

Триптофанил-тРНК-синтетаза как  
важный элемент  
персонафицированной медицины в  
аспекте концепции «гормезиса»

# Аминоацил-тРНК-синтетазы

- Несмотря на то, что АРСазы катализируют одну и ту же реакцию присоединения аминокислоты к гомологичной тРНК, различные ферменты из этого класса могут сильно различаться.
- Они имеют четыре типа субъединичной структуры, в частности  $\alpha$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_2\beta_2$ .
- Полипептидная цепь ферментов включает от 334 до 1000 аминокислотных остатков, и ферменты контактируют близкими по структуре доменами с «внутренней стороны» (как бы в углу) L-формы тРНК.
- АРСазы имеют отдельные участки связывания для аминокислот (20 видов). Синтетазы, к тому же, должны различать практически около 40 сходных по форме, но различающихся молекул tRNA в клетке, и они используют для этого только небольшую часть молекулы тРНК, названных «элементами идентичности».

**Аминоацил-тРНК синтетазы** - катализируют реакцию специфического аминоацилирования тРНК и играют критически важную роль для обеспечения точности реализации генетического кода.

Суммарная катализируемая реакция:

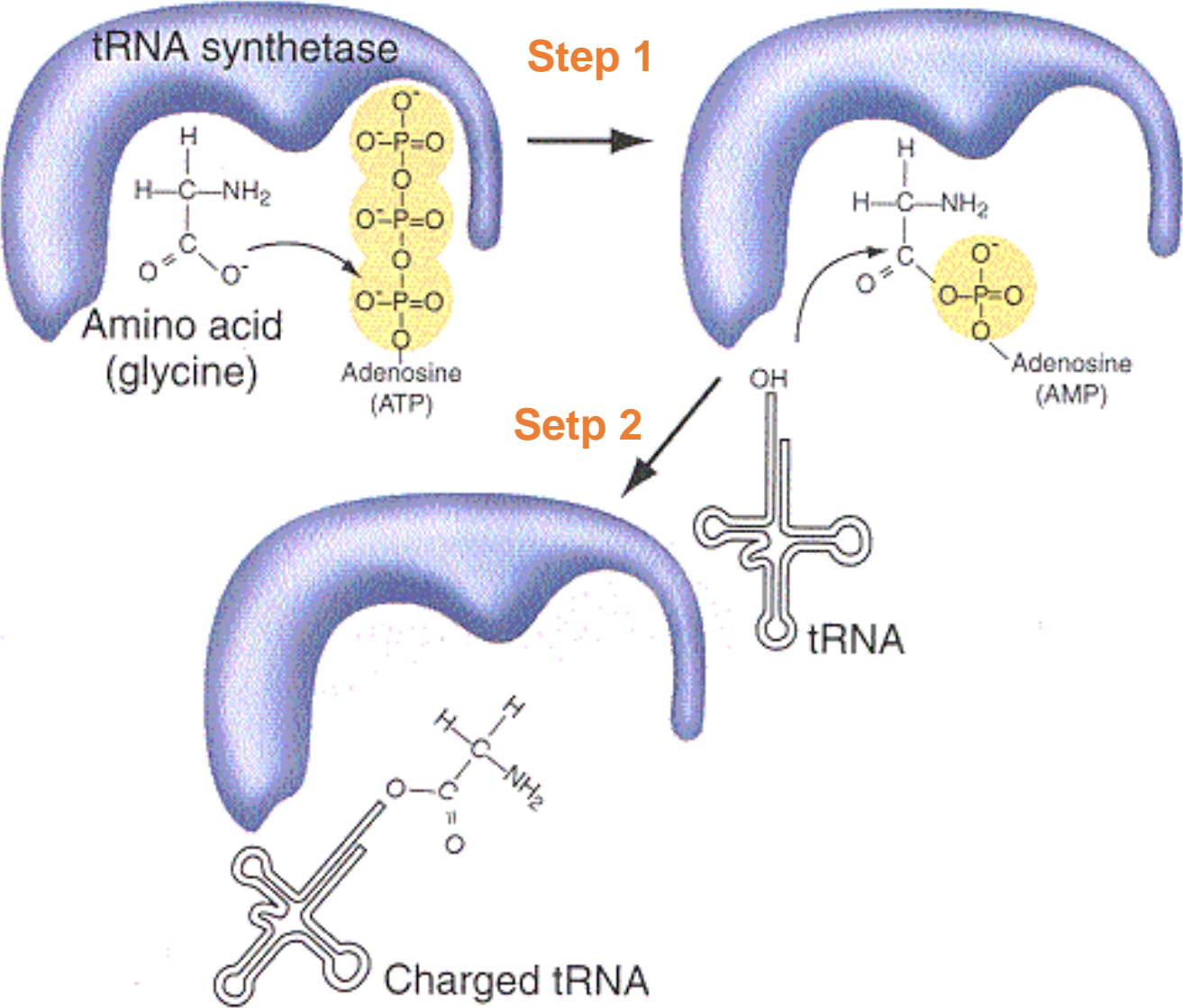
1. **аминокислота** + АТР → **аминоацил-АМР** +  $PP_i$ ;
2. **аминоацил-АМР** + **тРНК** → **аминоацил-тРНК** + АМР

2-х ступенчатая реакция происходит **самопроизвольно** и сильно сдвинута в сторону продукта, так как концентрация  $PP_i$  держится низкой в силу гидролиза ее с помощью активной пиррофосфатазы.

# Аминоацилирование тРНК

- Общая реакция аминоацилирования показана на предыдущем слайде. Она включает две стадии запускаемые с помощью АТР:
- На **первой стадии**, АМР связывается с карбоксильной группой аминокислоты, приводя к образованию богатого энергией интермедиата, называемого аминоацил-аденилатом.
- Гидролиз образующегося в результате реакции пирофосфата до двух молекул неорганического фосфата сдвигает ферментативную реакцию вправо.
- На **второй стадии**, аминоацил-аденилат реагирует с соответствующей тРНК с образованием продуктов реакции в виде аминоацил-тРНК и АМР.

