

МОДЕЛИРОВАНИЕ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ ИНОЗИН ТРИФОСФАТ ПИРОФОСФОГИДРОЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА R32T-ITPA И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ ФЕРМЕНТА

Колтовая Н.А.

Объединенный институт ядерных исследований,
ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: koltovaya@jinr.ru
Поступила в редакцию: 24.07.20

Аннотация. Аналоги оснований относятся к мощным антиметаболитам и опасным мутагенам, образующимся эндогенно в условиях окислительного стресса, воспаления и aberrантного синтеза нуклеотидов. Инозин трифосфатпирофосфогидролаза человека (ITPA) гидролизует трифосфаты неканонических пуриновых оснований (ИТФ, дИТФ, ХТФ, дХТФ) и, таким образом, регулирует пул нуклеотидов и защищает клетки от повреждений ДНК. Полиморфная аллель с.94C>A, характеризующаяся заменой R32T, приводит к утрате ферментативной активности в эритроцитах и накоплению ИТФ. Мутантная аллель R32T-ITPA ассоциирует с неблагоприятной реакцией на пуриновые аналоги, используемые в качестве препаратов при трансплантации органов, лечении рака крови и воспалительных заболеваний кишечника. Механизм инактивации мутантной формы R32T-ITPA не известен. Моделирование мутантной формы фосфогидролазы показало, что происходит ослабление связи между двумя субъединицами [1]. Действительно, согласно экспериментальным данным мутантный фермент менее стабилен, но активен *in vitro* [2]. Выдвинутая в литературе гипотеза о выталкивании гидрофобного остатка наружу, что служит сигналом для деградации белка [3], при моделировании мутантного фермента не подтвердилась [1]. Для понимания механизма инактивации *in vivo* необходимо более детальное рассмотрение молекулярных механизмов экспрессии гена. В процессе транскрипции гена происходит альтернативный сплайсинг и образование трех вариантов, причем в разных тканях пропорции этих вариантов разнятся. При белковом электрофорезе наблюдаются множественные полосы [4]. В данной работе, используя программы, определяющие потенциальные сайты химических модификаций, удалось определить сайты фосфорилирования, убиквитинирования и сумоилирования. Предполагается, что химические модификации участвуют в регуляции локализации белка и его активности. Полученные результаты позволяют планировать дальнейшую экспериментальную проверку наличия модифицированных форм и моделирование влияния химических модификаций на активность фермента.

Ключевые слова: *однонуклеотидный полиморфизм гена ITPA, аллельная форма инозин трифосфатпирофосфогидролаза R32T-ITPA, компьютерное моделирование, потенциальные сайты химических модификаций.*

Эволюционно-консервативная инозин трифосфатпирофосфогидролаза ИТФаза (кодируемая геном *ITPA*) относится к протекторным ферментам, которые удаляют неканонические (д)ИТФ (дезоксинуклеозид трифосфаты такие как (д)ИТФ из пула (д)ИТФ. Неканонические пурины возникают спонтанно при дезаминировании аденина или гуанина, а также являются предшественниками синтеза АМФ и ГМФ. Таким образом, ИТФаза регулирует внутриклеточный пул АТФ через предшественника ИТФ [5]. ИТФаза экспрессируется во всех тканях человека [6]. Результаты нозерн-блот и микрочипового анализа показали, что экспрессия наиболее активно происходит в клетках сердца, печени, щитовидной железы и тимуса. Исследования на клетках бактерий, дрожжей и человека выявили, что дефектность по фосфатазе приводит к повышению чувствительности к неканоническим пуринам, возрастанию скорости возникновения мутаций, замедлению прохождения клеточного цикла, возникновению повреждений ДНК и хромосомных aberrаций, увеличению апоптоза и повреждениям митохондриальной ДНК [7-13]. Последнее предполагает, что несбалансированность нуклеотидов может изменять митохондриальные функции. Как следствие, ИТФаза является важным протектором гомеостаза в клетках, снижает возникновение генетической нестабильности, рака, старения и целый ряд заболеваний у людей.

Полиморфизм гена *ITPA* ассоциирует с изменениями активности фосфатазы. Почти у трети популяции человека уровень активности *ITPA* снижен [4-16]. Так для двух аллелей в гетерозиготном состоянии наблюдается снижение активности фермента до 60 % и 22 %. Клетки эритроцитов гомозиготные по мутации *ITPA* с.94C>A имели нулевую ферментативную активность и 25 %-ную у гетерозигот [17]. Эта аллель наиболее часто встречается в Азии (11-15%), и наименее редко в Центральной и Южной Америке (1-2%), со средней частотой на Кавказе и в Африке (6-7%) [18]. У человека в гене *ITPA* идентифицировано, по крайней мере, тридцать полиморфизмов [19], из них семь имеют клинические проявления. Было показано, что мутации *ITPA* вызывают раннюю юношескую энцефалопатию и вариации связаны с ранней восприимчивостью к туберкулезу. За последнюю декаду была установлена фармакологическая значимость вариантов *ITPA* [19]. Многочисленные статьи демонстрируют, что статус *ITPA* влияет на результаты лечения гепатита С и тиопуриновую терапию [20].

