

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 577.127.3

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕГИДРАТАЗЫ δ -АМИНОЛЕВУЛЕНОВОЙ КИСЛОТЫ ХОЛОДНОВОДНОЙ ГУБКИ *Halisarca dujardini*

© 2023 г. О. И. Кравчук^{a, *}, А. Д. Фиошин^a, К. В. Михайлов^{b, c}, Р. Х. Зиганшин^d,
К. И. Адамейко^a, Н. Г. Горностаев^a, А. И. Жураковская^a, В. С. Михайлов^a,
Е. И. Шагимарданова^e, Ю. В. Люпина^a

^aИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^bНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

^cИнститут проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127051 Россия

^dИнститут биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва, 117997 Россия

^eНаучный центр “Регуляторная геномика”, Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420012 Россия

*e-mail: kravchuk444@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 02.06.2023 г.

Принята к публикации 20.06.2023 г.

Дегидратаза δ -аминолевуленовой кислоты (ALAD) – ключевой фермент цитоплазматического пути биосинтеза гема. В работе представлены структура гена *ALAD* холодноводной морской губки *Halisarca dujardini*, мультимерная организация ALAD/hemB, а также особенности экспрессии ALAD губки в разные периоды ее репродуктивного годового цикла. В регуляции экспрессии гена *ALAD* губок может участвовать транскрипционный фактор GATA-1 и метилирование ДНК. Реагрегация клеток губок сопровождается снижением экспрессии *ALAD* и изменением содержания активной формы ALAD/hemB в клетках. Изучение процессов биосинтеза гема и роли ALAD/hemB в морфогенетических процессах у базальных животных позволит открыть новые возможности для коррекции патологий у высших животных.

Ключевые слова: биосинтез гема, дегидратаза δ -аминолевуленовой кислоты, базальные животные, пластичность

DOI: 10.31857/S0026898423060113, EDN: QFTCTO

Тетрапирролы, в том числе и железокоординированный протопорфирин IX и гем, необходимы для жизнедеятельности всех организмов на Земле. Метаболический путь биосинтеза различных тетрапирролов (порфирин, хлорофилл, витамин B12, билины и гем цитохромов) у всех организмов – от бактерий до млекопитающих – включает образование фотореактивных промежуточных продуктов из 5- δ -аминолевуленовой кислоты (delta-aminolevulinic acid, 5-ALA). Этот эволюционно древний путь обеспечивает метаногенез, фотосинтез и дыхание [1]. Белки, участвующие в биосинтезе гема, вовлечены в морфогенетический процесс – реагрегацию клеток губок [2]. Избыток свободного гема токсичен из-за его способности индуцировать окислительный стресс и перекисное окисление липидов, что приводит к повреждению мембран и гибели клеток по механизму ферроптоза [3]. Концентрация внутриклеточ-

ного гема контролируется на этапах его синтеза, связывания гемопротейнами, внутриклеточного и межклеточного транспорта и деградации. Фермент дегидратаза δ -аминолевуленовой кислоты (delta-aminolevulinic acid dehydratase, ALAD/hemB) катализирует конденсацию двух молекул 5-ALA с образованием порфобилиногена. У животных ALAD/hemB находится в цитозоле, у растений, водорослей и простейших из группы *Apicomplexa* белки ALAD/hemB имеют пластидное происхождение и локализируются в пластидах. Контроль биосинтеза тетрапирролов обеспечивается регуляторными механизмами, чувствительными к изменению концентрации кислорода и железа в клетках, а также аллостерическим механизмом регуляции активности ALAD/hemB. ALAD/hemB существует в виде функционально различных мультимеров (активная форма – октамер, неактивная форма – гексамер). У животных октамерная

форма стабилизируется нейтральным значением рН и наличием 5-ALA, а у растений – ионами магния. Активация ALAD/hemB в хлоропластах растений происходит при воздействии света, сопровождающимся резким изменением концентрации ионов магния [1]. Стабилизаторы гексамерной формы – аллостерические регуляторы класса малых молекул, получившие название морфлоки, или “морфологические замки” (morphlock), приводят к метаболическим нарушениям в клетках [4]. Предполагают, что филогенетически изменчивая аллостерическая регуляция ALAD/hemB возникла из-за значительной разницы в условиях среды, в которой обитают организмы, и филогенетических особенностей внутриклеточной локализации.

Структура, мутации, а также особенности экспрессии гена *ALAD* изучают у высших животных в связи с важной ролью эритроидной изоформы ALAD/hemB, нарушения в функционировании которой у человека приводят к проявлениям порфириемии. Кроме того, ALAD/hemB рассматривают в качестве мишени для таргетной терапии разных форм рака, поскольку установлено, что снижение экспрессии ALAD в опухолевых клетках, активирующее фактор роста опухоли (TGF- β), индуцирует эпителиально-мезенхимальную трансформацию и рост опухоли [5, 6].

Фермент ALAD/hemB человека кодируется одним геном, а мультимер ALAD/hemB состоит из нескольких копий этого белка. Каждая субъединица ALAD/hemB состоит из 300 остатков $\alpha\beta$ -бочкообразного домена, в центре которого находится активный сайт фермента, и бокового плеча домена, содержащего более 25 а.о. Ген *ALAD* человека содержит два некодирующих (1A и 1B) и 11 кодирующих экзонов. Первым экзоном может быть или 1A, или 1B. Транскрипт основной (housekeeping) формы включает экзон 1A, тогда как эритроидный транскрипт – экзон 1B [7]. Альтернативный сплайсинг приводит к множеству вариантов транскриптов, кодирующих разные изоформы. Слияние экзонов 1A и 1B со вторым, в котором находится старт трансляции, приводит к тому, что все ткани содержат идентичный фермент ALAD/hemB, но мРНК существует в двух формах: основной (1A) и эритроидной (1B). Аналогично устроен ген *ALAD* мыши [8]. Экспрессия 1A- и 1B-мРНК идет с разных промоторов с разными регуляторными элементами. Оба промотора содержат CG-богатые последовательности и сайты связывания для транскрипционного фактора GATA-1, но только эритроидный промотор связывает транскрипционный фактор KLF-1 [9]. Метилирование гена *ALAD* приводит к снижению его экспрессии [10]. Структура гена *ALAD* и мультимерная организация ALAD/hemB у базальных животных не изучены.

Губки (Porifera) традиционно считаются древнейшим типом животных [11]. Как и другие животные, морские губки развиваются только в присутствии ионов железа [12] и устойчивы к гипоксии. Это обусловило их использование в качестве модели для исследования ранней эволюции метаболизма железа у животных, которая происходила на фоне глобальной оксигенизации. Клетки губок способны к трансдифференцировкам и дедифференцировкам (то есть, трансформации одного клеточного типа в другой и в плюрипотентную клетку), обеспечивающим непрерывную реорганизацию их водоносной системы. Клеточная пластичность губок проявляется в процессе регенерации их тела и реагрегации диссоциированных клеток, при которой происходит восстановление исходной структуры губки [13, 14]. Трансформации клеток губки в этих процессах могут быть аналогичны процессам, происходящим в стволовых клетках высших животных [15]. Симбионты морских губок (бактерии, водоросли и грибы), реализуя сходные метаболические пути, производят вторичные метаболиты, а также мощные токсины, отпугивающие хищников и конкурентов, и создают губкам оптимальные условия для существования. Ранее нами показано, что в процессе реагрегации клеток губок происходит повышение уровня экспрессии нейроглобина, белков, ответственных за обмен железа, а также транскрипционного фактора HIF [2, 16].

Нами исследована структура гена *ALAD* холодноводной морской губки *Halisarca dujardini*, описана мультимерная организация белка ALAD/hemB, а также особенности экспрессии *ALAD* губки в разные периоды ее годового репродуктивного цикла, который сопровождается изменениями разных параметров: температуры, степени оксигенации морской воды и интенсивности ультрафиолетового излучения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материал исследования. Образцы губок *Halisarca dujardini* были собраны в сублиторальной зоне (0–2 м) в районе Беломорской биологической станции МГУ (66°34' N 33°08' E). Сбор губок проводили в разные периоды их репродуктивного годового цикла: январе, марте, июле и ноябре [17]. Образцы губок собирали с субстратом (водорослями) для сохранения микроокружения и 7–8 особей помещали в 5-литровый аквариум с природной морской водой. Аквариум размещали в термобоксе с контролем температуры: 1–4°C зимой, 8–10°C летом и 5–8°C весной/осенью – и транспортировали в ИБР РАН. Перед экспериментом у губок выявляли функциональную целостность водоносной системы – по наличию фильтрации воды через оскулы – и очищали от сопутствующих беспозвоночных [2].

