

ГЛУТАРЕДОКСИН 1 ЭВОЛЮЦИОННО ДРЕВНЕЙ ГИДРЫ: СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА И ЕГО ВОЗМОЖНЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ФУНКЦИИ

© 2023 N. Perween^{1,2}, K. Pekhale¹, G. Haval^{1,3}, G.S. Bose⁴,
S.P.K. Mittal⁴, S. Ghaskadbi⁵, S.S. Ghaskadbi^{1*}

¹ Savitribai Phule Pune University, Department of Zoology,
Pune 411007, India; e-mail: ssg@unipune.ac.in; sghaskadbi@gmail.com

² M. C. E. Society's Abeda Inamdar Senior College, Department of Zoology, Pune 411001, India

³ Abasaheb Garware College, Department of Zoology, Pune 411004, India

⁴ Savitribai Phule Pune University, Department of Biotechnology, Pune 411007, India

⁵ Agharkar Research Institute, Developmental Biology Group, Pune 411004, India

Поступила в редакцию 23.10.2022

После доработки 20.02.2023

Принята к публикации 20.02.2023

Глутаредоксин (Grx) является антиоксидантным редокс-белком, который использует глутатион в качестве донора электронов. Grx играет важную роль в различных внутриклеточных процессах, включая антиоксидантную защиту, клеточный редокс-статус, редокс-контроль процесса транскрипции, обратимое S-глутатионилирование специфических белков, апоптоз, дифференцировка клеток и др. В настоящем исследовании нами был выделен и охарактеризован дитиольный глутаредоксин из *Hydra vulgaris* Ind-Pune (HvGrx1). Анализ аминокислотной последовательности показал, что HvGrx1 принадлежит к семейству Grx с классическим мотивом Grx (CPLC). Филогенетический анализ и моделирование гомологии свидетельствуют о близком родстве HvGrx1 с белком Grx2 *Danio rerio*. Ген, кодирующий HvGrx1, был клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli*; очищенный белок имел молекулярную массу 11,82 кДа. HvGrx1 эффективно восстанавливал β-гидроксиэтилдисульфид (HED) с температурным оптимум 25 °C и pH-оптимум – 8,0. Экспрессия HvGrx1 наблюдалась во всех частях тела *Hydra*. Экспрессия мРНК HvGrx1 и ферментативная активность HvGrx1 значительно повышались после воздействия H₂O₂. При экспрессии в культуре клеток человека HvGrx1 защищал клетки от окислительного стресса и усиливал пролиферацию и миграцию клеток. Несмотря на то что *Hydra* является простым беспозвоночным, HvGrx1 эволюционно ближе к своим гомологам из высших позвоночных (как и многие другие белки *Hydra*).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глутаредоксин, *Hydra*, гидра, редокс.

DOI: 10.31857/S0320972523050093, **EDN:** AYQWOQ

ВВЕДЕНИЕ

Hydra (Cnidaria) является эволюционно древним многоклеточным животным, которое предположительно эволюционировало примерно 60 млн лет назад [1]. Несмотря на простое диплобластическое строение тела, *Hydra* обладает сформировавшейся нервной системой и тремя различными линиями стволовых клеток: эктодермальные и энтодермальные эпителиальные стволовые клетки, которые дают начало

эктодермальным и энтодермальным эпителиальным клеткам соответственно, и интерстициальные клетки, которые являются мультипотентными клетками и дают начало нейронам, нематоцитам, железистым клеткам и клеткам слизистой оболочки, а также сперматозоидам и яйцеклеткам [2]. Эктодермальные и энтодермальные стволовые клетки самообновляются примерно через 3–4 дня, тогда как интерстициальные клетки – примерно через 1,5 дня. Стволовые клетки *Hydra* непрерывно дифферен-

Принятые сокращения: DIG – диоксигенин; GR – глутатионредуктаза; Grx – глутаредоксин; HvGrx1 – глутаредоксин 1 из *Hydra vulgaris*; GSH – глутатион; HED – β-гидроксиэтилдисульфид; ISH – гибридизация *in situ*; Trx – тиоредоксин; HvTrx1 – тиоредоксин из *H. vulgaris*.

* Адресат для корреспонденции.

цируются и замещают клетки организма. Для *Hydra* характерны постоянно активные клеточные процессы, такие как деление, адгезия, миграция, дифференцировка и апоптоз [3]. Кроме того, *Hydra* обладает впечатляющей регенеративной способностью. Она не проявляет организменного старения, и поэтому считается потенциально бессмертным животным [4, 5]. Эти замечательные способности *Hydra* обеспечиваются непрерывным самообновлением и дифференцировкой трех линий стволовых клеток [6]. Белком, ответственным за поддержание стволовых клеток и отсутствие старения у *Hydra*, является фактор транскрипции FOXO1 (forkhead box protein O1) [7]. Он участвует в регуляции антиоксидантных генов и, таким образом, способствует поддержанию окислительно-восстановительного (редокс) гомеостаза и восстановлению биомолекул, поврежденных активными формами кислорода (АФК) [8]. Экспрессия и посттранскрипционная регуляция FOXO1 контролируется редокс-статусом клетки [8]. Поэтому для поддержания линий стволовых клеток у *Hydra* были выработаны сложные и точно регулируемые антиоксидантные системы. К настоящему времени у *Hydra* охарактеризованы гены некоторых антиоксидантных ферментов, например фосфолипидгидропероксидглютационпероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы и тиоредоксина (Trx) [9–12].

Глутаредоксины (Grx) — повсеместно распространенные антиоксидантные белки, содержащие в активном центре мотив CXXC/S и участвующие в окислительно-восстановительном гомеостазе клетки [13]. Они входят в состав антиоксидантной системы глутатиона (GSH) и катализируют восстановление дисульфидов с использованием GSH в качестве косубстрата [14]. Grx можно разделить на два класса на основе их структуры, мотива активного центра и консервативных доменов [15]. Дитиольные Grx, образующие класс I, содержат два остатка цистеина в консенсусной последовательности CXXC, расположенной в активном центре фермента, в то время как ферменты, входящие в класс II, представляют собой монотиольные Grx с единственным остатком цистеина в консенсусной последовательности CXXS активного центра [16, 17]. Дитиольным Grx необходимы два остатка цистеина для восстановления глутатионилированных белков с образованием глутатионилированных Grx, которые регенерируются за счет рециркуляции цистеинов в активном центре. Восстановление образовавшейся дисульфидной связи происходит с участием двух молекул GSH или Trx-редуктазы. Напротив, монотиольным Grx требуется только

N-концевой цистеин и одна молекула GSH для восстановления дисульфида, а образовавшийся глутатионилированный Grx регенерируется непосредственно GSH. Большинство монотиольных Grx лишены классической ферментативной активности *in vitro* [18]. Монотиольные Grx могут быть однодоменными белками или состоять из нескольких доменов с N-концевым Trx-подобным доменом. Дитиольные Grx принимают участие в различных внутриклеточных процессах, таких как синтез дезоксирибонуклеотидов, антиоксидантная защита, клеточный редокс-статус, редокс-контроль процесса транскрипции, внутриклеточная передача сигнала, полимеризация актина, обратимое S-глутатионилирование специфических белков, апоптоз и дифференцировка клеток [18–23]. Показано, что монотиольные Grx участвуют в регуляции сборки железосерных кластеров, биосинтезе гема, эмбриональном развитии, иммунном ответе и физиологии сердца. Моно- и дитиольные Grx разных видов различаются по своим структурным, каталитическим и функциональным свойствам [18]. Были охарактеризованы Grx различных организмов, таких как бактерии, дрожжи, млекопитающие и растения. В настоящей работе сообщается о молекулярном клонировании, экспрессии, анализе и характеристике дитиольной изоформы Grx1 из *Hydra* (HvGrx1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура *Hydra*. В экспериментах использовали *Hydra vulgaris* Ind-Pune [24]. *Hydra* обычно содержали в среде для гидры (1 mM CaCl₂; 0,1 mM KCl; 1 mM NaCl; 0,1 mM MgSO₄ и 1 mM Tris-HCl) при 12-часовом цикле свет/темнота при температуре 18 °C, кормили 3–4 раза в неделю только что вылупившимися рачками *Artemia nauplii* и оставляли голодать на 48 ч перед проведением эксперимента.

Выделение РНК и синтез кДНК. От 40 до 50 не отпочковавшихся особей гидры гомогенизировали в 50 мкл реагента TRIzol® («TaKaRa», Япония) и экстрагировали общую РНК в соответствии с протоколом производителя. Количество РНК определяли на спектрометре Biospectrometer («Eppendorf», Германия), а целостность РНК подтверждали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле. Синтез кДНК проводили с помощью набора Verso cDNA synthesis kit («Thermo Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя.

Идентификация последовательности гена, кодирующего белок HvGrx1, и её клонирование. Предсказанная последовательность гена HvGrx1

была извлечена из базы данных GenBank с помощью программы tBLASTn [25] с использованием последовательности *Grx1 Homo sapiens* (UniProtKB, id: P35754) как запроса к базе данных Hydra EST. Полученный EST (GenBank: CV182757.1) был использован для конструирования праймеров (прямой: 5'-TGTAATAATAAAAAATGGGA-3'; обратный: 5'-AGATAAGTATTTGTTCTCAT-3'), чтобы амплифицировать ген *HvGrx1* из кДНК гидры. Полную последовательность, кодирующую ген *HvGrx1*, с 5' и 3' UTRs (untranslated regions) амплифицировали с использованием ДНК-полимеразы высокой точности Phusion® («New England Biolabs», США) в следующих условиях: исходная денатурация при 95 °C – 5 мин; денатурация при 95 °C – 30 с, отжиг при 43,2 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 30 с, 35 циклов; достройка цепи при 72 °C – 5 мин. Для визуализации продукт ПЦР наносили на 1%-ный агарозный гель. Искомый фрагмент элюировали из геля, очищали с помощью набора QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit («QIAGEN», США), прикрепляли А-хвост с помощью ДНК-полимеразы *Taq* («New England Biolabs») и лигировали в вектор pGEM-T («Promega», США). Полученную плазмиду использовали для трансформации клеток DH5α *Escherichia coli*. Трансформанты отбирали синеватым скринингом. Плазмиды экстрагировали из трансформированных клеток и подвергали перевариванию с помощью *NotI* для подтверждения получения положительных клонов. Кроме того, нуклеотидные последовательности вставок в этих плаزمиды были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего *HvGrx1*, была получена с помощью программы ChromasPro («Technelysium Pty Ltd», Австралия).

