

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В МОЛЕКУЛЕ БЕЛКА ДРОЖЖЕВОЙ АРГИНИН ПЕРМИАЗЫ CAN1

Колтовая Н.А., Жучкина Н.И., Душанов Э.Б.

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

Аннотация. При изучении закономерностей мутагенеза у дрожжей часто используют возникновение прямых мутаций в гене аргинин пермиазы *CAN1*, нарушение которого приводит к канавамин-резистентности. Нами получена представительная коллекция мутаций *can1*, позволяющая провести мутационный анализ структуры аргинин пермиазы. Этот фермент относится к суперсемейству транспортеров, переносящих аминокислоты через клеточные мембраны. Несмотря на несхожесть последовательностей, они обладают схожей структурой. Эукариотическая аргинин пермиаза может служить моделью для изучения структуры и функционирования аналогичных транспортеров. Изучение транспорта аргинина имеет особое значение в связи с тем, что аргинин является одним из ключевых метаболитов в процессах азотистого обмена. Аргинин является субстратом NO-синтазы в синтезе оксида азота NO, универсального трансммиттера, нейромедиатора и участника программируемой гибели клеток.

Ключевые слова: аргинин пермиаза, транспортеры APC-суперсемейства, мутационный анализ структуры фермента.

Молекулярные функции белка тесно связаны со структурой. Изучение изменений структуры и функции в результате мутаций важно для понимания формирования патологического фенотипа. На уровне нуклеотидной последовательности удалось выявить некоторые закономерности возникновения мутаций, например, превышение частоты транзиций над трансверсиями, однонуклеотидные выпадения в полинуклеотидных трэках, возникновение горячих точек рекомбинации, и т.д. Однако на закономерности мутагенеза влияют не только особенности нуклеотидной последовательности, но и селекция на уровне белка. Некоторые мутации нейтральны, например, при замене в третьем нуклеотиде кодона, и не приводят к замене аминокислоты, или не меняют знак аминокислоты, другие локализованы в неактивных участках белка. Какова реальная картина распределения возможных мутаций, инактивирующих фермент? Какова локализация «белых пятен», мутации в которых не нарушают функционирование фермента? Насколько занижена оценка частоты возникновения мутаций? Как сильно частота мутаций отличается для разных генов? Для ответа на эти вопросы необходим анализ конкретных данных по разным генетическим системам.

При изучении закономерностей мутагенеза у дрожжей часто используют прямые мутации в гене аргинин пермиазы, переносящей аргинин через клеточные мембраны. Изучение транспорта аргинина имеет особое значение в связи с тем, что аргинин является одним из ключевых метаболитов в процессах азотистого обмена. Аргинин является субстратом NO-синтазы в синтезе оксида азота NO, универсального трансммиттера, нейромедиатора и участника программируемой гибели клеток. Чрезмерное потребление аргинина иммунными клетками, которые обычно защищают мозг, по-видимому, является одной из причин возникновения болезни Альцгеймера [1].

Дрожжи – удобная модель для изучения функционирования аргинин пермиазы. Включение аминокислот в клетки дрожжей опосредуются ~16 плазмo-мембранными пермиазами, большинство из которых принадлежат к APC (*amino acid-polyamine-organocation*) – суперсемейству транспортеров, найденных во всех живых организмах, включая человека, растения и прокариоты. Транспорт аминокислот через мембрану клеток осуществляется при помощи **вторичного активного** транспорта и **глутатионовой** транспортной системы. Вторичный активный транспорт – это перенос веществ, в данном случае аминокислот, чаще всего с использованием градиента концентрации натрия между внутренней и наружной сторонами клеточной мембраны. Низкая концентрация ионов натрия внутри клеток создается мембранным ферментом Na^+, K^+ -АТФазой. Специфический белок-транспортер связывает аминокислоту и ион натрия. В отсутствие натрия аминокислота **не в состоянии** связаться с белком-переносчиком. Затем, изменив свое положение в мембране, белок отдает ион натрия в цитозоль по градиенту концентрации. Сразу после этого аминокислота теряет связь с белком и остается в цитоплазме. Пермиазы характеризуются субстратной специфичностью. Например, основная аминокислотная пермиаза *Gap1* транспортирует все аминокислоты. В то время как *Can1*, его паралог *Alp1*, и *Lyp1* имеют различную узкую специфичность. Пермиаза *Can1* транспортирует аргинин более эффективно, чем лизин (синпортер), *Alp1* транспортирует только аргинин (унипортер), в то время как *Lyp1* включает эффективно только лизин (унипортер). Таким образом, у дрожжей включение аргинина осуществляется в основном тремя пермиазами *Gap1*, *Can1*, *Alp1*, работающими и как транспортер, и как рецептор. При этом включение аргинина зависит от протонного насоса. *Can1* катализирует H^+ /аргинин симпорт и для переноса нужна протон-движущая сила [2]. Клетки, несущие одиночные делеционные мутации генов *CAN1* и паралога *ALP1* жизнеспособны, двойные мутации – летальны. Таким образом, для выживания клеткам нужен хотя бы один неповрежденный ген.