Подготовка препаратов диссоциированных клеток и клеточных агрегатов. Препараты диссоциированных клеток и клеточных агрегатов губки *H. dujardinii* получали по методике, описанной нами ранее [2, 16]. Клеточную суспензию центрифугировали 5 мин при 300 g. Количество и процент живых клеток (обычно более 96–98%) определяли в 10 мкл суспензии, смешанной с 10 мкл 0.1%-ного трипанового синего, с помощью стандартного гемоцитометра. Время от диссоциации губки до фиксации образцов и выделения РНК составляло 20 мин. Из клеточной суспензии и интактной губки (тело губки) выделяли РНК. Часть клеточной суспензии в концентрации 1×10^7 клеток/мл вносили в лунки 6-луночного планшета (2 мл/лунка) и инкубировали 24 ч при соответствующей температуре для получения агрегатов, после чего их собирали в пробирки и выделяли РНК [2].

Выделение РНК, конструирование библиотек кДНК и секвенирование. РНК выделяли с использованием TRI Reagent (“Molecular Research Center, Inc.”, США), обрабатывали ДНКазой I (“Ambion”, США) и очищали с помощью Ribo-zero rRNA Removal Kit (Human/Mouse/Rat) (“Illumina”, США). Фрагменты кДНК для библиотек получали с использованием NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina® (“New England Biolabs”, США), проверяли, используя Agilent 2100 DNA High Sensitivity Kit, и секвенировали на Illumina HiSeq2500 с парноконцевыми чтениями длиной 125 п.н. мРНК. Для одноконцевых прочтений длиной 50 п.н. выделение из суммарной РНК проводили с помощью NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (“New England Biolabs”). Далее проводили конструирование библиотек кДНК и их секвенирование на приборе Illumina HiSeq 2500.

Транскриптомная сборка и анализ дифференциальной экспрессии. На основе транскриптомной сборки [2] произведено предсказание белковых продуктов с помощью TransDecoder v.5.5 [18]. Предсказанные продукты были проверены с помощью черновой сборки генома. Одноконцевые прочтения интактных губок (тело губки), диссоциированных клеток и агрегатов губок, собранных в разные сезоны, были картированы на транскриптомную сборку с помощью bowtie 2 v.2.4.1 [19]. Уровни экспрессии транскриптов были рассчитаны с помощью RSEM v1.3.3 [20], как описано ранее [16, 21].

Структура гена и транскриптов ALAD. На основании черновой геномной сборки и последовательности транскрипта ALAD (QEN04756, NCBI) определена экзон-интронная структура. Поиск CpG-островков проводили с помощью программы CpGplot на сайте EMBOS (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/). Поиск ми-

норной изоформы ALAD проводили путем картирования транскриптомов (NCBI, проект PRJNA594150) на участке размером 10 т.п.н. с геном ALAD. Использовали следующие шаблоны последовательностей сайтов связывания транскрипционных факторов: (A/T)(A/G)GATA для GATA1; CCAAT для PCBP1; (T/G)GGGCGG(G/A)(G/T) для SP1; CCCACCC для KLF1.

Филогенетическое древо белка ALAD губок. Аминокислотные последовательности ALAD искали при помощи NCBI BLAST 2.2.29+ [22]. Для неаннотированных геномов губок последовательности ALAD предсказывали при помощи exonerate 2.2.0 [23], используя данные по белку ALAD других губок в качестве запроса. Выравнивание аминокислотных последовательностей выполняли в программе MEGA X с помощью ClustalW. Выравнивание для построения дерева выполняли с использованием инструмента MAFFT v7.130b [24] при помощи алгоритма L-INS-i. Перед построением дерева из выравнивания удаляли столбцы, состоящие более чем на 90% из пробелов. Реконструкцию филогенетического дерева выполняли методом максимального правдоподобия с IQ-TREE 1.6.12 [25]; выбор модели эволюции проводили автоматически с ModelFinder [26]; поддержка узлов дерева оценена при помощи сверхбыстрого бутстрэпа UFBoot [27] с 1000 репликами. Для визуализации реконструированного дерева использовали инструмент MEGA 7.0.21 [28].

Анализ аминокислотных последовательностей ALAD. Пространственное моделирование по гомологии проводили с использованием веб-сервера SWISS-MODEL, как описано ранее [16]. В качестве основного шаблона для модели ALAD *H. dujardinii* использовали структуру ALAD *Homo sapiens* (PDB: 5HMS). На основе результатов SWISS-MODEL подготовили молекулярные графики с использованием программного обеспечения PyMOL версии 2.5.2 (<http://citebay.com/how-to-cite/pymol/>).

Электрофорез в нативных условиях. Для выявления нативных форм фермента ALAD фрагменты тела, суспензию клеток и агрегаты губки *H. dujardinii* измельчали в буфере для гомогенизации (20 mM ЭДТА, 50 mM HEPES, pH 7.0, 200 mM NaCl) в соотношении 1 : 3, добавляли 5 мкл 0.2 M PMSF и 1 мкл коктейля ингибиторов протеаз (“Sigma”, США) и центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при 4°C. Осветленный гомогенат (супернатант) отбирали и смешивали с буфером для нанесения образцов (50% сахароза, 0.01% бромфенолового синего) в соотношении 5 : 1. Электрофорез проводили в нативном 12.5%-ном ПААГ [29] в буферной системе TBE (7.6 мл H₂O, 1 мл 10× TBE-буфера, 1.2 мл 30% акриламид/бис-акриламид), 40 мкл 0.5 M АТФ, 50 мкл 1 M MgCl₂, 100 мкл 10% PSA, 10 мкл TEMED) при 6–8°C в

камере для электрофореза (“Bio-Rad”, США). В лунки вносили по 25–40 мкг осветленного гомогената.

SDS-ПААГ-электрофорез. Аликвоты осветленного гомогената, содержащие 80 мкг белка, разводили в буфере для нанесения образцов, выдерживали в течение 4 мин на водяной бане при 95°C и затем проводили денатурирующий электрофорез в 12%-ном SDS-ПААГ (160 V).

Иммуноблоттинг для идентификации белка ALAD. Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”) проводили в буфере для “мокрого” переноса с SDS (25 mM Трис, 92 mM глицин, 0.05% SDS с метанолом, pH 8.3) в течение 12 ч при постоянном токе 30 V и 4°C. После переноса белков из геля мембрану помещали в чашку Петри и заливали красителем Понсо на 30 с, затем отмывали дистиллированной водой 2–3 раза и помещали в TNT-буфер (20 mM Трис-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.01% Tween-20). Мембрану в течение 2 ч инкубировали с поликлональными антителами кролика (#ARP41657_P050; “Aviva Systems Biology”, Канада; разведение 1 : 1000) к структурному домену белка ALAD, отмывали TNT-буфером и блокировали 5%-ным молоком (“GE Healthcare”, США) на TNT-буфере. В качестве вторичных использовали антитела козы против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (goat anti-rabbit IgG (H + L) cross-adsorbed secondary antibody, HRP; “Invitrogen”, США). Для детекции хемилюминесценции использовали набор ECL Luminol Enhancer Solution (“GE Healthcare”). Результаты обрабатывали в программе ImageJ. Содержание белка ALAD оценивали по отношению к общему белку в пробе.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Зоны, соответствующие подвижности белка ALAD, вырезали из геля, окрашенного Coomassie R250. Для протеолиза использовали трипсин. Образцы загружали на преколонку размером 50 × 0.1 мм (Inertsil ODS-3 HPLC Column 3 μm; “GL Sciences”, Япония) в растворе, содержащем 2% ацетонитрила, 98% H₂O, 0.1% трифторуксусной кислоты, при скорости потока 4 мкл/мин. Хроматографию проводили при комнатной температуре на колонке из плавленного кварца (300 × 0.1 мм), изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (“Sutter Instrument”, США), с сорбентом ReproSil-Pur C18-AQ 1.9 μm (“Dr. Maisch”, Германия). Обращеннофазовую хроматографию проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System (“Thermo Fisher Scientific”, США), соединенном с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (“Thermo Fisher Scientific”) посредством нанозлектроспрейного источника (“Thermo Fisher Scientific”). Для хроматографического разделения пептидов использовали систему растворителей А (99.9% вода, 0.1% муравьи-

