

А. И. Лукаш, Н. В. Пушкина, И. А. Климова, И. Н. Назарова

## РОЛЬ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ СКОРОСТИ СТАРЕНИЯ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES PARADOXUS*

Исследованы посттрансляционные неферментативные процессы дезамидирования и гликозилирования в белках «молодых» и «старых» клеток популяции дрожжей *S. paradoxus*, которые выращивались при 25 °С на минимальной среде при концентрациях глюкозы 1, 2, 5, 10 %.

Установлена прямая корреляционная зависимость между степенью гликозилирования и дезамидирования белков и скоростью старения популяции дрожжевых клеток.

Результатом посттрансляционных модификаций в белках дрожжей является увеличение их атакуемости протеолитическими ферментами.

**Введение.** Известна роль постсинтетического дезамидирования [1, 2], гликозилирования [3], окисления SH-групп [4] и др. в молекулярных механизмах накопления аномальных белков в клетках при старении. Неферментативное дезамидирование и связанная с ним аспарагинзависимая автофрагментация белков являются причиной изменения структурных, физико-химических свойств и атакуемости протеолитическими ферментами [5]. Установлена тесная корреляционная зависимость между неферментативными процессами гликозилирования и дезамидирования в белках [6]. Объектом дальнейших исследований мы выбрали клетки дрожжей *S. paradoxus*, которые в нормальных условиях функционируют в среде, содержащей свободную глюкозу в высокой концентрации.

Целью настоящей работы явилось изучение посттрансляционных процессов дезамидирования и гликозилирования в белках «молодых» и «старых» популяций клеток дрожжей, выращенных на минимальной среде при различных концентрациях глюкозы.

**Материалы и методы.** Препарат белка готовили на основе клеток *S. paradoxus* ВК У2437 (получены из коллекции микроорганизмов ИБФМ АН РАН), выращенных при 25 °С до середины логарифмической фазы роста на минимальной среде VNB при концентрации глюкозы в среде 1, 2, 5, 10 %.

Выращенную биомассу фракционировали на популяции «молодых» и «старых» клеток [7]. Замороженную клеточную массу хранили при температуре —20 °С. Перед опытом клеточную массу размораживали при 4 °С в течение 2—3 ч, механически растирали и суспендировали в равном объеме буфера А (80 мкМ трис-HCl; 2 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА; 2 мкМ β-меркаптоэтанол). В смесь добавляли 10 мл 0,2 М NaOH для суспендирования клеток. Препараты суммарного белка выделяли по методу [8]. Все операции по выделению препаратов осуществляли при температуре 4 °С.

В препарате определяли процентное содержание гликозилированных форм белка [9], а также сумму амидных групп (САГ) и фракции амидов: легкогидролизуемых (ЛАГ) и трудногидролизуемых (ТАГ), которые освобождают аммиак соответственно за 15 мин и 3 ч гидролиза в 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 100 °С [10]. Количество ТАГ рассчитывали по разнос-

© А. И. Лукаш, Н. В. Пушкина, И. А. Климова, И. Н. Назарова, 1994

ти САГ и ЛАГ. Атакуемость белка определяли с помощью бактериальной проназы («Sigma», США) [11].

**Результаты и обсуждение.** Данные по уровню гликозилирования белков «молодых» и «старых» популяций дрожжей *S. paradoxus*, выращенных в течение 17—24 ч при 1, 2, 5 и 10 %-м содержании глюкозы в среде, представлены в табл. 1. Степень гликозилирования белков, соответствующая физиологическому 2 %-му содержанию глюкозы в среде, составила  $\pm 68,2$  мкМ фруктозы на 1 г белка в популяции «молодых» клеток дрожжей. В белках «старых» клеток она была выше на 8 % и составила  $\pm 71,2$  мкМ фруктозы на 1 г белка ( $p < 0,01$ ).

