

## РЕПАРАЦИЯ БЕЛКОВ С УЧАСТИЕМ P1MT: МЕХАНИЗМ И ЗНАЧЕНИЕ

### Мини-обзор

© 2019 Р.К.К. Mishra\*, М. Mahawar

Division of Biochemistry, Indian Veterinary Research Institute,  
Izatnagar, Bareilly, Uttar Pradesh, India, 243122;  
E-mail: prasantmodel@gmail.com

Поступила в редакцию 25.07.2018

После доработки 18.12.2018

Принята к публикации 29.12.2018

Известны различные ковалентные модификации аминокислотных остатков белков. Однако было идентифицировано лишь несколько ферментов, восстанавливающих аминокислотные остатки до исходного состояния. Фермент P1MT (L-изоаспарат (D-аспарат) O-метилтрансфераза), также известный как PCMT (L-изоаспартил/D-аспартилметилтрансфераза карбоксильных групп белка), метилирует ковалентно модифицированные остатки изоаспартата (iso-Asp). Остатки iso-Asp накапливаются в белках в результате деаминации остатка аспарагина (Asn) или при гидролизе остатка аспарагиновой кислоты (Asp). Эта реакция протекает в цитоплазме, и в ходе этой реакции образуется промежуточный продукт – сукцинимид. Затем эта циклическая молекула снова превращается как в iso-Asp, так и Asp. Превращение сукцинимид в аспарат происходит спонтанно, в то время как восстановление iso-Asp осуществляется с помощью фермента P1MT с использованием S-аденозилметионина (SAM) в качестве донора метильной группы. P1MT превращает сукцинимид обратно в iso-Asp и, таким образом, создает условия для дальнейшего превращения в аспарат. Кроме нормальных физиологических условий, повышенное образование остатков iso-Asp в белках могут вызывать различные стрессовые факторы. Образующиеся остатки iso-Asp могут формировать петли или изгибы (повороты) в полипептидном остове, вызывая изменения конформации и функционирования белков. Показано, что в различных эукариотических клетках, а также и в некоторых прокариотических клетках присутствуют многочисленные белки, которые взаимодействуют с P1MT (у этих белков есть остатки iso-Asp). Кроме того, обширные исследования, проведенные на мышах, показали важность этого белка при нейродегенеративных условиях. Детальное изучение функций P1MT может создать платформу для борьбы с такими заболеваниями, как болезнь Альцгеймера и рак.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** L-изоаспарат (D-аспарат) O-метилтрансфераза, изоаспарат, S-аденозилметионин, сукцинимид.

DOI: 10.1134/S0320972519050014

Метилирование белка – это сложный и разнообразный процесс [1]. Значение метилирования белка, а также его роль в регуляции генов и передаче сигналов в настоящее время хорошо известны [2]. Во многих белках были выявлены метильные производные различных аминокислот естественного происхождения. Так, было показано, что белок жгутиков *Salmonella typhimurium* [3] и гистоновые белки тимуса содержат ε-N-метиллизин [4]. Также было показано, что в миозине камбаловидной мышцы кошки [5], ак-

тине амебы [6] и среди свободных аминокислот в моче человека [7] присутствует ε-N-диметиллизин. Миозин и актин скелетной мышцы кролика содержат 3-N-метилгистидин [8, 9]. Было также показано, что в овальбумине селезенки телят [10] присутствуют остатки карбоксиметиласпарагиновой кислоты. Кроме того, следует отметить, что метилирование аминокислотных остатков в белках происходит после образования пептидной связи, и этот процесс играет важную роль в физиологии клетки [11]. Ферменты, ответственные за метилирование белков, образуют обширный класс и обозначаются как метилтрансферазы белков (PMT – protein methyl transferase) [12]. По-видимому, во всех живых организмах почти 2% генов кодируют метилтрансферазы. Этот класс белков включает

Принятые сокращения: iso-Asp – изоаспарат (isoaspartate); P1MT – L-изоаспарат (D-аспарат) O-метилтрансфераза (L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase); SAM – S-аденозилметионин (S-adenosyl methionine).

\* Адресат для корреспонденции.

в себя значительное количество ферментов, использующих белок в качестве субстрата [13]. Метилтрансферазы белков (PMTs) подразделяются на три класса на основе их предпочтений относительно аминокислотных остатков, подвергающихся метилированию (Arg, Gln/Asp и Lys соответственно). В качестве донора метильной группы эти ферменты используют S-аденозилметионин (SAM) [13]. В последнее время были получены доказательства, которые существенно расширили понимание функционирования этих ферментов, как, например, вопросы, касающиеся их роли в эпигенетической регуляции посредством модификации гистоновых концевых участков, и в проявлении таких видов активности, как сенсорная адаптация бактерий к воздействию химических стимулов, ответы клеток на стресс, клеточное старение, репарация белков и реактивация некоторых из них [14–18]. Так, белки PCMT осуществляют репарацию остатков iso-Asp в белках с образованием остатков аспарагиновой кислоты. Поэтому они также известны как изоаспаратметилтрансферазы белков (PIMT – protein isoaspartate methyltransferase). К настоящему времени распространенность белков PIMT и их роль в репарации белков достаточно хорошо изучены. В данном обзоре обсуждаются последние достижения в области изучения структуры и функций этих ферментов.

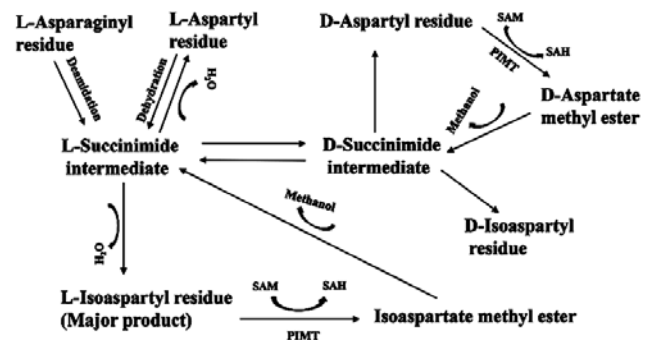
### ОБРАЗОВАНИЕ ИЗОАСПАРТАТА И ЕГО ПОСЛЕДСТВИЯ

Образование остатков iso-Asp происходит в результате деамидирования или дегидратации аспарагиновой кислоты. Хотя и не всегда, но такая рацемизация является спонтанным физиологическим процессом, и обращение этого процесса с возвращением белка в его нативное состояние ускоряется ферментом PIMT [19].

**Образование iso-Asp (и D-Asp).** Этот процесс представляет собой межмолекулярную реакцию перераспределения, протекающую при различных физиологических условиях, минуя стадию промежуточного продукта (сукцинимид), с образованием изомеризованных остатков L-iso-Asp (рис. 1) [20]. Как правило, консенсусная последовательность Asn/Asp-Gly/Ser благоприятствует деамидированию и образованию остатков iso-Asp [21]. Следует отметить, что в пептидах остатки аспарагина в 10 раз более подвержены деамидированию, чем остатки аспарагиновой кислоты. В то же время в случае белков остатки аспарагиновой кислоты являются более лабильными, чем остатки аспарагина [22, 23]. Было также

установлено, что у *E. coli* связывание аспартил-ТРНК с остатком L-Asp иногда происходит с участием  $\beta$ -COOH-, а не  $\alpha$ -COOH-группы [24]. Этот механизм имитирует тривиальный путь включения аминокислот в полипептидную цепь. У многих короткоживущих белков, таких как мембранные белки эритроцитов человека (RBCs – red blood cells) и стареющие белки, остатки D-Asp образуются вследствие деамидирования белка. Кроме того, происходит спонтанное образование D-сукцинимида из L-сукцинимида. D-сукцинимид может снова превратиться в L-сукцинимид или же может образовать структуру D-Asp/D-iso-Asp. В свою очередь, D-Asp может подвергнуться метилированию с помощью фермента PIMT с образованием исходного остатка L-Asp (рис. 1) [25]. Это предотвращает накопление в организме аномального D-стереоизомера.