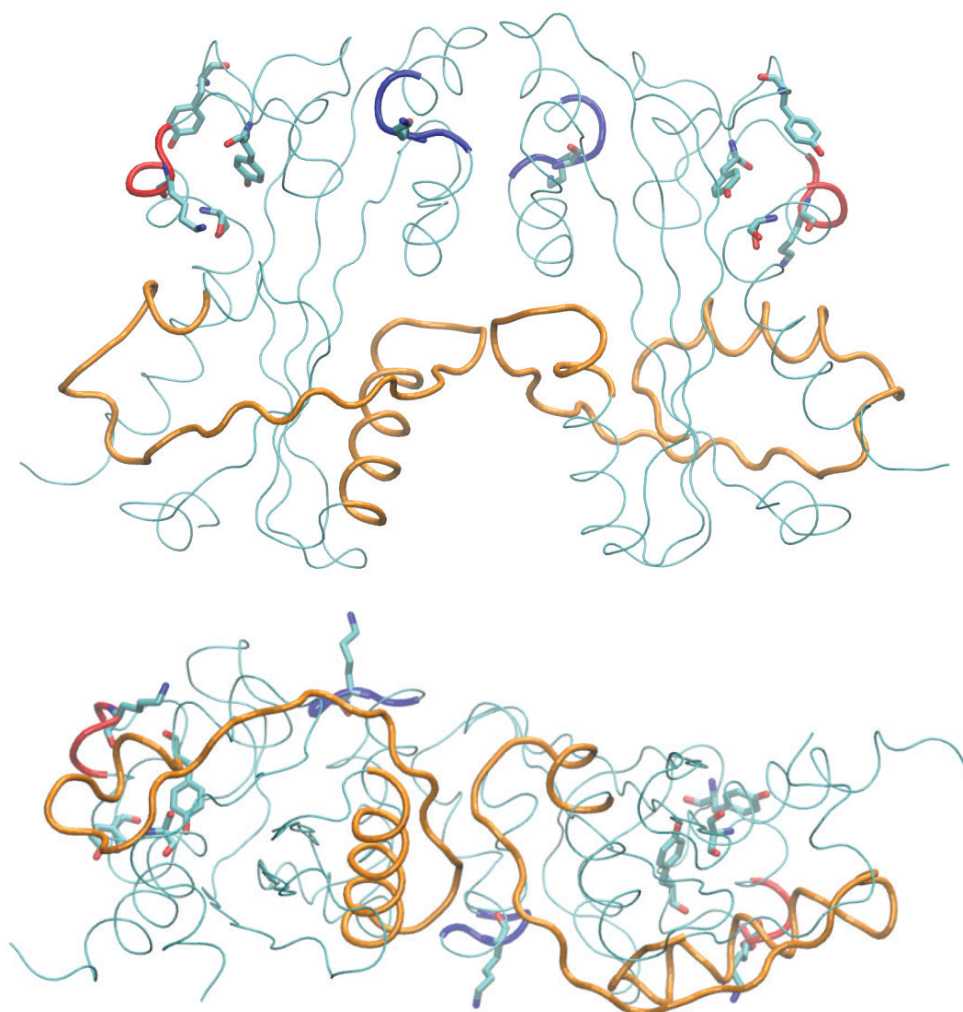


Рисунок 1. 20-нс структура димера Itpa дикого типа, полученная в результате симуляции на базе кристаллической структуры PDB: 2J4E [1]. Обозначены: делеция E2+E3 (золотой); потенциально убиквитинируемый консенсус (красный) и модифицируемый лизин (K171); сумоилируемый консенсус (синий) и модифицируемые лизины K108, K171; фосфорилируемые остатки (T36, Y162, Y166, S178)

Применение тиопурина может быть токсичным для пациентов с полиморфизмом *ITPA*, в то же время полиморфизм *ITPA* ассоциирует с улучшением результатов у пациентов принимавших рибавирин. Потенциально статус *ITPA* может оказывать влияние на большое число пациентов, и следовательно, контроль и моделирование активности ИТФаза перспективны для снижения негативных последствий для *ITPA* ассоциируемых заболеваний.

Белок. Ген *ITPA* кодирует белок размером 194 аа и массой 21,5 кДа, функционирующий в цитоплазме в виде гомодимера (45 кДа). Анализ кристаллической структуры [21, 22] показал, что мономер состоит из двух кулачков (рис. 1), в щели между которыми располагается сайт связывания нуклеотида. Субъединицы димера удерживаются вместе за счет водородных связей между кулачками.

