

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПРИРОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И СЕРОТОНИНА НА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ И ГУАНИЛАТЦИКЛАЗУ ИНFUЗОРИЙ

© К. В. Деркач,¹ А. О. Шпаков,^{1,*} З. И. Успенская,² А. Л. Юдин²

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН

и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Ранее было показано, что некоторые аминокислоты и их производные способны регулировать активность аденилатциклазы (АЦ) и гуанилатциклазы (ГЦ) у свободноживущих инфузорий *Dileptus anser* и *Tetrahymena pyriformis*. Цель работы состояла в изучении молекулярных механизмов влияния метионина, тирозина, аланина и нейрого гормона серотонина на активность ферментов-циклаз и в идентификации специфичных к ним рецепторов у *D. anser* и *T. pyriformis*. Метионин и серотонин в значительной степени повышали базальную активность АЦ у обеих инфузорий, причем эффект серотонина на АЦ у *T. pyriformis* осуществлялся с участием Ca^{2+} -зависимой формы АЦ и гетеротримерных G-белков. Стимулирующий АЦ эффект тирозина и аланина был выражен слабо и выявлялся только у *D. anser*. Серотонин у обеих инфузорий и аланин у *D. anser* стимулировали активность ГЦ, в то время как метионин и тирозин на ГЦ не влияли. Метионин и серотонин с высоким сродством связывались с поверхностными рецепторами инфузорий. Значения K_D для связывания [метил- 3H]метионина с *D. anser* и *T. pyriformis* составили 7.5 и 35.6 нМ, для связывания [3H]серотонина — 2.7 и 4.7 нМ соответственно. Аланин и тирозин связывались с инфузориями с низкой аффинностью. Таким образом, у инфузорий *D. anser* и *T. pyriformis* имеются хемосигнальные системы, регулируемые аминокислотами и их производными и включающие в себя ферменты с циклазной активностью. Предполагается, что эти системы сходны с гормональными сигнальными системами высших эукариот и являются их предшественниками.

Ключевые слова: аденилатциклаза, аминокислота, гуанилатциклаза, инфузория, метионин, рецептор, серотонин, *Dileptus anser*, *Tetrahymena pyriformis*.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦ система — аденилатциклазная система, ГЦ — гуанилатциклаза, GppNHp — β, γ -имидогуанозин-5'-трифосфат.

Хемосигнальные системы одноклеточных эукариот по своей структурно-функциональной организации имеют много общих черт с гормональными сигнальными системами высших эукариот, в том числе позвоночных животных (Shpakov, Pertseva, 2008). Однако наборы сигнальных молекул, которые специфически связываются с рецепторами и активируют внутриклеточные эффекторные белки, для одноклеточных и многоклеточных организмов существенно различаются. У одноклеточных важнейшими внешними сигналами, регулирующими фундаментальные клеточные процессы — рост, метаболизм, движение и споруляцию, являются природные сахара, нуклеотиды и аминокислоты, в то время как у высших эукариот сигнальные функции обычно выполняют более специализированные молекулы — гормоны и ростовые факторы (Xue et al., 2008).

Ранее нами было показано, что у свободноживущих инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и *Dileptus anser* некоторые природные аминокислоты и их производные влияют на активность ферментов с циклазной активностью — аденилатциклазы (АЦ) и гуанилатциклазы (ГЦ) (Шпаков и др., 2011а). Эти ферменты у большинства эукариот являются ключевыми компонентами хемосигнальных систем и функционально сопряжены с локализованными в