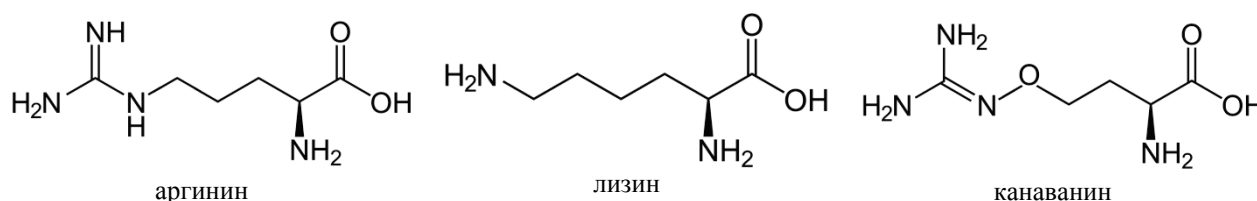


Рисунок 1. Химические формулы аргинина, лизина и канаванина

Интересно, что у дрожжевых нуль-мутантов *can1Δ* увеличивается продолжительность жизни при репликативном старении (уменьшение скорости клеточного деления с увеличением числа прошедших делений) [3].

У дрожжей инактивация гена аргинин пермиаза *CAN1* вызывает устойчивость к канаванину. Основная аминокислота аргинин имеет два основных центра: аминогруппу в α -положении и гуанидиновую в δ -положении. Гуанидиновая группа при протонировании становится сильно основной и способна образовывать множественные водородные связи. Лизин имеет более короткий боковой радикал. Токсичный для клетки канаванин является небелковым аминокислотным аналогом аргинина. В молекулу канаванина по сравнению с аргинином добавлен атом кислорода в боковом радикале и снижено количество CH_2 -групп (рис. 1).

Аргинин пермеаза переносит через клеточную мембрану не только аргинина и лизина, но также и канаванин. В клетке канаванин распознается аргининовой тРНК-синтетазой и в процессе трансляции занимает место аргинина в синтезируемых белках. Однако из-за наличия дополнительного атома кислорода канаванин несет значительно меньший положительный заряд, чем аргинин. Замена аргинина на канаванин приводит к утере белками функциональности, а в результате – к гибели клетки. Мутанты *can1* отбирают на селективной среде, в которую добавлены соли аммония, в качестве единственного источника азота, аргинин отсутствует, и добавлен канаванин. На такой среде клетки дикого типа включают канаванин и гибнут. В мутантных клетках, резистентных к канаванину, аргинин пермеаза теряет сродство к канаванину или инактивируется, и в отсутствие аргинина клетки выживают за счет второго источника азота – солей аммония. Таким образом, селективно отбираются мутации, нарушающие специфичность аргинин пермиаза к канаванину. Но о специфичности к аргинину у этих мутантов мы ничего сказать не можем. На среде с аргинином в качестве единственного источника азота мутанты по аргинин пермеазе, утратившие сродство к аргинину, будут расти за счет функционирования других транспортеров *Alp1* и *Gap1*. Поэтому, для проверки сродства аргинин пермиаза к аргинину необходимо помимо контроля источников азота в среде, заблокировать работу этих транспортеров.

В клетках, растущих на богатой среде, обнаруживается около 10 тыс. молекул *Can1* на клетку [4], локализованных в различных компартментах. Она входит в состав: плазматической мембраны, в том числе мембранные рафты (структурные домены мембраны) [5]; белковых комплексов МСС/эйзосом (сайты плазматической мембраны, служащие маркером эндоцитоза) [6], открытые у дрожжей в 2006 году [7] и являющихся производными эндоплазматического ретикулума [8]; в протеоме митохондрий [9, 10]. Хорошо изучена локализация *Can1* в компартменте МСС/эйзосома плазматической мембраны [6]. В состав МСС входит *Can1* и эргостерол, а платформа белков, удерживающая комплекс, называется эйзосомой и локализована она прямо под МСС, а весь комплекс называется МСС/эйзосома. Дрожжевая клетка содержит 30-50 МСС/эйзосомных структур, которые равномерно распределены по поверхности и занимают 3-5% поверхности плазматической мембраны. Только небольшое количество эйзосом активно в каждый момент. Предполагается, что эйзосомы функционируют, используя обратимое фосфорилирование, и регулируют портал, который служит для локализации и транспорта в клетку.