**Iso-Asp вызывает конформационные изменения в белке.** Для нормального функционирования белка необходимым условием является целостность его структуры и конформационная стабильность. Но во многих случаях различные необычные аминокислотные остатки, такие как окисленный метионин или изоаспарагиновая кислота, могут внести хаос в структурную иерархию белка, тем самым ставя под угрозу его функционирование [26, 27]. Подробное описание различных повреждений белков и их последствий приведено в работе Chondrogianni et al. [27]. В присутствии измененного остатка аспартата можно наблюдать изменения конформации или



**Рис. 1.** Репарация L-iso-Asp ускоряется белком PIMT: метилирование остатков L-iso-Asp и D-Asp увеличивает скорость их превращения в L-сукцинимид и D-сукцинимид соответственно. Будучи промежуточным продуктом, сукцинимид спонтанно превращается обратно в L-Asp, таким образом продолжая цикл. Количественное определение высвобождающегося метанола во время реакции является важным способом измерения активности PIMT. Хотя только 25% сукцинимида обратно превращаются в исходную форму аспартата, тем не менее циклическая реакция приводит к полному восстановлению исходного остатка. Адаптировано и представлено с доработками исходного рисунка из статьи Furuchi et al. [100]

образование изгибов в пептидном остове белка (рис. 2). Приставка «изо» используется для обозначения пептидной связи, образованной с участием групп, отличных от  $\alpha$ -амино- и -карбоксильной групп аминокислоты. Остаток аспартата содержит две  $\text{COOH}$ -группы, в то время как в аспарагине имеются две  $\text{NH}_2$ -группы (т.е.  $\beta$ -группы). Эта  $\beta$ -группа ответственна за пептидную связь в измененной структуре. Структурно остаток iso-Asp содержит внешний атом углерода в пептидном остове и аномальную карбоксильную боковую цепь. Этот дополнительный остаток вызывает значительное нарушение характерных для белка вторичных и третичных структур [28].

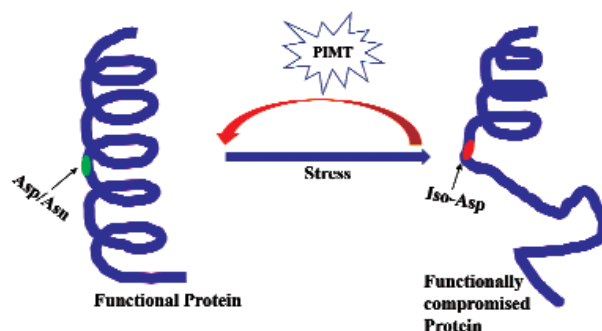
**Идентификация остатков iso-Asp в белках и пептидах.** Аспаратат и изоаспаратат являются структурными изомерами, что не позволяет различить их по массе [29]. Такие ограничения могут быть преодолены с помощью химических и ферментативных методов, включая определение гидразина [30], методы масс-спектрометрии MALDI-TOF MS [31], ESI MS [32] и метод ECD (electron capture dissociation, диссоциация захвата электронов) MS [33]. Другой подход, с помощью которого можно отличить остаток аспарагина от изоаспарагиновой кислоты, заключается в использовании свойств Asp-N – эндопротеазы, специфичной для остатка аспарагина; iso-Asp затем можно будет обнаружить с использованием метода диссоциации переноса электронов [34]. Остатки iso-Asp также можно идентифицировать путем включения изотопов  $\text{O}^{18}$  в нужный пептидный остов на стадии гидролиза с последующим его метилированием с использованием белка PIMT. Далее изменение массы белка на 2 Да может быть обнаружено с помощью масс-спектрометрии и использовано для количественного определения содержания остатков iso-Asp [35].

**Факторы, влияющие на образование iso-Asp.** Помимо спонтанного преобразования, также наблюдалось вызванное стрессом ускорение образования iso-Asp. Факторы, такие как температура, оксиданты и экстремальные значения pH, которые могут привести к денатурации полипептида и нарушению конформации белка, делают измененный белок более уязвимым для повреждений его ковалентной структуры, таким как деамидирование и рацемизация [36–40]. Было показано, что в условиях *in vivo* и *in vitro* накопление в белке остатков L-iso-Asp зависит от pH среды [40]. При значениях pH от нейтральных до щелочных образование остатков iso-Asp в белке значительно увеличивается [37]. Также было показано пропорциональное увеличение содержания L-iso-Asp в зависимости от темпе-

ратуры в бактериальном белке HPr [39]. Очевидно, что воздействие органического растворителя, такого как метанол, и адаптация к стационарной фазе способствовали образованию iso-Asp у прокариот [40]. Lyon et al. недавно показали, что белок, склонный к образованию iso-Asp, располагается в кристаллине человека, для которого характерно присутствие непрерывного участка, образованного остатками аспарагина. Кроме того, установлено, что предпочтительность  $\alpha$ -варианта по сравнению с  $\beta$ -кристаллином в большей степени обусловлена обилием в его структуре аспарагин-содержащих участков [41].

## БИОХИМИЯ PIMT

**Нуклеофильная атака пептидным остовом инициирует восстановление измененных остатков Asn/Asp.** Восстановление измененного остатка Asn/Asp начинается с нуклеофильной атаки пептидного азота на карбонильный углерод аспарагина или карбоксилатный углерод остатка аспарагиновой кислоты. В любом случае это приводит к образованию неустойчивого циклического промежуточного продукта – сукцинимиды. Этот промежуточный продукт имеет две карбонильные группы, которые подвержены гидролитическому расщеплению и определяют судьбу образования iso-Asp. Гидролиз по одной карбонильной группе приводит к образованию нативного остатка Asp, в то время как другая группа формирует искривленный остаток iso-Asp [21]. При этом образуется значительное количество iso-Asp и минимальное количество Asp. Эмпирическое соотношение между восстановлением нативного остатка (т.е. Asp) и образованием iso-Asp составляет 1 : 3 [42] (рис. 1). Инкубация синтетических пептидов, содержащих L-iso-Asp, с PIMT и SAM приводила к восста-



**Рис. 2.** Остатки iso-Asp инактивируют белок. PIMT репарирует такие остатки и помогает белку восстановить свою функцию.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

новлению ~50% остатков до L-Asp. Это можно объяснить тем, что метилирование остатков L-iso-Asp ускоряет образование сукцинимиды по сравнению с неметилованными остатками L-iso-Asp и L-Asp [22]. Это циклическое восстановление и образование необычного остатка продолжается до тех пор, пока полипептидный остов не вернется к своей нормальной конформации.

**Структурные и каталитические свойства PIMT.** В белке PIMT можно выделить три субдомена [21], из которых центральный субдомен является консервативным и напоминает (за исключением топологических связей) S-аденозилметионин-зависимые метилтрансферазы. Оптимальный контур этого белка обеспечивает подходящую среду для осуществления реакции переноса метильной группы [43]. Активный сайт этого энзима выстлан  $\beta$ -складчатой структурой, богатой остатками серина и треонина. Эти гидрофильные аминокислоты облегчают образование водородной связи, которая определяет взаимодействие с остатками iso-Asp, проявляя таким образом склонность фермента в отношении его субстрата. Процесс связывания и активный сайт PIMT были тщательно изучены у *T. maritime*. Было показано, что при этом образуется один сайт связывания остатка iso-Asp. У человека, напротив, в структуре PIMT выявлены четыре связывающих участка для остатков iso-Asp [25, 44]. Было отмечено, что в структуре PIMT человека три погруженных заряженных остатка отвечают за катализ и связывание с S-аденозилметионом [45, 46].

Этот фермент показывает два уникальных исключения из традиционных каталитических процессов. Предполагается, что в отличие от обычных ферментов, PIMT проявляет свою активность без образования каких-либо ковалентных промежуточных структур. Хотя для проявления его активности необходим S-аденозилметионин как донор метильных групп, в то же время нет данных о необходимости наличия кофакторов, таких как ионы металлов. Атом кислорода в изоаспартил- $\alpha$ -карбоксилатной группе является очень сильным нуклеофилом, и он достаточен для катализа опосредованного трансферзой превращения [21].

На примере S-аденозилгомоцистеина (SAH) было показано, что у *Vibrio cholerae* за связывание молекулы субстрата в активном центре отвечает участок из 19 а.о. (39–58 а.о.). Энергия связывания субстрата была первично рассчитана с использованием пептидного остова PIMT. Для синтетического пептида, содержащего iso-Asp, константа ассоциации составляла  $2,29 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . PIMT из *V. cholerae* обладает активностью, со-

поставимой с активностью у термофильных бактерий и являющейся более высокой, чем у *E. coli* [47]. Проведенный анализ *in silico* позволил получить данные касательно деталей связывающего окружения. Оказалось, что карбоксильная группа в составе  $\alpha$ - и  $\beta$ -изомеров D- и L-аспарагиновой кислоты связывается с одним и тем же участком в PIMT. В этой же работе также была продемонстрирована возможность распознавания подходящего субстрата с помощью компьютерных методов [48]. Структура белка PIMT дрожжей отличает его от бактериальных аналогов. C-Концевой домен в этом белке отходит на  $90^\circ$ . Это создает открытую форму активного участка, что увеличивает доступ растворителя внутрь активного центра [49]. У дрожжей сайт-направленный мутагенез определил остаток Ser60 в качестве ключевого игрока при катализе, т.к. его замена на остатки треонина или глутамина отменяла метилирующую активность этого фермента. Также было подтверждено отсутствие остатков цистеина вблизи активного участка, что отличает этот фермент от других цистеин-содержащих протеаз, таких как каспазы, для которых показано взаимодействие с остатками аспарагиновой кислоты [21].

