyltransferases // *Biochem. J.* 2016. Vol. 473, № 14. P. 1995–2009.
57. Demirci H. et al. Multiple-Site Trimethylation of Ribosomal Protein L11 by the PrmA Methyltransferase // *Structure.* 2008. Vol. 16, № 7. P. 1059–1066.
58. Boffa L.C. et al. Distribution of NG, NG-dimethylarginine in nuclear protein fractions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977. Vol. 74, № 3. P. 969–976.
59. Tewary S.K., Zheng Y.G., Ho M.-C. Protein arginine methyltransferases: insights into the enzyme structure and mechanism at the atomic level // *Cell. Mol. Life Sci.* 2019. № 0123456789. P. 1–16.
60. Blanc R.S., Richard S. Arginine Methylation: The Coming of Age // *Mol. Cell.* 2017. Vol. 65, № 1. P. 8–24.
61. Jain K., Clarke S.G. PRMT7 as a unique member of the protein arginine methyltransferase family: A review // *Arch. Biochem. Biophys.* Elsevier, 2019. Vol. 665. P. 36–45.
62. Yang Y., Bedford M.T. Protein arginine methyltransferases and cancer // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. Vol. 13, № 1. P. 37–50.

63. Sprung R. et al. Identification and Validation of Eukaryotic Aspartate and Glutamate Methylation in Proteins // *J. Proteome Res.* 2008. Vol. 7, № 3. P. 1001–1006.
64. Clarke S. Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair // *Ageing Res. Rev.* 2003. Vol. 2, № 3. P. 263–285.
65. Ryttersgaard C. et al. Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 12. P. 10642–10646.
66. Biterge B. et al. Methylation of histone H4 at aspartate 24 by Protein L-isoaspartate O-methyltransferase (PCMT1) links histone modifications with protein homeostasis // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 1–8.
67. Sanders D.A. et al. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, № 36. P. 21770–21778.
68. Rice M.S., Dahlquist F.W. Sites of deamidation and methylation in Tsr, a bacterial chemotaxis sensory transducer // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, № 15. P. 9746–9753.
69. Webb K.J. et al. A novel 3-methylhistidine modification of yeast ribosomal protein Rpl3 is dependent upon the YIL110W methyltransferase // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 48. P. 37598–37606.
70. Al-Hadid Q. et al. Histidine Methylation of Yeast Ribosomal Protein Rpl3p Is Required for Proper 60S Subunit Assembly // *Mol. Cell. Biol.* 2014. Vol. 34, № 15. P. 2903–2916.
71. Liscombe D.K., Louie G. V, Noel J.P. Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases // *Nat. Prod. Rep.* 2012. Vol. 29, № 1. P. 1238–1250.
72. Wood T.C. et al. Human Arsenic Methyltransferase (AS3MT) Pharmacogenetics // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 11. P. 7364–7373.
73. Chen S.-J., Yan X.-J., Chen Z. Arsenic in Tissues, Organs, and Cells // *Encyclopedia of Metalloproteins* / ed. Kretsinger R.H., Uversky V.N., Permyakov E.A. New York, NY: Springer New York, 2013. P. 135–138.
74. Wang L. et al. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: Chaperone protein association and allozyme degradation // *Pharmacogenetics.* 2003. Vol. 13, № 9. P. 555–564.
75. Wu Q. et al. Structural, mutagenic, and kinetic analysis of the binding of substrates and inhibitors of human phenylethanolamine N-methyltransferase // *J. Med. Chem.* 2005. Vol. 48, № 23. P. 7243–7252.
76. Aksoy S., Szumlanski C.L., Weinshilboum R.M. Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 20. P. 14835–14840.
77. Cantoni G.. Methylation of nicotinamide with a soluble enzyme system from rat liver // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 189. P. 203–217.

78. Armistead J. et al. Mutation of a Gene Essential for Ribosome Biogenesis, EMG1, Causes Bowen-Conradi Syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. Vol. 84, № 6. P. 728–739.