Анализ последовательности. Открытую рамку считывания (ORF) гена *HvGrx1* идентифицировали с помощью программы поиска ORF NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) и транслировали в соответствующую аминокислотную последовательность. Идентичность последовательности *HvGrx1* определяли с помощью программы BLAST, а консервативные аминокислотные остатки определяли с помощью программы MEGA-X [26]. Функционально важные участки и консервативные аминокислотные остатки в белке *HvGrx1* были предсказаны с помощью компьютерных подходов с использованием сервера Consurf (<https://consurf.tau.ac.il>). Семейство белков идентифицировали с помощью программы InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>), а консервативные домены идентифицировали с помощью поиска NCBI CD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Молекулярную массу белка *HvGrx1* и теоретическое значение pI рассчитывали с помощью инструмента ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>). Последовательность *HvGrx1* была проанализирована на присутствие сигнального пептида и митохондриальной таргетной последовательности с использованием инструментов SignalP 3.0 [27] и TargetP-2.0 [28] соответственно.

Анализ *in silico* последовательности *HvGrx1*.

Для поиска последовательностей гомологичных белков в базе данных UniProtKB/Swiss-Prot использовали программу BLASTP с последовательностью белка *HvGrx1* в качестве последовательности запроса. Множественные выравнивания были созданы с помощью MEGA-X с использованием последовательностей гомологичных белков из репрезентативных типов, и было создано филогенетическое древо с использованием метода минимальной эволюции (ME) [29]. Для проверки относительной поддержки ветвей, полученных с помощью ME-анализа, использовался метод бутстрэп-анализа. Вторичная структура *HvGrx1* была предсказана с помощью сервера SOPMA. Трехмерная структура белка была предсказана с помощью программы SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org>), основываясь на кристаллической структуре белка Grx2 *H. sapiens* (PDB: 2ht9). Качество сгенерированной модели проверяли с помощью программы SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>).

3D-Структуры гомологичных Grx были получены с помощью расширенного инструмента поиска последовательностей PDB, и модель *HvGrx1* была наложена на структуры белков Grx2 (3UIW) *Danio rerio*, Grx2 (2HT9) и Grx1 (4RQR) *H. sapiens*, Grx2 (3CTF) и Grx1 (3C1R) *Saccharomyces cerevisiae*, Grx1 (4MZB) *Plasmodium falciparum*, Grx (1GRX) *E. coli* и Grx1 (2MXN) *Trypanosoma brucei*. Предсказание связывания лигандов осуществлялось с использованием программы I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER>).

Субклонирование гена *HvGrx1* в экспрессирующий вектор pET-28b. Кодировующий участок кДНК *HvGrx1* амплифицировали из вектора pGEM-T с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion® и специфических праймеров (прямой: 5'-CATGCCATGGGACGAGCTGAAGCTGAA-3' и обратный: 5'-CCGCTCGAGAGATTTTCAACAAGTTCTTTCAATTCC-3'), которые были созданы для включения сайтов распознавания ферментами рестрикции *NcoI* и *XhoI*. Реакцию ПЦР проводили в следующем режиме: исходная денатурация при 98 °C – 30 с;

денатурация при 98 °C – 10 с, отжиг при 55,6 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 30 с, 35 циклов; достройка цепи при 72 °C – 5 мин. Продукт ПЦР и вектор pET-28b («Novagen», США) расщепляли эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *XhoI*, очищали с помощью набора QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit и лигировали при 4 °C в течение 18 ч с использованием ДНК-лигазы T4 («New England Biolabs»). Смесью лигирования трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21 C43 (DE3), которые были нанесены на агар, содержащий 50 мкг/мл канамицина. Для подтверждения вставок в рамку плазмидную ДНК из трансформированных клеток подвергали секвенированию по обоим цепям ДНК с использованием метода Сэнгера.

Экспрессия и очистка белка *HvGrx1*. Ночную культуру клеток *E. coli* BL21 C43 (DE3) с рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательность, кодирующую белок *HvGrx1*, вводили (в соотношении 1 : 100) в 200 мл среды LB, дополненной 50 мкг/мл канамицина, и инкубировали при 37 °C на шейкере при 200 об./мин до достижения оптической плотности при 600 нм (ОП₆₀₀), равной 0,4–0,5. Для индукции экспрессии белка добавляли 0,25 мМ IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) с последующей инкубацией клеток при 4 °C при 200 об./мин в течение 18 ч. Далее клетки собирали путем центрифугирования при 6000 об./мин в течение 10 мин, ресуспендировали в буфере для лизиса (50 мМ Tris-Cl (pH 8,0); 100 мМ NaCl; 0,1 мМ ЭДТА; 0,02% азид натрия; 0,05% (v/v) Triton X-100; 0,1 мМ PMSF; 0,1 мМ DTT; 0,02 мг/мл лизоцим) и лизировали ультразвуком, используя Sonics vibra cell VCX130 («Sonics & Materials, Inc.», США) при амплитуде 35% в течение 10 мин при 15-секундном импульсе включения/15-секундного выключения. Лизат центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 10 мин при 4 °C, и супернатант наносили на колонку Ni-NTA Superflow, предварительно уравновешенную буфером, содержащим 0,01 М Tris-HCl (pH 8,0) с добавлением 0,2 М NaH₂PO₄. Несвязавшиеся белки удаляли промывочным буфером (0,01 М Tris-HCl (pH 8,0); 0,2 М NaH₂PO₄; 50 мМ имидазол). Связанные His6-меченные белки элюировали буфером для элюции (0,01 М Tris-HCl (pH 8,0); 0,2 М NaH₂PO₄; 250 мМ имидазол). Элюированные белки подвергали диализу против фосфатно-солевого буфера (PBS (pH 7,4): 137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 8 мМ Na₂HPO₄; 2 мМ KH₂PO₄) в течение 24 ч при 4 °C с 3-кратной сменой буфера. Дальнейшую очистку белка проводили с помощью

гель-фильтрации на колонке Superdex 75 FPLC («GE Healthcare», Великобритания), предварительно уравновешенной 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) с добавлением 50 мМ NaCl. Чистоту препарата белка *HvGrx1* оценивали с помощью электрофореза в 10%-ном Tris-Tricine SDS-PAGE с последующим окрашиванием белковых полос красителем Кумасси бриллиантовый голубой R250. Концентрацию белка в образцах определяли с использованием стандартного метода Бредфорда [30].

Анализ ферментативной активности *HvGrx1*. Активность *HvGrx1* определяли при помощи HED (β-гидроксиэтилдисульфид) [31]. Специфичность действия *HvGrx1* была подтверждена с помощью специфического ингибитора 2-AAPA (R,R'-2-acetylamino-3-[4-(2-acetyl-amino-2-carboxyethylsulfanyltiocarbonylamino) phenylthiocarbamoylsulfanyl] propionic acid hydrate) [32]. *HvGrx1* (10 мкМ) инкубировали с 10, 25, 50, 100 или 200 мкМ 2-AAPA при 25 °C в течение 15 мин и измеряли остаточную активность с использованием HED-анализа.

Сообщается, что некоторые Grx снижают уровень инсулина, подобно Trx [33]. В реакционную смесь, содержащую 20 мкМ инсулина в 63 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,0), 5 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и 2 мМ EDTA (pH 8,0), добавляли 50 мкМ очищенного белка. Конечное значение pH реакционной смеси было равным 7,0. Реакцию запускали добавлением 1 мМ GSH и инкубировали при 25 °C в течение 20 мин. Увеличение поглощения при 650 нм (A₆₅₀) контролировали каждую минуту в течение 10 мин. Очищенный тиоредоксин из *H. vulgaris* (*HvTrx1*) использовали в качестве положительного контроля, а 1 мМ DTT использовали в качестве восстанавливающего агента. Отрицательный контроль не содержал белка и учитывал прямое снижение уровня инсулина с помощью DTT.

Сообщалось, что Grx проявляет активность глутатионредуктазы (GR), т.е. восстанавливает GSSG до GSH [34]; поэтому мы проанализировали *HvGrx1* на активность GR. Реакционная смесь содержала 100 мМ фосфата калия (pH 8,0); 0,2 мМ NADPH и 5 мМ GSSG в общем объеме реакционной смеси, равном 100 мкл. Реакцию запускали добавлением 10 мкМ *HvGrx1*; и в течение 10 мин регистрировали уменьшение поглощения при 340 нм (A₃₄₀) вследствие окисления NADPH. В качестве положительного контроля использовали очищенную GR *S. cerevisiae* («Sigma-Aldrich», США); в качестве отрицательного контроля использовали отсутствие фермента в реакционной смеси.

Определения оптимума pH и температуры.

Для определения pH-оптимума HvGrx1 определяли активность очищенного фермента (10 мкМ) с использованием HED в буферных растворах с различными значениями pH: Glycine-HCl (pH 4,0 и 5,0), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 6,0 и 7,0), Tris-HCl (pH 8,0) и Glycine-NaOH (pH 9,0 и 10,0). Для определения температурного оптимума активности HvGrx1 очищенный фермент (10 мкМ) анализировали при различных значениях температуры (18, 25, 37, 45 и 55 °C) при pH 8,0.