Уменьшение концентрации глюкозы в среде до 1 % не повлияло на содержание гликозилированных белков в популяции «старых» клеток, но степень гликозилирования белков «молодых» клеток была ниже контрольной на 13 %.

Таким образом, при низких и физиологических концентрациях глюкозы в среде белки «молодых» и «старых» клеток дрожжей гликозилируются в разной степени. «Старение» сопровождается возрастанием степени гликозилирования.

Увеличение процентного содержания глюкозы в среде до 5 и 10 % привело к усилению гликозилирования как в «молодых», так и «старых» клетках. Количество модифицированных белков в «молодых» клетках возросло на 25 и 38 % соответственно и превысило уровень гликозилирования «старых» белков дрожжей, выращенных в физиологических условиях. В «старых» клетках, выращенных на 5 %-й и 10 %-й глюкозе, степень гликозилирования белков возросла на 45 и 52 % соответственно.

Из литературы известно, что белки, находящиеся в среде с повышенным содержанием глюкозы, подвергаются неферментативному гликозилированию. Это было установлено и в клинических, и в экспериментальных условиях [12]. Предполагают, что подобный процесс происходит в результате взаимодействия альдегидной группы глюкозы и гидроксильной группы серина или треонина,  $\epsilon$ -аминогруппы лизина, амидной группы аспарагина с образованием продуктов реакции Maillard [13].

Возникающие при этом локальные изменения химической структуры полипептидной цепи могут играть немаловажную роль в дестабилизации высокоупорядоченной конформации белковой молекулы и, по-видимому, способствуют возникновению других неферментативных модификаций.

Установлено, что аспарагиновая кислота и аспарагин чувствительны к межмолекулярным перемещениям [14]. Также известно, что аспарагин наиболее подвержен другой неферментативной модификации — дезамидированию [15].

Скорость неферментативного дезамидирования аспарагина определяется как положением его в аминокислотной последовательности, так

Таблица 1

Степень гликозилирования белков дрожжей, выращенных в течение 17—24 ч при различных концентрациях глюкозы (мкМ фруктозы на 1 г белка)

Концентрация глюкозы, %	Популяция дрожжей	
	«Молодая»	«Старая»
Контроль (2 %)	65,8 $\pm$ 1,03	71,2 $\pm$ 0,5 ( $p_1 < 0,001$ )
1	57,35 $\pm$ 0,9 ( $p_2 < 0,05$ )	74,6 $\pm$ 1,02 ( $p_1 < 0,05$ , $p_2 < 0,01$ )
5	89,5 $\pm$ 1,05 ( $p_2 < 0,01$ )	99,7 $\pm$ 1,5 ( $p_1 < 0,001$ , $p_2 < 0,001$ )
10	98,5 $\pm$ 3,0 ( $p_2 < 0,001$ )	104,6 $\pm$ 1,3 ( $p_1 < 0,01$ , $p_2 < 0,001$ )

Примечание. Здесь и в табл. 2  $p_1$  — достоверные различия между «старыми» и «молодыми» популяциями дрожжей;  $p_2$  — то же между степенью гликозилирования белков при различных концентрациях глюкозы.

и структурной организацией белка [16], а также рядом внешних факторов [17].

Данные табл. 2 отражают изменения амидированности дрожжевых белков в зависимости от концентрации глюкозы в среде при выращивании дрожжей.

Амидированность белков «молодых» клеток дрожжей, выращенных в физиологических условиях (контроль), составила  $\pm 563 \pm 1,08$  мкМ амидного азота в  $\text{NH}_3$  на 1 г белка. Распределение аспарагина и глутамина в белках было практически поровну:  $\pm 268,7$  и  $\pm 301,6$  мкМ амидного азота в  $\text{NH}_3$  на 1 г белка. При «старении» количество амидов в белках снижалось на 17 (САГ), 13 и 16 % (ЛАГ и ТАГ). По данным литературы, при старении белков хрусталика глаза было отмечено снижение амидированности белков в среднем на 16—22 % [18].