При кристаллизации мутантного Р32Т-белка наблюдалось выдавливание N-концом соседнего остатка F31 [3]. На основании этого факта авторы предложили гипотезу протеасомной деградации мутантного белка, узнаваемого по выворачиванию гидрофобного остатка. Однако моделирование мутантного белка не подтвердило выворачивание остатка F31 [1], но подтвердило ослабление связи между субъединицами у мутантного димера.

Транскрипция. Инозинтрифосфатпирофосфогидролаза человека кодируется геном *ITPA* (*Inosine Triphosphate Pirophosphohydrolase*). Ген *ITPA* (GenBank AF026816) локализован в коротком плече хромосомы 20 (20p13). Размер гена 13,9 тпн, суммарная длина восьми экзонов составляет 585 пн [23]. В результате альтернативного сплайсинга помимо полной мРНК, обнаруживаются два укороченных варианта, у которых отсутствует либо 2 и 3 экзоны ($\Delta 123$ н), либо только 3 экзон ($\Delta 65$ н) [24]. Для транскрипции характерна тканеспецифичность. Например, в лейкоцитах периферической крови транскрипты гена *ITPA* распределяются по длине следующим образом – 70 % полная мРНК, 25 % короткая и 5 % средняя; в ретикулоцитах – 92 %, 8 %, 0 %, а в клетках фибробластов – 94 %, 1 % и 5 %, соответственно. В то же время, в клетках HeLa превалирует средний вариант [12]. Отметим, что для эукариот характерен альтернативный сплайсинг. Около 74 % генов человека подвергаются альтернативному сплайсингу. Кроме того, 15 % точечных мутаций, ассоциированных с заболеваниями человека, приводят к ошибочному сплайсингу пре-мРНК [25]. В эукариотических клетках альтернативный сплайсинг пре-мРНК обеспечивает регуляцию экспрессии генов и образование широкого спектра изоформ, влияющих на активность и локализацию белка в клетке.

Активность. Хотя снижение уровня полного транскрипта пре-мРНК у мутанта может частично объяснить снижение активности фермента, но для полной инактивации этого недостаточно. В настоящее время биохимия ИТФазы и ее специфическая роль в метаболизме пуринов недостаточно изучены. Хотя некоторое понимание достигнуто в отношении субстратной селективности, однако неизвестно существуют ли белок-связывающие партнеры, модифицируется ли фермент пост-трансляционно, есть ли аллостерическая регуляция. Кроме того, роль ингибирования субстратом в клетке неизвестна, может ли оно служить для модулирования внутриклеточной концентрации ИТФ, ИМФ и даже инозина. Это предположение косвенно подтверждается расхождением данных, полученных в работах с очищенной/рекомбинантной ИТФазой и полными клеточными лизатами. Например, Бэккер с соавторами нашел, что ИТФаза не является объектом ингибирования субстратом, в экспериментах они использовали клеточный экстракт эритроцита в качестве источника белка [26], в то время как исследования, использующие очищенный/рекомбинантный белок ИТФазы в качестве источника белка, показали ингибирование субстратом [5, 6, 27]. Эти результаты указывают, что уровень ингибирования субстратом для ИТФазы может модулироваться *in vivo*.

Из четырех SNP клинически значимых мутаций две влияют на структуру белка и два аллельных варианта гена *ITPA* ассоциируются со снижением ферментативной активности: *ITPA* с.94C>A и *ITPA* g.IVS2+21A>C [23]. Первая из них локализована в экзоне 2, вторая – в интроне 2. Наиболее изучена экзонная мутация с.94C>A (p.Pro32Thr), локализуется она в регуляторном элементе ESE (*exonic splicing enhancer*). Однонуклеотидная замена с.94C>A влияет на спектр транскриптов. Этот вариант изменяет сплайсинг мРНК, в результате мисс-сплайсинга вырезаются 2 и 3 экзоны и предположительно синтезируется неактивный белок. Хотя ошибочный сплайсинг происходит с некоторой частотой и в клетках дикого типа, уровень ошибочного сплайсинга возрастает в три раза для гомозиготных вариантов. У эритроцитов количество длинных вариантов падает до 33 %, а короткого – возрастает до 69 % [24]. Кроме того, показано, что в результате замены Pro32Thr образуется белок с почти в два раза сниженной каталитической активностью и стабильностью [2, 3, 28]. Эта позиция в полипептидной цепи локализована во внешней петле, соседней белок-димерному интерфейсу, и близко к остаткам, которые участвуют в катализе [21, 22]. Пролин в этом положении, по-видимому, ограничивает подвижность внешней полипептидной цепи, которая снижает способность раствора проникать внутрь белка и обеспечивает поддержание соответствующих позиции каталитическим остаткам [3, 28]. Точечная мутация P32T, по-видимому, влияет на белок тремя способами: снижает экспрессию полного транскрипта, снижает каталитическую активность и снижает стабильность [2, 3, 24, 28]. Иными словами, однонуклеотидный полиморфизм (SNP) приводит к слабой экспрессии нестабильного, каталитически компромиссного белка.