Используя флуоресцентную микроскопию высокого разрешения, показали, что *Can1* и гомологичный транспортер *Lyp1* могут диффундировать в МСС/эйзосома, при этом в условиях ограниченного количества белка они локализуются на внешней стороне компартмента плазматической мембраны. При добавлении субстрата иммобилизованные белки быстро выходят из компартмента МСС/эйзосома. Добавление субстрата изменяет конформацию *Can1* и *Lyp1*, которые разрывают взаимодействия со связанными с ними партнерами, и белок выходит из МСС/эйзосома. Снижение фракции связанного *Can1* с увеличением уровня экспрессии (в то время как увеличивается аргинин- и лизин- транспортная активность), свидетельствует об ограниченном количестве сайтов связывания. В отличие от субстрата протон-движущие силы, по-видимому, не играют роли в распределении *Can1* и *Lyp1* по плазматической мембране.

Аргининовая пермеаза – гомодимер и состоит из 590 аа. Используя платформу ProteinBLAST, мы провели поиск гомологичных последовательностей (табл. 1). Выделено только два гомологичных гена *Alp1* *Lyp1*.

Кристаллическая структура дрожжевых пермиаз в настоящее время отсутствует. Однако в базе данных PDB имеются атомные структуры трех бактериальных белков семейства APC (Табл. 2): антипортеры аргинин/агматин (*AdiC*) и глутамат/ γ -аминомасляная кислота (*GadC*) и протон/аминокислотный симпортер широкой специфичности (*ArcT*). Последовательность *AdiC* проявляет значительную гомологию с глутамат/GABA антипортером *GadC*, лизин/кадаверин антипортером *CadB*, и орнитин/путресцин антипортером *PotE*. По структуре белки аналогичны и состоят из 12 альфа-спиральных трансмембранных сегментов (ТМ), фланкирующих гидрофильный хвост, направленный в цитоплазму. Трансмембранные сегменты образуют два кольца «5+5», которые охватывают сайт связывания субстрата. Такая укладка типична для нескольких семейств транспортеров.

Таблица 1. Белки, имеющие последовательности гомологичные пермиазе Can1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (штамм S280C)

Белок	% идентичности	Организм
Alp1	77,14	<i>Zygosacchar. parabailii</i>
Alp1	68,33	<i>S.cerevisiae</i>
Lyp1	62,77	<i>S. cerevisiae.</i>
AdiC	15	<i>E. coli</i>

В своей работе для моделирования мы использовали кристаллическую структуру холо-фермента AdiC (PDB: 3L1L и 3OB6) [11,12] в открытой конформации с аргинином в качестве субстрата. Большую часть молекулы построили с помощью программы VMD [17], длинные петли P258-L285, Y345-Y356, L478-L488 и F515-V525 формировали с помощью программы MODELLER [18]. Молекулу канаванина встроили в молекулу пермиазы Can1, ориентируясь на положение аргинина. На Рисунке 2 приводится вид пермиазы сбоку, сверху и снизу. Внешнее кольцо ТМ-элементов состоит из ТМ2, ТМ4, ТМ5, ТМ7, ТМ9. Остальные ТМ элементы (ТМ1, ТМ3, ТМ6, ТМ8 и ТМ10) образуют внутреннее кольцо, с сайтами связывания субстрата. Элементы ТМ11 и ТМ12 не входят в состав «5+5» структуры.

Был проведен анализ нуклеотидной последовательности мутаций Can^R, возникших спонтанно или полученных при облучении УФ – и гамма-лучами, а также тяжелыми ионами. Кроме того, часть мутаций была любезно предоставлена д-ром Р.Д. Колоднером. Были отобраны мутации, вызывающие замены аминокислотных остатков. В нашем распоряжении оказались нуклеотидные последовательности 122 мутаций, затрагивающих 82 ао. Анализируемые мутации обнаруживаются как в ТМ, так и между ними. ТМ-элементы отличаются как по длине, так и по количеству обнаруженных в них мутаций (табл. 3). Мутации обнаруживаются во всех ТМ элементах кроме ТМ12, причем важны как сегменты, составляющие внутреннее кольцо, так и внешнее. Хотя во внутреннем кольце мутаций больше.