ная кислота) и Б (19.9% вода, 0.1% муравьиная кислота, 80% ацетонитрил). Пептиды элюировали с колонки линейным градиентом: 3 → 35% Б в течение 55 мин; 35 → 60% Б в течение 5 мин, 60 → 99% Б в течение 0.1 мин, 99% Б в течение 10 мин, 99 → 3% Б в течение 0.1 мин – при скорости потока 500 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме DDA (TopN = 10) со следующими настройками прибора: MS1 сканирование – разрешение 70000, диапазон сканирования – 200–1600 m/z, максимальное время инъекции ионов – 35 мс, уровень AGC – 3 × 10⁶, MS2 сканирование – разрешение 17 500, HCD фрагментация с энергией 30%, максимальное время инъекции ионов – 80 мс, уровень AGC – 1 × 10⁵.

Анализ данных масс-спектрометрии. Полученные данные анализировали при помощи компьютерной программы Peaks studio 10.0 (“Bioinformatics Solutions Inc.”) [30]. Идентификацию белков проводили посредством корреляции tandemных масс-спектров с базой данных аминокислотных последовательностей *Halisarca dujardinii* (NCBI, PRJNA594150), полученной нами ранее, со следующими параметрами: постоянная модификация – Cys-карбамидометилирование, переменные модификации – дезамидирование Asn/Gln и окисление Met, допустимый уровень ложноположительных identifications пептидов – 0.01 (определялся по реверсной базе данных аминокислотных последовательностей), специфичность протеазы – C-концевые остатки Arg и Lys (при поиске в базе данных допускалось до двух пропущенных сайтов гидролиза). При идентификации пептидов допускалось отклонение экспериментально полученной массы пептида от его теоретической массы до 10 мДа, а отклонение массы фрагментов – до 0.05 Да.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У губки *H. dujardinii* найден один ген *ALAD*. В его состав входит 9 экзонов, а промоторная область обладает сходством с housekeeping-промотором гена человека: по CG-богатой последовательности и сайту связывания с транскрипционным фактором GATA-1 (рис. 1). На основе транскриптомных сборок для *H. dujardinii*, описанных нами ранее (NCBI: PRJNA594150), идентифицирована мажорная изоформа *ALAD*, включающая 9 экзонов, и укороченные транскрипты. Найденные элементы позволяют предположить, что в регуляцию экспрессии гена *ALAD H. dujardinii*, как и у млекопитающих, вовлечены транскрипционный фактор GATA-1 и метилирование ДНК. Наличие нескольких транскриптов *ALAD* описано ранее у моллюсков [31]. Укороченные формы *ALAD* обнаружены также при некоторых мутациях гена *ALAD* у человека [32].

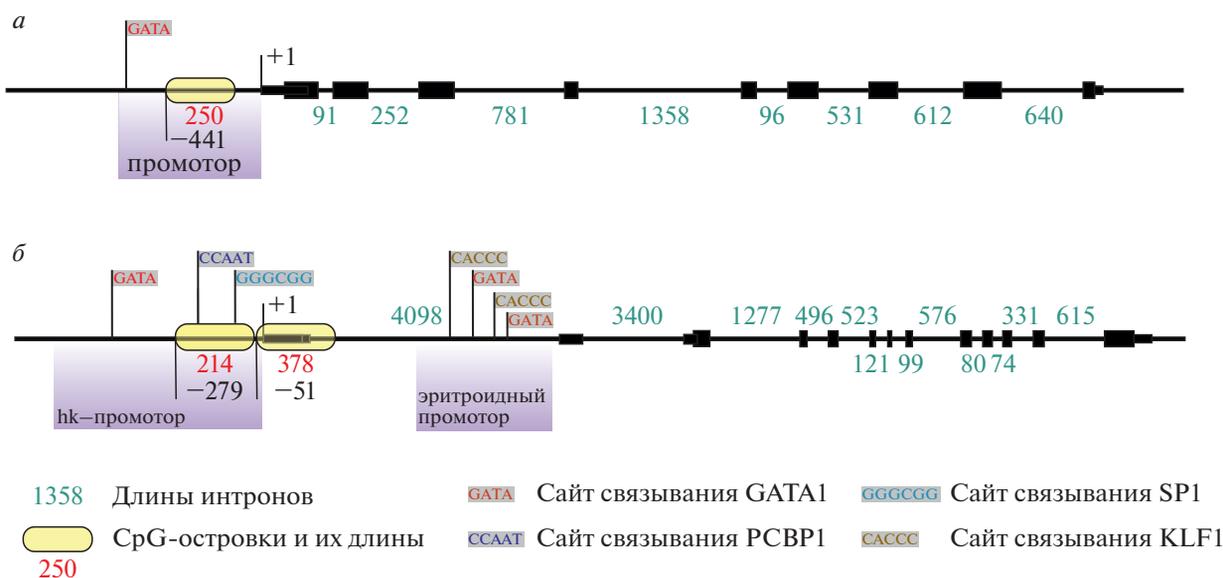


Рис. 1. Структура генов *ALAD H. dujardinii* (а) и человека (б). Черными прямоугольниками обозначены экзоны, узкие прямоугольники соответствуют нетранслируемым областям. Синими цифрами указаны размеры интронов, красными — размеры CpG-островков, буквами на сером фоне — последовательности сайтов связывания. Длина 5'-нетранслируемой области (5'UTR) мРНК *ALAD H. dujardinii* подтверждена экспериментально. hk — housekeeping промотор; транскрипционные факторы: GATA1 — эритроидный фактор транскрипции, PCBP1 — поли(рС)-связывающий белок 1, SP1 — белок специфичности 1, KLF1 — Krüppel-подобный фактор 1.

Ранее установлено, что ALAD/hemB относится к наиболее эволюционно консервативным среди белков биосинтеза гема, в отличие от глобинов ADGB и NGB, которые накапливают аминокислотные замены быстрее [16]. С целью сравнить функциональные домены ALAD/hemB губок с таковыми у других видов (табл. 1) мы построили множественные выравнивания аминокислотных последовательностей ALAD/hemB губок, беспозвоночных, растений, грибов, бактерий и человека (рис. 2а). В отношении аминокислотной последовательности ALAD/hemB найдено высокое сходство губок с другими беспозвоночными. Эти белки содержат консервативные функциональные домены каталитического сайта, домены связывания ионов Zn^{2+} и “крышки” активного центра. Белки ALAD губок класса Demospongia кластеризуются вместе и удалены от белков губок класса Calcarea (рис. 2в). ALAD морских губок *Amphimedon queenslandica* и *Petrosia ficiformis* являются наиболее дивергентными среди класса Demospongia. Представители подкласса Heteroscleromorpha образуют единую группу на дереве, но ALAD морских губок *H. dujardinii* и *Chondrosia reniform* не входят в нее (рис. 2в).

Для предсказания трехмерной структуры ALAD губки *H. dujardinii* использовали данные для ALAD человека. Идентичность аминокислотных последовательностей ALAD губки и человека (PDB: 5HMS) составляет 65.9%, а покрытие использованных для моделирования оснований

(2–325) — 98%. N-концевой участок ALAD/hemB губок короткий, наименее консервативен и имеет замены в ключевых остатках функционального домена: S5M и F12H (N-концевой участок плеча) (рис. 2а, б). Кроме этих замен ALAD *H. dujardinii* несет замену T127A в металлсвязывающем центре и V275M. Короткий участок (до S5) N-концевого плеча одной субъединицы затрудняет взаимодействие с R240 C-доменов двух других субъединиц ALAD и формирование мультимеров ALAD/hemB (рис. 2б). Показано, что такие замены в N-концевом плече и в металлсвязывающем центре приводят к снижению активности фермента [4, 33, 34].