# Аминоацил-тРНК



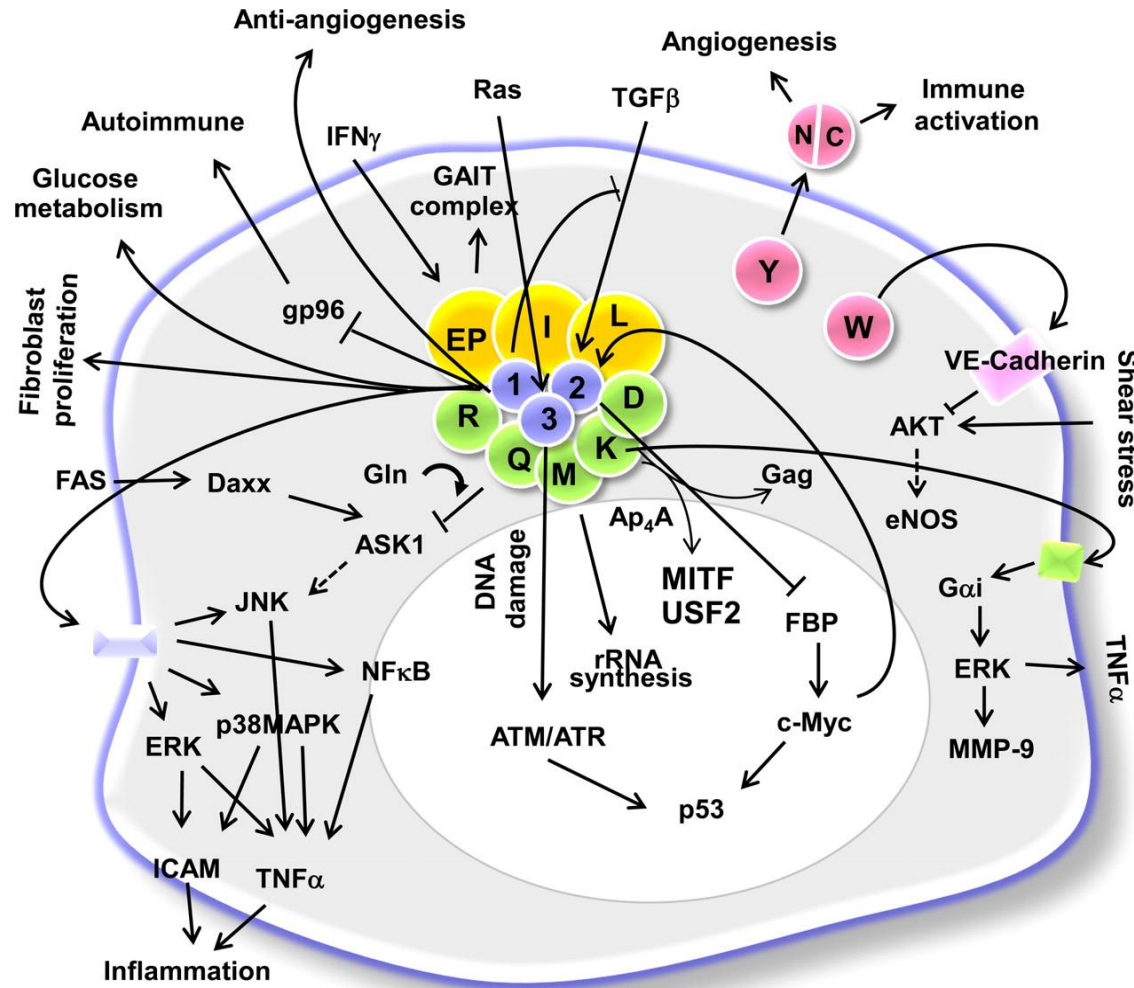
# **Аминоацил-тРНК-синтетазы их основные и дополнительные (неканонические) регуляторные функции**

У прокариотических и низших эукариотических организмов: Контроль трансляции, транскрипции собственных генов по принципу обратной связи, процессинг пре-мРНК (*E. coli* AlaRS - ингибирование транскрипции в области промотора; mt-LeuRS из дрожжей и mt-TyrRS *Neurospora crassa* – участие в процессинге собственных пре-мРНК).

Увеличение видов и степени сложности регуляторных неканонических функций APCаз у высших позвоночных и млекопитающих путем «наращивания» полипептидных цепей и «раскрытия» этих активностей в процессе частичного протеолиза фермента:

(1) регуляция метаболизма аминокислот (АК); (2) регуляция развития специфических органелл и тканей; (3) контроль процессов ангиогенеза и антиангиогенеза; (4) запуск или замалчивание воспалительных ответов; (5) контроль процессов апоптоза и стресс ответов с риском развития онкопроцесса; и (6) усиление или подавление иммунного ответа.

**Сигнальные маршруты APCаз млекопитающих. Девять различных APCаз (EP: глутамил-пролил-, I: изолейцил-, L: лейцил-, M: метионил-, Q: глутаминил-, R: аргинил-, K: лизил-, and D: аспартил-тРНК-синтетазы) образуют макромолекулярный комплекс с тремя неферментативными белковыми факторами (1,2,3).**

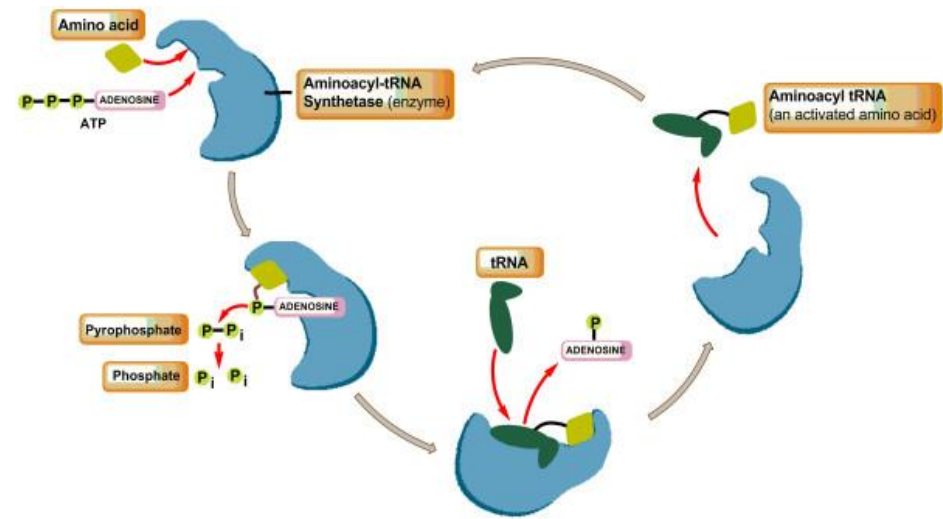
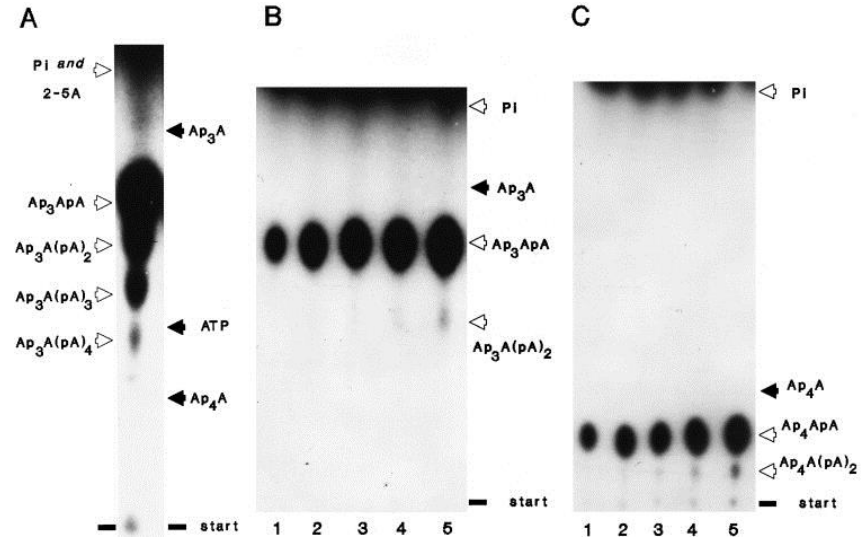