Таблица 2. Кристаллические структуры белков APC-семейства, имеющиеся в базе PDB

Фермент	Функция	Организм	Код PDB (разрешение, Å) Форма (субстрат)	Источник
AdiC	Аргинин/агматинантпортер	<i>E. coli</i>	3L1L (3.00 Å) A, apo, holo (аргинин)	[11]
			3OB6 (3.00Å) A, B holo (аргинин) Open-to-out	[12]
			5J4N (2.594 Å) A, B holo (агматин)	[13]
			5J4I (2.21Å) A,B apo	[13]
GadC	Глутамат/γ-аминомасляная кислота антипортер	<i>E. coli</i>	4DJK (3.097 Å) A,B apo (inward)	[14]
			4DJI (3.187Å) A,B apo (inward)	[14]
ApcT	Протон/аминокислота симпортер широкой специфичности	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	3GI8 (2.59 Å) C, apo (occluded - OF)	[15]
			3GI9 (2.48 Å) C, apo	[15]
			3GIA (2.32 Å) A (bicine)	[15]
ApcT	Аминокислотный транспортер	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	6F34 (3.13 Å) A (аргинин)	[16]

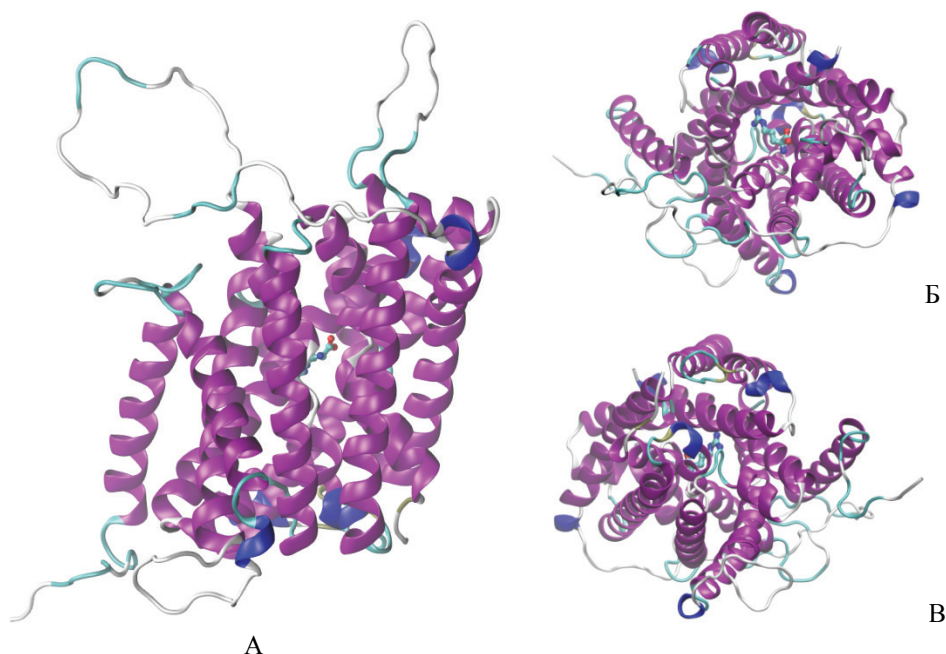


Рисунок 2. Построенная с помощью программы MODELLER 3Д-модель пермиазы Can1 в outward-open occluded состоянии с аргинином в качестве субстрата. Концевые TM11 и TM12 не являются частью характерной «5+5» упаковки. В центре молекулы располагается субстрат Arg (шарики). Две длинные петли, выступающие за поверхность молекулы, располагаются между TM5-TM6 и TM7-TM8. А, вид сбоку. Б, вид сверху. В, вид снизу.