плазматической мембране рецепторами и внутриклеточными цАМФ/цГМФ-зависимыми сигнальными каскадами. АЦ катализирует превращение АТФ во вторичный посредник цАМФ, регулирующий активность цАМФ-зависимых белков, в то время как ГЦ катализирует превращение ГТФ в другой вторичный посредник — цГМФ, активирующий цГМФ-зависимые протеинкиназы и ионные каналы. Другим организмом, у которого аминокислоты способны влиять на функциональную активность ферментов-циклаз, является гриб *Cryptococcus neoformans*, который, так же как инфузории, относится к низшим эукариотам (Xue et al., 2006). Показано, что метионин и пролин стимулируют активность АЦ и ГЦ, причем их действие осуществляется через рецептор серпантинного типа GPR4, сопряженный с гетеротримерными G-белками. У некоторых других грибов также выявлены рецепторы серпантинного типа, гомологичные аминокислотному рецептору GPR4 *C. neoformans*, которые могут быть мишенями природных аминокислот (Shpakov, Pertseva, 2008; Xue et al., 2008).

Задача работы состояла в изучении возможных молекулярных механизмов обнаруженного нами ранее влияния природных аминокислот метионина, тирозина и аланина, а также гормона серотонина, продукта метаболиче-

ских превращений триптофана на активность АЦ и ГЦ у инфузорий *D. anser* и *T. pyriformis*, а также в идентификации и характеристике специфических для них связывающих мест.

Материал и методика

Для опытов использовали креатинфосфат, креатинфосфокиназу из мышц кролика (НФ 2.7.3.2), АТФ, ГТФ, цГМФ, солянокислый N-(6-аминогексил)-5-хлор-1-нафталенсульфонамид (W-7) и сурамин (Sigma, США). Для определения активности ферментов-циклаз использовали [α - 32 P]АТФ (1000 Ки/ммоль) и [α - 32 P]ГТФ (6000 Ки/ммоль) производства ОАО «Институт реакторных материалов» (Россия). Для определения специфического связывания аминокислот с мембранами инфузорий использовали L-[метил- 3 H]метионин (70 Ки/ммоль), L-[3,5- 3 H]тирозин (40 Ки/ммоль), L-[2,3- 3 H]аланин (40 Ки/ммоль) и 5-гидрокси[G- 3 H]триптамина креатинин-сульфат ([3 H]серотонин) (20 Ки/ммоль) (Amersham, Великобритания).

В опытах использовали культуры инфузорий *T. pyriformis* и *D. anser* с плотностью 150—300 тысяч и 140—150 кл./мл соответственно. Для получения гомогената инфузорий *T. pyriformis* их осаждали центрифугированием (600 g, 3 мин) и трижды отмывали 20 мМ Tris-HCl-буфером, pH 7.5. Гомогенизирование проводили путем обработки клеток ультразвуком на приборе УЗДН-2Т при частоте 20 кГц в течение 1 мин при охлаждении. Инфузорий *D. anser* культивировали в солевой среде Prescott при 25 °С (кормом для них служили инфузории *T. pyriformis*). Их осаждали центрифугированием (600 g, 3 мин), трижды отмывали 20 мМ Tris-HCl-буфером (pH 7.5). Гомогенат клеток инфузорий получали растиранием клеток в ручном гомогенизаторе (60—70 ударов). Количество разрушенных клеток *T. pyriformis* и *D. anser* составило не менее 95 % от их общего количества.

Определение активности АЦ (АТФ-пирофосфатлиаза циклизирующая, НФ 4.6.1.1) в гомогенатах культур инфузорий проводили при 30 °С и времени инкубации 10 мин, как описано ранее (Деркач и др., 2002, 2003), в инкубационной среде следующего состава: 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 1 мМ АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.5 мг/мл креатинфосфокиназы, 5 мМ MgCl₂, [α - 32 P]АТФ добавляли из расчета 1 мкКи на пробу. Реакцию начинали добавлением 50—100 мкг белка. Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка.