Структуры белков напрямую связаны с их функциями. Недавно была продемонстрирована такая корреляция между последовательностью аминокислот и функцией PIMT. Однонуклеотидные полиморфизмы PIMT человека, такие как L191S и A150V, приводили более чем к 50%-ному снижению активности нативного фермента [50].

Детальное исследование кинетики PIMT из мозга быка было проведено Johnson и Aswad [28]. Они использовали синтетический пептид YAGGiso-DASGN и определили для него значение  $V_{\max}$  как равное 32–34 нмоль/мин на 1 мг белка. В этой работе также было предположено, что метилирование белка с помощью PIMT прямо пропорционально и показывает линейную зависимость с таковым для субстрата, таким образом, позволяя классифицировать катализ по последовательному «bi-bi»-типу.

**SAM: донор метильной группы для реакции, катализируемой PIMT.** Полученные экспериментальные данные позволили установить, что S-аденозилметионин (SAM/AdoMet) является единственным донором группы углерода в виде метильной группы во всех опосредованных PIMT реакциях [42]. Кроме того, сродство к нему остается неизменным для разных типов организмов [51]. При этом одним из методических подходов является метод диффузии метанола, хотя несомненным эталоном является метод переноса радионуклида. В большинстве подобных

экспериментов использовался S-аденозилметионин, меченный тритием. Перенос метки подтверждался на восстановленных остатках аспартата. Интересно, что S-аденозилгомоцистеин (продукт S-аденозилметионина, образующийся при катализе P1MT) конкурентно ингибирует связывание S-аденозилметионина с P1MT.

**P1MT не обладает абсолютной стереоспецифичностью.** P1MT может взаимодействовать со стереоизомерами (такими как формы L-iso-Asp и D-Asp соответствующих аминокислот) и метилировать их. Но до сих пор нет сообщений о взаимодействии с D-iso-Asp и L-Asp. У прокариот P1MT нацелена исключительно на L-iso-Asp [21]. В то же время у млекопитающих D-Asp также может быть субстратом для фермента в дополнение к рацемизированному аналогу. В таком случае репарация приводит к преобразованию остатков D-Asp в L-Asp [25]. Эффективность этих путей зависит от сродства P1MT к D-Asp [20]. Различное сродство фермента к стереоизомерам субстрата подтверждается экспериментами, в которых белки мембраны эритроцитов больных уремией с недостаточным уровнем метилирования имели более низкие уровни содержания остатков D-iso-Asp, что могло быть вызвано сниженной активностью P1MT у этих пациентов [52]. Четыре изоформы аспартата, а именно D-Asp, D-iso-Asp, L-Asp, L-iso-Asp, отличаются друг от друга только по ориентации их атома азота в изопептиде. Таким образом, вполне возможно, что P1MT предпочитает, чтобы атом N оставался позади плоскости, как в случае L-iso-Asp и D-Asp [20].

**Методы измерения активности P1MT.** Для измерения активности P1MT было предложено несколько методов, основанных на переносе метки, диффузии метанола и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC, ВЭЖХ) [47, 53]. Химические методы определения менее чувствительны, в то время как методы, основанные на ВЭЖХ, требуют наличия высококлассных приборов, обученного персонала, сложных систем мониторинга и анализа данных [54]. Метод с использованием радиоактивной метки также имеет некоторые недостатки. К ним относятся такие аспекты, как надлежащие экспериментальные установки, утилизация отходов, наличие обслуживающего персонала, опасность для здоровья и токсичность для окружающей среды [55]. В настоящее время большая часть радиоактивных химических анализов заменена методами анализа, в которых используются флуорогенные соединения. Флуоресцентная эмиссия связана с большими структурными изменениями в молекуле химического субстрата, вызываемыми такими реакциями, как, напри-

мер, гидролиз [56]. Однако во время переноса метильной группы структурные изменения незначительны, поэтому флуоресценцию наблюдать затруднительно. В этом заключается причина ограниченного использования флуорогенных субстратов для таких ферментов.

Тем не менее недавно был разработан метод флуорогенного определения активности P1MT [57], в котором используются P1MT и каспазы-3 (протеазы, содержащие остаток аспарагиновой кислоты). Как правило, каспазы-3 распознают пептидные мотивы D<sub>1</sub>XXD<sub>2</sub> и расщепляют расположенную по соседству пептидную связь. Kimura et al. получили два различных флуорогенных пептида, исходя из следующих положений.

1) Остаток D<sub>1</sub> в D<sub>1</sub>XXD<sub>2</sub> был заменен на остаток изоаспартата. Ожидалось, что после репарации с помощью P1MT остаток Asp будет восстановлен, и затем пептид будет расщеплен каспазой-3. В результате произойдет испускание флуоресценции, которое можно измерить количественно. Однако этот подход не дал ожидаемых результатов.

2) Другая стратегия была основана на предположении о том, что отрицательно заряженный остаток в положении P<sub>1</sub> предотвращает расщепление каспазой-3. После метилирования заряд нейтрализуется, происходит расщепление пептида, и наблюдается флуоресценция (рис. 3). С помощью этого подхода Kimura et al. разработали высокоэффективный метод определения различных ингибиторов P1MT.

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ P1MT СРЕДИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ, СОХРАНЕНИЕ ЕЕ ПЕРВИЧНОЙ И ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ В ХОДЕ ЭВОЛЮЦИИ

P1MT играет важную роль в восстановлении нативной структуры белка, катализируя превращение остатка iso-Asp в Asp. Согласно аннотации, этот фермент обозначается как EC-2.1.1.77 и в широком смысле относится к семейству трансфераз [20, 58, 59]. В связи с участием этого белка в восстановлении структуры денатурированных белков он также входит в семейство белков-шаперонов [60]. Установлено, что этот фермент широко распространен среди различных организмов, как про-, так и эукариот [61, 62]. В настоящее время (до декабря 2018 г.) в базе данных UniProt насчитывалось > 15 тыс. последовательностей P1MT различных видов (таблица). Более того, принято рассматривать его как высококонсервативный белок благодаря высокой степени гомологии последовательности у раз-

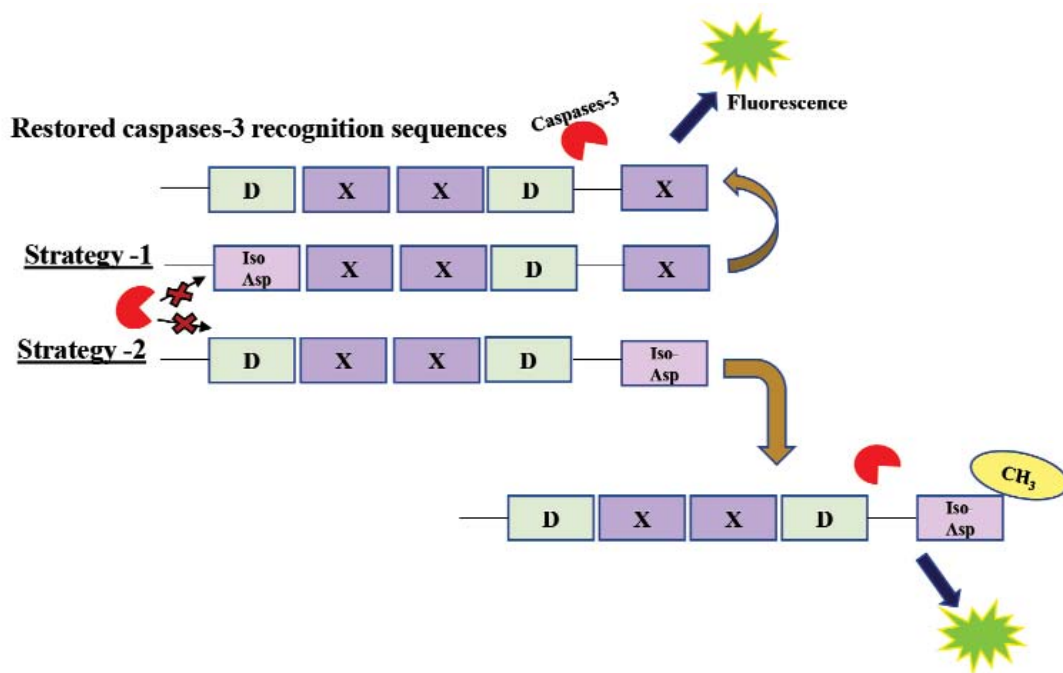


Рис. 3. Флуориметрический способ измерения активности PIMT.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

личных видов. При сравнении аминокислотных последовательностей нами было обнаружено, что PIMT человека на 96% идентичен PIMT мыши. Степень идентичности составила 83,8% при его сравнении с PIMT *Danio rerio*. Далее следуют PIMT дрозофилы и кишечной палочки со степенью идентичности, равной 53,8 и 30,3% соответственно. Кроме того, структурное сходство между PIMT из *E. coli* и PIMT человека было проанализировано *in silico*, результаты представлены на рис. 4. Также есть сообщения о PIMT, обнаруживаемых в клетках эубактерий и архей [52]. Clarke и Li в 1998 г. подтвердили на различных бактериальных экстрактах широкое распространение этого фермента среди  $\gamma$ -ветви грамотрицательных бактерий [63].