Часть мутаций можно охарактеризовать, используя имеющиеся в литературе данные [19]. Для моделирования в качестве базовой авторы также использовали кристаллическую структуру AdiC (PDB: 3L1L) холо-фермента с аргинином в качестве субстрата. Модельная структура белка Can1 была построена для анализа структурных особенностей, определяющих специфичность аргинин пермиазы. С помощью модели были выявлены аминокислотные остатки, необходимые для связывания субстрата, и также мутации, конвертирующие аргининовую пермиазу в лизиновую. Для связывания субстрата необходимые следующие остатки: T456 (TM10), S176 (TM3), W177 (TM3), E301 (TM6), E184 (TM3), F295 (TM6), T101 (TM1), T104 (TM1), G103 (TM1), G105 (TM1). В Таблице 4 приведены основания, определяющие связывание и специфичность субстрата, а также мутации, вызывающие изменение специфичности к канаванину. Показано, что два основания в связывающем сайте влияют на селективность Can1. Замены T456 (TM10) на A и S не влияют на транспорт аргинина и лизина, в то же время замены S176 (TM3) на A и N снижают транспорт аргинина, особенно в последнем случае. S176N не способен также к транспорту лизина. В то же время двойной мутант S176N T456S не транспортирует аргинин, но транспортирует лизин. Остаток E184 высоко консервативен и его протонирование сильно влияет на

Таблица 3. Количество мутаций в трансмембранных (TM) сегментах

TM сегмент	Остатки	Размер, н	Число мутаций
TM1	93-111	19	10
TM2	119-138	19	3
TM3	168-193	26	7
TM4	199-218	20	2
TM5	227-252	26	5
TM6	283-307	25	6
TM7	328-345	18	5
TM8	378-396	20	5
TM9	421-439	19	3
TM10	452-469	18	4
TM11	493-510	28	2
TM12	524-547	24	0
Всего: внутренние		108	20
внешние		102	32

Таблица 4. Характеристика некоторых аминокислотных остатков

Сайт	Замена остатка	Функция
T101 (TM1)		Связывание NH_3^+Arg .
G103 (TM1)	G103C, G103V, G103D	Связывание COO^-Arg .
T104 (TM1)	T104I, T104R, T104A	Связывание COO^-Arg (остов, боковой радикал).
F295 (TM6)		Связывание NH_3^+Arg .
Q298 (TM6)	Q298K	Связывание NH_3^+Arg .
F295 (TM6)		Взаимодействие боковых цепей (CH_2).
E301 (TM6)		Взаимодействие боковых цепей (гуанидин ⁺). Протонирование?
W177 (TM3)	W177G	Взаимодействие боковых цепей (гуанидин ⁺).
S176 (TM3)	S176Y <i>S176A, S176N</i> <i>S176N (TM3) T456S (TM10)</i>	Взаимодействие боковых цепей(гуанидин ⁺). Транспорт (-Can). Транспортная селективность (-Arg, -Lys). Транспортная селективность (-Arg, +Lys).
T180 (TM3)	T180R T180P	Протонирование. Связывание субстрата. Транспорт (-Can).
E184(TM3)	<i>E184Q or E184A</i> E184K, E184V <i>E184D</i>	Транспортная селективность (-Arg, -Lys). Протонирование. Способствует убиквитинированию. Транспорт (-Can). Передача субстрата через мембрану.
T456 (TM10)	<i>T456S</i>	Взаимодействие боковых цепей (гуанидин ⁺). Транспортная селективность (+Arg,+Lys). Блокирует убиквитинирование. Резистентный к эндоцитозу. Гиперактивен.

Курсивом обозначены мутации из [19,27]

ориентацию бокового радикала аргинина. Замена глутамата E184 на Q (имитирует необратимое протонирование E184) или A в сайте связывания приводит к неспособности транспортировать любую аминокислоту. Предполагается возможная роль глутамата в сцеплении транспорта аргинина с потоком протонов.

Интересно, что в нашей коллекции мутаций были мутации, выделенные Прево с коллегами [19] и определяющие специфичность к аргинину и лизину. Они же определяли и специфичность к канаванину. В результате этих мутаций аргинин пермиаза утрачивала специфичность к канаванину. На рисунке 3 приведено расположение аргинина и канаванина в сайте связывания.

Для функционирования ферментов важна не только первичная последовательность, которая определяет пространственную структуру белка, но регуляторные сайты, например, сайты связывания регуляторных белков или химической модификации. В SGB базе данных есть информация по химическим модификациям белков, в частности по фосфорилированию и убиквитинированию. В таблице 5 приведены сайты фосфорилирования и убиквитинирования аргинин пермиазы Can1. Причем, как правило, фосфорилирование предшествует убиквитинированию и служит сигналом деградации [20].