Трансляция. Для получения чистого белка полную версию кДНК дикого (P32) или мутантного (T32) типов встраивали в плазмиду и трансформировали в бактериальные клетки. Выделенный и очищенный белок разгоняли с помощью ЭФ в полиакриламидном геле с SDS, затем гели окрашивали Кумасси [2, 6]. Другие авторы разгоняли лизат клеток, а белок локализовали с помощью Вестерн блот-гибридизации [4]. При ЭФ очищенного белка обычно наблюдается одна полоса, соответствующая белку ~23 кДа, но при перегрузе появляется вторая полоса ~60 кДа. Первая, по-видимому, соответствует мономеру, а вторая – димеру. При ЭФ с SDS почти все димерные формы распадаются, так как происходит разрыв водородных связей.

Укороченный белок (~16,5 кДа) не виден на приведенных ЭФ, возможно из-за урезания авторами электрофореграмм. Его образование не исключено, поскольку сайты связывания между субъединицами в верхнем кулачке сохранились. Но его функциональность скорее всего нарушена, поскольку дилетированный фрагмент участвует в связывании нуклеотида. Промежуточный белок abortивный, так как в результате вырезания экзона 3 происходит сдвиг рамки считывания. Поэтому в клетках HeLa, в которых преобладает мРНК среднего размера, по-видимому, будет наблюдаться сильное снижение активности.

Вестерн блот-гибридизация лизатов клеток человека (фибробласты человека, эпителиальные колоректальные раковые клетки), несущих дикий и мутантный аллели, показал наличие четырех ярких и нескольких слабых полос (рис. 2).

Не исключено, что множественность полос связана с неспецифичностью антител. Однако, можно предположить, что наблюдаются реально существующие химически модифицированные формы ИТФазы.

Пост-трансляционная химическая модификация. Для поиска сайтов химической модификации использовали несколько программ. Эти программы оперируют понятием «предсказательная оценка» консервативности консенсуса (score). Эта величина лежит в области 0,000-1,000. Оценка $s > 0,500$ показывает положительное предсказание. Анализ аминокислотной последовательности белка:

```
GSMAASLVGKKIVFVTGNAKKLEEIVVQILGDKFPCTLV AQKIDLPEYQGE PDEISIQKCQEAVRQVQGPVLV  
EDTCLCFNALGGLPGPYIKWFLEK LKPEGLHQLLAGFEDKSAYALCTFALSTGDPSQPVRLFRGRTSGRIVAPR  
GCQDFGWDPCFQPDG YEQT YAEMPKAEKNAVSHRFRALLELQEYFGSLAA
```

выявил потенциальные консенсусы модификации убиквитином, SUMO и фосфатом (0,5 кДа) (табл. 1). При убиквитинировании к лизину белка-субстрата присоединяется через глицин 76 одна (моноубиквитинирование) или несколько (полиубиквитинирование) молекул убиквитина (8,5 кДа). Белки SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier proteins*) подобны убиквитину и представляют семейство малых убиквитин-подобных белков. При