Определение активности ГЦ (ГТФ-пирофосфатлиаза циклизирующая, НФ 4.6.1.2) проводили по методу (Garbers, Murad, 1979) с некоторыми модификациями (Шпаков и др., 2011а). Гомогенаты культур инфузорий инкубировали в течение 10 мин при 30 °С в инкубационной среде следующего состава: 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 1 мМ ГТФ, 0.1 мМ цГМФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.5 мг/мл креатинфосфокиназы, 5 мМ MgCl₂, [α - 32 P]ГТФ добавляли из расчета 0.5—1 мкКи на пробу. Общий объем пробы составил 50 мкл. Реакцию начинали добавлением 50—100 мкг белка и останавливали внесением в пробу 100 мкл 0.5 М HCl, после чего образцы помещали на 6 мин на кипящую водяную баню, а затем в каждую пробу вносили по 100 мкл 1.5 М имидазола и наносили образцы на колонку с окисью алюминия. Образовавшийся в ходе ферментативной реакции цГМФ элюировали с помощью 10 мл 10 мМ имидазол-HCl-буфера, pH 7.4. Элюат помещали в сцинтилляци-

онные флаконы и измеряли в них радиоактивность по методу Черенкова на счетчике Rackbeta (ЛКВ, Швеция). Активность ГЦ выражали в пмоль цГМФ за 1 мин на 1 мг белка.

Связывание меченых метионина, тирозина, аланина и серотонина проводили в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.5), содержащем 10 мМ ДТТ, в соответствии с методикой, описанной ранее (Шпаков и др., 2010, 2011б). Концентрации клеток для культур *D. anser* и *T. pyriformis* составили $5 \cdot 10^5$ и 10^6 кл./мл соответственно. Для связывания брали 100 мкл клеток и инкубировали их с различными концентрациями радиолигандов (0.5—200 нМ) в течение 30 мин при 25 °С, затем инкубационную смесь помещали на фильтры GF/B, которые трижды промывали Tris-HCl-буфером (по 5 мл), высушивали, помещали в виалы со сцинтилляционной смесью и измеряли радиоактивность на счетчике Rackbeta (ЛКВ, Швеция). Значения специфического связывания метионина, тирозина, аланина и серотонина рассчитывали вычитанием неспецифического связывания, измеренного в присутствии немеченых лигандов (10^{-3} М), из общего связывания радиолигандов. Для расчета константы диссоциации (K_D) и числа связывающих мест (B_{max}) кривые насыщения преобразовывали по методу Скэтчарда.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Каждый эксперимент был выполнен трехкратно. Данные представлены в виде $M \pm S.E.M.$ из нескольких независимых экспериментов. Различия между контрольными пробами и пробами, подвергнутыми воздействию аминокислот, серотонина и других агентов, оценивали как достоверные при $P < 0.05$.

Результаты

На первом этапе изучали влияние метионина, тирозина, аланина и серотонина на активность АЦ и ГЦ инфузорий. Все эти вещества дозозависимым способом стимулировали активность АЦ у *D. anser*, причем наиболее выраженный эффект был выявлен у метионина и серотонина, которые в концентрации 10^{-4} М повышали базальную активность фермента на 557 и 665 % соответственно (рис. 1). В случае *T. pyriformis* активность АЦ повышалась только в присутствии серотонина и метионина, в то время как тирозин и аланин на нее практически не влияли, а в концентрации 10^{-4} М в незначительной степени ее снижали. У *T. pyriformis* добавление 5 мкМ Ca²⁺ приводило к повышению АЦ эффекта серотонина на 88 % в сравнении с таковым в отсутствие Ca²⁺, принятым за 100 %. АЦ эффект метионина при этом не менялся. Антагонист кальмодулина W-7, взятый в концентрации 500 мкМ, практически не влиял на АЦ эффект серотонина и лишь в незначительной степени (на 17 %) снижал стимуляцию АЦ метионином. Полученные данные указывают на возможное участие Ca²⁺-зависимых форм АЦ в реализации эффекта серотонина на активность фермента у *T. pyriformis*. В свою очередь у инфузории *D. anser* стимулирующие АЦ эффекты всех изученных аминокислот и серотонина существенно не менялись в присутствии 5 мкМ Ca²⁺ и 500 мкМ W-7. Это свидетельствует о том, что их мишенями являются формы АЦ, нечувствительные к низким концентрациям Ca²⁺ и кальмодулину.