С целью охарактеризовать экспрессию генов белков биосинтеза гема: ALAS, ALAD, NGB, ADGB, ферритинов Ft1a/b и Ft2, — а также факторов NF- κ B1, BCL2, NOS1 в процессах диссоциации и агрегации клеток губки *H. dujardinii* в разные периоды годового цикла мы сравнили методом RNA-seq уровень их экспрессии в интактном теле, диссоциированных клетках и клеточных агрегатах губок, собранных в разные сезоны и, следовательно, в разные периоды жизненного цикла губок. В интактном теле губок наибольший уровень экспрессии характерен для генов ферритинов *Ft1a/b* [16] во все исследованные периоды жизни (рис. 3). Экспрессия генов белков биосинтеза гема: ALAD и ADGB — в теле губок, собранных летом, была ниже, а NGB выше, чем в другие исследованные периоды (рис. 3). Экспрессия ALAD в клеточных агрегатах губок, собранных во все ис-

Таблица 1. Последовательности ALAD, которые использованы в выравнивании (рис. 2)

Организм	Аббревиатура	ID в Genbank ^a
<i>Homo sapiens</i>	H.sap	NP_000022.3
<i>Halisarca dujardinii</i>	H.duj	QEH04756.1
<i>Halichondria panicea</i>	H.pan	QIA61829.1
<i>Amphimedon queenslandica</i>	A.que	XP_019852250.1
<i>Suberites domuncula</i>	S.dom	CAE02648.1
<i>Ephydatia muelleri</i>	E.mue	Em0016g656a ^b
<i>Lubomirskia baicalensis</i>	L.bai	A8_TRINITY_DN16294_c0_g1_i1 ^c
<i>Chondrosia reniform</i>	—	OX359193.1
<i>Spongilla lacustris</i>	—	OX442424.1
<i>Agelas oroides</i>	—	OX422197.1
<i>Oscarella pearsei</i>	—	m.7375 ^d
<i>Oscarella lobularis</i>	—	OX382157.1
<i>Petrosia ficiformis</i>	—	OX345639.1
<i>Leucosolenia complicata</i>	—	Gene.107319
<i>Sycon ciliatum</i>	—	scpid88365 ^d
<i>Trichoplax</i> sp.	T sp.	RDD46522.1
<i>Mnemiopsis leidyi</i>	M.lei	см. примечание ^e
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S.cer	AJR94895.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	A.tha	OAP13053.1
<i>Paramecium octaurelia</i>	P.oct	CAD8165915.1
<i>Kiritimatiellae bacterium</i>	K.bac	MBP7274600.1

^a Все последовательности присутствуют в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), кроме ALAD *Ephydatia muelleri*, *Lubomirskia baicalensis*, *Oscarella pearsei*, *Sycon ciliatum* и *Mnemiopsis leidyi*.

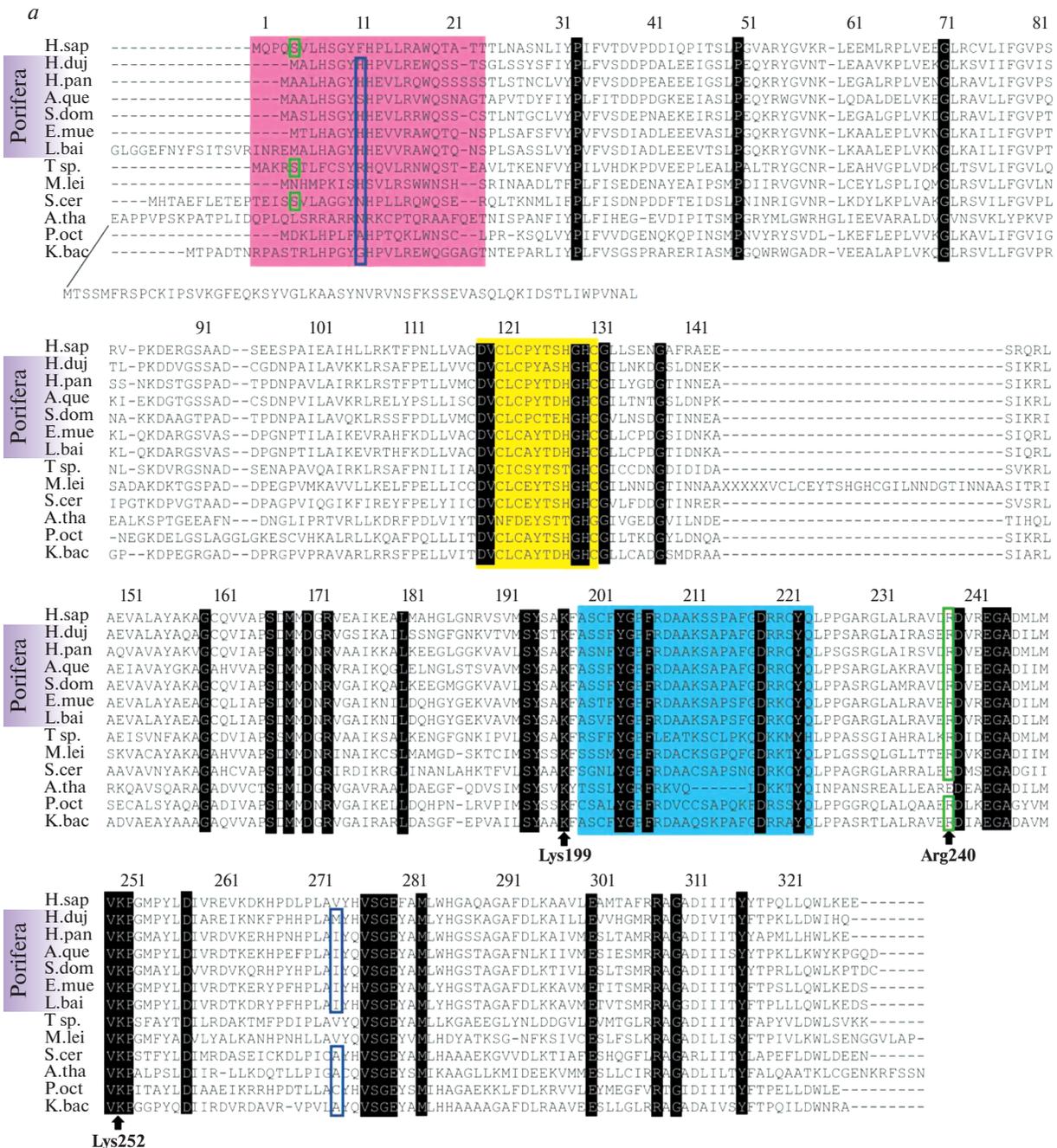
^b <https://spaces.facsci.ualberta.ca/ephybase/>

^c https://figshare.com/articles/Transcriptomic_and_genomic_assemblies_Lake_Baikal_Sponge_Data/6819812

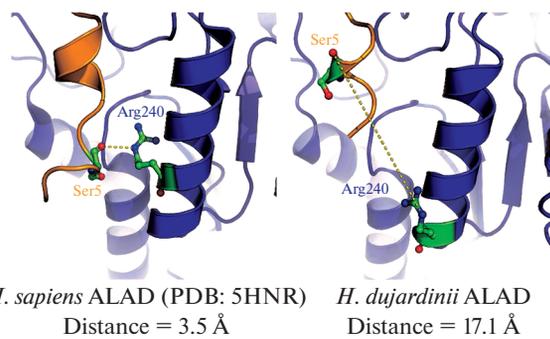
^d <http://www.compagen.org/datasets.html>

^e <https://kona.nhgri.nih.gov/mnemiopsis/>

Рис. 2. Домены и вторичная структура белка ALAD губок. *a* – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ALAD: человека, базальных животных, грибов, растений, одноклеточных и бактерий (см. табл. 1). Нумерация аминокислот соответствует нумерации б-изоформы ALAD человека (ALAD-б). Аминокислоты, идентичные у разных видов, обозначены черным цветом. Стрелками показаны консервативные остатки Lys и Arg. Зеленым цветом выделены аминокислоты, играющие ключевую роль в формировании четвертичной структуры ALAD человека. Розовым цветом обозначено N-концевое плечо; желтым – металлсвязывающий сайт; голубым – “крышка” активного центра. *б* – 3D-структуры областей, соответствующих N-концевому плечу ALAD-б человека и ALAD губки *H. dujardinii*. Выбранная структура ALAD *Homo sapiens* (PDB: 5HMS) представляет собой октамер. Значения GMQE (Global Model Quality Estimate) = 0.90, QSQE (Quaternary Structure Quality Estimate) = 0.94 для 5HMS; например, для мыши (PDB: 2Z1B) они составляли 0.83 и 0.55 соответственно. RMSD (Root-Mean-Square Deviation of atomic positions) составляет 0.59 Å. Эта структура выбрана как обладающая наиболее высокими оценками качества предполагаемых моделей GMQE и QSQE по сравнению с другими доступными структурами-шаблонами эукариот (мышь, дрожжи) на использованном сервере Swiss Model. *в* – Филогенетическое дерево ALAD губок. Максимально правдоподобное дерево ALAD губок, реконструированное с IQ-TREE; цифры на узлах дерева соответствуют оценкам поддержки узла (в процентах) методом сверхбыстрого бутстрэпа с 1000 реплик.