Для определения pH-стабильности HvGrx1 очищенный фермент (10 мкМ) предварительно инкубировали в течение 30 мин при разных значениях pH (4–10), а затем определяли остаточную активность фермента с помощью HED-анализа. Термостабильность фермента исследовали путем инкубации 10 мкМ HvGrx1 при различных значениях температуры (25, 45 или 55 °C) в течение 40 мин. Каждые 10 мин отбирали аликвоту и анализировали при оптимальных условиях, как описано выше. Наивысшее значение активности было принято за 100% остаточной активности.

Оценка кинетических параметров HvGrx1.

Очищенный HvGrx1 (10 мкМ) инкубировали с различными концентрациями HED (1–16 мкМ) или GSH (0,2–1,2 мМ), и активность фермента определяли при pH 8,0 и температуре 25 °C с использованием HED-анализа. Для определения констант GSH мы использовали 0,7 мМ HED и варьировали концентрацию GSH. Для определения констант HED использовали 1 мМ GSH и варьировали концентрацию HED. Кинетические параметры K_m , $k_{\text{кат}}$ и $k_{\text{кат}}/K_m$ рассчитывали с помощью уравнения Михаэлиса–Ментен на графике Лайнуивера–Берка. Общую каталитическую скорость HvGrx1 ($k_{\text{кат}}$) определяли с помощью уравнения $k_{\text{кат}} = V_{\text{макс}} [E]_t$, где $[E]_t$ – концентрация фермента, используемого в реакции.

Локализация транскриптов гена HvGrx1 в теле Hydra, определенная методом гибридизации *in situ*. Транскрипты гена HvGrx1 локализовали с помощью гибридизации *in situ* (ISH), проводимой по стандартным протоколам [35] с использованием меченных дигоксигенином (DIG) смысловых и антисмысловых рибозондов, приготовленных с помощью набора DIG RNA labelling kit («Roche», Германия).

Экспрессия мРНК HvGrx1 после воздействия на клетки H_2O_2 . Суммарно 240 особей Hydra после 48-часового голодания подвергали воздействию 1 мМ H_2O_2 , добавленной в среду для гидр на 30 мин, после чего животных тщательно промывали и переносили в свежую среду для гидры (не содержащую H_2O_2).

Через 0, 0,5, 2, 4, 8 или 24 ч каждый раз отбирали по 40 особей. Гидры, не подвергавшиеся воздействию H_2O_2 , были использованы в качестве контроля. Экстракцию РНК из подвергавшихся и не подвергавшихся воздействию H_2O_2 (контрольных) гидр проводили с использованием реагента TRIzol®, и синтез кДНК осуществляли с помощью набора Verso cDNA synthesis kit. Количественную ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) проводили на приборе StepOnePlus real-time PCR system («Applied Biosystems», США) с использованием сконструированных праймеров (прямой: 5'-GCTACTTACACTGTTTTGGAG-3'; обратный: 5'-AGTACGAGCACCAGTCATAT-3') при следующих условиях: исходная денатурация при 95 °C – 10 мин; денатурации при 95 °C – 30 с, отжиг при 56,7 °C – 15 с, элонгация при 60 °C – 15 с, 40 циклов. В качестве внутреннего контроля был использован ген β -актина из *H. vulgaris* (прямой праймер: 5'-CAATTGAACACGGAATTGTA-3'; обратный праймер: 5'-AGTAAGAAGGACAGGGTGTTC-3'), чтобы нормировать уровень экспрессии мРНК HvGrx1. Эксперименты проводили в трех независимых повторах. Для оценки количества транскриптов использовали метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Ферментативная активность HvGrx1 после воздействия H_2O_2 на клетки. Суммарно 240 особей Hydra после 48-часового голодания подвергали воздействию 1 мМ H_2O_2 , добавленной в среду для гидр на 30 мин, после чего животных тщательно промывали и переносили в свежую среду для гидры. Через 0, 0,5, 2, 4, 8 или 24 ч каждый раз отбирали по 40 особей и разрушали их тела импульсным ультразвуком в буфере для лизиса (20 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 1 мМ ЭДТА; 0,7% (v/v) Triton X-100; 0,1 мМ PMSF и коктейль ингибиторов 1X Protease). Лизат клеток центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 30 мин при 4 °C. Концентрацию белка в супернатанте оценивали с помощью метода Бредфорда, а активность белка HvGrx1 определяли при помощи HED-анализа. Эксперименты проводили в трех независимых повторах. В качестве контроля использовали Hydra, не подвергавшиеся воздействию H_2O_2 .

Влияние 2-ААРА, ингибитора Grx1, на регенерацию Hydra. Гидры, которые голодали в течение 48 ч, были разделены на три части, и образцы, содержащие 12–13 средних частей, инкубировали в среде гидры, содержащей 0, 100, 200 или 1000 мкМ 2-ААРА (ингибитор Grx1). Оценивали степень регенерации и записывали живые изображения через 24, 48 и 72 ч под стереомикроскопом Zeiss Stemi 302 («Zeiss», Германия). В качестве контроля ис-

пользовали средние части *Hydra*, не подвергавшиеся воздействию H_2O_2 . Эксперимент выполняли в трех независимых повторях.

Культура клеток и плазмидная трансфекция. Клетки НСТ116 (линия опухолевых клеток рака толстой кишки) были получены из Национального центра клеточных исследований, Пуна, Индия. Клетки культивировали в среде DMEM, дополненной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS) и раствором, содержащим антибиотики и противогрибковые средства ($1\times$) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Для проведения трансфицирования 2×10^5 клеток рассевали на 30-мм чашки с полной средой DMEM. Кодировшую последовательность гена *HvGrx1* амплифицировали из вектора pGEM-T с использованием ДНК-полимеразы высокой точности Phusion® и специфических праймеров (прямой: 5'-CGCGGA TCCACCATGGGACGAGCTGAAGCTGA-3', обратный: 5'-TGCTCTAGATTAGATTTTCACAA GTTCTTTCAATTCCC-3'), которые включали сайты ферментов рестрикции *Bam*HI и *Xba*I, и затем клонировали в вектор экспрессии pCS + GFP, содержащий на C-конце метку — белок GFP (зеленый флуоресцирующий белок). Клетки были трансфицированы плазмидами pCS + GFP или pCS + GFP + *HvGrx1* с использованием полиэтиленимина (PEI) в среде DMEM. После инкубации в течение ночи производили замену неполной культуральной среды на полную среду. Через 48 ч клетки оценивали на жизнеспособность, пригодность к образованию колоний и миграции.

Анализ жизнеспособности клеток. Чтобы выявить роль *HvGrx1* в процессе восстановления клеток после воздействия H_2O , трансфицированные клетки НСТ116 рассевали в 96-луночные планшеты (10 000 клеток/луночка). После инкубации в течение ночи клетки подвергали воздействию 0,8 мМ H_2O_2 в течение 24 ч, после чего в каждую лунку добавляли реагент МТТ (5 мг/мл). После 4 ч инкубации в каждую лунку добавляли по 100 мкл солюбилизирующего раствора, и инкубировали клетки в течение ночи. Поглощение регистрировали при 570 нм с помощью планшетного ридера ELISA («Hidex», Финляндия), и рассчитывали процент жизнеспособных клеток, принимая за 100% жизнеспособность контрольных клеток, не подвергавшихся трансфекции.

Определение колониеобразующей способности клеток. Трансфицированные клетки НСТ116 рассевали в колбы Т-25 со средой, содержащей сыворотку. Образование колоний в колбах наблюдали в течение 4 дней; изображения были получены с помощью инвертированного мик-

роскопа со встроенной камерой DP70 CCD («Zeiss»). Количественную оценку флуоресценции проводили с помощью программного обеспечения ZEN 2.3 и Image J.

Определение способности клеток к миграции. Трансфицированные клетки НСТ116 культивировали в среде, содержащей сыворотку. После достижения конfluence создавали в монослое клеток «рану» с помощью наконечника для микропипеток на 10 мкл. Наблюдали за миграцией клеток с помощью инвертированного микроскопа со встроенной камерой DP70 CCD. Расстояние, пройденное клетками к ране, определяли через 24 ч.

Статистическая обработка данных. Каждый эксперимент проводили как минимум в трех независимых повторях; данные представлены как среднее $\pm$ SE. Для проведения сравнения между группами использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клонирование и анализ последовательности гена, кодирующего *HvGrx1*. Продукт ПЦР размером 379 п.н. был получен в результате амплификации гена *HvGrx1* (рис. S1 в Приложении). Нуклеотидная последовательность гена *HvGrx1* (рис. S2 в Приложении) была размещена в базе данных NCBI GenBank (код доступа KX760114). Секвенирование клонированного в плазмиде pGEM-T гена (pGEM-T + *HvGrx1*) выявило открытую рамку считывания для 105 а.о. С помощью программы BLAST была выявлена гомология аминокислотной последовательности *HvGrx1* с последовательностями других белков Grx, размещенных в базе данных NCBI. С помощью базы данных InterProScan было обнаружено, что *HvGrx1* принадлежит к группе дитиольных белков Grx, которые проявляют активность глутатионоксиоредуктазы и глутатиондисульфидредуктазы (NADPH) и имеют один домен Grx (рис. S3, А в Приложении).

Поиск консервативных доменов показал, что *HvGrx1* имеет домен Grx и принадлежит к Grx-подобному суперсемейству (рис. S3, В в Приложении). В результате проведения множественного выравнивания последовательностей с помощью программы Clustal omega, в последовательности *HvGrx1*, а именно в его активном центре, был выявлен мотив СРУС. С помощью программы ScanProsite было предсказано, что Grx-домен содержит два остатка цистеина, которые могут образовывать дисульфидные связи. С использованием сервера

Consurf были выявлены экспонированные на поверхности белка высококонсервативные и функционально важные остатки лизина (L24 и L34), глутаминовой кислоты (E48 и E50), глутамин (Q59), треонина (T66 и T70), пролина (P72), аргинина (R73), изолейцина (I81) и глицина (G94). Кроме того, были выявлены структурно значимые высококонсервативные остатки фенилаланина (F22), серина (S23), цистеина (C27), валина (V71), глицина (G83) и лейцина (L96), которые были скрыты внутри молекулы белка (рис. S3, С в Приложении).