У *T. pyriformis* в присутствии 10 мкМ сурамина, селективного ингибитора гетеротримерных G-белков, АЦ

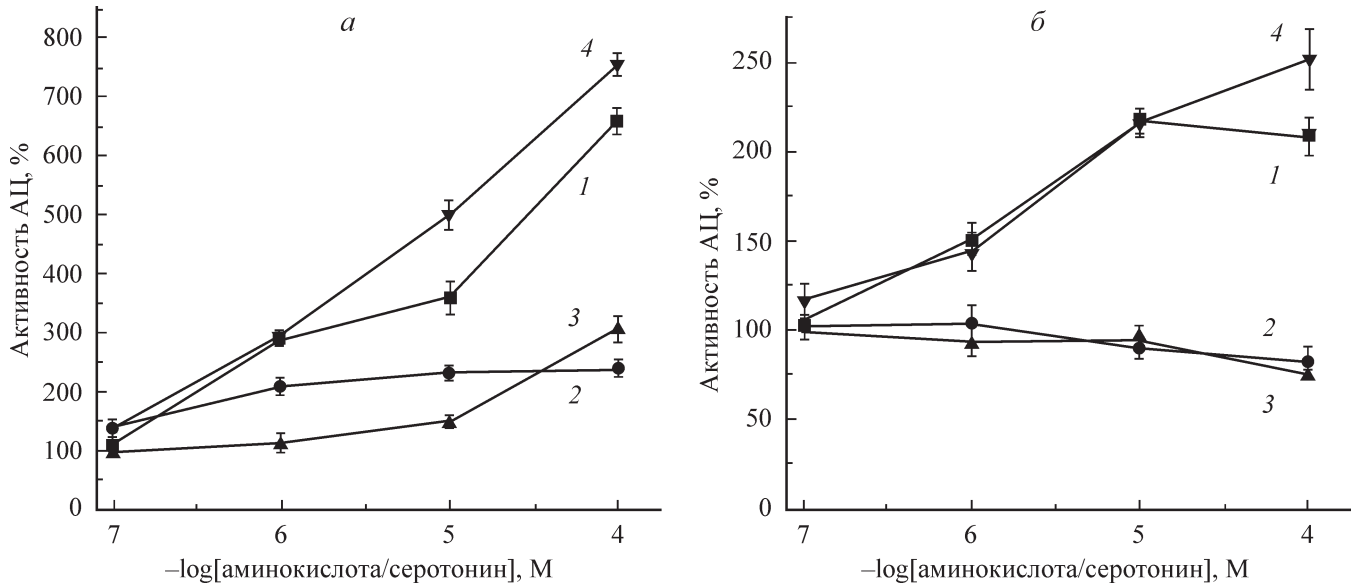


Рис. 1. Влияние метионина, тирозина, аланина и серотонина на активность аденилатциклазы (АЦ) инфузорий *Dileptus anser* (а) и *Tetrahymena pyriformis* (б).

Кривые: 1 — метионин, 2 — тирозин, 3 — аланин, 4 — серотонин. Базальная активность АЦ, которая в гомогенатах инфузорий *D. anser* и *T. pyriformis* составила 20.5 ± 1.4 и 28.5 ± 1.1 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка соответственно, принята за 100 %.

эффекты серотонина и метионина снижались до 28 и 39 % от таковых в отсутствие ингибитора. У *D. anser* сурамин снижал АЦ эффекты серотонина и метионина до 41 и 28 %, но практически не влиял на соответствующие эффекты тирозина и аланина (снижение менее чем на 11 %). Ингибирование сурамином АЦ эффектов серотонина и метионина указывает на возможное участие в их реализации ГТФ-связывающих белков, сходных по некоторым характеристикам с гетеротримерными G-белками позвоночных животных.