Park S G et al. PNAS 2008;105:11043-11049

PNAS

# Триптофанил-тРНК-синтетаза и ее основные и дополнительные (неканонические) регуляторные функции

- Этапы открытия важных неканонических функций ТРСазы:
- Нами установлено, что ТРСаза в присутствии L-триптофана,  $ATP-Mg^{2+}$  и  $ADP$  катализирует синтез  $Ap_3A$  через формирование промежуточного фермент-аденилатного комплекса.  $Ap_3A$  может вступать в обратную реакцию в качестве субстрата при образовании комплекса E- ( $Trp \sim AMP$ ) и дальнейшем ацилировании тРНК<sup>Trp</sup>
- В 1991 году группой авторов открыта мощная стимуляция экспрессии ТРСазы на уровне белка и мРНК при действии интерферона гамма.
- Нами ранее была показана суперэкспрессия ТРСазы в тканях ПЖ на уровне белка.
- Наконец в 2002-2004 гг. в лаборатории Шиммея была открыта важная функция пары АРСаз тирозил-тРНК-синтетазы (ТирПРСаза) и ТРСазы по контролю процессов ангиогенеза, причем ТирПРСаза модифицированная путем расщепления с С-конца обладала ангиогенным действием а ТРСаза, модифицированная отщеплением фрагмента в 20 кД с N-конца молекулы обладала мощным антиангиогенным действием.





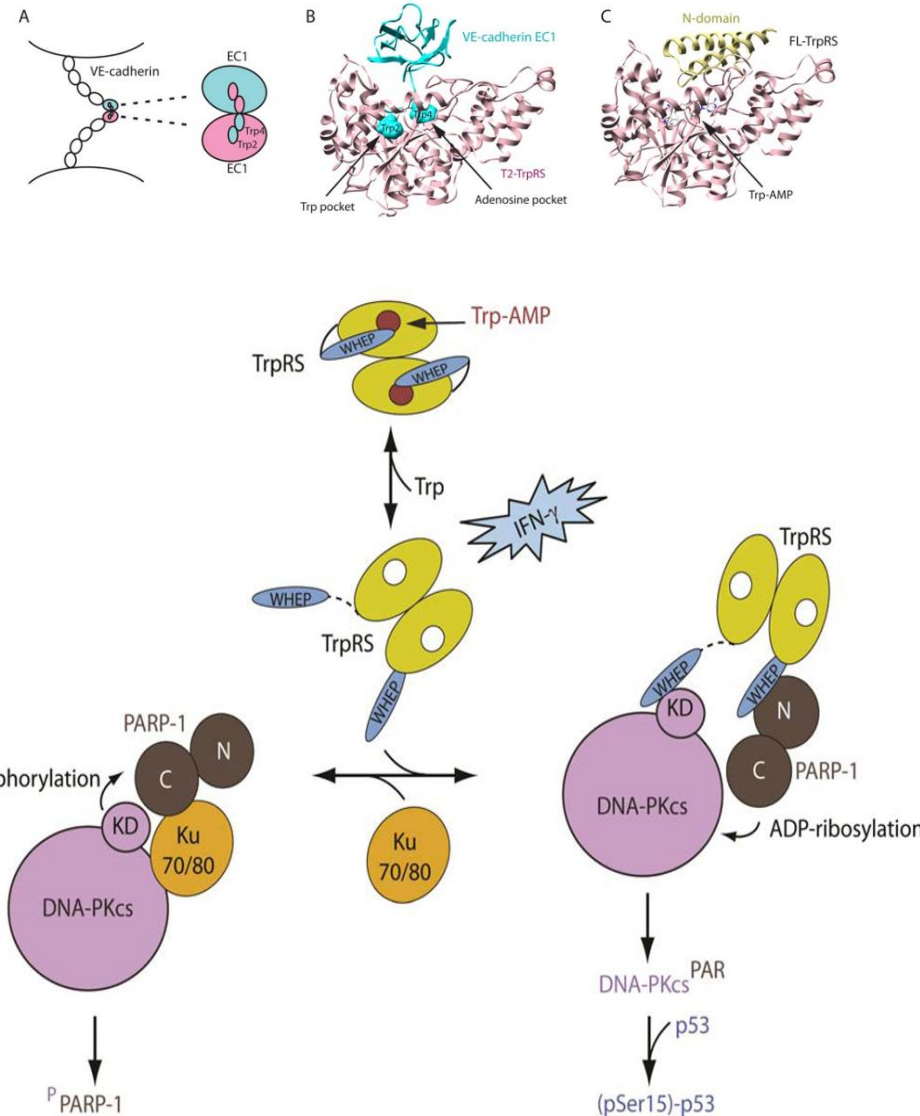
# Триптофанил-тРНК-синтетаза и ее основные и дополнительные (неканонические) регуляторные функции