Физико-химические свойства HvGrx1 рассчитывали с помощью программы Protparam (инструмент ExPasy). Предсказанная молекулярная масса HvGrx1 составила 11,87 кДа, а предсказанное значение pI – 4,94. Анализ последовательности белка с помощью программ SignalP и TargetP 2.0 позволил предположить, что HvGrx1 является внутриклеточным белком, расположенным в цитоплазме.

Анализ *in silico* HvGrx1 и других Grx. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности подтвердило наличие Grx-домена, а также локализацию консервативных остатков цистеина (C27 и C30), необходимых для каталитической активности, в активном центре HvGrx1. Было показано, что Grx-домен и остатки цистеина из активного центра фермента консервативны во всех белках Grx1 и Grx2, за исключением Arthropoda, у которых второй остаток цистеина заменен на остаток аланина (рис. S4 в Приложении). Кроме каталитически важных остатков, в большинстве типов также присутствуют другие консервативные аминокислотные остатки, такие как G67, G82, G83, T70, V71 и P72.

Чтобы определить эволюционное положение белка HvGrx1, мы провели филогенетический анализ с использованием метода ME на основе выведенной аминокислотной последовательности и последовательностей дитиольных Grx некоторых репрезентативных организмов, полученных из базы данных SwissProt/UniProt-KB database (рис. S5 в Приложении). Полученное филогенетическое древо дало представление о разнообразии белков Grx и эволюционных отношениях между разными видами. Дитиольные белки Grx в основном группировались в две ветви (Grx1 и Grx2). Интересно, что HvGrx1 группировался с ферментами высших позвоночных и был наиболее близок к белку Grx2 *D. rerio*. Взаимосвязи, показанные на филогенетическом древе, хорошо согласовывались с традиционной таксономией, так как вирусы, бактерии, дрожжи, беспозвоночные и позвоночные образовывали отдельные клады.

SOPMA-анализ HvGrx1 показал, что белок состоит из 47,62% α -спиралей, 30,48% приходится на структуры типа случайный клубок, 15,24% составляют удлиненные цепи и 6,67% – β -повороты (рис. S6, А в Приложении).

3D-Модель структуры HvGrx1 с типичным для Grx способом сворачивания белка была создана с использованием SWISS-MODEL (рис. S6, В в Приложении). Согласно серверу SAVES v6.0, предсказанная модель HvGrx1 имеет общий коэффициент качества, равный 97,87, и для 99,02% аминокислотных остатков средняя оценка 3D-1D $\geq 0.2 \cdot 3D$. Структура HvGrx1 включает ядро, состоящее из четырех β -листов, окруженных пятью α -спиральями (рис. S6, В в Приложении) с мотивом активного центра CXXC, расположенным в петле, соединяющей β -лист 1 и α -спираль 1. Предсказанная структура белка HvGrx1 была наложена на доступные структуры белков Grx1 или Grx2 (рис. S6, С в Приложении) с рассчитанными значениями RMSD, равными

0,073 (Grx2 *D. rerio*; 3UIW),
0,677 (Grx2 *H. sapiens*; 2HT9),
0,759 (Grx2 *S. cerevisiae*; 3CTF),
0,773 (Grx1 *H. sapiens*; 4RQR),
0,927 (Grx1 *S. cerevisiae*; 3C1R),
0,988 (Grx1 *P. falciparum*; 4MZB),
1,578 (Grx *E. coli*; 1GRX),
2,074 (Grx1 *T. brucei*; 2MXN).

Было определено наибольшее структурное сходство HvGrx1 с Grx2 *D. rerio*. Прогнозирование сайтов связывания лиганда с помощью сервера I-TASSER выявило сайты связывания для трех субстратов: GSH, цисплатина и β -меркаптоэтанола (рис. S6, D в Приложении).

Экспрессия и очистка белков. Экспрессированный в клетках *E. coli* и очищенный белок давал единственную полосу с молекулярной массой 12 кДа в 10%-ном Tris-Tricine SDS-PAGE (рис. 1, а). Наблюдаемая молекулярная масса HvGrx1 соответствовала расчетной.

Биохимические анализы. Как показано на рис. 1, б, HvGrx1 проявляет активность Grx (восстановление дисульфидной связи в HED) в зависимости от концентрации. Специфичность реакции подтверждали с помощью 2-ААРА, специфического ингибитора Grx1. Чтобы определить концентрацию 2-ААРА, которая полностью ингибирует активность HvGrx1, мы обрабатывали одни и те же количества HvGrx1 разными концентрациями ингибитора. По мере увеличения концентрации 2-ААРА активность HvGrx1 снижалась, а при концентрации 200 мкМ 2-ААРА полностью ингибировал восстановление HED (рис. 1, с).

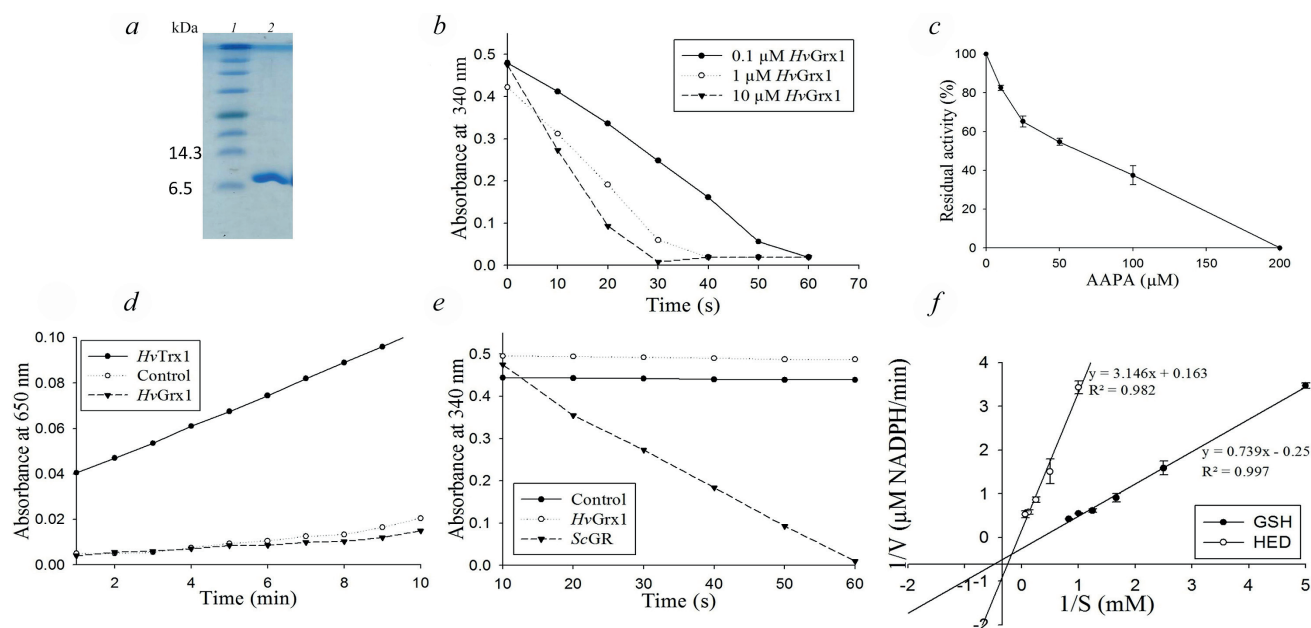


Рис. 1. *a* – Очищенный рекомбинатный белок *HvGrx1*, проанализированный с помощью 10%-ного Tris-Tricine SDS-PAGE: дорожка 1 – маркеры молекулярной массы; дорожка 2 – очищенный белок. *b* – Ферментативная активность очищенного *HvGrx1*, проанализированная при использовании HED в качестве субстрата. *c* – Влияние ингибитора (2-AAPA) на ферментативную активность *HvGrx1*. *d* – Снижение уровня инсулина с помощью *HvGrx1* (в качестве положительного контроля был взят тиоредоксин из *H. vulgaris* (*HvTrx1*)). *e* – Глутатионредуктазная (GR-активность) *HvGrx1* (в качестве положительного контроля была взята GR из *S. cerevisiae*). *f* – График Лайнуивера–Берка каталитической активности *HvGrx1*. Все определения проводились как минимум в трех независимых повторах. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ SD

Сообщалось, что Grx восстанавливает два межцепочечных дисульфидных мостика в молекуле инсулина, подобно Trx [33, 36]. Однако даже при концентрации, равной 50 мкМ, *HvGrx1* не смог катализировать восстановление инсулина по сравнению с 10 мкМ *HvTrx1*, который восстанавливал инсулин, что указывает на отсутствие активности Trx у *HvGrx1* (рис. 1, *d*). *HvGrx1* также не смог восстановить GSSG до GSH, что указывает на отсутствие активности GR (рис. 1, *e*).

Кинетические параметры. Кинетические параметры *HvGrx1* при использовании HED в качестве субстрата определяли по графику Лайнуивера–Берка: $K_m = 0,57 \pm 0,05$ мМ; $V_{\text{макс}} = 3,63 \pm 0,15$ мкМ NADPH/мин; $k_{\text{кат}} = 21,80 \pm 0,24$ с⁻¹ и $k_{\text{кат}}/K_m = 38,24 \pm 1,1$. Значения, полученные при использовании GSH в качестве субстрата, были равны: $K_m = 0,003$ мМ; $V_{\text{макс}} = 4,12 \pm 0,1$ мкМ NADPH/мин; $k_{\text{кат}} = 24,71 \pm 0,4$ с⁻¹ и $k_{\text{кат}}/K_m = 8236,66 \pm 11,3$ (рис. 1, *f*).

Влияние pH и температуры на активность *HvGrx1*. Как показано на рис. 2, *a*, *HvGrx1* проявляет активность в широком диапазоне pH (4,0–10,0), и максимальная активность наблюдается при pH 8,0.

Активность *HvGrx1* измеряли в диапазоне температур 18–55 °С. Как показано на рис. 2, *b*, инкубация белка при 18, 25 или 37 °С не влияла на его ферментативную активность.