PIMT в основном кодируется одним геном, но были зарегистрированы несколько исключений, как в случае *Archaeoglobus fulgidus* [64] и *Arabidopsis thaliana* [65], для которых сообщается о кодировании PIMT более чем одним геном. Хотя у эукариот в гене присутствуют интроны, кодирующие области отличаются относительной консервативностью. Профиль экспрессии этого фермента у разных организмов различен. Как у бактерий, так и у животных экспрессия PIMT является конститутивной, но у растений экспрессия регулируется сложным образом и контролируется гормонами, факторами развития и окружающей среды [66, 67]. L-Изоаспартилметилтрансфераза существует в качестве мономера в цитозольной фракции клетки [20, 68, 69],

хотя у некоторых эукариот этот фермент также связан с клеточной мембраной.

Согласно недавнему исследованию Juang et al. [70], всего было выявлено 15 вариантов PIMT человека. В этой работе изучалось влияние замены одной аминокислоты среди различных вариантов фермента, и был сделан вывод, что мутация в позиции 36 (от R до C) инактивировала фермент. Такие варианты аминокислотных замен, как A7P и I58V, приводили к различным изменениям ферментативной активности в сравнении с ферментом дикого типа. Замена Glu на Arg в положении 175 вызывала агрегацию белка, а замена остатка Arg в положении 17 на остаток His или Ser делала этот белок термолабильным. У человека PIMT с изолейцином в положении 119 доминирует среди азиатов/африканцев. Эта изоформа отличается более высокой (на 20%) удель-

Количество различных последовательностей PIMT (EC-2.1.1.77), представленных в базе данных UniProt по состоянию на декабрь 2018 г.

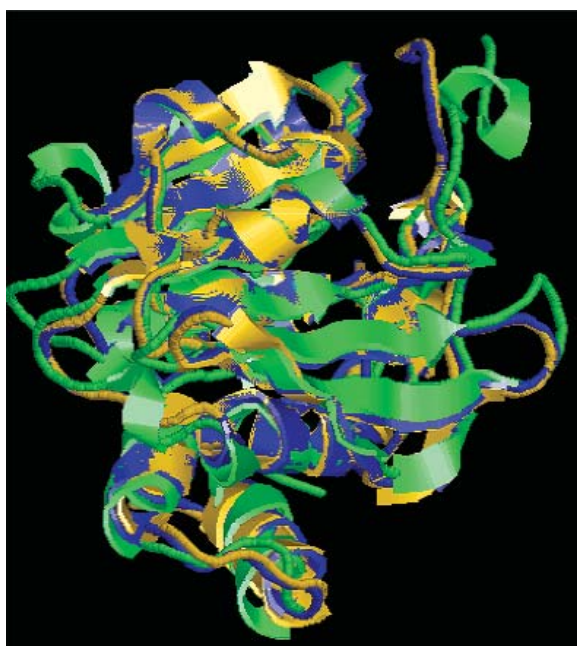
Таксон	Число последовательностей
Бактерии	13 434
Археи	713
Эукариоты	1125

Примечание. Неклассифицированные последовательности в подсчет не включались.

ной активностью, чем другой вариант PIMT с остатком Val в том же положении. Интересно, что вариант фермента с остатком Val показал на 30% большее сродство к эндогенному субстрату в головном мозге. Но изолейциновый вариант PIMT обладает большей гибкостью и большей склонностью к образованию солевого мостика вблизи места связывания субстрата [59, 71].

## ФИЗИОЛОГИЯ

**Роль PIMT.** Все больше данных, полученных при изучении различных видов, свидетельствуют об участии PIMT в восстановлении стационарной фазы, при старении, окислительном стрессе и выживании бактерий в условиях теплового стресса. В эксперименте PIMT способствовала повышению степени выживаемости клеток *E. coli* при старении и стрессе, вызванном действием метанола и параквата [14]. Был продемонстрирован вклад этого фермента в выживаемость штамма *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) с ослабленной вирулентностью, у которого этот фер-



**Рис. 4.** Данные, касающиеся структуры PIMT человека и *E. coli*, были получены из базы данных PDB (ID-1KR5 для PIMT человека и 3LBF для PIMT *E. coli*). Элементы структуры были наложены друг на друга и проанализированы на совпадение с помощью программы PDBeFold [101]. Установлено, что элементы вторичной структуры (SSEs – secondary structural elements) сходны на 83% при значении среднеквадратичного отклонения (RMSD), равном 1,374. PIMT человека показан зеленым цветом, а PIMT из *E. coli* – желтым и синим.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

мент отсутствовал, что поставило под угрозу выживаемость этой бактерии при 42 °С в организме домашних птиц [72]. Кроме того, в этой работе также было продемонстрировано более чем трехкратное увеличение уровня экспрессии PIMT у *S. typhimurium*. Недавно было показано, что дефицитный по PIMT *S. typhimurium* подвергался воздействию окислительного стресса [73]. У *E. coli* PIMT играет важную роль в выживаемости клеток в условиях долгосрочного стресса и недостатка питательных веществ [40].

Персисторы (persistors, персистирующие, упорствующие) представляют собой группу бактерий, устойчивых к антибиотикам и способных выживать в течение длительного времени. Было показано, что удаление PIMT делает бактерии устойчивыми к офлоксацину. Двойная мутация по PIMT и глицерол-3-фосфатдегидрогеназе (*glpD*) дополнительно увеличивала выживаемость персистирующих клеток и их сопротивляемость действию антибиотика. Удаление PIMT способствовало накоплению неправильно свернутых белков в этих клетках, но не влияло на их выживаемость в стационарной фазе роста [74]. Модификация концевой части гистонов вносит вклад в эпигенетическую модификацию, а также в экспрессию различных генов у эукариот. Было показано, что в клетках мозга млекопитающих, по меньшей мере, в 12% вариантов гистона H2B обнаруживаются необычные остатки D-Asp. Также было показано, что в гистоне H2B активного хроматина количество остатков D-iso-Asp выше, чем в молчащем хроматине. Таким образом, было предположено, что PIMT играет важную роль в сохранении этих остатков в активно экспрессирующемся хроматине [75].

Нарушение выживаемости клеток *Arabidopsis thaliana* после удаления PIMT (как и у *E. coli*) было также отмечено во время пролонгированной стационарной фазы или при инкубации этих клеток при 55 °С. Максимальная активность PIMT при этой температуре была зафиксирована в случае клеток *A. thaliana* [76]. Повышение активности ферментов наблюдалось при 42 °С в клеточной линии эпителия шейки матки человека [77]. Тканеспецифичная экспрессия различных изоформ ферментов является эффективным способом осуществления катализа целого ряда биохимических реакций в различных средах. Patla et al. [78] показали экспрессию изоформ PIMT в зависимости от ткани и стадии развития в клетках риса (*Oryza sativa*). Максимальное накопление наблюдалось в созревших зернах риса, что может быть связано с поддержанием структурной целостности клеточных антиоксидантных ферментов в процессе старе-

ния. Таким образом, можно избежать накопления активных форм кислорода (АФК), что приведет к увеличению сохранности зерна.