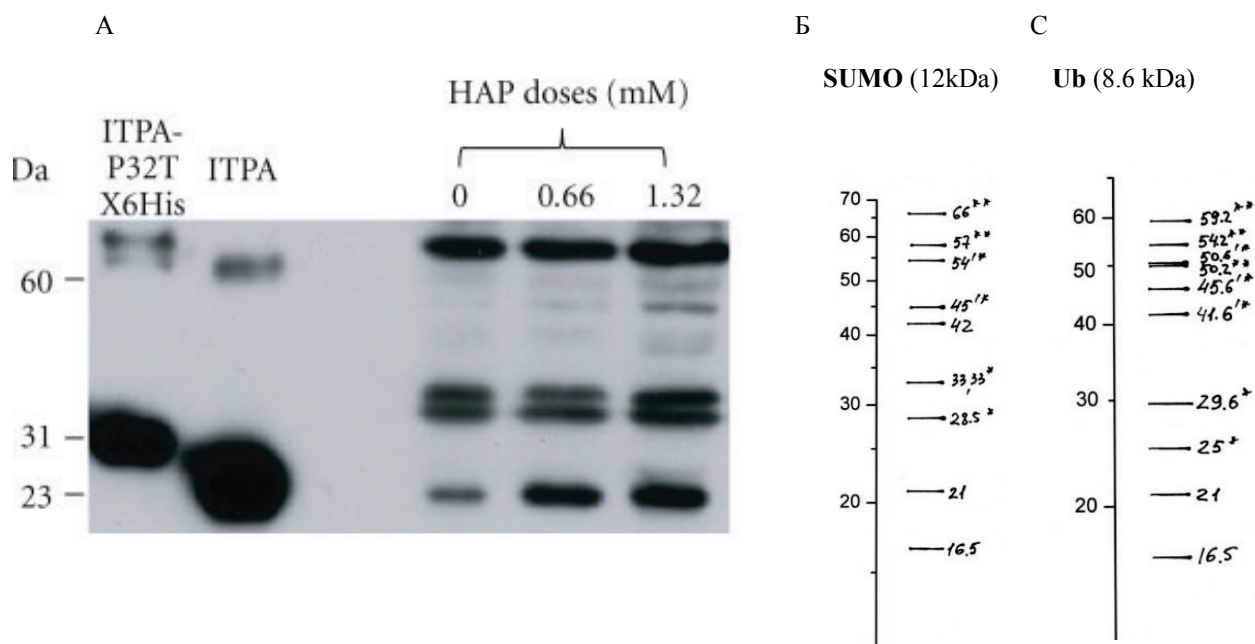


Рисунок 2. А) Белковая электрофореграмма лизата клеток НСТ116. Уровень Itpa [4]. Б) Теоретически ожидаемые размеры комбинации моносумоилированных и немодифицированных субъединиц (димеры и мономеры). С) Теоретически ожидаемые размеры комбинации моноубиквитинированных и немодифицированных субъединиц (димеры и мономеры)

сумоилировании лизин белка-субстрата связывается с белком SUMO (12 кДа), посредством каскада реакций аналогичной системе убиквитинирования. Зрелая молекула SUMO образуется в результате отщепления четырех концевых остатков. В результате С-концевой глицин связывается с лизином субстрата изопептидной связью.

Структура белковой молекулы позволяет определить локализацию этих высоко консервативных сайтов (рис. 1). Оказалось, что лизин K108 лежит на поверхности белковой молекулы и доступен для сумоилирования. Лизин K171 также локализуется в петле на поверхности белка и может как сумоилироваться, так и убиквитинироваться. На рисунке 2 приведена электрофореграмма лизата клеток, ИТФаза локализована с помощью блот-гибридизации. Более стабильные формы дают яркие полосы, менее стабильные – слабые. Известно, что сумоилированное состояние нестабильно и сумоилированная форма дает полосы слабой интенсивности. Рядом приведены теоретически ожидаемые электрофореграммы при сумоилировании и моноубиквитинировании субъединиц.

Кроме того, лизин K171 окружен тремя сайтами фосфорилирования (Y162, Y166, S178). Еще один сайт фосфорилирования локализован в мутантной петле T36 и замена P32T улучшает консервативную последовательность, узнаваемую киназой PKC. Оценка прогноза положительна в обоих случаях и возрастает с

Таблица 1. Потенциальные сайты химической модификации ИТФаза

Программа	Сайт модификации	Окружение	Score	Фермент
UbPred: predictor of protein ubiquitination sites	K171	PKAE	0.67	
SUMOplot™ Analysis Program JASSA	K108 K171 K108	LKPE PKAE LKPE	0.91 Strong consen. Consensus	
NetPhos	T16 T36 T36 T119 S123 T124 S139 Y162 Y166 S178	IVFVTGNAK KFPCTLVAQ KFTCTLVAQ YALCTFALS TFALSTGDP FALSTGDPS RGRTSGRIV QPDGYEQTY YEQTYAEMP KNAVSHRFR	0.868 0.690 0.799 0.847 0.984 0.750 0.957 0.956 0.983 0.773	PKC PKC PKC PKC unsp* PKC unsp unsp unsp

*unsp– non-specific prediction

0,69 до 0,799, оба эти значения лежат в области умеренного уровня консервативности. У киназы РК наблюдается наибольшее количество сайтов фосфорилирования – 6 сайтов, в их числе четыре с высоким уровнем консервативности. Всего программа выявляет 22 потенциальных сайта фосфорилирования.

Локализация. Изучение локализации белка с помощью флуоресцентных антител показало, что белок локализуется как в цитоплазме, так и в ядре [4]. Причем в цитоплазме он образует сеть вокруг ядра, а в ядре образуются яркие гранулы. Локализация белка сильно различается у линии WI-38 и мутанта P32T. Мутантный белок не образует сетчатую структуру вокруг ядра. Несколько светящихся областей по соседству с ядром присутствуют, но они не структурированы.

Гипотеза. Регуляция активности мутантного белка осуществляется, по-видимому, не в результате выворачивания остатка F31 и последующего узнавания его системой деградации, а в результате тонкой химически модулируемой настройки. На поверхности белка обнаружены консервативные последовательности убиквитинирования, сумоилирования и фосфорилирования. Можно предположить, что мутантная петля служит регулятором связывания регуляторного белка.