В то же время инкубация белка при 45 и 55 °С приводила к падению активности *HvGrx1* на 30 и 50% соответственно. Температурный оптимум *HvGrx1* оказался равным 25 °С. Фермент сохранял более 60% активности после инкубации при различных значениях pH (4–10), и максимальная стабильность фермента наблюдалась при pH 8,0 (рис. 2, *c*). Анализ термостабильности *HvGrx1* также показал, что *HvGrx1* сохранял 64,0% своей активности после инкубации в течение 40 мин при 25 °С, но инактивировался на 50% после инкубации при 45 или 55 °С (рис. 2, *d*).

Локализация транскриптов гена *Grx1* в теле *Hydra*. Расположение транскриптов мРНК *HvGrx1* в теле гидры изучали с помощью метода ISH с использованием меченных DIG рибозондов. Выявлено, что мРНК *HvGrx1* экспрессировалась как в эктодерме, так и энтодерме, что указывает на то, что мРНК *HvGrx1* экспрессируется в *Hydra* повсеместно (рис. 3, *a*).

Влияние H₂O₂ на уровень экспрессии *HvGrx1* и его ферментативную активность. Максимальная экспрессия транскриптов гена *HvGrx1* наблюдалась сразу после воздействия H₂O₂, а затем снижалась в течение 0,5 ч после переноса животных в свежую среду. Активность *HvGrx1* в лизате клеток была аналогичной, при этом наибольшая активность наблюдалась сразу после воздействия H₂O₂ (рис. 3, *b* и *c*).

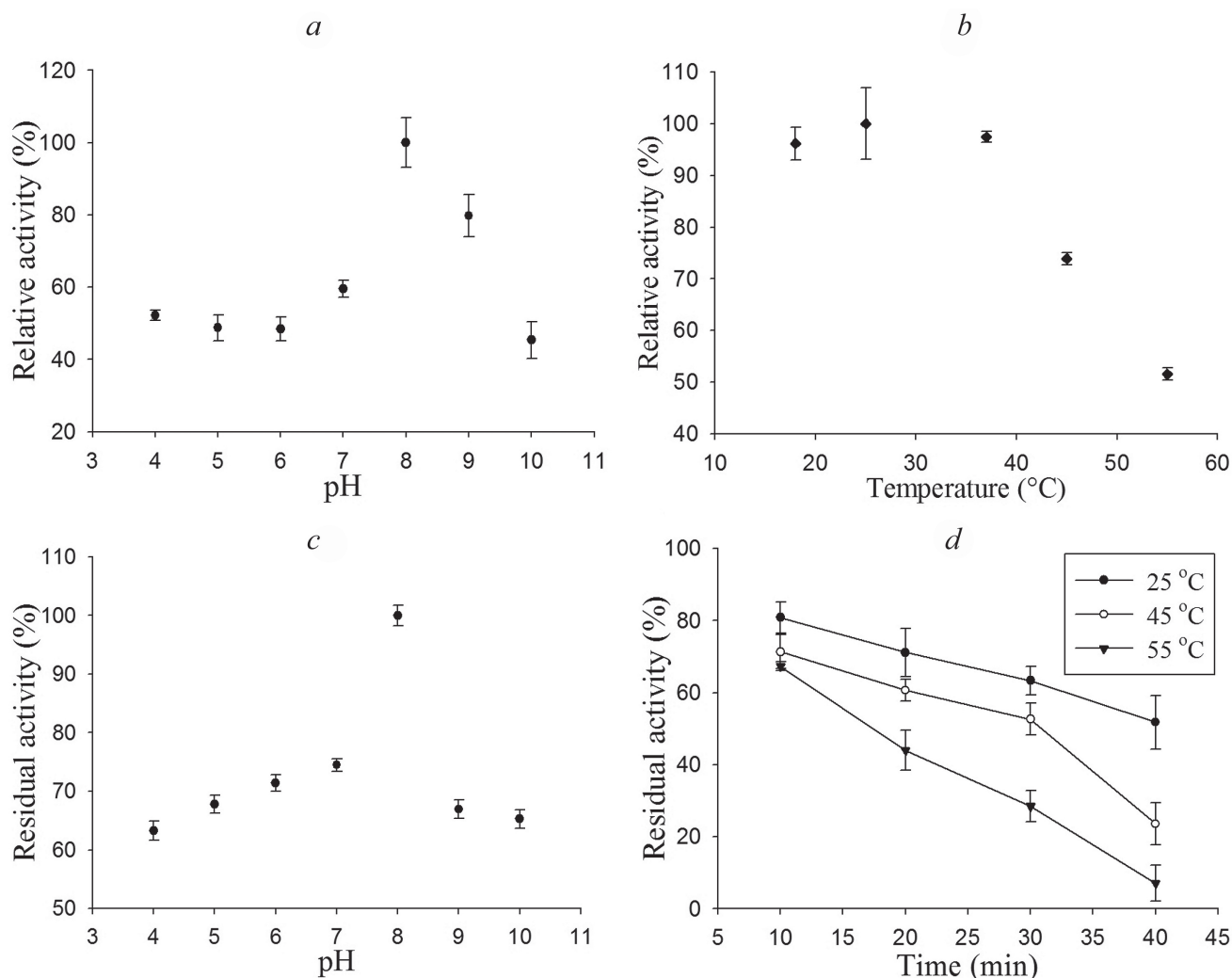


Рис. 2. *a* – pH-Оптимум каталитической активности HvGrx1, определенный в ходе проведения реакции при различных значениях pH (4,0–10,0) при 25 °C. *b* – Температурный оптимум ферментативной активности HvGrx1, определенный по параметрам реакции восстановления НЕД при различных температурах (18, 25, 37, 45 и 55 °C). *c* – pH-Стабильность HvGrx1 при различных значениях pH, определяемая в ходе инкубации белка в буферах с различными значениями pH (pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, и 10) в течение 30 мин с последующей оценкой остаточной активности в отношении НЕД. *d* – Устойчивость HvGrx1 к температурам. Белок инкубировали при 25, 45 или 55 °C в течение 10, 20, 30 или 40 мин, а затем измеряли его остаточную активность

Влияние ингибирования активности Grx1 на процесс регенерации Hydra. 2-ААРА даже в максимальной концентрации, равной 1 мМ, не ингибировал регенерацию средних участков разделенного на три части тела гидры. Все обработанные H₂O₂ и необработанные средние части тела гидры в течение 3 дней успешно регенерировали как голову, так и подошву (рис. S7 в Приложении).

HvGrx1 защищал клетки человека от окислительного стресса и способствовал пролиферации и миграции клеток. Поскольку HvGrx1 демонстрирует высокое сходство с Grx позвоночных, было изучено влияние HvGrx1 на пролиферацию клеток, их способность к образованию колоний и к миграции в клетках НСТ116 человека. Мы индуцировали сверх-

экспрессию HvGrx1 в клетках НСТ116 и исследовали жизнеспособность клеток после обработки H₂O₂ с помощью МТТ-анализа, а пролиферацию клеток – с помощью анализа образования колоний. HvGrx1 защищал клетки от окислительного стресса, вызванного H₂O₂. Клетки со сверхэкспрессией HvGrx1 были на 25% более жизнеспособными по сравнению с контрольными клетками после обработки H₂O₂ (рис. 4, *a*).

HvGrx1 способствовал пролиферации клеток, о чем свидетельствовал больший размер колоний, формируемых клетками, трансфицированными геном HvGrx1 (рис. 4, *b* и *c*). HvGrx1 также усиливал миграцию клеток НСТ116. Как показано на рис. 4, *d*, площадь заживления в монослое клеток была значительно уменьшена в