79. Thomas S.R. et al. Structural insight into the functional mechanism of Nep1/Emg1 N1-specific pseudouridine methyltransferase in ribosome biogenesis // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39, № 6. P. 2445–2457.
80. Warda A.S. et al. Effects of the Bowen-Conradi syndrome mutation in EMG1 on its nuclear import, stability and nucleolar recruitment // *Hum. Mol. Genet.* 2016. Vol. 25, № 24. P. 5353–5364.
81. Wei F.Y. et al. Deficit of tRNA<sup>Lys</sup> modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice // *J. Clin. Invest.* 2011. Vol. 121, № 9. P. 3598–3608.
82. Metodiev M.D. et al. Methylation of 12S rRNA Is Necessary for In Vivo Stability of the Small Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome // *Cell Metab.* 2009. Vol. 9, № 4. P. 386–397.
83. Koeck T. et al. A common variant in TFB1M is associated with reduced insulin secretion and increased future risk of type 2 diabetes // *Cell Metab.* 2011. Vol. 13, № 1. P. 80–91.
84. Abbasi-Moheb L. et al. Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability // *Am. J. Hum. Genet.* 2012. Vol. 90, № 5. P. 847–855.
85. Martinez F.J. et al. Whole exome sequencing identifies a splicing mutation in NSUN2 as a cause of a Dubowitz-like syndrome // *J. Med. Genet.* 2012. Vol. 49, № 6. P. 380–385.
86. Jin Z., Liu Y. DNA methylation in human diseases // *Genes Dis.* 2018. Vol. 5, № 1. P. 1–8.
87. Liu Y. et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis // *Nat. Biotechnol.* 2013. Vol. 31, № 2. P. 142–147.
88. Chung S.A. et al. Genome-wide assessment of differential DNA methylation associated with autoantibody production in systemic lupus erythematosus // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 7. P. 1–16.
89. Cuddapah V.A. et al. Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) mutation type is associated with disease severity in rett syndrome // *J. Med. Genet.* 2014. Vol. 51, № 3. P. 152–158.
90. Wong K.K. DNMT1: A key drug target in triple-negative breast cancer // *Semin. Cancer Biol.* 2021. Vol. 72. P. 198–213.
91. Bartlett J.M.S. et al. Mammostrat ® as a tool to stratify breast cancer patients at risk of recurrence during endocrine therapy // *Breast Cancer Res.* 2010. Vol. 12, № 4. P. 1–11.
92. Strømme P., Bjørnstad P.G., Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome // *J. Child Neurol.* 2002. Vol. 17, № 4. P. 269–271.
93. Progress M., Pober B.R. Williams–Beuren Syndrome // *N. Engl. J. Med.* 2010. Vol. 362, № 3. P. 239–252.

94. Schubert C. The genomic basis of the Williams - Beuren syndrome // *Cell. Mol. Life Sci.* 2009. Vol. 66, № 7. P. 1178–1197.
95. Альбертс Б. et al. Основы молекулярной биологии клетки // Альбертс, Д. Брей, К. Хопкин, А. Джонсон, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, П. Уолтер//М. БИНОМ. Лаборатория знаний. 2015.
96. Cocciolone A.J. et al. Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 2018. Vol. 315, № 2. P. H189–H205.
97. Kohn J.C., Lampi M.C., Reinhart-King C.A. Age-related vascular stiffening: Causes and consequences // *Front. Genet.* 2015. Vol. 6. P. 1–17.
98. Latham G.J. et al. Perioperative morbidity in children with elastin arteriopathy // *Pediatr. Anesth.* 2016. Vol. 26, № 9. P. 926–935.
99. Kozel B.A. et al. Williams syndrome // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2021. Vol. 7, № 1.
100. Antonell A. et al. Partial 7q11.23 deletions further implicate GTF2I and GTF2IRD1 as the main genes responsible for the Williams-Beuren syndrome neurocognitive profile // *J. Med. Genet.* 2010. Vol. 47, № 5. P. 312–320.