У крыс была выявлена зависимость активности фермента от возраста. Содержание iso-Asp в кристаллике глаза 18-месячной крысы резко отличалось от его содержания в кристаллике глаза крысы 2-месячного возраста. Следует отметить, что после 18 месяцев концентрация iso-Asp далее не повышалась, что свидетельствует об активном участии PIMT в удалении этих остатков из белков кристаллика [79]. У мышей делеция гена *pimt* приводила к накоплению в нейронах измененных белков, что проявлялось в замедлении роста и эпилептических припадках. Возможно, эти результаты свидетельствуют о защитной роли PIMT при нейродегенеративных заболеваниях [80, 81]. У человека было выявлено 15 изоформ PIMT. Нарушение функции и недостаток этого белка могут проявляться различными способами, от нарушения когнитивной функции до тяжелых неврологических заболеваний, возникающих в соответствии с мутантным генотипом, кодирующим различные изоформы фермента [70].

Также было показано, что в отсутствие белка PIMT происходит нарушение клеточного ответа на действие различных оксидантов (хинон, паракват, гомоцистеин и гомоцистеин тиолактон) не только у млекопитающих, но и у животных более низкого порядка, таких как, например, *C. elegans* [82].

**Белки, взаимодействующие с PIMT: роль PIMT-опосредованной репарации в функционировании белков.** Было показано, что у *E. coli* PIMT осуществляет репарацию белка HPr (гистидинфосфотрансфераза) после его деамидирования. Белок HPr является компонентом системы фосфоенолпируват/гликозилфосфотрансфераза и активным участником процесса усвоения сахаров у бактерий [39, 83]. Было показано, что структурные и транспортные белки везикул клеток мозга мышей взаимодействуют с этой метилтрансферазой. К ним относятся, в частности,  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулин,  $\beta$ - и  $\gamma$ -актин,  $\alpha$ -интернексин, дианами-1, аконитаза-2,  $\alpha$ -енолаза и креатинкиназа B [84]. Кроме того, с PIMT также взаимодействуют ассоциированный с микротрубочкой мыши белок 2, калретикулин, легкие цепи клатрина  $\alpha/\beta$ , гидролаза C-концевого участка убиквитина L1, фосфатидилэтаноламин-связывающий белок и статмин [26]. В последнее время в этот перечень также включены синуклеины  $\alpha$  и  $\beta$  [85]. Было показано, что в мозге мыши происходит PIMT-опосредованная репарация гистонового белка H4 [86]. Гомеостаз кальция важен в поддержании различных клеточных и

внеклеточных активностей. PIMT также репарировала  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий белок кальмодулин и восстанавливала его функцию [87]. Кроме того, было установлено PIMT-опосредованное ингибирование синтеза белка путем стабилизации активности антитрансляционного фактора 4E-BP2 [88]. Это может указывать на косвенную роль PIMT в регуляции пролиферации клеток путем подавления действия многих генов, регулируемых 4E-BP2.

PIMT негативно регулирует уровень белка p53, репарируя белок mdm2, который необходим для мечения белка p53 перед его последующей убиквитин-опосредованной деградацией. Необходимо отметить, что делеция гена *pimt* приводила к усилению контроля со стороны p53 [89]. Показано, что у растений, подобных арабидопсису, PIMT способствует восстановлению активности АТФ-зависимой DEAD-бокс-РНК-хеликазы (АТФ-dependent DEAD box RNA helicase) [90]. В то же время имеется очень мало данных о PIMT-зависимых белках в клетках человека. Можно упомянуть два примера:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТРаза [91] и SOD1 [92].

**Значение PIMT в клетке: дифференцировка, миграция и апоптоз.** Дифференцировка нервных волокон вызывает целостное изменение в нейронах, выражающееся в удлинении отростков, экспрессии маркеров и сжатии тела клетки. Основной фактор роста фибробластов (bFGF – basic fibroblast growth factor) – это нейротрофический фактор, ответственный за дифференцировку нейронов, опосредованную нижележащими каскадами передачи сигнала, такими как mTOR-, MAPK- и ERK-опосредованные сигнальные пути. Dung et al. [93] обнаружили, что bFGF-опосредованная дифференцировка клеток PC-12 останавливается при действии ингибиторов метилирования, подобных SAH. Культивируемые клетки, в которые была введена PIMT-специфичная siRNK-конструкция, вели себя сходным образом, что указывает на значимость метилирования, осуществляемого этим ферментом. PIMT участвует не только в процессе дифференцировки клеток, но и в их миграции. Результаты, полученные при работе с клетками эндотелия сосудов человека (HUVES), показывают роль этого фермента в миграции клетки и формировании микрососудов. Подавление экспрессии гена *pimt* с помощью siRNK и его делеция также подтверждают роль PIMT в миграции клеток и тубулогенезе [94].

Нейротрансмиттеры, такие как дофамин, в ходе метаболизма подвергают клетки действию окислительного стресса. В этих условиях PIMT ингибирует повреждения путем метилирования и репарации остатков iso-Asp в различных анти-



оксидантах. Это помогает клеткам избежать апоптоза. Исследования клеток нейробластомы (SH-SY5Y) показало антиапоптотическую роль этого фермента. В этих клетках PIMT ингибировала активацию каспазы-3 и каспазы-9, тем самым блокируя внешние и внутренние пути апоптоза соответственно [95].

Недавно было предположено наличие корреляции между уровнем экспрессии PIMT и прогнозом возникновения рака [60]. В исследовании 208 образцов, собранных от пациентов с аденокарциномой легких, была выявлена значительная ассоциация между послеоперационной выживаемостью пациентов и повышенной экспрессией PIMT в тканях легких. При аденокарциноме легких некоторые органеллы, такие как эндоплазматический ретикулум, испытывают стресс, который можно количественно измерить, контролируя уровень экспрессии регулируемого глюкозой белка (GRP – glucose regulated protein), который увеличивается пропорционально уровню экспрессии PIMT. Этот фактор также может служить дополнительным показателем для прогноза. Повышенная экспрессия PIMT связана с уменьшением выживаемости больных после хирургического вмешательства при лечении рака. Также было выявлено повышение уровня экспрессии PCMT1 (вариант PIMT у человека) в опухолевой ткани мочевого пузыря [96]. Таким образом, оценка уровня экспрессии PIMT *in situ* может позволить определить необходимость послеоперационного лечения рака химиотерапевтическими средствами.

Белок внеклеточного матрикса фибронектин (FN – fibronectin) способствует адгезии клеток, взаимодействуя с интегринами рецепторами на поверхности клеток. Образованные различными модулями молекулы фибронектина содержат линейный мотив RGD, который необходим для прикрепления к интегринам, таким как  $\alpha\beta5$ . Кроме того, фибронектин человека содержит последовательности NGR в своем модуле FN-1<sub>5</sub>, которые также необходимы для адгезии клеток. Деамидирование остатка Asn263 приводит к образованию iso-Asp и переходу к iso-DGR, который является активированной формой линейного мотива NGR и ключевым фактором при связывании с  $\alpha\beta5$ . PIMT деактивирует этот «липкий» участок, восстанавливая остаток аспарагина, и, таким образом, может служить в качестве «молекулярных часов» при образовании опухоли и росте клеток [97].

Нарушение системы репарации белков может также негативно влиять на пути деградации белков. Аутофагия включает рециркуляцию и повторное использование состарившихся компонентов клеток путем их целенаправленной

деградации упорядоченным образом внутри аутофагосомы [98]. Используя аутофагосомный маркер, Gomez et al. заметили, что клетки *Caenorhabditis elegans*, у которых произошла делеция гена *pimt*, не подвергаются аутофагии во время статической стадии спящей личинки (дауэр) этой нематоды. Было также отмечено, что вышеупомянутый мутант не смог выжить при недостатке энергии, когда был помещен в среду M9 без питательных веществ. Мутагенез гена *pimt* у *C. elegans* с использованием транспозона Tc1 делает эту генетически измененную нематоду неспособной выживать на стадии дауэра. Репродуктивная способность мутанта была на 16% меньше по сравнению с диким типом *C. elegans* [99].

Деамидирование аспарагина и гидролиз аспарагиновой кислоты в белках происходит спонтанно, однако различные стрессы усиливают этот процесс. Белок PIMT играет важную роль в выживании клеток в условиях стресса, репарируя деамидированные остатки и возвращая их в нативное состояние. Значение PIMT в выживаемости клеток было показано путем получения нокаутированных штаммов и анализа восприимчивости этих штаммов к различным стрессам. В эукариотических клетках были выявлены различные белки (iso-Asp), взаимодействующие с PIMT, и лишь несколько таких белков обнаружено у бактерий. Механистический анализ PIMT-опосредованной репарации изоаспарат-содержащих белков может помочь в разработке новых активаторов и ингибиторов, способных ускорить или ингибировать этот процесс репарации. Применение таких активаторов может проложить путь к профилактике хронических нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, а использование ингибиторов – предложить новые способы лечения бактериальных заболеваний.