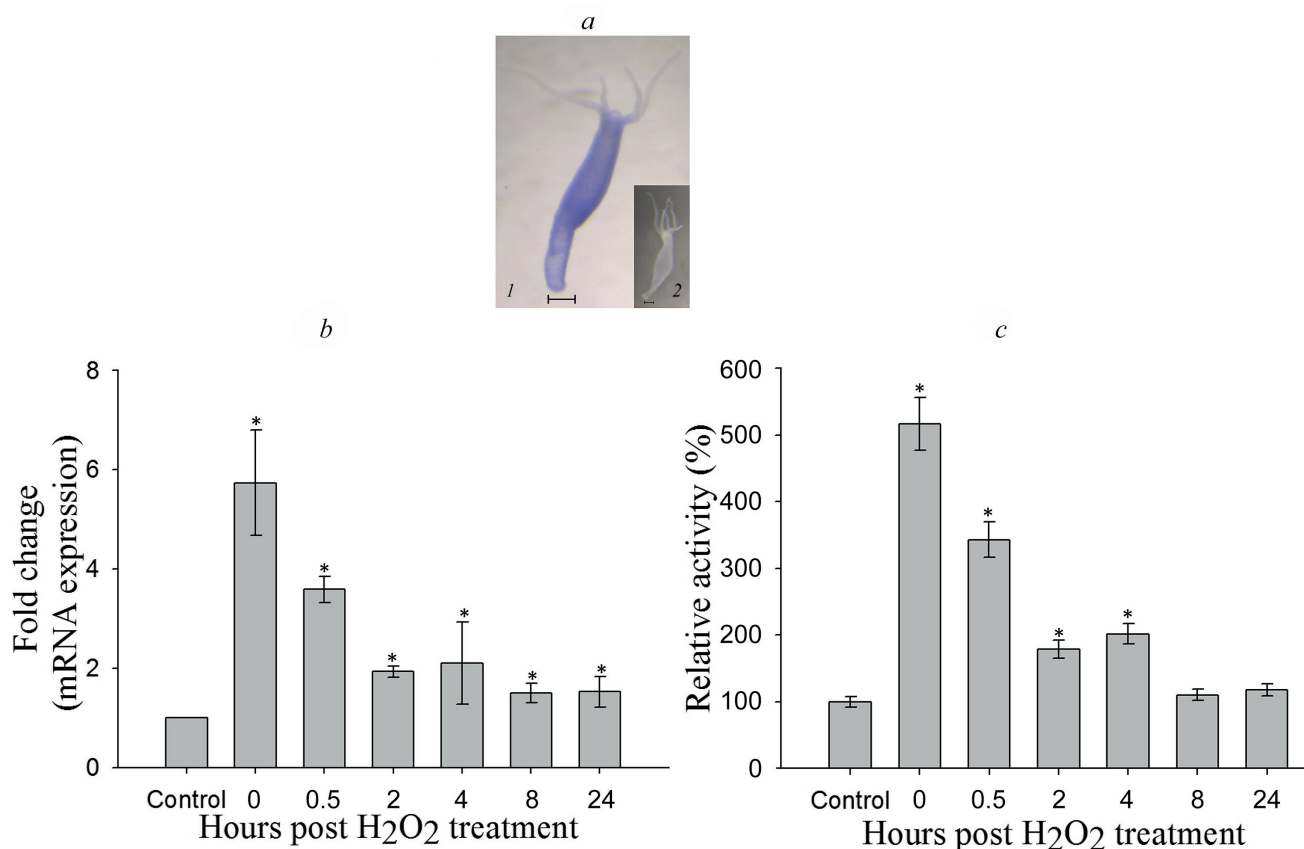


Рис. 3. *a* – Локализация транскриптов гена *HvGrx1* в гидре методом ISH с использованием меченных DIG рибозондов: смысловой зонд (1) и антисмысловой зонд (2). Изображения были получены на стереомикроскопе Zeiss; масштабная линейка – 200 мкм. Экспрессия *HvGrx1* (*b*) и его активность (*c*) в целой гидре после воздействия H₂O₂. Каждый эксперимент был проведен как минимум в трех независимых повторях. Полученные данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SE (* $p < 0,05$ в сравнении с контролем)

клетках, повышенно экспрессирующих *HvGrx1*, и эти клетки мигрировали в 4 раза быстрее по сравнению с контрольными клетками (рис. 4, *e*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Во всех организмах окислительно-восстановительный (редокс) гомеостаз поддерживается ферментативными и неферментативными системами антиоксидантной защиты, которые противодействуют возникновению избыточных количеств АФК [15]. В число этих защитных систем входят глутаредоксины (Grx) – небольшие, содержащие дисульфидные связи, редокс-белки, участвующие в многочисленных жизненно важных процессах, происходящих в клетках. Были идентифицированы две изоформы Grx, дитиольная и монотиольная, которые содержат каталитический мотив CXXC или CXXS соответственно в высококонсервативном участке [37]. Grx используют GSH в качестве восстанавливающего агента и играют важную роль в защите клеток от окислительных повреждений. Помимо окислительно-вос-

становительного гомеостаза, Grx контролируют многие физиологические процессы, такие как иммунный ответ, процесс формирования нейронов, развитие сердца, апоптоз и т.д. [20, 38].

Мы впервые идентифицировали, клонировали и охарактеризовали дитиольный Grx1 из *H. vulgaris* Ind-Pune. Клонированная последовательность содержала ORF размером 379 п.н., что соответствует 105 а.о. (предсказанная молекулярная масса *HvGrx1* составляет 11,87 кДа). Множественное выравнивание последовательности *HvGrx1* и дитиольных Grx других видов, а также анализ вторичной структуры, выполненный на сервере Consurf, выявили наличие характерного для белков Grx консервативного каталитического мотива CXXC с двумя остатками цистеина, ответственными за редокс-активность фермента. С помощью инструментов SignalP и TargetP-2.0 было предположено, что *HvGrx1* является цитоплазматическим белком, у которого отсутствует ассоциированная с митохондриями сигнальная последовательность. Grx2 *D. rerio*, имеющий наибольшее структурное сходство с *HvGrx1*, также является цитоплазматическим белком [39].

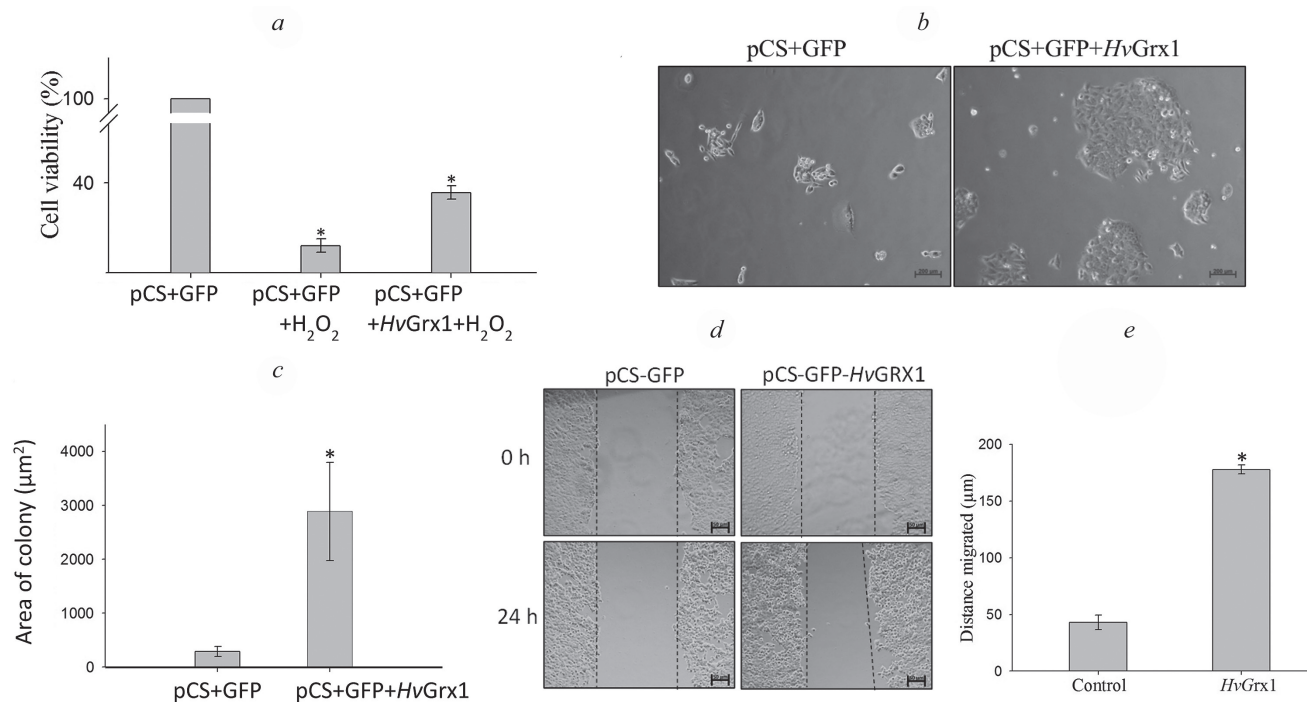


Рис. 4. *a* – Жизнеспособность контрольных клеток и клеток со сверхэкспрессией *HvGrx1* после обработки H₂O₂. *b* – Определение способности к формированию колоний. *c* – Площадь, занятая GFP-положительными колониями. *d* – Репрезентативные изображения клеток НСТ116, трансфицированных геном *HvGrx1*, полученные при изучении миграции клеток. *e* – Расстояние, пройденное контрольными клетками и клетками со сверхэкспрессией *HvGrx1* через 12 ч. Каждый эксперимент был выполнен в трех независимых повторах. Результаты представлены в виде среднего значения ± SE (* $p < 0,05$ в сравнении с контролем)

Выравнивание последовательностей показало, что *HvGrx1* является дитиольным Grx с мотивом СРУС, расположенным в активном центре фермента. Аминокислотные остатки, расположенные между остатками цистеина дитиольного мотива (С27РУС30), высококонсервативны как у прокариот, так и у эукариот. Остатки цистеина Grx2 человека (С68 и С153) и Grx2 *D. rerio* (С64 и С149) участвуют через железосерный (2Fe-2S) кластер в образовании ферментативно неактивного димера Grx2 [40]. Отсутствие этих дополнительных остатков цистеина в *HvGrx1* позволяет предположить, что этот фермент не образует димеров. *HvGrx1* также содержит консервативную С-концевую последовательность, участвующую в связывании GSH, которая проявляет наибольшую гомологию с другими Grx. С помощью программы I-TASSER были предсказаны три GSH-связывающих сайта, которые содержат консервативные аминокислотные остатки F18, V20, K24, C27, Y29, Q59, T70, V71, P72, F75, I76, N77, R78, G83, G84, T85 и D86, предположительно участвующие во взаимодействии с GSH [41]. Мотив G-G, который был определен как характерный для Grx мотив [42], также был обнаружен в *HvGrx1* (G83-G84). Взаимодействуя с остатком треонина (T70)

в мотиве TVF и остатком тирозина (Y29) активного центра фермента, мотив G-G образует на поверхности белка бороздку для связывания GSH [42]. Анализ результатов множественного выравнивания аминокислотных последовательностей показал, что консервативный остаток валина (V19) в *HvGrx1* заменен на остаток изолейцина. Однако это не влияет на структуру белка из-за схожего строения и наличия гидрофобных боковых цепей у обеих аминокислот. Анализ филогенетического дерева и моделирование гомологии показали, что *HvGrx1* имеет наибольшую идентичность с Grx2 *D. rerio*, указывая на то, что *HvGrx1* эволюционно ближе к Grx высших позвоночных, а не к ферментам беспозвоночных или прокариот.