101. Frangiskakis J.M. et al. LIM-kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition // *Cell.* 1996. Vol. 86, № 1. P. 59–69.
102. Lalli M.A. et al. Haploinsufficiency of BAZ1B contributes to Williams syndrome through transcriptional dysregulation of neurodevelopmental pathways // *Hum. Mol. Genet.* 2016. Vol. 25, № 7. P. 1294–1306.
103. Doll A., Grzeschik K.H. Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome // *Cytogenet. Cell Genet.* 2001. Vol. 95, № 1–2. P. 20–27.
104. Merla G. et al. Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region // *Hum. Genet.* 2002. Vol. 110, № 5. P. 429–438.
105. Haag S., Kretschmer J., Bohnsack M.T. WBSCR22/Merm1 is required for late nuclear pre-ribosomal RNA processing and mediates N7-methylation of G1639 in human 18S rRNA // *Rna.* 2015. Vol. 21, № 2. P. 180–187.
106. Zorbas C. et al. The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis // *Mol. Biol. Cell.* 2015. Vol. 26, № 11. P. 2080–2095.
107. VonHoldt B.M. et al. Structural variants in genes associated with human Williams-Beuren syndrome underlie stereotypical hypersociability in domestic dogs // *Sci. Adv.* 2017. Vol. 3, № 7.

108. VonHoldt B.M. et al. Activity of genes with functions in human Williams-Beuren syndrome is impacted by mobile element insertions in the gray wolf genome // *Genome Biol. Evol.* 2018. Vol. 10, № 6. P. 1546–1553.
109. Hahn Y., Lee B. Identification of nine human-specific frameshift mutations by comparative analysis of the human and the chimpanzee genome sequences // *Bioinformatics.* 2005. Vol. 21, № SUPPL. 1. P. 186–194.
110. Campeanu I.J. et al. Multi-omics integration of methyltransferase-like protein family reveals clinical outcomes and functional signatures in human cancer // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11. P. 1–14.
111. Wang K. et al. METTL27 is a prognostic biomarker of colon cancer and associated with immune invasion // *Nan Fang yi ke da xue xue bao= J. South. Med. Univ.* 2022. Vol. 42, № 4. P. 486–497.
112. An T. et al. Salvianolic acid B plays an anti-obesity role in high fat diet-induced obese mice by regulating the expression of mRNA, circRNA, and lncRNA // *PeerJ.* 2019. Vol. 7. P. e6506.
113. Metzger E. et al. KMT9 monomethylates histone H4 lysine 12 and controls proliferation of prostate cancer cells // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2019. Vol. 26, № 5. P. 361–371.
114. Husmann D., Gozani O. Histone lysine methyltransferases in biology and disease // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2019. Vol. 26, № 10. P. 880–889.
115. Lim S.P. et al. Small molecule inhibitors that selectively block dengue virus methyltransferase // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 8. P. 6233–6240.
116. Griffith S.C. et al. Crystal Structure of a Protein Repair Methyltransferase from *Pyrococcus furiosus* with its L-Isoaspartyl Peptide Substrate // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 313, № 5. P. 1103–1116.
117. Brecher M.B. et al. Refolding of a fully functional flavivirus methyltransferase revealed that S-adenosyl methionine but not S-adenosyl homocysteine is copurified with flavivirus methyltransferase // *Protein Sci.* 2015. Vol. 24, № 1. P. 117–128.
118. Miller D.J. et al. Crystal complexes of a predicted S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase reveal a typical AdoMet binding domain and a substrate recognition domain // *Protein Sci.* 2003. Vol. 12, № 7. P. 1432–1442.