6



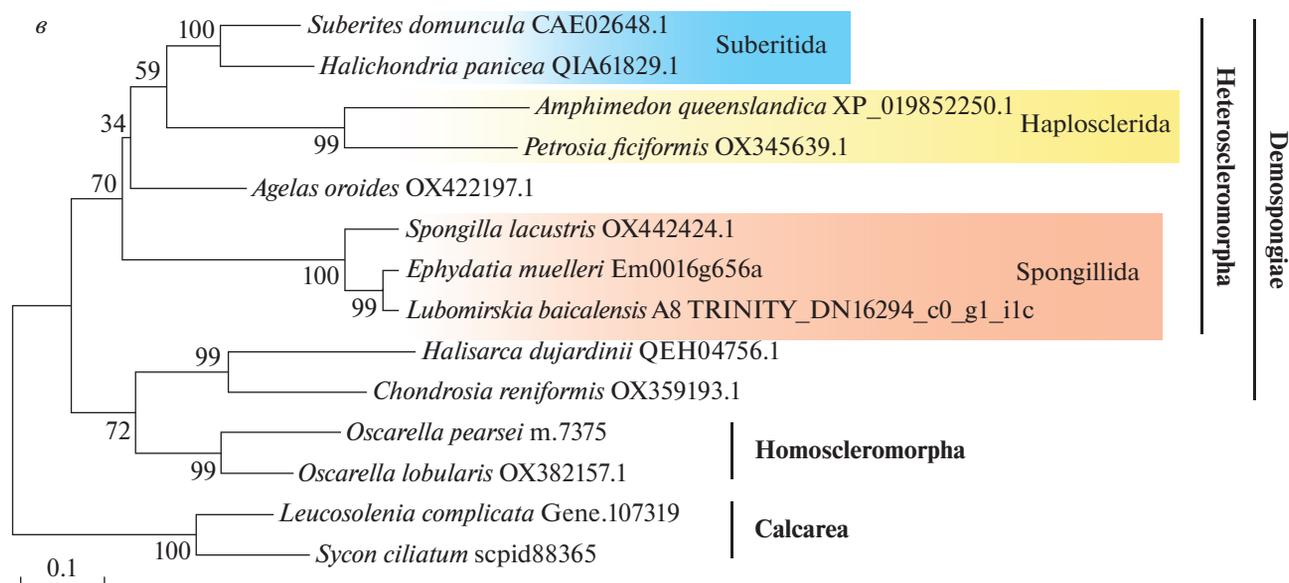


Рис. 2. Окончание.

следованные сезоны, снижалась, а экспрессия *NGB* снижалась только в клеточных агрегатах губок, собранных летом, но увеличивалась в собранных зимой, весной и осенью (рис. 3). Также увеличивалась экспрессия генов *Ft2* [16], транскрипционного фактора NF-κB и антиапоптотического белка *BCL2* в клеточных агрегатах губок, собранных во все исследованные сезоны (рис. 3). Таким образом, в летний период, характеризующийся повышенной температурой и пониженной степенью оксигенации морской воды, а также усилением интенсивности ультрафиолетового излучения, в теле губки повышена экспрессия гена глобинового белка *NGB*, но экспрессия гена ключевого белка цитозольного пути биосинтеза гема *ALAD* снижена. Несмотря на различия в среднем уровне экспрессии в интактном теле губок, собранных в разные сезоны, для *ALAD*, NF-κB и *BCL2* наблюдались сходные изменения при реагрегации, что свидетельствует о возможном их участии в регуляции этого процесса. Экспрессия *ALAD* снижалась в агрегатах по сравнению с экспрессией в тканях. Понижение экспрессии было стабильным и не зависело от периода репродуктивного цикла. Известно, что снижение экспрессии *ALAD* ассоциировано с развитием злокачественных опухолей у человека: гепатоцеллюлярной карциномы [6] и рака молочной железы [5]. С. Neslund-Dudas и соавт. [35] сообщали, что *ALAD* вовлечен в прогрессирование рака предстательной железы. Можно предположить, что при развитии опухоли и образовании агрегатов у губки могут быть задействованы сходные механизмы трансдифференцировки клеток в клеточные типы со сниженной экспрессией *ALAD*.

В транскриптомах губки *H. dujardinii* также были идентифицированы *ALAD* симбиотических микроорганизмов, в основном бактерий рода *Alpha- u Gammaproteobacteria*. Лучшие совпадения, полученные с помощью инструмента BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) путем запроса последовательностей бактериального ортолога *ALAD* в базе данных белков NCBI, имеют хорошее покрытие последовательностей (80–100%) и значения идентичности (выше 70%) для *Rhodobacteraceae*. Бактериальные симбионты *H. dujardinii* могут регулировать биосинтез гема губки. Известно, что симбиотические граммотрицательные бактерии легче утилизируют железо из гема хозяина [36].

Белок *ALAD/hemB* губки *H. dujardinii* имеет мажорную изоформу с молекулярной массой 35 414.46 Да, состоящую из 325 а.о. и имеющую изоэлектрическую точку (pI), равную 7.82. Прогнозируемая изоэлектрическая точка pI *ALAD/hemB* губки *H. dujardinii* значительно выше рабочего диапазона *ALAD/hemB* других животных. Исходя из этого, мы предположили, что активность *ALAD* губки ниже, чем у человека. Методом масс-спектрометрии идентифицирован белок *ALAD/hemB* клеток губки *H. dujardinii* и обнаружено 4 посттрансляционные модификации: ацетилирование (A6), карбамидометилирование (C96), дезамидирование (N185) и окисление (M193) (рис. 4, табл. 2).

В результате проведенного исследования, состоящего из следующих этапов: фракционирование экстрактов белков клеток интактного тела губки, диссоциированных клеток и клеточных агрегатов в 12%-ном нативном геле или SDS-ПААГ,