**Благодарности.** Авторы благодарят директора Индийского научно-исследовательского ветеринарного института и NFBSFARA за предоставление необходимых финансовых средств и услуг для работ по изучению PIMT, выполненных в лаборатории Mahawar.

**Вклад авторов.** Mishra P.K.K. – сбор данных, построение филогенетических деревьев, моделирование белков, составление таблиц и подготовка черновой версии статьи; Mahawar M. – исправления и доработка черновой версии статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paik, W.K., and Kim, S. (1971) Protein methylation, *Science*, **174**, 117–119.
2. Paik, W.K., and Kim, S. (2007) Historical review: the field of protein methylation, *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 146–152.
3. Ambler, R.P., and Rees, M.W. (1959)  $\epsilon$ -N-Methyl-lysine in bacterial flagellar protein, *Nature*, **184**, 56–57.
4. Murray, K. (1964) The occurrence of  $\epsilon$ -N-methyl lysine in histones, *Biochemistry*, **3**, 10–15.
5. Kuehl, W.M., and Adelstein, R.S. (1970) The absence of 3-methylhistidine in red, cardiac and fetal myosins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 956–964.
6. Weihing, R.R., and Korn, E.D. (1970)  $\epsilon$ -N-Dimethyl-lysine in amoeba actin, *Nature*, **227**, 1263–1264.
7. Kakimoto, Y., and Akazawa, S. (1970) Isolation and identification of NG, NG- and NG, N'G-dimethylarginine, Ne-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl- $\delta$ -hydroxylysine from human urine, *J. Biol. Chem.*, **245**, 5751–5758.
8. Johnson, P., Harris, C.I., and Perry, S.V. (1967) 3-Methylhistidine in actin and other muscle proteins, *Biochem. J.*, **105**, 361–370.
9. Asatoor, A.M., and Armstrong, M.D. (1967) 3-Methylhistidine, a component of actin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **26**, 168–174.
10. Liss, M., Maxam, A.M., and Cuprak, L.J. (1969) Methylation of protein by calf spleen methylase a new protein methylation reaction, *J. Biol. Chem.*, **244**, 1617–1622.
11. Kleinsmith, L.J., Allfrey, V.G., and Mirsky, A.E. (1966) Phosphoprotein metabolism in isolated lymphocyte nuclei, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 1182–1189.
12. Clarke, S. (1993) Protein methylation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 977–983.
13. Clarke, S.G. (2013) Protein methylation at the surface and buried deep: thinking outside the histone box, *Trends Biochem. Sci.*, **38**, 243–252.
14. Visick, J.E., Cai, H., and Clarke, S. (1998) The L-isoaspartyl protein repair methyltransferase enhances survival of aging *Escherichia coli* subjected to secondary environmental stresses, *J. Bacteriol.*, **180**, 2623–2629.
15. Li, C., and Clarke, S. (1992) A protein methyltransferase specific for altered aspartyl residues is important in *Escherichia coli* stationary-phase survival and heat-shock resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9885–9889.
16. Visick, J.E., and Clarke, S. (1995) Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins, *Mol. Microbiol.*, **16**, 835–845.
17. Nguyen, V.T., Morange, M., and Bensaude, O. (1989) Protein denaturation during heat shock and related stress. *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase and *Photinus pyralis* luciferase inactivation in mouse cells, *J. Biol. Chem.*, **264**, 10487–10492.
18. Stadtman, E.R. (1992) Protein oxidation and aging, *Science*, **257**, 1220–1224.
19. Reissner, K.J., and Aswad, D.W. (2003) Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 1281–1295.
20. Clarke, S. (1999) A protein carboxyl methyltransferase that recognizes age-damaged peptides and proteins and participates in their repair, in *S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases: structures and functions* (Xiaodong, C., and Blumenthal, R.M., eds), World Scientific, Singapore, pp. 123–148.
21. Skinner, M.M., Puvathingal, J.M., Walter, R.L., and Friedman, A.M. (2000) Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: a catalyst for protein repair, *Structure*, **8**, 1189–1201.
22. McFadden, P.N., and Clarke, S. (1987) Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: implications for the cellular repair of damaged proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2595–2599.
23. Geiger, T., and Clarke, S. (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2785–2794.
24. Momand, J.A., and Clarke, S. (1990) The fidelity of protein synthesis: can mischarging by aspartyl-tRNA(Asp) synthetase lead to the formation of isoaspartyl residues in proteins? *Biochim. Biophys. Acta*, **1040**, 153–158.
25. Lowenson, J.D., and Clarke, S. (1992) Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis, *J. Biol. Chem.*, **267**, 5985–5995.
26. Levine, R.L., Moskovitz, J., and Stadtman, E.R. (2000) Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation, *IUBMB Life*, **50**, 301–307.
27. Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Grimm, S., Georgila, K., Catalgol, B., Friguet, B., Grune, T., and Gonos, E.S. (2014) Protein damage, repair and proteolysis, *Mol. Aspects Med.*, **35**, 1–71.
28. Johnson, B.A., and Aswad, D.W. (1993) Kinetic properties of bovine brain protein L-isoaspartyl methyltransferase determined using a synthetic isoaspartyl peptide substrate, *Neurochem. Res.*, **18**, 87–94.
29. Yang, H., and Zubarev, R.A. (2010) Mass spectrometric analysis of asparagine deamidation and aspartate isomerization in polypeptides, *Electrophoresis*, **31**, 1764–1772.
30. Alfaro, J.F., Gillies, L.A., Sun, H.G., Dai, S., Zang, T., Klaene, J.J., Kim, B.J., Lowenson, J.D., Clarke, S.G., Karger, B.L., and Zhou, Z.S. (2008) Chemo-enzymatic detection of protein isoaspartate using protein isoaspartate methyltransferase and hydrazine trapping, *Anal. Chem.*, **80**, 3882–3889.
31. Kameoka, D., Ueda, T., and Imoto, T. (2003) A method for the detection of asparagine deamidation and aspartate isomerization of proteins by MALDI/TOF-mass spectrometry using endoproteinase Asp-N, *J. Biochem.*, **134**, 129–135.
32. Lehmann, W.D., Schlosser, A., Erben, G., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., and Kinzel, V. (2000) Analysis of isoaspartate in peptides by electrospray tandem mass spectrometry, *Protein Sci.*, **9**, 2260–2268.
33. Cournoyer, J.J., Lin, C., and O'Connor, P.B. (2006) Detecting deamidation products in proteins by electron capture dissociation, *Anal. Chem.*, **78**, 1264–1271.
34. Ni, W., Dai, S., Karger, B.L., and Zhou, Z.S. (2010) Analysis of isoaspartic acid by selective proteolysis with Asp-N and electron transfer dissociation mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **82**, 7485–7491.
35. Liu, M., Cheetham, J., Cauchon, N., Ostovic, J., Ni, W., Ren, D., and Zhou, Z.S. (2011) Protein isoaspartate methyltransferase-mediated 18O-labeling of isoaspartic acid for mass spectrometry analysis, *Anal. Chem.*, **84**, 1056–1062.
36. MacLaren, D.C., and Clarke, S. (1995) Expression and purification of a human recombinant methyltransferase that repairs damaged proteins, *Protein Expr. Purif.*, **6**, 99–108.
37. Brennan, T.V., and Clarke, S. (1993) Spontaneous degradation of polypeptides at aspartyl and asparaginyl residues: effects of the solvent dielectric, *Protein Sci.*, **2**, 331–338.
38. Brennan, T.V., and Clarke, S. (1995) Effect of adjacent histidine and cysteine residues on the spontaneous degradation of asparaginyl- and aspartyl-containing peptides, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **45**, 547–553.
39. Sharma, S., Hammen, P.K., Anderson, J.W., Leung, A., Georges, F., Hengstenberg, W., Klevit, R.E., and Way-