## • Механизм антиангиогенного действия ТРСазы:

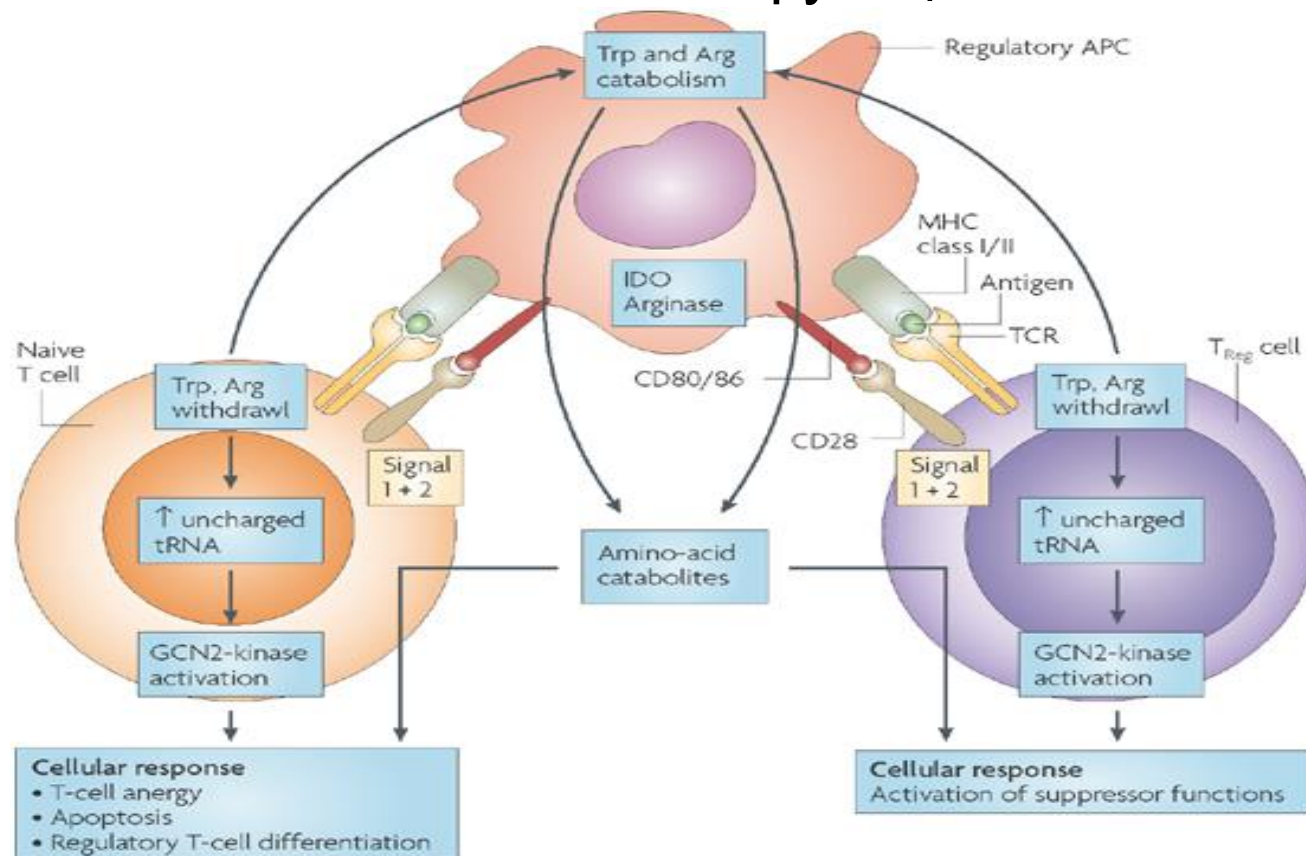
• Модифицированный N-концевой фрагмент ТРСазы ( $\text{TrpRS}^{\text{Act}}$ ) связываясь с VE-кадгерином, блокирует его дальнейшее критически важное участие в формировании новых сосудов, прочно связываясь с выступающими остатками триптофана EC1 доменов кадгерина. При этом ключевую роль играет открытый нами ранее эндогенный триптофан в соответствующем эффекторном участке ТРСазы.

• Возможная антионкогенная функция ТРСазы была открыта относительно недавно (2004).

• Картина иллюстрирует важную функцию ТРСазы в ядре. В отсутствие ТРСазы в ядре, Ku70/80 выступает в качестве мостика между DNA-ПК и PARP-1 и ориентирует C-домен PARP-1 для фосфорилирования с DNA-ПКcs. В присутствии ТРСазы в ядре, Ku70/80 смещается при участии WHEP домена ТРСазы, образуя мостик между C-концевым киназным доменом DNA-ПКcs и N-доменом PARP-1. Далее TrpRS стимулирует модификацию DNA-ПКcs, а DNA-ПКcs киназа способствует фосфорилированию и активации фактора p53.



# Триптофанил-тРНК-синтетаза (ТРСаза) и ее противовоспалительная функция.



Nature Reviews | Immunology

Рис.1. Относительная

- ТРСаза в комплексе противовоспалительных реакций неспецифического природного иммунитета

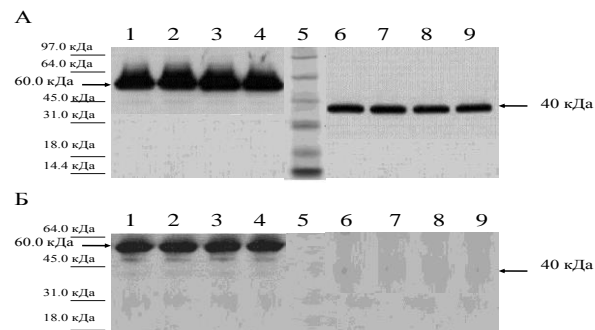
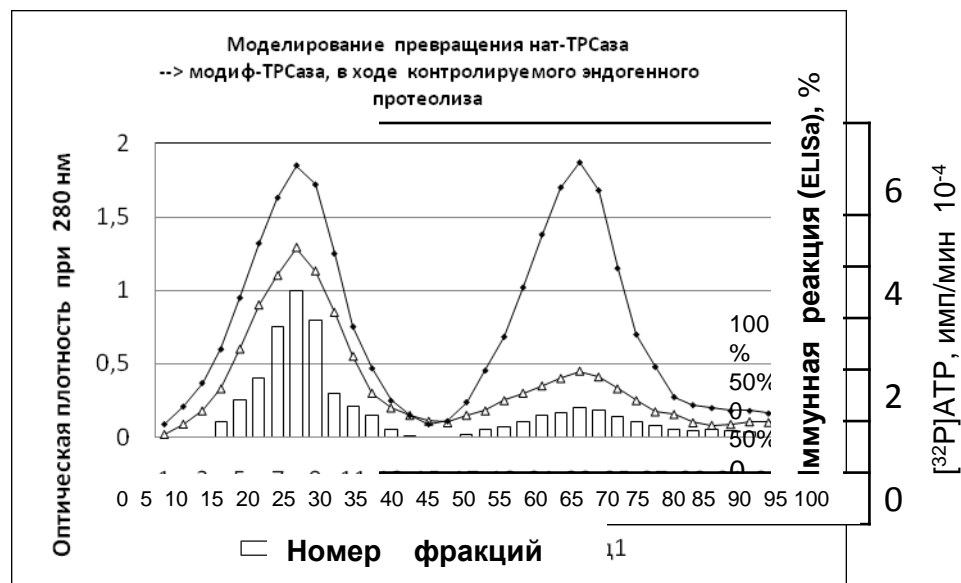
Альтернативный сплайсинг (АС), ограниченный протеолиз и пост-трансляционная модификация в регуляции биологических процессов: возможная роль в реализации канонических и неканонических функций ТРСазы