Убиквитинирование регулирует деградацию белков (через протеасомы и лизосомы), координирует субклеточную локализацию белков, их активацию и инактивацию, модулирует белок-белковые взаимодействия [29]. Моноубиквитинирование влияет на такие клеточные процессы как транспорт через мембрану и эндоцитоз. Полиубиквитинирование участвует в деградации белков. В противоположность убиквитину, SUMO не используется в качестве метки для деградации. Сумоилирование белков влияет на такие клеточные процессы, как регуляция ядерно-цитоплазматического транспорта, транскрипции, стабильность белков, митоз, апоптоз, и др. [30]. Особый интерес представляет взаимодействие убиквитинирования и фосфорилирования [31], так как фосфорилирование часто служит маркером событий, в которых убиквитинирование ведет к деградации.

Примером регуляции с помощью химической модификации может служить хорошо изученный фермент рибонуклеотидредуктаза. Рибонуклеотидредуктаза RNR, также, как и нуклеозид трифосфатпирифосфатаза ИТРА, участвует в синтезе пуринов и регуляции баланса нуклеотидов. Комплекс RNR катализирует лимитирующую реакцию в синтезе *de novo* дезоксирибонуклеотидов – образование дезоксирибонуклеотидов из рибонуклеотидов. Сбалансированная продукция дезоксирибонуклеотид-трифосфатов (дНТФ) необходима для точного удвоения генома. Как концентрация в целом, так и баланс между индивидуальными нуклеотидами (дАТФ, дТТФ, дГТФ, и дЦТФ) тонко регулируются рибонуклеотид-редуктазой. Активность рибонуклеотидредуктазы меняется в процессе клеточного цикла, возрастая от первоначально низкого уровня до максимального в фазе S и снижаясь в конце фазы S.

RNR – это тетрамерный комплекс, состоящий из двух больших субъединиц (Rnr1) и двух маленьких (Rnr2 и Rnr4). В процессе клеточного цикла субъединица Rnr1 находится в цитоплазме, в то время как Rnr2 и Rnr4 в ядре. В ответ на начало синтеза ДНК (фаза S) или при повреждении ДНК субкомплекс Rnr2:Rnr4 подвергается checkpoint-зависимому перераспределению между ядром и цитоплазмой и связывается с гомодимером Rnr1, образуя активный комплекс RNR [32-34]. В регуляции участвуют белки Dif1 и Wtm1. Dif1 контролирует субклеточную локализацию субкомплекса Rnr2:Rnr4, непосредственно связываясь с ним и опосредуя ядерный импорт [34, 35]. В то время как Wtm1 служит ядерным якорем и поддерживает ядерную локализацию Rnr2:Rnr4 вне фазы S или в отсутствие повреждений ДНК [34, 36, 37]. В клетках дрожжей в ответ на повреждения ДНК запускается киназный каскад и checkpoint-киназа Rad53 фосфорилирует множество белков, в том числе несколько белков, регулирующих активность RNR, таких как Hug1 (транспорт субъединиц между ядром и цитоплазмой) [38], Sml1 (ингибитор редуктазы), Crt1 (активатор транскрипции генов RNR), Dif1 (ядерный импорт). Кроме того, редуктаза ингибируется конечным продуктом (дАТФ).

В числе киназ, потенциально фосфорилирующих фосфатазу ИТРА, есть такие как DNA-ПК (s 0.557, 0.642, 0.528), cdc2 (s 0.509), ATM (s 0.575), СКII (s 0.637). Можно предположить, что фосфатаза регулируется в процессе клеточного цикла и checkpoint-ответа. Возможно, ее экспрессия увеличивается в фазе S, при checkpoint-остановке в случае задержки движения репликативной вилки при повреждении ДНК, при репарации двунитевого разрыва ДНК и повышенной потребности нуклеотидов. Можно предположить, что при повышении синтеза пуринов повышается и уровень неканонических нуклеотидов. Для фосфатазы, также, как и для редуктазы, продемонстрировали ингибирование субстратом [6, 27]. Для понимания молекулярных механизмов регуляции активности фосфатазы и ее инактивации у мутантных форм требуются дальнейшие исследования возможных химических модификаций фосфатазы и их роль в локализации и активации фермента.

В заключение хочу выразить благодарность Душанову Э.Б. за исполнение рисунка 1.

Список литературы / References:

1. Dushanov E.B., Koltovaya N.A. Effect of substitution Pro32Thr on the interaction between dimer subunits of human phosphatase ИТРА. *Current Enzyme Inhibition*, 2019, vol. 15, iss. 1, pp. 46-54. DOI: 10.2174/1573408015666190327174841.
2. Stepchenkova E.I., Tarakhovskaya E.R., Spitler K., Frahm C., Menezes M.R., Simone P.D., Kolar C., Marky L.A., Borgstahl G.E., Pavlov Y.I. Functional study of the P32T ИТРА variant associated with drug sensitivity in humans. *Journal of Molecular Biology*, 2009, vol. 392 (3), pp. 602-613.