- good, E.B. (1993) Deamidation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system, involves asparagine 38 (HPr-1) and asparagine 12 (HPr-2) in isoaspartyl acid formation, *J. Biol. Chem.*, **268**, 17695–17704.
40. Hicks, W.M., Kotlajich, M.V., and Visick, J.E. (2005) Recovery from long-term stationary phase and stress survival in *Escherichia coli* require the L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase at alkaline pH, *Microbiology*, **151**, 2151–2158.
  41. Lyon, Y.A., Sabbah, G.M., and Julian, R.R. (2018) Differences in  $\alpha$ -crystallin isomerization reveal the activity of protein isoaspartyl methyltransferase (PIMT) in the nucleus and cortex of human lenses, *Exp. Eye Res.*, **171**, 131–141.
  42. Vigneswara, V., Lowenson, J.D., Powell, C.D., Thakur, M., Bailey, K., Clarke, S., and Carter, W.G. (2006) Proteomic identification of novel substrates of a protein isoaspartyl methyltransferase repair enzyme, *J. Biol. Chem.*, **281**, 32619–32629.
  43. Kagan, R.M., and Clarke, S. (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **310**, 417–427.
  44. Lowenson, J.D., and Clarke, S. (1991) Spontaneous degradation and enzymatic repair of aspartyl and asparaginyl residues in aging red cell proteins analyzed by computer simulation, *Gerontology*, **37**, 128–151.
  45. Ryttersgaard, C., Griffith, S.C., Sawaya, M.R., MacLaren, D.C., Clarke, S., and Yeates, T.O. (2002) Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 10642–10646.
  46. Dutta, T., Banerjee, S., Soren, D., Lahiri, S., Sengupta, S., Rasquinha, J.A., and Ghosh, A.K. (2012) Regulation of enzymatic activity by deamidation and their subsequent repair by protein L-isoaspartyl methyl transferase, *Appl. Biochem Biotechnol.*, **168**, 2358–2375.
  47. Chatterjee, T., Mukherjee, D., Banerjee, M., Chatterjee, B.K., and Chakrabarti, P. (2015) Crystal structure and activity of protein L-isoaspartyl-O-methyltransferase from *Vibrio cholerae*, and the effect of AdoHcy binding, *Arch. Biochem. Biophys.*, **583**, 140–149.
  48. Oda, A., Noji, I., Fukuyoshi, S., and Takahashi, O. (2015) Prediction of binding modes between protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase and peptide substrates including isomerized aspartic acid residues using *in silico* analytic methods for the substrate screening, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **116**, 116–122.
  49. Bennett, E.J., Bjerregaard, J., Knapp, J.E., Chavous, D.A., Friedman, A.M., Royer, W.E., and O'Connor, C.M. (2003) Catalytic implications from the *Drosophila* protein L-isoaspartyl methyltransferase structure and site-directed mutagenesis, *Biochemistry*, **42**, 12844–12853.
  50. Kim, J., Chen, B., Bru, J.L., Huynh, E., Momen, M., and Aswad, D.W. (2018) New findings on SNP variants of human protein L-isoaspartyl methyltransferase that affect catalytic activity, thermal stability, and aggregation, *PLoS One*, **13**, e0198266.
  51. Mudgett, M.B., and Clarke, S. (1993) Characterization of plant L-isoaspartyl methyltransferases that may be involved in seed survival: purification, cloning, and sequence analysis of the wheat germ enzyme, *Biochemistry*, **32**, 11100–11111.
  52. Fujii, N., Satoh, K., Harada, K.Y., and Ishibashi, Y. (1994) Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in  $\alpha$ A-crystallin from human lens, *J. Biochem.*, **116**, 663–669.
  53. Verma, P., Kaur, H., Petla, B.P., Rao, V., Saxena, S.C., and Majee, M. (2013) Protein L-isoaspartyl methyltransferase 2 gene is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins, *Plant Physiol.*, **161**, 1141–1157.
  54. Zheng, Q.X., Fu, H.Y., Li, H.D., Wang, B., Peng, C.H., Wang, S., Cai, J.L., Liu, S.F., Zhang, X.B., and Yu, Y.J. (2017) Automatic time-shift alignment method for chromatographic data analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 256.
  55. Nascimento, E.D.S., and Tenuta Filho, A. (2010) Chemical waste risk reduction and environmental impact generated by laboratory activities in research and teaching institutions, *Brazil. J. Pharmac. Sci.*, **46**, 187–198.
  56. Itoh, T. (2012) Fluorescence and phosphorescence from higher excited states of organic molecules, *Chem. Rev.*, **112**, 4541–4568.
  57. Kimura, Y., Komatsu, T., Yanagi, K., Hanaoka, K., Ueno, T., Terai, T., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., and Urano, Y. (2017) Development of chemical tools to monitor and control isoaspartyl peptide methyltransferase activity, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **56**, 153–157.
  58. Fu, J.C., Ding, L., and Clarke, S. (1991) Purification, gene cloning, and sequence analysis of an L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 14562–14572.
  59. Kagan, R.M., McFadden, H.J., McFadden, P.N., O'Connor, C., and Clarke, S. (1997) Molecular phylogenetics of a protein repair methyltransferase, *Compar. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **117**, 379–385.
  60. Saito, H., Yamashita, M., Ogasawara, M., Yamada, N., Niisato, M., Deguchi, M.H., Tanita, T., Ishida, K., Sugai, T., and Yamauchi, K. (2016) Chaperone protein L-isoaspartate (D-aspartyl) O-methyltransferase as a novel predictor of poor prognosis in lung adenocarcinoma, *Hum. Pathol.*, **50**, 1–10.
  61. Johnson, B.A., Ngo, S.Q., and Aswad, D.W. (1991) Widespread phylogenetic distribution of a protein methyltransferase that modifies L-isoaspartyl residues, *Biochem. Int.*, **24**, 841–847.
  62. Johnson, B.A., Shirokawa, J.M., Hancock, W.S., Spellman, M.W., Basa, L.J., and Aswad, D.W. (1989) Formation of isoaspartate at two distinct sites during *in vitro* aging of human growth hormone, *J. Biol. Chem.*, **264**, 14262–14271.
  63. Ichikawa, J.K., and Clarke, S. (1998) A highly active protein repair enzyme from an extreme thermophile: the L-isoaspartyl methyltransferase from *Thermotoga maritima*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **358**, 222–231.
  64. Li, C., and Clarke, S. (1992) Distribution of an L-isoaspartyl protein methyltransferase in eubacteria, *J. Bacteriol.*, **174**, 355–361.
  65. Xu, Q., Belcastro, M.P., Villa, S.T., Dinkins, R.D., Clarke, S.G., and Downie, A.B. (2004) A second protein L-isoaspartyl methyltransferase gene in *Arabidopsis* produces two transcripts whose products are sequestered in the nucleus, *Plant Physiol.*, **136**, 2652–2664.
  66. Mudgett, M.B., and Clarke, S. (1994) Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat, *J. Biol. Chem.*, **269**, 25605–25612.
  67. Mudgett, M.B., Lowenson, J.D., and Clarke, S. (1997) Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in plants (phylogenetic distribution and the accumulation of substrate proteins in aged barley seeds), *Plant Physiol.*, **115**, 1481–1489.
  68. Clarke, S. (1987) Propensity for spontaneous succinimide formation from aspartyl and asparaginyl residues in cellular proteins, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **30**, 808–821.
  69. DeVry, C.G., and Clarke, S. (1999) Polymorphic forms of the protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins, *J. Hum. Genet.*, **44**, 275–288.