- **Основные положения:**
- **1. АС один из основных механизмов поступательной эволюции от одноклеточных к многоклеточным и, далее, к высшим формам организмов.**
- **2. Существует, однако, высокий риск переоценки функциональности АС, особенно, в случае человека [    ],**
- **3. Существует большая видовая специфичность АС (у растений интенсивнее, чем у животных), тканеспецифичность и даже специфичность на уровне отдельных белков [    ],**
- **4. Существуют строгие механизмы регуляции АС, а их нарушения приводят к патологиям, причем, АС часто является биомаркером важных распространенных патологий [    ],**
- **5. Существуют веские основания к поддержанию высокого уровня нативной формы ТРСазы и ограничения в нормальных физиологических условиях процессов АС и ограниченного протеолиза данного фермента.**

# Ограниченный протеолиз ТРСазы и эндогенный триптофан как важные факторы регуляции переключения функций ТРСазы

Основные положения:

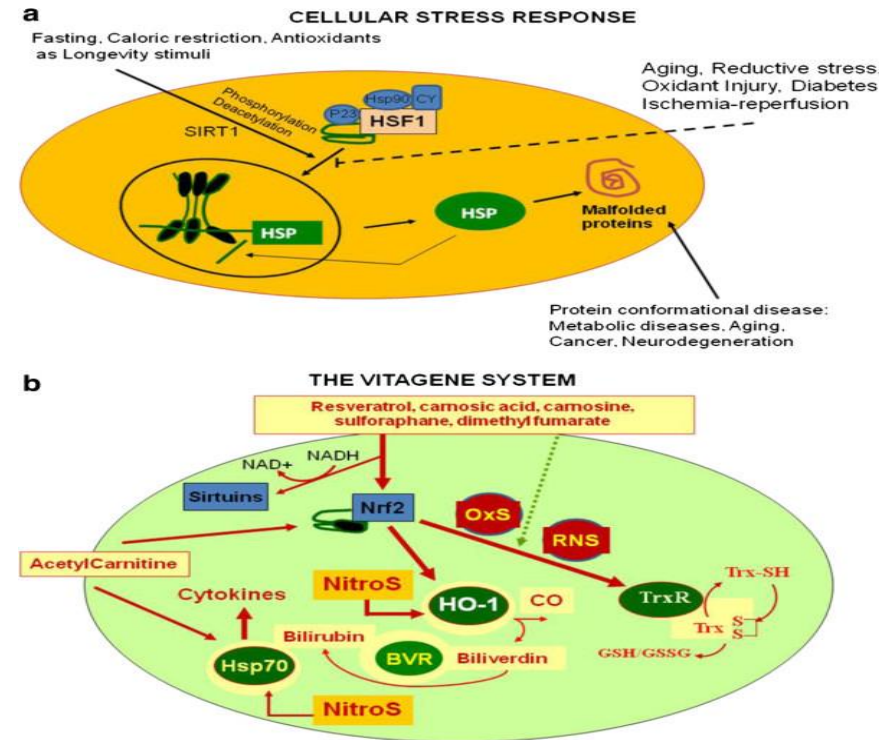
1. Неканонические функции ТРСазы играют важную защитную тканеспецифическую функцию – антиинфекционная, участие в регуляции функций антионкогенного фактора р53, участие в синтезе вторичного медиатора Ар3А, который стимулирует секрецию инсулина бетта-клетками ПЖ [ ];
2. Оптимизированная по сырью (ПЖ) процедура выделения ТРСазы, позволяла получать в соответствующих фракциях до 90% нативного белка в количествах существенно превышающих обычные выходы других внутриклеточных ферментов (до 1 грамма из – 2 кг железы);
3. Дополнительная модификация стандартной процедуры, заключающаяся в изменении стадии добавления ингибитора протеаз и изменении процедуры хроматографического разделения, позволила подтвердить важную (возможно, ведущую роль ограниченного протеолиза в регуляции канонических и неканонических функций ТРСазы.



# Концепция «гормезиса», роль «витагенов».

## Витагены и пути клеточного ответа на стресс

- Накопление дефектных белков в ответ на воздействия вредных факторов окружающей среды вызывает клеточный ответ на стресс (рис. а).
- HSPs , которые обычно связаны с HSF1 и поддерживают ее в подавленном состоянии перед воздействием стресса, удаляются вместе с поврежденными или неправильно свернутыми белками в результате активирова HSF- 1.
- Многоступенчатая активации HSF1 включает в себя множество пост-трансляционных модификаций, тримеризацию белкового фактора HSF1, транслокацию в ядро, и связываются с элементом теплового шока ( HSES) в промоторной области гена-мишени hsp.