Результаты, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о взаимосвязи между степенью гликозилирования дрожжей, которая изменялась в зависимости от условий культивирования, и степенью их дезамидирования.

Увеличение степени гликозилирования белков дрожжей, а также «молодых» и «старых» клеток коррелировало со степенью их дезамидирования. Количество суммарных амидных групп белков «молодых» клеток, выращенных на 10 %-й глюкозе, уменьшилось по сравнению с контролем на 30 %. Снижение амидированности осуществлялось одновременно за счет обеих фракций амидов.

Белки «старых» клеток дезамидировались в большей степени, причем следует подчеркнуть, что снижение амидированности происходило в основном за счет фракции ЛАГ, представленной аспарагином. Количество ЛАГ белков «старых» клеток, выращенных на среде с 10 %-м содержанием глюкозы, уменьшилось на 25 % по сравнению с контролем, что подтверждается данными литературы о преимущественном дезамидировании аспарагина. Эти материалы косвенно свидетельствуют о неферментативности процесса. Коэффициент корреляции между

Таблица 2

Изменение амидированности белков дрожжей, выращенных в течение 17—24 ч при различных концентрациях глюкозы (мкМ амидного азота на 1 г белка)

Концентрация глюкозы, %	Популяция дрожжей		
	«Молодая»		
	САГ	ЛАГ	ТАГ
Контроль (2 %)	563 ± 1,08	268,7 ± 6,8	301,6 ± 1,5
1	551,6 ± 2,5 (p <sub>2</sub> > 0,1)	276,5 ± 1,6 (p <sub>2</sub> < 0,005)	298,4 ± 8,5 (p <sub>2</sub> < 0,001)
5	471,6 ± 1,7 (p <sub>2</sub> < 0,01)	233,5 ± 1,5 (p <sub>2</sub> < 0,001)	250,6 ± 2,5 (p <sub>2</sub> > 0,001)
10	420,3 ± 1,6 (p <sub>2</sub> > 0,01)	210,4 ± 1,2 (p <sub>2</sub> < 0,5)	214,4 ± 1,3 (p <sub>2</sub> < 0,5)
Концентрация глюкозы, %	Популяция дрожжей		
	«Старая»		
	САГ	ЛАГ	ТАГ
Контроль (2 %)	770,2 ± 3,05	236,1 ± 11,4	249,2 ± 2,5
1	560,7 ± 2,0 (p <sub>1</sub> < 0,05)	282 ± 2,2 (p <sub>1</sub> < 0,01)	293,3 ± 1,0 (p <sub>1</sub> < 0,01)
5	460,6 ± 0,9 (p <sub>1</sub> > 0,1, p <sub>2</sub> < 0,01)	213,9 ± 1,7 (p <sub>1</sub> < 0,05, p <sub>2</sub> > 0,001)	253,7 ± 1,5 (p <sub>1</sub> < 0,01, p <sub>2</sub> < 0,05)
10	391,0 ± 2,5 (p <sub>1</sub> < 0,001, p <sub>2</sub> < 0,001)	120,0 ± 2,3 (p <sub>1</sub> < 0,001, p <sub>2</sub> < 0,01)	200,1 ± 2,3 (p <sub>1</sub> < 0,05, p <sub>2</sub> < 0,05)

Таблица 3

Проназый гидролиз белков дрожжей, выращенных в течение 17–24 ч в присутствии глюкозы (мг на 1 г фермента в ч)

Концентрация глюкозы, %	Популяция дрожжей	
	«Молодая»	«Старая»
2	7,1 ± 1 (p <sub>1</sub> < 0,01, p <sub>2</sub> > 0,01)	10,5 ± 0,9 (p <sub>1</sub> < 0,01, p <sub>2</sub> < 0,01)
10	14,5 ± 0,95 (p <sub>2</sub> > 0,001)	18,4 ± 1,5 (p <sub>1</sub> < 0,001, p <sub>2</sub> < 0,01)

Примечание. p<sub>1</sub> — достоверные различия между «молодыми» и «старыми» популяциями дрожжей; p<sub>2</sub> — то же между атакуемостью белков, выращенных из «молодых» и «старых» клеток при различных концентрациях глюкозы в среде.