70. Juang, C., Chen, B., Bru, J.L., Nguyen, K., Huynh, E., Momen, M., Kim, J., and Aswad, D.W. (2017) Polymorphic variants of human protein L-isoaspartyl methyltransferase affect catalytic activity, aggregation, and thermal stability; implications for the etiology of neurological disorders and cognitive aging, *J. Biol. Chem.*, **292**, 3656–3665.
71. Rutherford, K., and Daggett, V. (2009) The V119I polymorphism in protein L-isoaspartate O-methyltransferase alters the substrate-binding interface, *Protein Eng. Des. Sel.*, **22**, 713–721.
72. Pesingi, P.K., Kumawat M., Behera P., Dixit, S.K., Agarwal, R.K., Goswami, T.K., and Mahawar, M. (2017) Protein-L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) is required for survival of *Salmonella typhimurium* at 42 °C and contributes to the virulence in poultry, *Front. Microbiol.*, **8**, 361.
73. Kumawat, M., Pesingi, P.K., Agarwal, R.K., Goswami, T.K., and Mahawar, M. (2016) Contribution of protein isoaspartate methyl transferase (PIMT) in the survival of *Salmonella typhimurium* under oxidative stress and virulence, *Int. J. Med. Microbiol.*, **306**, 222–230.
74. VandenBerg, K.E., Ahn, S., and Visick, J.E. (2016) (p)ppGpp-Dependent persisters increase the fitness of *Escherichia coli* bacteria deficient in isoaspartyl protein repair, *Appl. Environ. Microbiol.*, **825**, 5444–5454.
75. Qin, Z., Zhu, J.X., and Aswad, D.W. (2016) The D-iso-Asp-25 variant of histone H2B is highly enriched in active chromatin: potential role in the regulation of gene expression? *Amino Acids*, **48**, 599–603.
76. Villa, S.T., Xu, Q., Downie, A.B., and Clarke, S.G. (2006) *Arabidopsis* protein repair L-isoaspartyl methyltransferases: predominant activities at lethal temperatures, *Physiol. Plant.*, **128**, 581–592.
77. Ladino, C.A., and O'Connor, C.M. (1992) Methylation of atypical protein aspartyl residues during the stress response of HeLa cells, *J. Cell. Physiol.*, **153**, 297–304.
78. Petla, B.P., Kamble, N.U., Kumar, M., Verma, P., Ghosh, S., Singh, A., Rao, V., Saxena, S.C., Salvi, P., Kaur, H., and Majee, M. (2016) Rice protein L-isoaspartyl methyltransferase isoforms differentially accumulate during seed maturation to restrict deleterious isoAsp and reactive oxygen species accumulation and are implicated in seed vigor and longevity, *New Phytol.*, **211**, 627–645.
79. Warmack, R.A., Mansilla, E., Goya, R.G., and Clarke, S.G. (2016) Racemized and isomerized proteins in aging rat teeth and eye lens, *Rejuvenation Res.*, **19**, 309–317.
80. Kim, E., Lowenson, J.D., MacLaren, D.C., Clarke, S., and Young, S.G. (1997) Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6132–6137.
81. Dimitrijevic, A., Qin, Z., and Aswad, D.W. (2014) Isoaspartyl formation in creatine kinase B is associated with loss of enzymatic activity; implications for the linkage of isoaspartate accumulation and neurological dysfunction in the PIMT knockout mouse, *PLoS One*, **9**, e100622.
82. Khare, S., Gomez, T., Linster, C.L., and Clarke, S.G. (2009) Defective responses to oxidative stress in protein L-isoaspartyl repair-deficient *Caenorhabditis elegans*, *Mech. Ageing Dev.*, **130**, 670–680.
83. Brennan, T.V., Anderson, J.W., Jia, Z., Waygood, E.B., and Clarke, S. (1994) Repair of spontaneously deamidated HPr phosphocarrier protein catalyzed by the L-isoaspartate-(D-aspartate) O-methyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **269**, 24586–24595.
84. Zhu, J.X., Doyle, H.A., Mamula, M.J., and Aswad, D.W. (2006) Protein repair in the brain, proteomic analysis of endogenous substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in mouse brain, *J. Biol. Chem.*, **281**, 33802–33813.
85. Morrison, G.J., Ganesan, R., Qin, Z., and Aswad, D.W. (2012) Considerations in the identification of endogenous substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase: the case of synuclein, *PLoS One*, **7**, e43288.
86. Biterge, B., Richter, F., Mittler, G., and Schneider, R. (2014) Methylation of histone H4 at aspartate 24 by protein L-isoaspartate O-methyltransferase (PCMT1) links histone modifications with protein homeostasis, *Sci. Rep.*, **4**, 66–74.
87. Johnson, B.A., Langmack, E.L., and Aswad, D.W. (1987) Partial repair of deamidation-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **262**, 12283–12287.
88. Bidinosti, M., Martineau, Y., Frank, F., and Sonenberg, N. (2010) Repair of isoaspartate formation modulates the interaction of deamidated 4E-BP2 with mTORC1 in brain, *J. Biol. Chem.*, **285**, 19402–19408.
89. Lee, J.C., Kang, S.U., Jeon, Y., Park, J.W., You, J.S., Ha, S.W., and Han, J.W. (2012) Protein L-isoaspartyl methyltransferase regulates p53 activity, *Nat. Commun.*, **3**, 927.
90. Nayak, N.R., Putnam, A.A., Addepalli, B., Lowenson, J.D., Chen, T., Jankowsky, E., and Downie, A.B. (2013) An *Arabidopsis* ATP-dependent, DEAD-box RNA helicase loses activity upon isoAsp formation but is restored by protein isoaspartyl methyltransferases, *Plant Cell*, **25**, 2573–2586.
91. Adav, S.S., Qian, J., Ang, Y.L., Kalaria, R.N., Lai, M.K., Chen, C.P., and Sze, S.K. (2014) iTRAQ quantitative clinical proteomics revealed role of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase and its correlation with deamidation in vascular dementia, *J. Proteome Res.*, **11**, 4635–4646.
92. Bierzynska-Krzysik, A., Lopaciuk, M., Pawlak-Morka, R., and Stadnik, D. (2014) Investigation of asparagine deamidation in a SOD1-based biosynthetic human insulin precursor by MALDI-TOF mass spectrometry, *Acta Biochim. Pol.*, **61**, 349–357.
93. Dung, T.T.M., Yi, Y.S., Heo, J., Yang, W.S., Kim, J.H., Kim, H.G., Park, J.G., Yo, B.C., Cho, J.Y., and Hong, S. (2016) Critical role of protein L-isoaspartyl methyltransferase in basic fibroblast growth factor-mediated neuronal cell differentiation, *BMB Rep.*, **49**, 437–442.
94. Ouanouki, A., and Desrosiers, R.R. (2016) The enzyme L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase is required for VEGF-dependent endothelial cell migration and tubulogenesis, *Mol. Cell. Biochem.*, **413**, 37–46.
95. Ouazia, D., Levros, L.C., Jr, Rassart, E., and Desrosiers, R.R. (2015) The protein L-isoaspartyl (D-aspartyl) methyltransferase protects against dopamine-induced apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Neuroscience*, **295**, 139–150.
96. Dong, L., Li, Y., Xue, D., and Liu, Y. (2018) PCMT1 is an unfavorable predictor and functions as an oncogene in bladder cancer, *IUBMB Life*, **70**, 291–299.
97. Curnis, F., Longhi, R., Crippa, L., Cattaneo, A., Dondossola, E., Bachi, A., and Corti, A. (2006) Spontaneous formation of L-isoaspartate and gain of function in fibronectin, *J. Biol. Chem.*, **281**, 36466–36476.
98. Klionsky, D.J. (2008) Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve, *Autophagy*, **4**, 740–743.
99. Gomez, T.A., Banfield, K.L., Troglor, D.M., and Clarke, S.G. (2007) The L-isoaspartyl-O-methyltransferase in *Caenorhabditis elegans* larval longevity and autophagy, *Dev. Biol.*, **303**, 493–500.
100. Furuchi, T., Sakurako, K., Katane, M., Sekine, M., and Homma, H. (2010) The role of protein L-isoaspartyl/D-aspartyl O-methyltransferase (PIMT) in intracellular signal transduction, *Chem. Biodivers.*, **71**, 1337–1348.
101. Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2256–2268.

**PIMT MEDIATED PROTEIN REPAIR:  
MECHANISM AND IMPLICATIONS****P. K. K. Mishra\* and M. Mahawar**

*Division of Biochemistry, Indian Veterinary Research Institute,  
Izatnagar, Bareilly, Uttar Pradesh, India, 243122;  
E-mail: prasantmodel@gmail.com*

Received July 25, 2018

Revised December 18, 2018

Accepted December 29, 2018

Many covalent modifications of amino acids are known, but only few amino acid repair enzymes have been identified. Protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT), also known as L-isoaspartyl/D-aspartyl protein carboxyl methyltransferase (PCMT), methylates covalently modified isoaspartate (iso-Asp) residues. The iso-Asp residues accumulate in proteins due to deamidation of Asn or hydrolysis of Asp. This cytoplasmic reaction is mediated via a succinimide intermediate and generates either iso-Asp or Asp from the succinimide. Conversion of succinimide to Asp is spontaneous, while iso-Asp is restored by PIMT using S-adenosylmethionine as a methyl donor. PIMT shunts back iso-Asp to succinimide form and thus creates a chance to get converted into Asp residue. Apart from normal cell physiology, various stress conditions enhance formation of iso-Asp in proteins. Iso-Asp can form a kink or bend in a protein backbone thus making the protein conformationally and functionally distorted. Many PIMT-interacting proteins (proteins that have iso-Asp residues) have been reported in eukaryotes and few in prokaryotes. Further, extensive research in mice has shown the importance of this protein in neurodegenerative conditions. Detailed elucidation of PIMT function can pave the platform for addressing diseases like Alzheimer's and cancer.

*Keywords:* protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase, isoaspartate, S-adenosylmethionine, succinimide