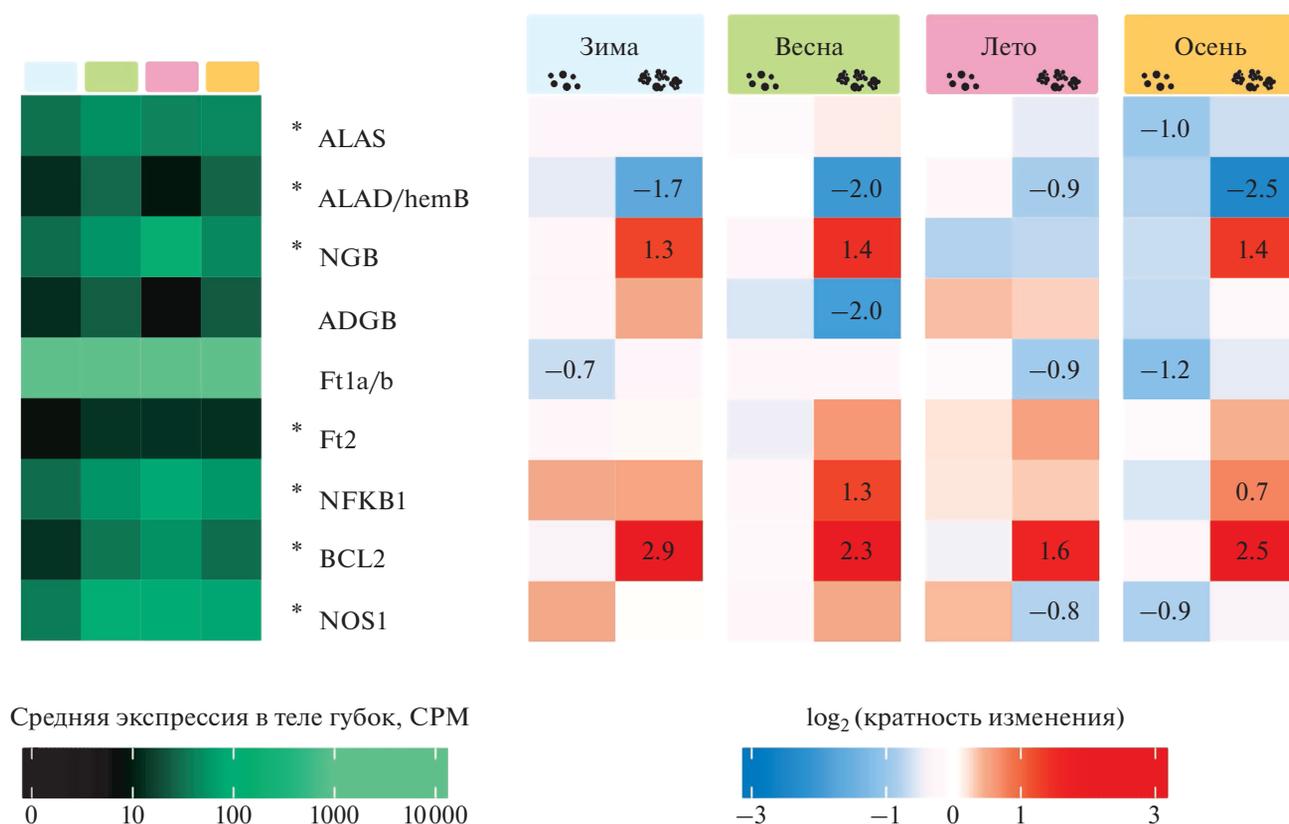


Рис. 3. Экспрессия отдельных дифференциально экспрессирующихся генов белков биосинтеза гема, ферритинов и белков, связанных с обменом железа, в процессах диссоциации/реагрегации у губки *H. dujardini* в разные периоды годового цикла. Большими и маленькими точками обозначены диссоциированные клетки и агрегаты. Экспрессия транскриптов (мРНК) белков в CPM (counts per million, число прочтений, отнесенных к данному транскрипту, на миллион прочтений) после нормализации методом TMM (trimmed mean of M-values – усеченное среднее M-значений) рассчитана с использованием программного обеспечения edgeR (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>). *Статистически значимые различия экспрессии в интактной ткани между разными сезонными периодами для скорректированных по методу Бенджамини–Хохберга значений $p < 0.001$ t -критерия Стьюдента, проведенного для повторов каждого периода относительно зимнего периода. На тепловой карте справа изображены логарифмированные уровни изменения экспрессии в диссоциированных клетках и агрегатах по отношению к образцам интактной губки (тело губки) соответствующих сезонных периодов; при этом численные значения указаны только в тех ячейках, где изменения на данном контрасте статистически значимы согласно модели дифференциальной экспрессии пакета edgeR (FDR < 0.001). В связи с тем, что последовательности мРНК минорной и мажорной изоформ ALAD практически идентичны, их экспрессия рассчитана как сумма.

последующего иммуноблоттинга с окрашиванием специфическими антителами к ALAD, – выявлено увеличение содержания ALAD в диссоциированных клетках по сравнению с таковым в теле (рис. 5). Доля активной (октамерной) формы

ALAD увеличивалась в 3.5 раза, тогда как неактивной (гексамерной) увеличивалась незначительно по сравнению с таковой в интактном теле. В клеточных агрегатах содержание октамерной и гексамерной форм ALAD снижалось относитель-

Таблица 2. Данные масс-спектрометрии для белка ALAD

Белок	NCBI ID	$-10 \lg P^a$	Покрытие, %	N_t^b	N_u^c	Посттрансляционные модификации	M_r , Да
ALAD	QEN04756.1	140.68	30	10	10	Окисление; дезаминирование; карбамидометилирование; ацетилирование	35 415

^a Показатель PEAKS DB score, отражающий статистическую значимость совпадения спектра пептида с каким-либо из базы (форма записи p -значения, определяемого программой PEAKS как вероятность того, что ложная идентификация при поиске в базе данных даст такой же или лучший результат соответствия). Значения $-10 \lg P > 30$ (эквивалентно p -значениям < 0.001) представляют собой совпадения высокого качества.

^b Общее число пептидов.

^c Число уникальных пептидов.

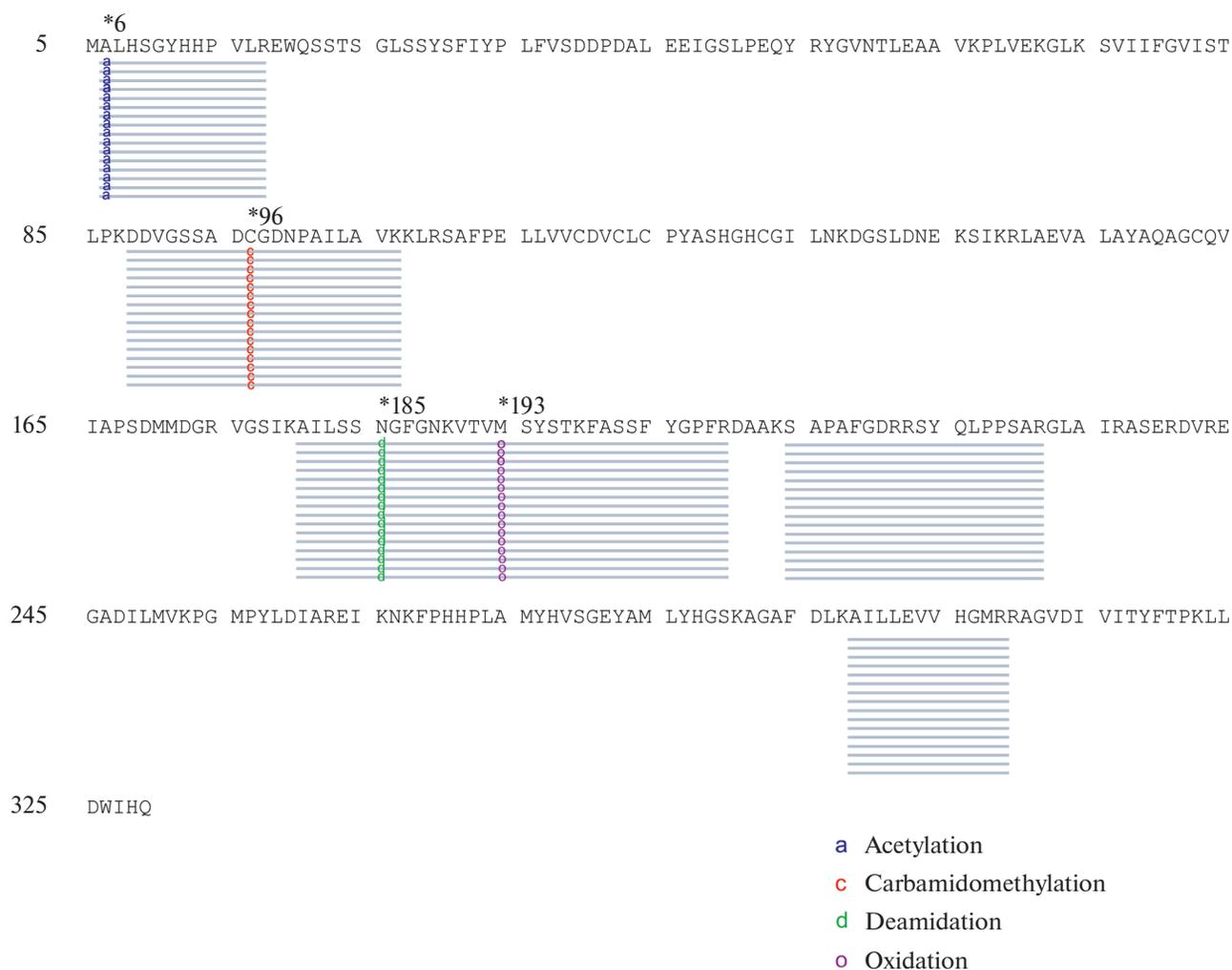


Рис. 4. Аминокислотная последовательность ALAD/hemB и пептиды, определенные с помощью масс-спектрометрии (серые линии). Указана нумерация, соответствующая ALAD человека (NP_000022.3). Модификации аминокислот обозначены соответствующими буквами.