Рисунок 3. Расположение аргинина (А) и канаванина (Б) в сайте связывания

Таблица 5. Сайты химической модификации аргинин пермиазы Can1

Сайт	Модификация	Источник
S4	фосфорилирование	Swaney et al., 2013 [20]
K5	убиквитинирование	Kolawa et al., 2013 [21]
K5	убиквитинирование	Swaney et al., 2013 [20]
K5	убиквитинирование	Fang et al., 2014 [22]
S38	фосфорилирование	Swaney et al., 2013 [20]
S38	фосфорилирование	Soulard et al., 2010 [23]
S38	фосфорилирование	Holt et al., 2009 [24]
K42	убиквитинирование	Swaney et al., 2013 [20]
K47	убиквитинирование	Swaney et al., 2013 [20]
S66	фосфорилирование	Swaney et al., 2013 [20]
K85	убиквитинирование	Swaney et al., 2013 [20]

На приведенной аминокислотной последовательности аргинин пермиазы сайты фосфорилирования и убиквитинирования выделены синим, а полученные нами сайты замен аминокислотных остатков (Can^R) – красным:

1 M**NSK**EDADI EEKHMYNEPV TFLFDV**EA**S QTHHRRGS**IP** L**KDEKSKELY** PLRSFPTRVN
61 GEDTFS**ME**DG IGDEDEGEVQ NAEV**KRE**LKQ **RHIGMIALGG** T**IGTGL**FIGL **STPLTNA**GPV
121 **GALISY**L**FMG** SL**AYSVTQ**SL **GEMATFIP**V**T** **SSFTVFSQ**R**F** L**SPA**F**GA**ANG **YMYW**FS**W**AIT
181 **FAL**ELSVVGQ **VIQ**FWTYKVP **LAA**WISIFWV IIT**MN**LFPV **KYYGE**FEFWV **ASIK**VLAIG
241 **FLIY**C**FCM**V**C** GAGV**TGP**VGF **RYWR**NP**GA**WG PGI**SKD**KNE GRFLGWV**SS**L INAA**FTFOG**T
301 **ELV**GITAGEA AN**PRK**SV**PR**A IKKVV**FR**ILT FYIG**SLL**FIG **LLV**PN**DP**KL TQSTSY**V**STS
361 PFP**AI**ENSG TKV**LPH**IFNA VIL**TPI**S**AA** NS**NIY**VGS**RI** LF**GLS**KNKLA PK**FL**SRTTKG
421 **GVP**YIAV**FV**T AAF**GAL**AYME TSTGGDKV**FE** WLL**NITG**V**AG** F**FAW**L**FIS**IS **HIR**FMQ**AL**KY
481 R**GIS**RDEL**PF** KAK**LMP**GLAY **YA**AT**FM**THI **IIQ**G**FTAF**AP **KFNG**V**SFA**AA **YIS**IF**L**FLAV
541 **WIL**QCIFRC RFIW**KIG**DVD ID**SDRR**DIEA IV**WED**HEPKT **FWD**KFWNVVA *

Интересно, что все сайты фосфорилирования и убиквитинирования располагаются в длинном N-конце перед первым трансмембранным сегментом TM1, отсутствующем у бактериального белка AdiC. В этом фрагменте мы не обнаружили мутаций Can^R. Ближайшая к N-концу мутация, которую мы получили, L88H.

Широко распространенным способом ингибирования функционирования специфических плазмемембранных рецепторов, транспортеров и каналов является селективная сортировка этих белков в эндосоитозные везикулы, с последующим эндосомальным трафиком и доставкой к лизосомам, где они деградируются [25]. У дрожжей *S. cerevisiae* убиквитинирование поверхностных белков опосредуется HECT-семейством убиквитин лигаз Rsp5, доставку которых обеспечивают аррестин-подобные адапторы Art1 (arrestin-related trafficking) [26]. В частности активность пермиазы Can1 в ответ на изменение концентрации субстрата подавляется, и это подавление обусловлено не внутриклеточным накоплением транспортируемых аминокислот, а непосредственно самим катализом [27]. Для индуцированного субстратом убиквитин-зависимого эндосоитоза необходим переход пермиазы в специфическое конформационное состояние, предшествующее выходу субстрата в клетку. Это промежуточное состояние достаточно стабильно для того чтобы произошло подавление пермиазы. Субстрат индуцированное изменение конформации, активирующее эндосоитоз, включает в себя перестройку цитозольной области пермиазы, тем самым обеспечивая ее узнавание аррестин-подобным адаптором убиквитин лигазы Rsp5. Согласно гипотезе субстрат-индуцированного убиквитинирования и последующего эндосоитоза после связывания субстрата пермиаза переходит сначала в outward-open-occluded, а затем в inward-open-occluded состояния, предшествующее выходу субстрата в цитозоль. В inward-open состоянии пермиаза склонна к убиквитинированию. Обнаружены замены аминокислотных остатков, препятствующие прохождению этих этапов. Так в случае T180R пермиаза не способна связать субстрат. Замена E184D блокирует дальнейший переход в inward-open-occluded состояние. В случае E184Q в присутствии Arg пермиаза переходит в состояние, в котором убиквитинирование предпочтительнее выхода субстрата в клетку. Наблюдение, что неактивная E184Q подвергается нормальному эндосоитозу, предполагает, что структурные изменения предшествуют депротонизации E184. Эта депротонизация, вероятно сцепленная с протонизацией другого остатка Can1, существенна для выхода аргинина в клетку. При замене T456S состояние, предпочтительное для убиквитинирования, нестабильно и недостаточно для обеспечения эффективного эндосоитоза. Конформационные изменения, способствующие убиквитинированию, включают N-концевой хвост, который возможно