Антиоксиданты , в том числе карнозин, ресвератрол, сульфорафан , диметилфумарат , способны активировать витагены - гем оксигеназа, Hsp70, тиоредоксинредуктаза и сиртуины которые представляют собой комплексную систему сопротивления клеточному стрессу. (рис. b)

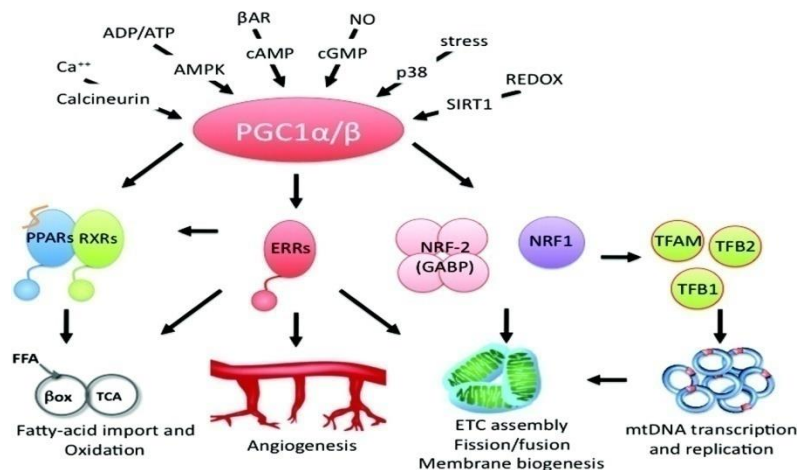
Активация витагенов указанными выше соединениями приводит к активации антиоксидантного маршрута в клетке и к состоянию адаптации к стрессу

# Актуальность

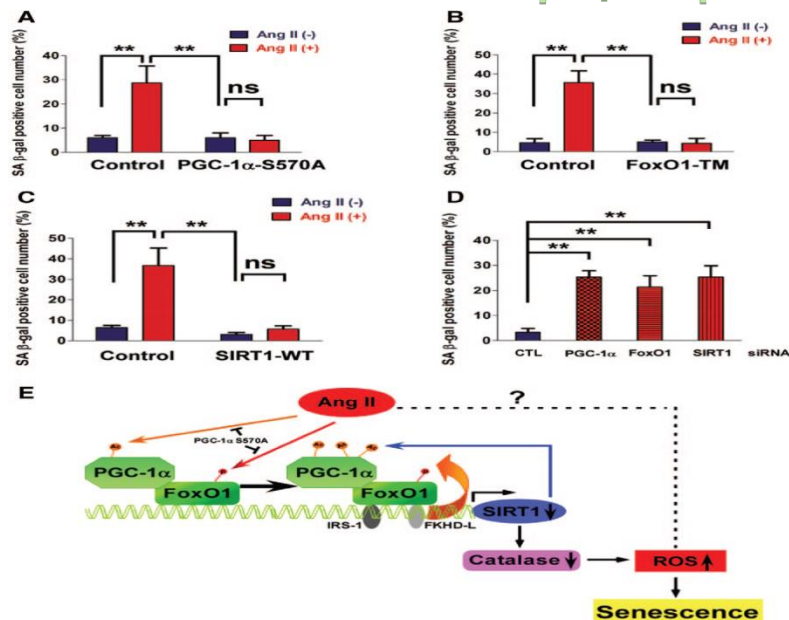
PGC-1 $\alpha$  является ключевым регулятором энергетического обмена в таких важных тканях как мышечная, нервная, печень, который осуществляется через коактивацию ядерных транскрипционных факторов генов биогенеза и функций митохондрий. Эффективный контроль биогенеза митохондрий критически важен для поддержания и тонкой регуляции уровня продукции энергии в форме АТФ, адаптивной реакции мышечной системы на тренировки, предотвращения эндогенного окислительного стресса и, в конце концов, для замедления старения организма.

# Роль PGC-1 alpha в клетке

- В связи с вышеуказанным, представлялось актуальным, поиск различных биологически активных соединений и препаратов, способных тканеспецифически активировать указанный ген на различных уровнях и, в зависимости, от выявляемых тонких механизмов активирующего действия препаратов, рекомендовать их для различных целей общей или специфической активации функций митохондрий и регуляции энергетического метаболизма в клетках, тканях и организме человека.



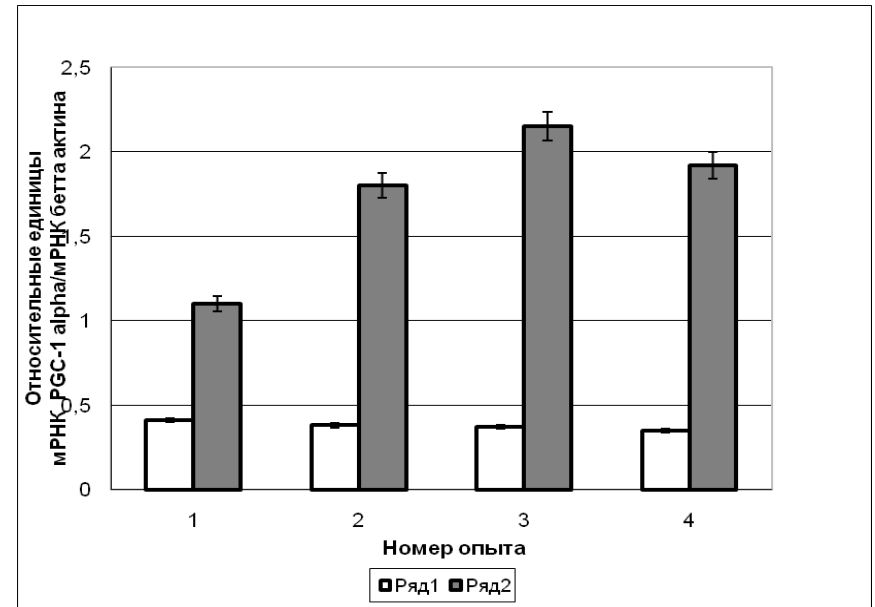
## ЯР – ядерные рецепторы



# PGC-1 alpha как биомаркер состояния мышечной системы и способа коррекции и терапии дисфункций мышечной системы

- Изобретение относится к медицинской биотехнологии и биотехнологии в спортивной медицине. Изобретение позволяет эффективно решать комплекс проблем по профессиональной ориентации и отбору в спорте, допуска к разным формам тренировочных занятий, планированию режимов двигательной нагрузки исходя из регистрируемого уровня физической подготовленности и состояния здоровья.

- Биологические образцы берутся методом биопсии из мышц бедра или неинвазивно методом соскоба эпителия ротовой полости. Ткани и клетки подвергают процедуре выделения препаратов РНК с применением набора «Yellow Solve». С использованием стандартных наборов с использованием гексануклеотидных затравок получают препараты кДНК, в которых с использованием специфических затравок и флуоресцентно меченых зондов проводят оценку экспрессии гена коактиватора PGC-1 alpha.