119. Lin S. et al. A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 13. P. 10795–10803.
120. Remy C.N. Metabolism of Thiopyrimidines Thiopurines // *Enzyme.* 1963. Vol. 238, № 3. P. 1078–1084.
121. Woodson L.C., Weinshilboum R.M. Human kidney thiopurine methyltransferase purification and biochemical properties // *Biochem. Pharmacol.* 1983. Vol. 32, № 5. P. 819–826.

122. Axelrod J. Purification and properties of Phenylethanolamine-N-methyl Transferase // *J Biol Chem.* 1962. Vol. 237, № 5. P. 1657–1660.
123. Shimba S. et al. Accurate and Efficient N-6-Adenosine Methylation in Spliceosomal U6 Small Nuclear-Rna By Hela-Cell Extract in-Vitro // *Nucleic Acids Res.* 1995. Vol. 23, № 13. P. 2421–2426.
124. Siegrist J. et al. Functional and structural characterisation of a bacterial O-methyltransferase and factors determining regioselectivity // *FEBS Lett.* 2017. Vol. 591, № 2. P. 312–321.
125. Golovina A.Y. et al. The yfiC gene of E. coli encodes an adenine-N6 methyltransferase that specifically modifies A37 of tRNA<sup>1</sup> Val(cmo<sup>5</sup>UAC) // *Rna.* 2009. Vol. 15, № 6. P. 1134–1141.
126. Mendel M. et al. Methylation of Structured RNA by the m6A Writer METTL16 Is Essential for Mouse Embryonic Development // *Mol. Cell.* 2018. Vol. 71, № 6. P. 986-1000.e11.
127. Rubin R.A., Modrich P. EcoRI methylase. Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme. // *J. Biol. Chem. Elsevier,* 1977. Vol. 252, № 20. P. 7265–7272.
128. Hevel J.M., Price O.M. Rapid and direct measurement of methyltransferase activity in about 30 min // *Methods.* 2020. Vol. 175. P. 3–9.
129. Wu J. et al. Scintillation proximity assay of arginine methylation // *J. Biomol. Screen.* 2012. Vol. 17, № 2. P. 237–244.
130. Ero R. et al. Identification of pseudouridine methyltransferase in Escherichia coli // *Rna.* 2008. Vol. 14, № 10. P. 2223–2233.
131. Wan W. et al. Rapid screening for S-adenosylmethionine-dependent methylation products by enzyme-transferred isotope patterns analysis // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 18, № 3. P. 319–324.
132. Liu J. et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. // *Nat. Chem. Biol.* 2014. Vol. 10, № 2. P. 93–95.
133. Morvan D. et al. Methionine-Dependence Phenotype of Tumors: Metabolite Profiling in a Melanoma Model Using L-[methyl-C]methionine and High-Resolution Magic Angle Spinning 1H–13C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy // *Magn. Reson. Med. An Off. J. Int. Soc. Magn. Reson. Med.* 2006. Vol. 55, № 5. P. 984–996.
134. Peters W. et al. Enzymatic site-specific functionalization of protein methyltransferase substrates with alkynes for click labeling // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2010. Vol. 49, № 30. P. 5170–5173.
135. Qu W. et al. Capturing Unknown Substrates via in Situ Formation of Tightly Bound Bisubstrate Adducts: S-Adenosyl-vinthonine as a Functional Probe for AdoMet-Dependent Methyltransferases // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. Vol. 138, № 9. P. 2877–2880.

136. Wong J.M.F.R.C. S-adenosylmethionine: studies on chemical and enzymatic synthesis // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1987. Vol. 9, № 1. P. 39–52.
137. Smith M.C.M. Molecular biological methods for bacillus // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 287, № 1–2. P. 227–227.
138. Kerfah R. et al. Methyl-specific isotopic labeling: A molecular tool box for solution NMR studies of large proteins // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. Vol. 32. P. 113–122.
139. Field J. et al. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method // *Mol. Cell. Biol.* 1988. Vol. 8, № 5. P. 2159–2165.