но показателей диссоциированных клеток, но сохранялось на высоком уровне по сравнению с содержанием в интактном теле. Интересно, что в интактном теле соотношение неактивной формы ALAD/hemB к активной выше по сравнению с таковыми показателями в клетках и агрегатах. Высокое содержание неактивной (гексамерной) формы ALAD/hemB в интактном теле по сравнению с содержанием его активной формы, а также изменение этого соотношения при диссоциации и реагрегации можно интерпретировать как тонкий механизм регуляции этих процессов. Известно, что в клетках живых организмов существует динамическое равновесие различных форм ALAD: октамера, гексамера, димеров и тетрамера. Время сборки мультимеров и разборки до мономера зависит от организма, типа и состояния клеток [37], а соотношение различных форм может меняться при изменении pH, концентрации одно- и двухвалентных ионов металлов [38] и в присутствии морфологов [4].

Возможно, повышение содержания активной формы ALAD/hemB при диссоциации вызывает активацию цитоплазматического пути биосинтеза гема в определенных клеточных типах, инициируя процесс реагрегации.

Таким образом, впервые показана аллостерическая модификация ALAD/hemB в процессе диссоциации губки и реагрегации ее клеток. В регуляции экспрессии гена *ALAD* губки может участвовать транскрипционный фактор GATA-1 и метилирование ДНК [9]. Реагрегация клеток губки *H. dujardinii* сопровождается снижением экспрессии ALAD и изменением содержания активной и неактивной форм белка. Дальнейшее изучение процессов биосинтеза гема и роли ALAD/hemB в морфогенетических процессах у базальных животных позволит идентифициро-

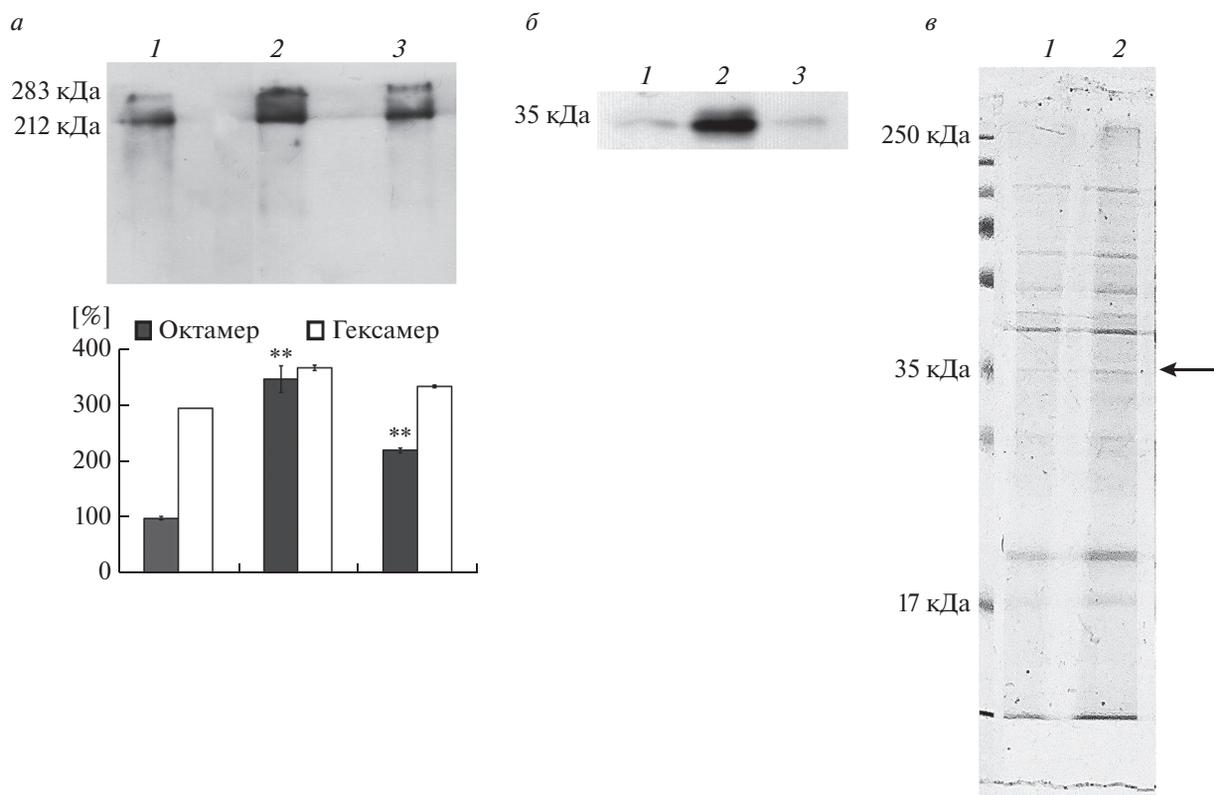


Рис. 5. Анализ содержания белка ALAD/hemB в клетках губки *H. dujardinii*. *a* – Содержание октамерной и гексамерной форм ALAD в клетках губки при диссоциации и реагрегации: 1 – тело губки, 2 – диссоциированные клетки, 3 – агрегаты клеток. Представлены результаты иммуноблоттинга, проведенного после электрофореза в 12%-ном ПААГ. *б* – Содержание белка ALAD в тех же образцах. Представлены результаты иммуноблоттинга, проведенного после электрофореза в 12%-ном SDS-ПААГ. *в* – Электрофоретический анализ образцов 1 и 2 в 12%-ном SDS-ПААГ, окрашивание Coomassie G250. Стрелкой показана полоска в геле, использованная для идентификации ALAD/hemB методом масс-спектрометрии.

вать мишени, которые могут быть использованы для коррекции нарушений этих процессов у высших животных.

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе материала туристическому центру “Полярный Круг” (Россия).

Исследования проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института биологии развития им. Н.К. Колюцова Российской академии наук (ИБР РАН).

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН (№ ГЗ 0088-2021-0008).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jaffe E.K. (2020) Porphobilinogen synthase: an equilibrium of different assemblies in human health. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **169**, 85–104. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.11.003>
- Finoshin A.D., Adameyko K.I., Mikhailov K.V., Kravchuk O.I., Georgiev A.A., Gornostaev N.G., Kosevich I.A., Mikhailov V.S., Gazizova G.R., Shagimardanova E.I., Gusev O.A., Lyupina Y.V. (2020) Iron metabolic pathways in the processes of sponge plasticity. *PLoS One*. **15**, e0228722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228722>
- Chiabrando D., Bertino F., Tolosano E. (2020) Hereditary ataxia: a focus on heme metabolism and Fe–S cluster biogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3760. <https://doi.org/10.3390/ijms21113760>
- Jaffe E.K., Lawrence S.H. (2012) Allosteric and the dynamic oligomerization of porphobilinogen synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **519**, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.10.010>
- Ge J., Yu Y., Xin F., Yang Z.J., Zhao H.M., Wang X., Tong Z.S., Cao X.C. (2017) Downregulation of delta-aminolevulinic acid dehydratase is associated with poor prognosis in patients with breast cancer. *Cancer Sci.* **108**, 604–611. <https://doi.org/10.1111/cas.13180>
- Ye Q., Yang X., Zheng S., Mao X., Shao Y., Xuan Z., Huang P. (2022) Low expression of moonlight gene