Очищенный *HvGrx1* имел кажущуюся молекулярную массу 12 кДа при электрофорезе в 10%-ном Tris-Tricine SDS-PAGE (как и предполагалось). Подобно Grxs, он эффективно восстанавливал HED. Было показано, что *HvGrx1* обладает высокой стабильностью в широком диапазоне pH и сохраняет 50% активности при 55 °C. Анализ кинетических параметров *HvGrx1* выявил высокое сродство этого белка к HED с $K_m = 0,57$ мМ и $k_{кат} = 21,80$ с⁻¹. Значение K_m для *HvGrx1* оказалось ниже, чем у Grx из *Chlorella virus* (1,4–2,1 мМ) [43],

Grx2 из *H. sapiens* (1,68 мМ) [44] и Grx из *Cryptococcus neoformans* (1,03 мМ) [45]. Это указывает на то, что HvGrx1 имеет более высокое сродство к HED. Некоторые Grx также могут снижать уровень инсулина и GSSG; однако нам не удалось обнаружить такую активность у HvGrx1.

Было обнаружено, что HvGrx1 из *Hydra* экспрессируется по всему телу, подобно Grx2 человека [44], Grx2 из *Hippocampus abdominalis* [33] и Grx1 из *Sebastes schlegelii* [22]. Известно, что многие гены антиоксидантов, в том числе ген, кодирующий Grx1, активируются транскрипционным фактором OxyR в ответ на действие H₂O₂ [46]. Действительно, мы обнаружили, что у *Hydra* сразу после воздействия H₂O₂ повышались экспрессия и активность HvGrx1. Мы также проверили влияние ингибирования активности Grx1 специфическим ингибитором, 2-ААРА, на процессы регенерации *Hydra*. Однако даже при самых высоких используемых концентрациях ингибитор не блокировал регенерацию. Возможно, *Hydra* содержит изоформы Grx, компенсирующие ингибирование активности Grx1.

Поскольку HvGrx1 показал структурное сходство с ферментами высших позвоночных, нам было любопытно выяснить, может ли HvGrx1 функционировать в клетках человека. Известно, что Grx усиливают пролиферацию клеток [47, 48]. Мы обнаружили, что гиперэкспрессия HvGrx1 действительно способствовала росту клеток НСТ116, о чем свидетельствуют более крупные колонии клеток. Это указывает на то, что HvGrx1 поддерживал пролиферацию клеток человека. Grx также защищают клетки от окислительных повреждений [49, 50]. HvGrx1 защищал клетки НСТ116 от действия перекисью водорода, обеспечивая лучшее, по сравнению с контрольными клетками, выживание после воздействия H₂O₂. Кроме того, известно, что Grx участвуют в миграции клеток. Так, нокдаун гена, кодирующего Grx3 в клетках OSCC человека, приводил к ингибированию миграции и инвазии клеток *in vitro*, тогда как сверхэкспрессия Grx2с в клетках HeLa значительно индуцировала клеточную подвижность и позволяла клеткам внедряться в модельный матрикс [51, 52]. В нашем исследовании HvGrx1 способствовал миграции клеток, что оценивалось в тесте на заживление ран. Все вышеприведенные данные ясно указывают на то, что HvGrx1 сохраняет свои функции в клетках человека, и это говорит о высокой эволюционной консервативности данного белка и на функциональном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы клонировали, экспрессировали и охарактеризовали Grx1 *Hydra* (Cnidaria). Было показано, что HvGrx1 представляет собой однодоменный дитиольный Grx. Анализ белка *in silico* показал, что он эволюционно близок к глутаредоксинам высших позвоночных. HvGrx1 проявлял максимальную ферментативную активность при pH 8,0 и 25 °C и обладал очень высоким сродством к HED как к субстрату. Мы показали, что HvGrx1 повсеместно присутствует в теле *Hydra*; как его транскрипция, так и трансляция усиливались в ответ на обработку H₂O₂. Интересно, что HvGrx1 оказался функционален в клетках человека, и он поддерживал пролиферацию клеток и их миграцию, а также защищал клетки от окислительных повреждений. Полученные результаты показывают, что хотя *Hydra* является эволюционно древним простым беспозвоночным, HvGrx1 является высококонсервативным белком и близок к своим гомологам из высших позвоночных.

Вклад авторов. NP, SG и SSG являются авторами идеи исследования; NP, KP, GH, GB и SPM выполнили эксперименты и проанализировали результаты; NP и SSG написали манускрипт; NP, KP, GH, SPM, SG и SSG рассмотрели окончательный вариант статьи; SSG руководил исследованием.

Финансирование. SSG выражает искреннюю признательность Департаменту науки и технологий по содействию университетским исследованиям и научному совершенству (DST-PURSE), правительству Индии [F-5-2/2005(SAP-II)], Комиссии по университетским грантам и Центру перспективных исследований (UGC-CAS) (грант № GOI-A-670 предоставлен Департаменту зоологии), Университету Савитрибай Фуле Пуна (SPPU) за финансовую поддержку. NP и SPM выражают признательность Программе наставничества по инновационным исследованиям (ASPIRE) SPPU.

Благодарности. Авторы благодарят д-ра Шекхара Манде (Национальный центр клеточных наук, Пуна) и г-жу Сапну Суганди за их помощь и советы по очистке белков. NP, KP и GB признают финансовую поддержку в виде стипендий от Совета по научным и промышленным исследованиям (CSIR), Нью-Дели. SG является почетным ученым Совета по научным и промышленным исследованиям (CSIR), Нью-Дели.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 88, вып. 5, 2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Martínez, D. E., Iñiguez, A. R., Percell, K. M., Willner, J. B., Signorovitch, J., and Campbell, R. D. (2010) Phylogeny and biogeography of *Hydra* (Cnidaria: Hydridae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **57**, 403-410, doi: 10.1016/j.ympev.2010.06.016.
- Bosch, T. C., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G., and Khalturin, K. (2010) The *Hydra* polyp: nothing but an active stem cell community, *Dev. Growth Differ.*, **52**, 15-25, doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01143.x.
- Schaible, R., Sussman, M., and Kramer, B. H. (2014) Aging and potential for self-renewal: hydra living in the age of aging – a mini-review, *Gerontology*, **60**, w548-556, doi: 10.1159/000360397.
- Martínez, D. E. (1998) Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra, *Exp. Gerontol.*, **33**, 217-225, doi: 10.1016/s0531-5565(97)00113-7.
- Martínez, D. E., and Bridge, D. (2012) *Hydra*, the everlasting embryo, confronts aging, *Int. J. Dev. Biol.*, **56**, 479-487, doi: 10.1387/ijdb.113461dm.
- Hemmrich, G., Khalturin, K., Boehm, A.-M., Puchert, M., Anton-Erxleben, F., Wittlieb, J., Klostermeier, U. C., Rosenstiel, P., Oberg, H.-H., Domazet-Lošo, T., Sugimoto, T., Niwa, H., and Bosch, T. C. G. (2012) Molecular signatures of the three stem cell lineages in hydra and the emergence of stem cell function at the base of multicellularity, *Mol. Biol. Evol.*, **29**, 3267-3280, doi: 10.1093/molbev/mss134.
- Boehm, A. M., Khalturin, K., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G., Klostermeier, U. C., Lopez-Quintero, J. A., Oberg, H. H., Puchert, M., Rosenstiel, P., Wittlieb, J., and Bosch, T. C. (2012) FoxO is a critical regulator of stem cell maintenance in immortal *Hydra*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 19697-19702, doi: 10.1073/pnas.1209714109.
- Klotz, L. O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., and Monsalve, M. (2015) Redox regulation of FoxO transcription factors, *Redox Biol.*, **6**, 51-72, doi: 10.1016/j.redox.2015.06.019.
- Dash, B., Metz, R., Huebner, H. J., Porter, W., and Phillips, T. D. (2006) Molecular characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases from *Hydra vulgaris*, *Gene*, **381**, 1-12, doi: 10.1016/j.gene.2006.04.026.
- Dash, B., Metz, R., Huebner, H. J., Porter, W., and Phillips, T. D. (2007) Molecular characterization of two superoxide dismutases from *Hydra vulgaris*, *Gene*, **387**, 93-108, doi: 10.1016/j.gene.2006.08.020.
- Dash, B., and Phillips, T. D. (2012) Molecular characterization of a catalase from *Hydra vulgaris*, *Gene*, **501**, 144-152, doi: 10.1016/j.gene.2012.04.015.
- Perween, N., Pekhale, K., Haval, G., Mittal, S., Ghaskadbi, S., and Ghaskadbi, S. S. (2022) Cloning and characterization of Thioredoxin 1 from the Cnidarian *Hydra*, *J. Biochem.*, **171**, 41-51, doi: 10.1093/jb/mvab092.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M. E., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems, *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 1375-1377, doi: 10.1042/bst20051375.
- Wells, W. W., Xu, D. P., Yang, Y. F., and Rocque, P. A. (1990) Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity, *J. Biol. Chem.*, **265**, 15361-15364, doi: 10.1016/S0021-9258(18)55401-6.
- Lillig, C. H., Berndt, C., and Holmgren, A. (2008) Glutaredoxin systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 1304-1317, doi: 10.1016/j.bbagen.2008.06.003.
- Couturier, J., Jacquot, J. P., and Rouhier, N. (2013) Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: biochemical basis for the definition of two subclasses, *Front. Plant Sci.*, **4**, 518, doi: 10.3389/fpls.2013.00518.
- Keselman, A., Pulak, R. N., Moyal, K., and Isakov, N. (2011) PICOT: A multidomain protein with multiple functions, *ISRN Immunol.*, **2011**, 426095, doi: 10.5402/2011/426095.
- Herrero, E., and de la Torre-Ruiz, M. A. (2007) Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions, *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 1518-1530, doi: 10.1007/s00018-007-6554-8.
- Bräutigam, L., Jensen, L. D., Poschmann, G., Nyström, S., Bannenberg, S., Dreij, K., Lepka, K., Prozorovski, T., Montano, S. J., Aktas, O., Uhlén, P., Stühler, K., Cao, Y., Holmgren, A., and Berndt, C. (2013) Glutaredoxin regulates vascular development by reversible glutathionylation of sirtuin 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 20057-20062, doi: 10.1073/pnas.1313753110.
- Fernandes, A. P., and Holmgren, A. (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup sys-