Эксперименты проводились на крысах линии Вистар массой 180-200 г. Животные получали раствор трекрезана из расчета 25 мг/кг массы внутрибрюшинно в течение 7-8 дней. Измерения проводили со 2-го дня через день. Динамическую работоспособность животных определяли в тесте принудительного плавания. После курса воздействия трекрезана и плацебо животных декапитировали. В образцах экспрессию гена PGC-1 alpha, измеряли методом РТ-ПЦР с использованием стандартных наборов и сконструированных с учетом экзон-интронной структуры гена специфических затравок и TaqMan флуоресцентных зондов.



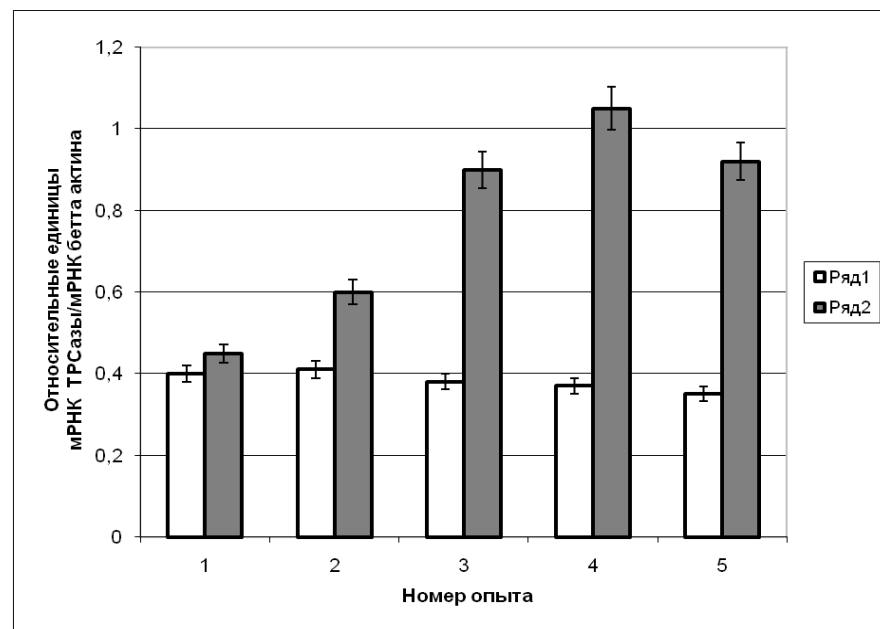
# Модуляция экспрессии мРНК ТРСазы в системе *in vitro* при действии иммуностимулятора и адаптогена -трекрезана

❖Комплекс регуляторных неканонических функций ТРСазы делает его перспективной мишенью терапевтического воздействия, как со специфической целью стимуляции антиангиогенных и, опосредованно, антиатерогенных и антионкогенных защитных реакций организма.

❖Другим аспектом проблемы является возможная важная роль ТРС азы в поддержании состояния гомеостаза или «гормезиса» в ответ на различный стрессовые воздействия внешней и внутренней среды.

❖Предполагаемый механизм тесного взаимодействия воспалительного процесса и противостоящих ему реакций гормезиса, приводит к состоянию динамического равновесия, воспринимаемому как состояние гомеостаза.

27.11.2013



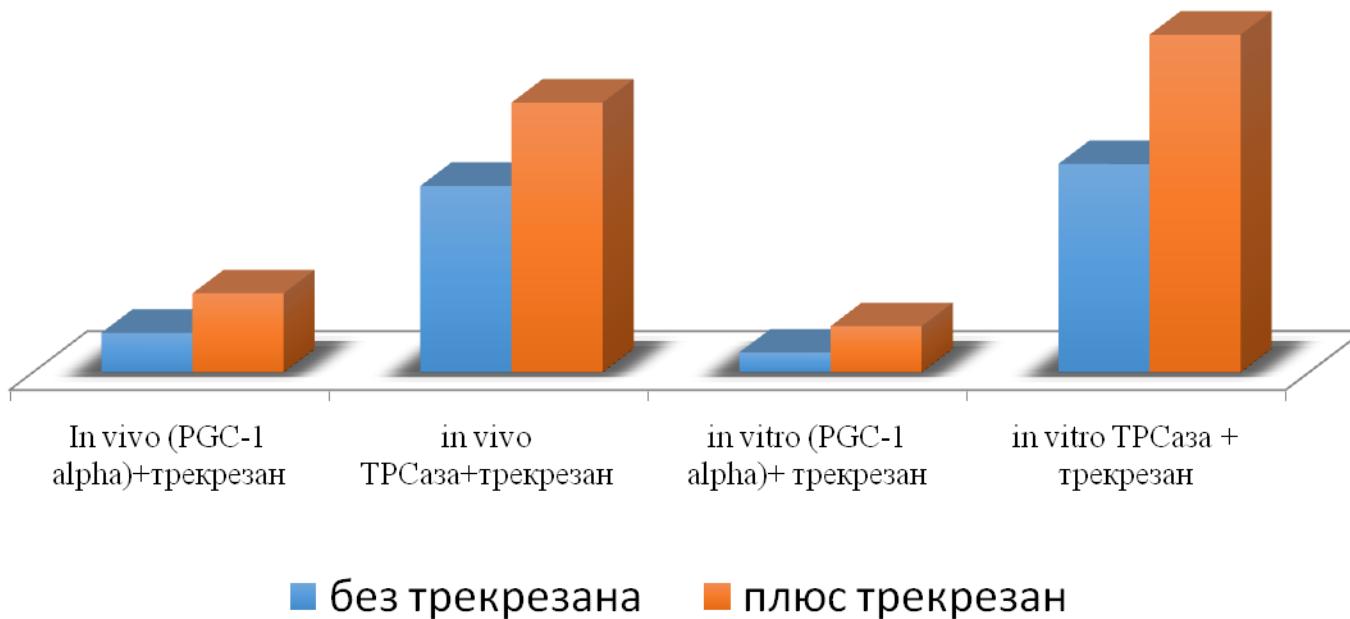
**Фиг.1. Экспрессия мРНК ТРСазы и влияние трекрезана на этот процесс.**

Экспрессию мРНК ТРСазы в культуре мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) человека после 1, 3, 6, 12 и 24 часов культивирования в присутствии - 20 мкг в мл препарата трекрезана и в его отсутствии, чистая культуральная среда.