140. Roux K.J., Kim D.I., Burke B. BioID: A screen for protein-protein interactions // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2013. Vol. 91, № 1. P. 19–23.
141. Ran F.A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8, № 11. P. 2281–2308.
142. Kowarz E., Löscher D., Marschalek R. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines // *Biotechnol. J.* 2015. Vol. 10, № 4. P. 647–653.
143. Mátés L. et al. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates // *Nat. Genet.* 2009. Vol. 41, № 6. P. 753–761.
144. Chugunova A. et al. LINC00116 codes for a mitochondrial peptide linking respiration and lipid metabolism // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019. Vol. 116, № 11. P. 4940–4945.
145. Laptev I. et al. Mouse Trmt2B protein is a dual specific mitochondrial methyltransferase responsible for m5U formation in both tRNA and rRNA // *RNA Biol.* 2020. Vol. 17, № 4. P. 441–450.
146. Barsnes H., Vaudel M. SearchGUI: A Highly Adaptable Common Interface for Proteomics Search and de Novo Engines // *J. Proteome Res.* 2018. Vol. 17, № 7. P. 2552–2555.
147. Lesnyak D. V. et al. Identification of *Escherichia coli* m2G methyltransferases: I. The ycbY Gene Encodes a Methyltransferase Specific for G2445 of the 23 S rRNA // *J. Mol. Biol.* 2006. Vol. 364, № 1. P. 20–25.
148. Schanda P., Kupče E., Brutscher B. SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds // *J. Biomol. NMR.* 2005. Vol. 33, № 4. P. 199–211.
149. Delaglio F. et al. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes // *J. Biomol. NMR.* 1995. Vol. 6, № 3. P. 277–293.
150. Lee W., Tonelli M., Markley J.L. NMRFAM-SPARKY: Enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy // *Bioinformatics.* 2015. Vol. 31, № 8. P. 1325–1327.
151. Willcott M.R. MestRe Nova // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131, № 36. P. 13180–13180.

152. Sattler M., Schleucher J., Griesinger C. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution. // *Pubman.Mpdl.Mpg.De.* 1999. Vol. 34. P. 93–158.
153. Lee W. et al. I-PINE web server, an integrative probabilistic NMR assignment system // *J. Biomol. NMR.* 2019. Vol. 73, № 5. P. 213–222.
154. Petrushanko I.Y. et al. Critical role of  $\gamma$ -phosphate in structural transition of Na,K-ATPase upon ATP binding // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 1–5.
155. Connelly P.R., Thomson J.A. Heat capacity changes and hydrophobic interactions in the binding of FK506 and rapamycin to the FK506 binding protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Vol. 89, № 11. P. 4781–4785.
156. Polshakov V.I. et al. Structure and dynamics in solution of the complex of *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase with the new lipophilic antifolate drug trimetrexate // *Protein Sci.* 1999. Vol. 8, № 3. P. 467–481.
157. Shen Y. et al. TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts // *J. Biomol. NMR.* 2009. Vol. 44, № 4. P. 213–223.
158. Cornilescu G. et al. Validation of protein structure from anisotropic carbonyl chemical shifts in a dilute liquid crystalline phase // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120, № 27. P. 6836–6837.
159. Ottiger M., Bax A. Bicelle-based liquid crystals for NMR-measurement of dipolar couplings at acidic and basic pH values // *J. Biomol. NMR.* 1999. Vol. 13, № 2. P. 187–191.
160. Hansen M.R., Mueller L., Pardi A. Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions // *Nat. Struct. Biol.* 1998. Vol. 5, № 12. P. 1065–1074.
161. Brünger A.T. et al. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 1998. Vol. 54, № 5. P. 905–921.
162. Kuszewski J., Gronenborn A.M., Clore G.M. Improvements and Extensions in the Conformational Database Potential for the Refinement of NMR and X-ray Structures of Proteins and Nucleic Acids // *Journal of Magnetic Resonance.* 1997. Vol. 125, № 1. P. 171–177.