- tem, *Antioxid. Redox Signal.*, **6**, 63-74, doi: 10.1089/152308604771978354.
21. Jeong, D., Kim, J. M., Cha, H., Oh, J. G., Park, J., Yun, S. H., Ju, E. S., Jeon, E. S., Hajjar, R. J., and Park, W. J. (2008) PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling, *Circ. Res.*, **102**, 711-719, doi: 10.1161/circresaha.107.165985.
 22. Madusanka, R. K., Tharuka, M. D. N., Liyanage, D. S., Sirisena, D., and Lee, J. (2020) Role of rockfish (*Sebastes schlegelii*) glutaredoxin 1 in innate immunity, and alleviation of cellular oxidative stress: Insights into localization, molecular characteristics, transcription, and function, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **243-244**, 110432, doi: 10.1016/j.cbpb.2020.110432.
 23. Wang, J., Boja, E. S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H. M., English, S., Mieyal, J. J., and Chock, P. B. (2001) Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells, *J. Biol. Chem.*, **276**, 47763-47766, doi: 10.1074/jbc.C100415200.
 24. Reddy, P. C., Barve, A., and Ghaskadbi, S. (2011) Description and phylogenetic characterization of common hydra from India, *Curr. Sci.*, **101**, 736-738.
 25. Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., and Madden, T. L. (2008) NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Res.*, **36**, W5-W9, doi: 10.1093/nar/gkn201.
 26. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547-1549, doi: 10.1093/molbev/msy096.
 27. Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, *J. Mol. Biol.*, **340**, 783-795, doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.028.
 28. Almagro Armenteros, J. J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Eloffsson, A., and Nielsen, H. (2019) Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning, *Life Sci. Alliance*, **2**, e201900429, doi: 10.26508/lsa.201900429.
 29. Rzhetsky, A., and Nei, M. (1993) Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference, *Mol. Biol. Evol.*, **10**, 1073-1095, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040056.
 30. Kruger, N. J. (2009) The Bradford method for protein quantitation, in *The Protein Protocols Handbook*, pp. 17-24.
 31. Holmgren, A., and Aslund, F. (1995) Glutaredoxin, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 283-292.
 32. Sadhu, S. S., Callegari, E., Zhao, Y., Guan, X., and Seefeldt, T. (2013) Evaluation of a dithiocarbamate derivative as an inhibitor of human glutaredoxin-1, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **28**, 456-462, doi: 10.3109/14756366.2011.649267.
 33. Omeka, W. K. M., Liyanage, D. S., Yang, H., and Lee, J. (2019) Glutaredoxin 2 from big belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*) and its potential involvement in cellular redox homeostasis and host immune responses, *Fish Shellfish Immunol.*, **95**, 411-421, doi: 10.1016/j.fsi.2019.09.071.
 34. Ken, C. F., Chen, I. J., Lin, C. T., Liu, S. M., Wen, L., and Lin, C. T. (2011) Monothiol glutaredoxin cDNA from *Taiwanofungus camphorata*: a novel CGFS-type glutaredoxin possessing glutathione reductase activity, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 3828-3835, doi: 10.1021/jf1048113.
 35. Martinez, D. E., Dirksen, M. L., Bode, P. M., Jamrich, M., Steele, R. E., and Bode, H. R. (1997) Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra, *Dev. Biol.*, **192**, 523-536, doi: 10.1006/dbio.1997.8715.
 36. Gupta, A., Sripa, B., and Tripathi, T. (2017) Purification and characterization of two-domain glutaredoxin in the parasitic helminth *Fasciola gigantica*, *Parasitol. Int.*, **66**, 432-435, doi: 10.1016/j.parint.2016.05.005.
 37. Ströher, E., and Millar, A. H. (2012) The biological roles of glutaredoxins, *Biochem. J.*, **446**, 333-348, doi: 10.1042/bj20112131.
 38. Arnér, E. S., and Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6102-6109, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x.
 39. Berndt, C., Poschmann, G., Stühler, K., Holmgren, A., and Bräutigam, L. (2014) Zebrafish heart development is regulated via glutaredoxin 2 dependent migration and survival of neural crest cells, *Redox Biol.*, **2**, 673-678, doi: 10.1016/j.redox.2014.04.012.
 40. Hashemy, S. I., Johansson, C., Berndt, C., Lillig, C. H., and Holmgren, A. (2007) Oxidation and S-nitrosylation of cysteines in human cytosolic and mitochondrial glutaredoxins: effects on structure and activity, *J. Biol. Chem.*, **282**, 14428-14436, doi: 10.1074/jbc.M700927200.
 41. Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson, M., and Holmgren, A. (2001) Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms, *J. Biol. Chem.*, **276**, 26269-26275, doi: 10.1074/jbc.M011605200.
 42. Ceylan, S., Seidel, V., Ziebart, N., Berndt, C., Dirdjaja, N., and Krauth-Siegel, R. L. (2010) The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism, *J. Biol. Chem.*, **285**, 35224-35237, doi: 10.1074/jbc.M110.165860.
 43. Fitzgerald, L. A., Zhang, Y., Lewis, G., and Van Etten, J. L. (2009) Characterization of a monothiol glutaredoxin encoded by *Chlorella virus* PBCV-1, *Virus Genes*, **39**, 418-426, doi: 10.1007/s11262-009-0392-8.
 44. Gallogly, M. M., Starke, D. W., Leonberg, A. K., Ospina, S. M., and Mieyal, J. J. (2008) Kinetic and mechanistic characterization and versatile catalytic properties of mammalian glutaredoxin 2: implications for intracellular roles, *Biochemistry*, **47**, 11144-11157, doi: 10.1021/bi800966v.

45. Sa, J. H., Kim, K., and Lim, C. J. (1997) Purification and characterization of glutaredoxin from *Cryptococcus neoformans*, *Mol. Cells*, **7**, 655-660.
46. Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6161-6165, doi: 10.1073/pnas.96.11.6161.
47. Löfgren, S., Fernando, M. R., Xing, K. Y., Wang, Y., Kuszynski, C. A., Ho, Y. S., and Lou, M. F. (2008) Effect of thioltransferase (glutaredoxin) deletion on cellular sensitivity to oxidative stress and cell proliferation in lens epithelial cells of thioltransferase knockout mouse, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 4497-4505, doi: 10.1167/iovs.07-1404.
48. Mollbrink, A., Jawad, R., Vlamis-Gardikas, A., Edenvik, P., Isaksson, B., Danielsson, O., Stål, P., and Fernandes, A. P. (2014) Expression of thioredoxins and glutaredoxins in human hepatocellular carcinoma: correlation to cell proliferation, tumor size and metabolic syndrome, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **27**, 169-183, doi: 10.1177/039463201402700204.
49. Liu, X., Jann, J., Xavier, C., and Wu, H. (2015) Glutaredoxin 1 (Grx1) protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative damage by preventing AKT glutathionylation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **56**, 2821-2832, doi: 10.1167/iovs.14-15876.
50. Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species, *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1081-1091, doi: 10.1091/mbc.9.5.1081.
51. Gellert, M., Richter, E., Mostertz, J., Kantz, L., Masur, K., Hanschmann, E. M., Ribback, S., Kroeger, N., Schaeffeler, E., Winter, S., Hochgräfe, F., Schwab, M., and Lillig, C. H. (2020) The cytosolic isoform of glutaredoxin 2 promotes cell migration and invasion, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1864**, 129599, doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129599.
52. Li, B., Chen, M., Lu, M., Xin-Xiang, J., Meng-Xiong, P., and Jun-Wu, M. (2018) Glutaredoxin 3 promotes migration and invasion via the Notch signalling pathway in oral squamous cell carcinoma, *Free Radic. Res.*, **52**, 390-401, doi: 10.1080/10715762.2018.1435871.

GLUTAREDOXIN 1 FROM EVOLUTIONARY ANCIENT *Hydra*: CHARACTERISTICS OF THE ENZYME AND ITS POSSIBLE FUNCTIONS IN CELL

N. Perween^{1,2}, K. Pekhale¹, G. Haval^{1,3}, G. S. Bose⁴,
S. P. K. Mittal⁴, S. Ghaskadbi⁵, and S. S. Ghaskadbi^{1*}

¹ Department of Zoology, Savitribai Phule Pune University,
Pune 411007, India; e-mail: ssg@unipune.ac.in; sghaskadbi@gmail.com

² Department of Zoology, M. C. E. Society's Abeda Inamdar Senior College, Pune 411001, India

³ Department of Zoology, Abasaheb Garware College, Pune 411004, India

⁴ Department of Biotechnology, Savitribai Phule Pune University, Pune 411007, India

⁵ Developmental Biology Group, Agharkar Research Institute, Pune 411004, India

Glutaredoxin (Grx) is an antioxidant redox protein that uses glutathione (GSH) as an electron donor. Grx plays a crucial role in various cellular processes, such as antioxidant defense, control of cellular redox state, redox control of transcription, reversible S-glutathionylation of specific proteins, apoptosis, cell differentiation, etc. In the current study, we have isolated and characterized dithiol glutaredoxin from *Hydra vulgaris* Ind-Pune (HvGrx1). Sequence analysis showed that HvGrx1 belongs to the Grx family with the classical Grx motif (CPYC). Phylogenetic analysis and homology modeling revealed that HvGrx1 is closely related to Grx2 from zebrafish. HvGrx1 gene was cloned and expressed in *Escherichia coli* cells; the purified protein had a molecular weight of 11.82 kDa. HvGrx1 efficiently reduced β -hydroxyethyl disulfide (HED) with the temperature optimum of 25°C and pH optimum 8.0. HvGrx1 was ubiquitously expressed in all body parts of *Hydra*. Expression of HvGrx1 mRNA and enzymatic activity of HvGrx1 were significantly upregulated post H₂O₂ treatment. When expressed in human cells, HvGrx1 protected the cells from oxidative stress and enhanced cell proliferation and migration. Although *Hydra* is a simple invertebrate, HvGrx1 is evolutionary closer to its homologs from higher vertebrates (similar to many other *Hydra* proteins).

Keywords: glutaredoxin, *Hydra*, redox