степенью гликозилирования белков и количеством легкогидролизуемых групп белков «старых» клеток в 10 %-й глюкозе равен 0,69.

Снижение содержания глюкозы в среде до 1 % не изменило степени амидирования белков «молодых» клеток, но привело к увеличению амидированности белков «старой» популяции дрожжей до уровня «молодых» контрольных клеток и составило 560,7 ± 20.

Таким образом, по нашим данным, с увеличением концентрации глюкозы в среде происходит повышение степени гликозилирования белков, сопровождающееся снижением амидированности белков, что является отражением «старения» популяции клеток дрожжей.

Одной из возможных причин возрастания скорости неферментативного дезамидирования при повышении концентрации глюкозы может быть взаимодействие гидроксильной группы свободной глюкозы и амидной группы аспарагина, что облегчает протонизацию амида при гидролизе и способствует трансформации амидной группы в карбоксильную [19].

Изученные посттрансляционные модификации и связанная с дезамидированием аспарагинзависимая автофрагментация белка [5] способствуют изменению структурной организации белковой молекулы, вследствие чего увеличивается «атакуемость» их протеолитическими ферментами.

По нашим данным, в результате постсинтетического дезамидирования и гликозилирования белков достоверно повысилась их атакуемость проназой. С увеличением степени гликозилирования она возросла в 2 раза по сравнению с контролем как в «молодых», так и в «старых» клетках. При этом необходимо отметить, что белки «старых» клеток атакуются проназой интенсивнее, чем «молодых», и в «контроле», и в 10 %-й глюкозе (табл. 3).

Таким образом, суммируя полученные результаты, можно предположить, что такие две неферментативные постсинтетические модификации, как гликозилирование и дезамидирование, являются возможной причиной локальных изменений в структуре белка, вследствие чего происходит нарушение структурно-функциональной организации белковых молекул и их деструкция при старении. Можно также предположить регуляторную роль сопряженных процессов гликозилирования и дезамидирования, изменяющую активность метаболических процессов в дрожжевых клетках в зависимости от изменений концентрации глюкозы в окружающей среде.

О. I. Лукаш, Н. В. Пушкіна, I. О. Климова, I. Н. Назарова

## РОЛЬ ПОСТТРАНСЛЯЦІЙНИХ МОДИФІКАЦІЙ БІЛКІВ У РЕГУЛЯЦІЇ ШВИДКОСТІ СТАРІННЯ КЛІТИН ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES PARADOXUS*

### Резюме

Досліджено посттрансляційні неферментативні процеси дезамідування і глікозилювання у білках «молодих» та «старих» клітин популяції дріжджів *S. paradoxus*, які вирощували при 25 °С на мінімальній середовищі за концентрації глюкози 1, 2, 5, 10 %.

Встановлено пряму кореляційну залежність між ступенем глікозилювання і деамідування білків та швидкістю старіння популяції клітин дріжджів.

Результатом посттрансляційних модифікацій у білках дріжджів є збільшення їх атакуювання протеолітичними ферментами.

*A. I. Lukasch, N. V. Puschkina, I. A. Klimova, I. N. Nasarova*

## THE ROLE OF NONENZYMATIC POSTTRANSLATIONAL DEAMIDATION AND GLYCOSYLATION PROCESS IN AGING OF YEAST CELLS *SACCHAROMYCES PARADOXUS*