- ALAD is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Gene*. **825**, 146437.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146437>
7. Kaya A.H., Plewinska M., Wong D.M., Desnick R.J., Wetmur J.G. (1994) Human delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) gene: structure and alternative splicing of the erythroid and housekeeping mRNAs. *Genomics*. **19**, 242–248.
<https://doi.org/10.1006/geno.1994.1054>
 8. Bishop T.R., Miller M.W., Beall J., Zon L.I., Dierks P. (1996) Genetic regulation of delta-aminolevulinic acid dehydratase during erythropoiesis. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2511–2518.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2511>
 9. Desgardin A.D., Abramova T., Rosanwo T.O., Kartha S., Shim E.H., Jane S.M., Cunningham J.M. (2012) Regulation of delta-aminolevulinic acid dehydratase by Krüppel-like factor 1. *PLoS One*. **7**, e46482.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046482>
 10. Li C., Xu M., Wang S., Yang X., Zhou S., Zhang J., Liu Q., Sun Y. (2011) Lead exposure suppressed ALAD transcription by increasing methylation level of the promoter CpG islands. *Toxicol. Lett.* **203**, 48–53.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.03.002>
 11. Simion P., Philippe H., Baurain D., Jager M., Richter D.J., Di Franco A., Roure B., Satoh N., Quéinnec É., Ereskovsky A., Lapébie P., Corre E., Delsuc F., King N., Wörheide G., Manuel M.A. (2017) Large and consistent phylogenomic dataset supports sponges as the sister group to all other animals. *Curr. Biol.* **27**, 958–967.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.031>
 12. Wade J., Byrne D.J., Ballentine C.J., Drakesmith H. (2021) Temporal variation of planetary iron as a driver of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **118**, e2109865118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2109865118>
 13. Лавров А.И., Косевич И.А. (2014) Реагрегация клеток губок: механизмы и динамика процесса. *Онтогенез*. **45**, 250–271.
<https://doi.org/10.7868/S0475145014040077>
 14. Ereskovsky A., Borisenko I.E., Bolshakov F.V., Lavrov A.I. (2021) Whole-body regeneration in sponges: diversity, fine mechanisms, and future prospects. *Genes (Basel)*. **12**, 506.
<https://doi.org/10.3390/genes12040506>
 15. Sogabe S., Hatleberg W.L., Kocot K.M., Say T.E., Stoupin D., Roper K.E., Fernandez-Valverde S.L., Degnan S.M., Degnan B.M. (2019) Pluripotency and the origin of animal multicellularity. *Nature*. **570**, 519–522.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1290-4>
 16. Adameyko K.I., Burakov A.V., Finoshin A.D., Mikhailov K.V., Kravchuk O.I., Kozlova O.S., Gornostaev N.G., Cherkasov A.V., Erokhov P.A., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Moiseenko A.V., Sokolova O.S., Bonchuk A.N., Zhegalova I.V., Georgiev A.A., Mikhailov V.S., Gogoleva N.E., Gazizova G.R., Shagimardanova E.I., Gusev O.A., Lyupina Y.V. (2021) Conservative and atypical ferritins of sponges. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8635.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168635>
 17. Ereskovsky A.V. (2000) Reproduction cycles and strategies of the cold-water sponges *Halisarca dujardini* (Demospongiae, Halisarcida), *Myxilla incrustans* and *Iophon piceus* (Demospongiae, Poecilosclerida) from the White Sea. *Biol. Bull.* **198**, 77–87.
<https://doi.org/10.2307/1542805>
 18. Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., MacManes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., LeDuc R.D., Friedman N., Regev A. (2013) *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* **8**, 1494–1512.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
 19. Langmead B., Salzberg S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*. **9**, 357–359.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
 20. Li B., Dewey C.N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. **12**, 323.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
 21. Адамейко К.И., Кравчук О.И., Финошин А.Д., Бончук А.Н., Георгиев А.А., Михайлов В.С., Горностаев Н.Г., Михайлов К.В., Бачева А.В., Индейкина М.И., Бугрова А.Е., Газизова Г.Р., Козлова О.С., Гусев О.А., Шагимарданова Е.И., Люпина Ю.В. (2020) Структура нейроглобина холодноводной губки *Halisarca dujardini*. *Молекуляр. биология*. **54**, 474–479.
<https://doi.org/10.31857/S0026898420030039>
 22. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
 23. Slater G.S., Birney E. (2005) Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics*. **6**, 31.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-31>
 24. Katoh K., Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
 25. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268–274.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
 26. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermini L.S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*. **14**, 587–589.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
 27. Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. (2018) UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 518–522.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
 28. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

29. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
30. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. (2003) PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2337–2342.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1196>
31. Williams S.T., Lockyer A.E., Dyal P., Nakano T., Churchill C.K.C., Speiser D.I. (2017) Colorful sea-shells: identification of haem pathway genes associated with the synthesis of porphyrin shell color in marine snails. *Ecol. Evol.* **7**, 10379–10397.
<https://doi.org/10.1002/ece3.3552>
32. Akagi R., Kato N., Inoue R., Anderson K.E., Jaffe E.K., Sassa S. (2006) delta-Aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) porphyria: the first case in North America with two novel ALAD mutations. *Mol. Genet. Metab.* **87**, 329–336.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.10.011>
33. Inoue R., Akagi R. (2008) Co-synthesis of human delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) mutants with the wild-type enzyme in cell-free system-critical importance of conformation on enzyme activity. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **43**, 143–153.
<https://doi.org/10.3164/jcbn.2008035>
34. Maruno M., Furuyama K., Akagi R., Horie Y., Meguro K., Garbaczewski L., Chiorazzi N., Doss M.O., Hassoun A., Mercelis R., Verstraeten L., Harper P., Floderus Y., Thunell S., Sassa S. (2001) Highly heterogeneous nature of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) deficiencies in ALAD porphyria. *Blood*. **97**, 2972–2978.
<https://doi.org/10.1182/blood.v97.10.2972>
35. Neslund-Dudas C., Levin A.M., Rundle A., Beebe-Dimmer J., Bock C.H., Nock N.L., Jankowski M., Datta I., Krajenta R., Dou Q.P., Mitra B., Tang D., Rybicki B.A. (2014) Case-only gene-environment interaction between *ALAD* tagSNPs and occupational lead exposure in prostate cancer. *Prostate*. **74**, 637–646.
<https://doi.org/10.1002/pros.22781>
36. Richard K.L., Kelley B.R., Johnson J.G. (2019) Heme uptake and utilization by Gram-negative bacterial pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 81.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00081>
37. Jaffe E.K. (2016) The remarkable character of porphobilinogen synthase. *Acc. Chem. Res.* **49**, 2509–2517.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00414>
38. Selwood T., Tang L., Lawrence S.H., Anokhina Y., Jaffe E.K. (2008) Kinetics and thermodynamics of the interchange of the morphoein forms of human porphobilinogen synthase. *Biochemistry*. **47**, 3245–3257.
<https://doi.org/10.1021/bi702113z>

Characteristics of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase of the Cold-Water Sponge *Halisarca dujardinii*

O. I. Kravchuk¹*, A. D. Finoshin¹, K. V. Mikhailov^{2, 3}, R. H. Ziganshin⁴, K. I. Adameyko¹, N. G. Gornostaev¹, A. I. Zhurakovskaya¹, V. S. Mikhailov¹, E. I. Shagimardanova⁵, and Yu. V. Lyupina¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

³Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia

⁴Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

⁵Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420012 Russia

*e-mail: kravchuk444@mail.ru

Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) is a key enzyme in the cytoplasmic pathway of heme biosynthesis. Here, a primary structure of the *ALAD* gene of the marine cold-water sponge *Halisarca dujardinii*, a multimeric structure of the ALAD/hemB protein, and the *ALAD* gene expression during the sponge annual reproductive cycle were analyzed. On the base of results obtained one can suppose that the sponge *ALAD* gene expression is regulated by the transcription factor GATA-1 and DNA methylation. Re-aggregation of the sponge cells was accompanied by a decrease in *ALAD* expression and a change in the cellular content of the active ALAD/hemB form. Further study of heme biosynthesis and the role of ALAD/hemB in morphogenesis of basal animals may provide new opportunities for correcting pathologies in higher animals.

Keywords: heme biosynthesis, δ -aminolevulinic acid dehydratase, basal animals, plasticity