взаимодействует с внутренней петлей пермиазы, тем самым делая терминальный лизин более доступным для убиквитинирования лигазой Rsp5, как это наблюдается в случае урацил пермиазы Fur4 [28]. Убиквитинирование пермиазы контролируется непосредственно фосфорилированием/ убиквитинированием адапторов [29].

В дальнейшем планируется провести мутационный анализ структуры пермиазы, специфики локализации мутаций *can1*, дать обоснования связи структурных и функциональных изменений, а также провести динамическое моделирование исходной и мутантных форм аргинин пермиазы.

Список литературы / References:

1. Kan M.J., Lee J.E., Wilson J.G., et al. Arginine deprivation and immune suppression in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 2015, vol. 35, pp. 5969-5982.
2. Opekarova M., Caspari T., Tanner W. Unidirectional arginine transport in reconstituted plasma-membrane vesicles from yeast overexpressing CAN1. *European Journal of Biochemistry*, 1993, vol. 211, pp. 683-688.
3. McCormick M.A., Delaney J.R., Tsuchiya M., Tsuchiyama S., Shemorry A., Sim S., Chou A.C., Ahmed U., Carr D., Murakami C.J., et al. A Comprehensive analysis of replicative lifespan in 4,698 single-gene deletion strains uncovers conserved mechanisms of aging. *Cell Metabolism*, 2015, vol. 22, pp. 895-906.
4. Ho B., Baryshnikova A., Brown G.W. Unification of protein abundance datasets yields a quantitative *Saccharomyces cerevisiae* proteome. *Cell Systems*, 2018, vol. 6, pp. 192-205.e3.
5. Malinska K., Malinsky J., Opekarova M., Tanner W. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Cell Science*, 2004, vol. 117, pp. 6031-6041.
6. Bianchi F., Syga L., Moiset G., Spakman D., Schavemaker P.E., Punter C.M., Seinen A.B., van Oijen A.M., Robinson A., Poolman B. Steric exclusion and protein conformation determine the localization of plasma membrane transporters. *Nature Communications*, 2018, vol. 9, p. 501.
7. Walther T.C., Brickner J.H., Aguilar P.S., Bernales S., Pantoja C., Walter P. Eicosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*, 2006, vol. 439, pp. 998-1003.
8. Yofe I., Weill U., Meurer M., Chuartzman S., Zalckvar E., Goldman O., Ben-Dor S., Schütze C., Wiedemann N., Knop M., Khmelinskii A., Schuldiner M. One library to make them all: streamlining the creation of yeast libraries via a SWAp-Tag strategy. *Nature Methods*, 2016, vol. 13, pp. 371-378.
9. Sickmann A., Reinders J., Wagner Y., Joppich C., Zahedi R., Meyer H.E., Schönfisch B., Perschil I., Chacinska A., Guiard B., Rehling P., Pfanner N., Meisinger C. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2003, vol. 100, pp. 13207-13212.
10. Reinders J., Zahedi R.P., Pfanner N., Meisinger C., Sickmann A., et al. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of Proteome Research*, 2006, vol. 5, pp. 1543-1554.
11. Gao X., Zhou L., Shi Y. Structure of Arg-bound *Escherichia coli* AdiC. *Nature*, 2010, vol. 463, pp. 828-832.
12. Kowalczyk L., Ratera M., Paladino A., Bartocciono A., Errasti-Murugarren E., Valencia E., Portella G., Bial S., Zorzano A., Fita I., Orozco M., Carpena X., Vazquez-Ibar J.L., Palacin M. Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2011, vol. 108, pp. 3935-3940.
13. Ilgue H., Jeckelmann J.M., Gapsys V., Ucurum Z., de Groot B.L., Fotiadis D. Insight into the molecular basis for substrate binding and specificity of the wild-type L-arginine/ agmatine antiporter AdiC. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2016, vol. 113, pp. 10358-10363.
14. Ma D., Lu P.L., Yan C.Y., Fan C., Yin P., Wang J.W., Shi Y.G. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature*, 2012, vol. 483, pp. 632-636.
15. Shaffer P.L., Goehring A.S., Shankaranarayanan A., Gouaux E. Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science*, 2009, vol. 325, pp. 1010-1014.
16. Jungnickel K.E.J., Newstead S. Crystal structure of a bacterial cationic amino acid transporter (CAT) homologue bound to Arginine. *Nature Communications*, 2018, vol. 9, pp. 550-550.
17. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
18. Šali A., Blundell T.L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 1993, vol. 234, pp. 779-815.
19. Ghaddar K., Krammer E.-M., Mihajlovic N., Brohée S., André B., Prévost M. Converting the yeast arginine Can1 permease to a lysine permease. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, vol. 289, pp. 7232-7246.
20. Swaney D.L., Beltrao P., Starita L., Guo A., Rush J., Fields S., Krogan N.J., Villén J. Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nature Methods*, 2013, vol. 10, pp. 676-682.
21. Kolawa N., Sweredoski M.J., Graham R.L., Oania R., Hess S., Deshaies R.J. Perturbations to the ubiquitin conjugate proteome in yeast δ ubx mutants identify Ubx2 as a regulator of membrane lipid composition. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, vol. 12, pp. 2791-2803.
22. Fang N.N., Chan G.T., Zhu M., Comyn S.A., Persaud A., Deshaies R.J., Rotin D., Gsponer J., Mayor T. Rsp5/Nedd4 is the main ubiquitin ligase that targets cytosolic misfolded proteins following heat stress. *Nature Cell Biology*, 2014, vol. 16, pp. 1227-1237.