163. Laskowski R.A. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR // *J. Biomol. NMR.* 1996. Vol. 8, № 4. P. 477–486.
164. Farrow N.A. et al. Backbone dynamics of a free and a phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation // *Biochemistry.* 1994. Vol. 33, № 19. P. 5984–6003.
165. Molday R.S., Englander S.W., Kallen R.G. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange // *Biochemistry.* 1972. Vol. 11, № 2. P. 150–158.

166. Bai Y. et al. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 1993. Vol. 17, № 1. P. 75–86.
167. Boratyn G.M. et al. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST // *Biol. Direct.* 2012. Vol. 7. P. 1–14.
168. Luka Z., Mudd S.H., Wagner C. Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 34. P. 22507–22511.
169. Shimazu T. et al. Selenium-Based S-Adenosylmethionine Analog Reveals the Mammalian Seven-Beta-Strand Methyltransferase METTL10 to Be an EF1A1 Lysine Methyltransferase // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 8.
170. Létoquart J. et al. Structural and functional studies of Bud23-Trm112 reveal 18S rRNA N7-G1575 methylation occurs on late 40S precursor ribosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111, № 51. P. E5518–E5526.
171. Gopanenko A. V. et al. Human ribosomal protein eS1 is engaged in cellular events related to processing and functioning of U11 snRNA // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 15. P. 9121–9137.
172. Польшаков В., Батуев Е., Манцызов А. Методы спектроскопии ЯМР для крининга и изучения взаимодействия биомишень-лиганд // *Успехи Химии.* 2019. Vol. 88, № 1. P. 59–98.
173. Lipari G., Szabo A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity // *J. Am. Chem. Soc.* 1982. Vol. 104, № 17. P. 4546–4559.
174. Clore G.M. et al. Analysis of the Backbone Dynamics of Interleukin-1 $\beta$  Using Two-Dimensional Inverse Detected Heteronuclear <sup>15</sup>N-1H NMR Spectroscopy // *Biochemistry.* 1990. Vol. 29, № 32. P. 7387–7401.
175. Martin J.L., McMillan F.M. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold // *Curr. Opin. Struct. Biol. Elsevier,* 2002. Vol. 12, № 6. P. 783–793.
176. Ōunap K. et al. The stability of ribosome biogenesis factor WBSCR22 is regulated by interaction with TRMT112 via ubiquitin-proteasome pathway // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 7. P. 1–20.
177. Romanowski M.J., Bonanno J.B., Burley S.K. Crystal structure of the Escherichia coli glucose-inhibited division protein B (GidB) reveals a methyltransferase fold // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2002. Vol. 47, № 4. P. 563–567.
178. Abedeera S.M. et al. RsmG forms stable complexes with premature small subunit rRNA during bacterial ribosome biogenesis // *RSC Adv.* 2020. Vol. 10, № 38. P. 22361–22369.
179. Connolly K., Rife J.P., Culver G. Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA // *Mol. Microbiol.* 2008. Vol. 70, № 5. P. 1062–1075.

180. Laptev I. et al. METTL15 interacts with the assembly intermediate of murine mitochondrial small ribosomal subunit to form m<sup>4</sup>C840 12S rRNA residue // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 14. P. 8022–8034.
181. Van Tran N. et al. The human 18S rRNA m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112 // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № 15. P. 7719–7733.
182. Yang W.Q. et al. THUMP3-TRMT112 is a m<sup>2</sup>G methyltransferase working on a broad range of tRNA substrates // *Nucleic Acids Res.* 2021. Vol. 49, № 20. P. 11900–11919.
183. Wang Y. et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells // *Nat. Cell Biol.* 2014. Vol. 16, № 2. P. 191–198.
184. Ping X.L. et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase // *Cell Res.* 2014. Vol. 24, № 2. P. 177–189.