3. Simone P.D., Struble L.R., Kellezi A., Brown C.A., Grabow C.E., Khutsishvili I., Marky L.A., Pavlov Y.I., Borgstahl G.E.O. The human ITPA polymorphic variant P32T is destabilized by the unpacking of the hydrophobic core. *Journal of Structural Biology*, 2013, vol. 182, pp. 197-208.
4. Waisertreiger I.S.-R., Menezes M.R., Randazzo J., Pavlov Y.I. Elevated levels of DNA strand breaks induced by a base analog in the human cell line with the P32T ITPA variant. *Journal of Nuclear Research*, 2010. DOI: 10.4061/2010/872180.
5. Vanderheiden B.S. ITP pyrophosphohydrolases and IDP phosphohydrolase in rat tissue. *The Journal of Cellular Physiology*, 1975, vol. 86, pp. 167-175.
6. Lin S., McLennan A.G., Ying K., et al. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the ITPA gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, pp. 18695-18701.
7. Pang B., McFalline J.L., Burdis N.E., et al. Defects in purine nucleotide metabolism lead to substantial incorporation of xanthine and hypoxanthine into DNA and RNA. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2012, vol. 109, pp. 2319-2324.
8. Abolhassani N., Iyama T., Tsuchimoto D., et al. NUDT16 and ITPA play a dual protective role in maintaining chromosome stability and cell growth by eliminating dIDP/IDP and dITP/ITP from nucleotide pools in mammals. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 38, pp. 2891-2903.
9. Burgis N.E., Brucker J.J., Cunningham R.P. Repair system for noncanonical purines in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2003, vol. 185, pp. 101-110.
10. Noslov V.N., Staak K., Shcherbakova P.V., Kozmin S.G., et al. HAMI, the gene controlling 6-N-hydroxylaminopurine sensitivity and mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1996, vol. 12, pp. 17-29.
11. Waisertreiger I.S.-R., Menezes M.R., Radazzo J., Pavlov Y.I. Elevated levels of DNA strand breaks induced by a base analog in the human cell line with the P32T ITPA variant. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, vol. 2010, p. 872180.
12. Menezes M.R., Waisertreiger I.S.-R., Lopez-Bertoni H., Luo X., Pavlov Y.I. Pivotal role of inosine triphosphate pyrophosphatase in maintaining genome stability and the prevention of apoptosis in human cells. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, p. e32313.
13. Zamzami M.A., Duley J.A., Price G.R., et al. Inosine triphosphate pyrophosphohydrolases (ITPA) polymorphic sequence variants in adult hematological malignancy patients and possible association with mitochondrial DNA defects. *Journal of Hematology and Oncology*, 2013, vol. 6, p. 24.
14. Rembeck K., Waldenstrom J., Hellstrand K., et al. Variants of the inosine triphosphate pyrophosphatase gene are associated with reduced relapse risk following treatment for HCV genotype 2/3. *Hepatology*, 2014, vol. 59, pp. 2131-2139.
15. Jimmerson L.C., Urban T.J., Truesdale A., et al. Variant ITPA phenotypes are associated with increased ribavirin triphosphate levels. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2016. DOI: 10.1002/jcph.783.
16. Thompson A.J., Fellay J., Patel K., et al. Variants in the ITPA gene protect against dose reduction. *Gastroenterology*, 2010, vol. 139, pp. 1181-1189.
17. Shipkova M., Lorenz K., Oellerich M., Wieland E., von Ahsen N. Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolases (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in Caucasian population. *Clinical Chemistry*, 2006, vol. 52, pp. 240-247.
18. Von Ahsen N., Oellerich M., Armstrong V.W. Characterization of the inosine triphosphatase (ITPA) gene: haplotype structure, haplotype-phenotype correlation and promoter function. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2008, vol. 30, pp. 16-22.
19. Burgis N.E. A disease spectrum for ITPA variation: advances in biochemical and clinical research. *Journal of Biomedical Science*, 2016, vol. 23, pp. 73.
20. Bierau J., Lindhout M., Bakker J.A. Pharmacogenetics significance of inosine triphosphatase. *Pharmacogenomics*, 2007, vol. 8, pp. 1221-1228.
21. Porta J., Kolar C., Kozmin S.G., Pavlov Y.I., Borgstahl G.E. Structure of the orthorhombic form of human inosine triphosphate pyrophosphatase. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2006, vol. 62, pp. 1076-1081.
22. Stenmark P., Kursula P., Flodin S., Gräslund S., Landry R., Nordlund P., Schüler H. Crystal structure of human inosine triphosphatase. Substrate binding and implication of the inosine triphosphatase deficiency mutation P32T. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol. 282, pp. 3182-3187.
23. Sumi S., Marinaki A., Arenas M., et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase. *Human Genetics*, 2002, vol. 111, pp. 360-367.
24. Arenas M., Duley J., Sumi S., Sanderson J., Marinaki A. The ITPA c.94C>A and g.IVS2+21A>C sequence variants contribute to mis-splicing of the ITPA gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1772, pp. 96-102.
25. Baralle F.E., Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, vol. 18, pp. 437-451.
26. Bakker J.A., Lindhout M., Habets D.D., van den Wijngaard A., Paulussen A.D., Bierau J. The effect of ITPA polymorphisms on the enzyme kinetic properties of human erythrocyte inosine triphosphatase toward its substrates ITP and 6-Thio-ITP. *Nucleotides Nucleic Acids*, 2011, vol. 30, pp. 39-49.
27. Burgis N.E., Cunningham R.P. Substrate specificity of RdgB protein, a deoxyribonucleoside triphosphate pyrophosphohydrolases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol. 282, pp. 3531-3538.
28. Herting G., Barber K., Zappala M.R., Cunningham R.P., Burgis N.E. Quantitative *in vitro* and *in vivo* characterization of the human P32T mutant ITPase. *Biochemical and Biophysical Acta*, 2010, vol. 802, pp. 269-274.

29. Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 2009, vol. 37, pp. 937-953.
30. Gareau J.R., Lima C.D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, vol. 11, pp. 861-871.
31. Nguyen L.K., Kolch W., Kholodenko B.N. When ubiquitination meets phosphorylation: a systems biology perspective of EGFR/MAPK signaling. *Cell Communication and Signaling*, 2013, vol. 11, pp. 52-67.
32. Yao R., Zhang Z., An X., Bucci B., Perlstein D.L., Stubbe J., Huang M. Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2003, vol. 100, pp. 6628-6633.
33. An X., Zhang Z., Yang K., Huang M. Cotransport of the heterodimeric small subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase between the nucleus and the cytoplasm. *Genetics*, 2006, no. 173, pp. 63-73.
34. Lee Y.D., Wang J., Stubbe J., Elledge S.J. Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase. *Molecular Cell*, 2008, vol. 32, pp. 70-80.
35. Wu X., Huang M. Dif1 controls subcellular localization of ribonucleotide reductase by mediating nuclear import of the R2 subunit. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, vol. 28, pp. 7156-7167.
36. Zhang Z., An X., Yang K., Perlstein D.L., Hicks L., Kelleher N., Stubbe J., Huang M. Nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit requires a karyopherin and a WD40 repeat protein. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2006, vol. 103, pp. 1422-1427.
37. Lee Y.D., Elledge S.J. Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes Development*, 2006, vol. 20, pp. 334-344.
38. Meurisse J., Bacquin A., Richet N., Charbonnier J.B., Ochsenbein F., Peyroche A. Hup1 is an intrinsically disordered protein that inhibits ribonucleotide reductase activity by directly binding Rnr2 subunit. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, pp. 13174-13185.

MODELING MUTANT HUMAN INOSINE TRIPHOSPHATE PYROPHOSPHOHYDROLASE P32T-ITPA AND POTENTIAL REGULATORY CHEMICAL MODIFICATIONS OF THE ENZYME

Koltovaya N.A.

6 Joliot-Curie St., Joint Institute for Nuclear Research
Dubna, 141980, Russia; e-mail: koltovaya@jinr.ru

Abstract. Base analogs are powerful endogenous antimetabolites and dangerous mutagens forming under oxidative stress, inflammation and aberrant nucleotide synthesis. Human inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) catalyzes the hydrolysis of triphosphates of non-canonic purine bases (ITP, dITP, XTP, dXTP) and thus regulates the nucleotide pool and protects cells from DNA damage. The polymorphic allele c.94C>A, which encodes the enzyme with P32T substitution, causes enzymatic activity loss in erythrocytes and ITP accumulation. An association is observed between the mutant allele P32T-ITPA and adverse sensitivity to purine base analog drugs that are used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia and inflammatory intestinal diseases and for preventing organ rejection after transplantation. The inactivation mechanism of the polymorph P32T-ITPA enzyme is unknown. A simulation of the enzyme's mutant form showed weakening of the interconnection between the two subunits [1]. Indeed, the experimental data indicate that the mutant enzyme is less stable but active *in vivo* [2]. The assumption made in the literature that the hydrophobic residue is pushed outside, which is a signal for proteasome degradation, has not been confirmed *in silico* [1]. To understand the mechanism of inactivation *in vivo*, it is necessary to examine the molecular mechanisms of gene expression in more detail. It has been found that alternative splicing and formation of three forms is possible; the latter's proportion being tissue specific. Numerous strips are observed in protein electrophoresis [4]. In the present work, using special programs that identify the potential chemical modification sites, we have determined the potential sites of phosphorylation, ubiquitination, and SUMOylation. It is assumed that chemical modifications participate in the regulation of the enzyme's location and activity. Hypothetic mechanisms are suggested. The results allow us to carry out a further experimental check of the existence of modified forms and to simulate the impact of chemical modifications on enzyme activity.

Key words: single nucleotide polymorphism, ITPA gene, mutant inosine triphosphatase P32T-ITPA, computer simulation, potential sites of regulatory chemical modifications.