### Summary

The posttranslational nonenzymatic deamidation and glycosylation process in proteins from young and old yeast population cells were investigated. Yeast population *Saccharomyces paradoxus* were grown on minimal nutritional medium with 1, 2, 5, 10 % of glucose at 25 °C. The in correlation between the rate of glycosylation and deamidation in cell proteins from young and old population was established. Posttranslational modifications of yeast cell proteins affected they were more actively by proteolytic enzymes.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Gillery P., Morboise I., Magar F., Bozel I.* Aging mechanisms of proteins // *Diabet. Metab.*— 1991.— 17, N 1.— P. 17—16.
2. *Wright H. T.* Nonenzymatic deamidation of asparaginy and glutaminy residues in proteins // *Crit. Rep. Biochem. and Mol. Biol.*— 1991.— 26, N 1.— P. 1—52.
3. *Appel N.* Bericht über Symp. glykirtie Hemoglobin // *Clin. chem.*— 1987.— 18, N 4.— S. 172—175.
4. *John A., Jeffrey S., Suzanne R., John W.* Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N-(carboxymethyl)lysine in lens proteins // *Biochemistry.*— 1989.— 28.— P. 9464—9468.
5. *Пушкина Н. В., Шепотиновская И. В., Назарова И. Н., Лукаш А. И.* Роль ферментативного гликозилирования в ускорении процессов старения белков // Ускоренное старение: связь с возрастной патологией: Науч. конф.— Киев, 1992.
6. *Пушкина Н. В.* Амидированность белков при старении // *Укр. биохим. журн.*— 1979.— 51, № 6.— С. 680—683.
7. *Wickerhau U. S.* Yeast nitrogen base // *Dep. A. G. Tech. Bull.*— 1951.— N 1029.— P. 2437—2465.
8. *Jons S., Nelson N.* An immunological method for detecting gene expression in yeast colonies // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1984.— 81.— P. 7426—7435.
9. *Parker U. M., Emglund S. D., Decasta S. D. et al.* Jusproved colometric assay of glycosylated hemoglobin // *Clin. chem.*— 1981.— 27, N 5.— P. 665—672.
10. *Pongor S., Ulrich P., Beusant F. et al.* Aging of proteins isolation and identification of a fluorescens chromofore // *Prol. Mat. Acad.*— 1984.— 81, N 9a.— P. 2684.
11. *Шепотиновская И. В.* Влияние глутатиона на протеолитическое расщепление белков тканей молодых и старых крыс // *Укр. биохим. журн.*— 1986.— 58, № 4.
12. *Данилова Л. А., Фоменко М. О., Леина Л. М.* Гликозилирование белков и способы его оценки // Там же.— 1991.— 63, № 3.— С. 5—8.
13. *Azevedo M. S.* Maillard compounds asa cause of aging // *Acta Med. Port.*— 1990.— 3, N 2.— P. 126—128.
14. *Cowencon J. D., Clarce S.* Spontaneo us degradation and enzymatic reparir of aspartyl and asparaginy residues in aging red all proteins analysed by coctev simulation // *Gerontology.*— 1991.— 37, N 1—3.— P. 128—151.
15. *Patell K., Borchardt R. T.* Chemical pathways of peptide degradation. Kinetic of deamidation of an asparaginy residues in a model hexapeptide // *Pharm. Res.*— 1990.— 7, N 7.— P. 703—711.
16. *Wright H. T.* Sequence and structure determinations of the nonenzymatic deamidation of Asn and Cln residues in proteins // *Protein Eng.*— 1991.— 4, N 5.— P. 283—294.
17. *Tyler-Cross R., Schirch V.* Effect of aminoacid sequence buffers and mechanism of deamidation of asparagine residues in, small peptides // *J. Biol. Chem.*— 1991.— 25, N 266 (33).— P. 2254—2256.
18. *Пушкина Н. В., Лукаш А. И.* Легко- и трудногидролизуемые амидные группы в белках // *Изв. Северо-Кавказ. науч. центра высш. шк. естеств. науки.*— 1976.— № 2.— С. 95.
19. *Shanp G. C., Robinson A. B., Katen M. D.* Synthesis of polypeptide with lysozyme activity // *Amer. Chem. Soc.*— 1973.— 95.— P. 6097—6104.