23. Souillard A., Cremonesi A., Moes S., Schütz F., Jenö P., Hall M.N.I. The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, vol. 21, pp. 3475-3486.
24. Holt L.J., Tuch B.B., Villén J., Johnson A.D., Gygi S.P., Morgan D.O. Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*, 2009, vol. 325, pp. 1682-1686.
25. Lauwers E., Erpapazoglou Z., Haguenaer-Tsapis R., Andre B. The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends in Cell Biology*, 2010, vol. 20, pp. 196-204.
26. Becuwe M., Herrador A., Haguenaer-Tsapis R., Vincent O., Leon S. Ubiquitin-mediated regulation of endocytosis by proteins of the arrestin family. *Biochemistry Research International*, 2012, 242764. DOI: 10.1155/2012/242764.
27. Ghaddar K., Merhl A., Saliba E., Krammer E.-M., Prevost M., Andre B. Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Molecular and Cellular Biology*, 2014, vol. 34, pp. 4447-4463.
28. Keener J.M., Babst M. Quality control and substrate-dependent downregulation of the nutrient transporter Fur4. *Traffic*, 2013, vol. 14, pp. 412-427.
29. Lin C.H., MacGurn J.A., Chu T., Stefan C.J., Emr S.D. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell*, 2008, vol. 135, pp. 714-725.

LANDSCAPE OF MUTATION SUBSTITUTIONS IN YEAST ARGININE CAN1 PERMEASE

Koltovaya N.A., Zhuchkina N.I., Dushanov E.B.

Joint Institute for Nuclear Research

6 Joliot-Curie St., Dubna, 141980, Russia; e-mail: koltovaya@jinr.ru

Abstract. The occurrence of forward mutations in the arginine permease *CAN1* gene, where damage leads to canavanine resistance, is often used to study mutagenesis in yeasts. We have obtained a representative collection of *can1* mutations, which enables the mutational analysis of the arginine permease structure. This transport enzyme belongs to the APC superfamily supplying amino acids to cells. Despite sequence nonidentity, they have a similar structure. Eukaryotic arginine permease can serve as a model for the analysis of the structure and functioning of similar transporters. Studying arginine transport is of particular importance due to arginine being one of the key metabolites in nitrogen metabolism. Arginine is the NO-synthase substrate in NO synthesis, universal transmitter, neuromediator and actor of programmed cell death.

Key words: arginine permease, conveyors ARS-supersmash, mutational analysis of the structure of the enzyme.