Значения *P* менее 0,5 основаны на 3 независимых опытах.

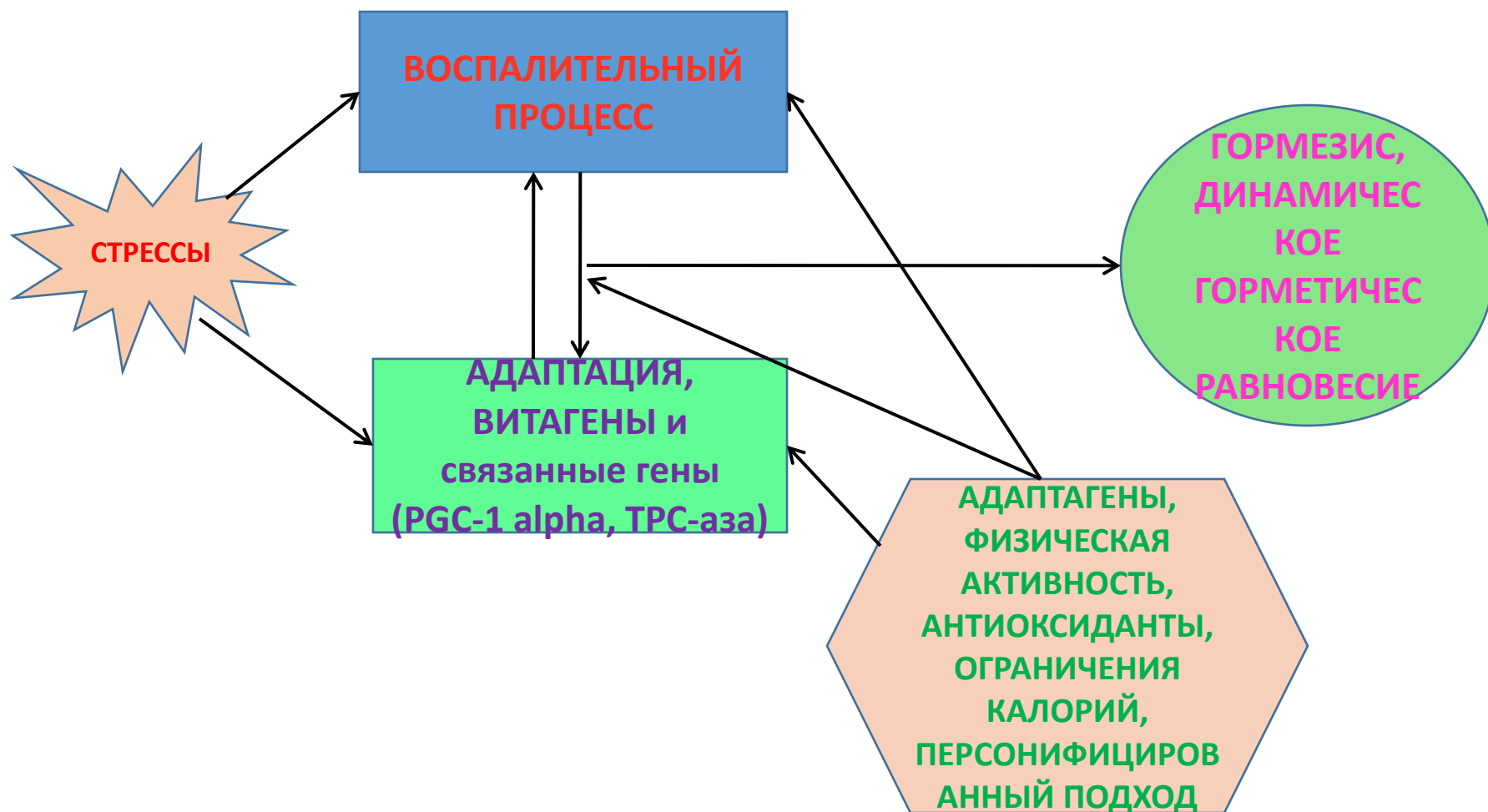
Показаны средние значения и стандартное отклонение.

# Конечный результат



- Сравнительный анализ экспрессии генов PGC-1 alpha и TPC-азы в системах *in vivo* и *in vitro* в отсутствии и в присутствии сильного адаптогена и иммуностимулятора трекрезана. Приводятся нормированные данные нескольких циклов экспериментов с использованием в качестве внутреннего контроля экспрессии проводимый в той же пробе анализ экспрессии домашнего гена бетта-актина.

# МАРШРУТЫ АДАПТАЦИИ К ВНУТРЕННИМ СТРЕССАМ И СТРЕССАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ЧЕРЕЗ МЕХАНИЗМЫ ГОРМЕЗИСА И ФУНКЦИЙ ВИТАГЕНОВ



# Выводы

- Проведен всесторонний анализ регуляторной роли генов TPC-азы и PGC-1 $\alpha$  в контроле метаболических процессов, а также роли генов в становлении процессов гормезиса и динамического горметического равновесия.
- В ходе работы были освоены, отработаны многие сложные методики белковой химии, молекулярной энзимологии, иммунохимии, полиморфного и экспрессионного анализа с использованием TagMap зондов и ПЦР в реальном времени, а также подходы к исследованиям сложных сетей управления метаболизмом клеток и тканей. Методики были успешно использованы для изучения тонких молекулярных механизмов переключения между каноническими аминокислотными функциями TPCазы и неканоническими функциями TPCазы
- Разработанные методики РТ ПЦР анализа позволили провести цикл экспериментов по изучению и сравнительному анализу экспрессии в системах *in vivo* и *in vitro* генов PGC-1 $\alpha$  и TPCазы.
- Исследованы пути модуляции активности указанных генов с применением адаптогенного и иммуностимулирующего препарата трекрезана с целью разработки подходов активации антиангиогенных, антиатерогенных и антионкогенных функций.
- Полученные результаты позволило выдвинуть концепцию не только важной роли указанных генов в каскадах защитных реакций организма, но и их взаимосвязанное участие в поддержании комплексных защитных реакций гормезиса в концертном взаимодействии с уже известными витагенами. Результаты позволяют высказать важную роль изученных генов и их продуктов в качестве биомаркеров при создании новых методик персонализированной медицины с учетом концепции гормезиса.