У инфузории *T. pyriformis* наблюдалось повышение активности ГЦ в присутствии серотонина, у *D. anser* — в

присутствии серотонина и аланина, в то время как метионин и тирозин не влияли на активность фермента у обеих инфузорий. В концентрации 10^{-5} М серотонин стимулировал активность ГЦ у *T. pyriformis* на 130 % и у *D. anser* на 177 % (рис. 2). У *D. anser* стимулирующий ГЦ эффект серотонина достигал максимума при концентрации 10^{-5} М и в дальнейшем практически не менялся. У *T. pyriformis* этот эффект при повышении концентрации гормона до 10^{-4} М снижался (до 111 %), что может указывать на активацию путей, ингибирующих ГЦ. Стимулирующий ГЦ эффект аланина отчетливо выявлялся только при концентрации 10^{-4} М. Сурамин (10 мкМ) не влиял на стиму-

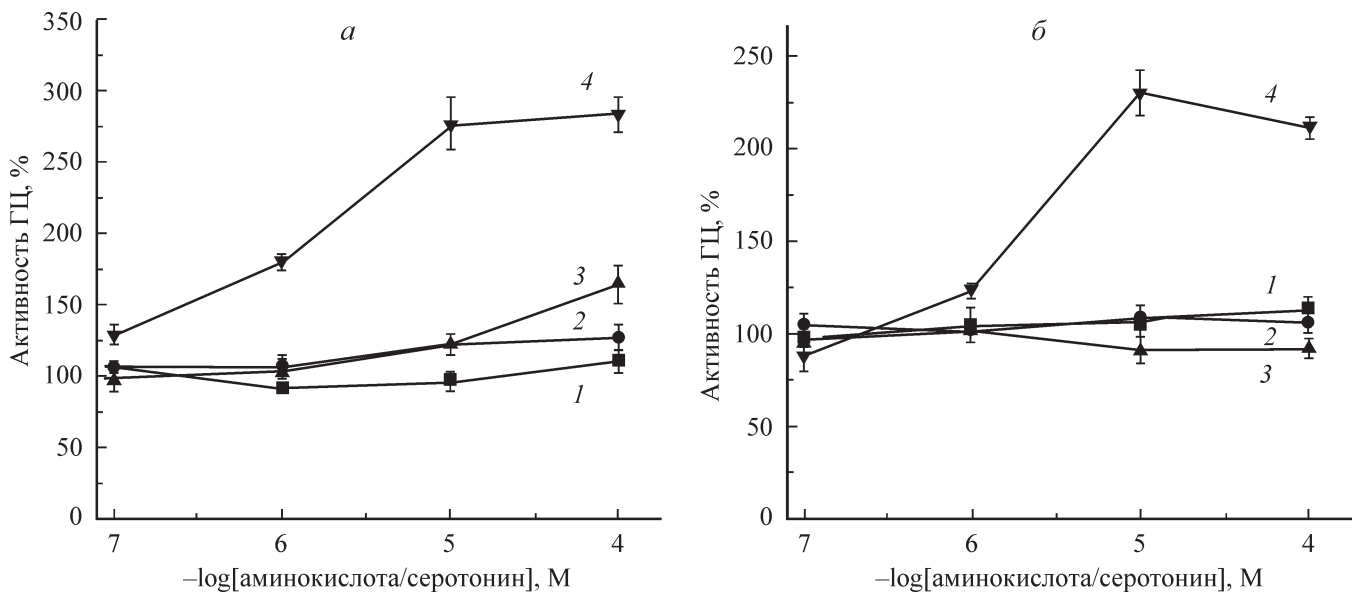


Рис. 2. Влияние метионина, тирозина, аланина и серотонина на активность гуанилатциклазы (ГЦ) инфузорий *Dileptus anser* (а) и *Tetrahymena pyriformis* (б).

Кривые: 1 — метионин, 2 — тирозин, 3 — аланин, 4 — серотонин. Базальная активность ГЦ, которая в гомогенатах инфузорий *D. anser* и *T. pyriformis* составила 2.9 ± 0.3 и 4.0 ± 0.2 пмоль цГМФ за 1 мин на 1 мг белка соответственно, принята за 100 %.

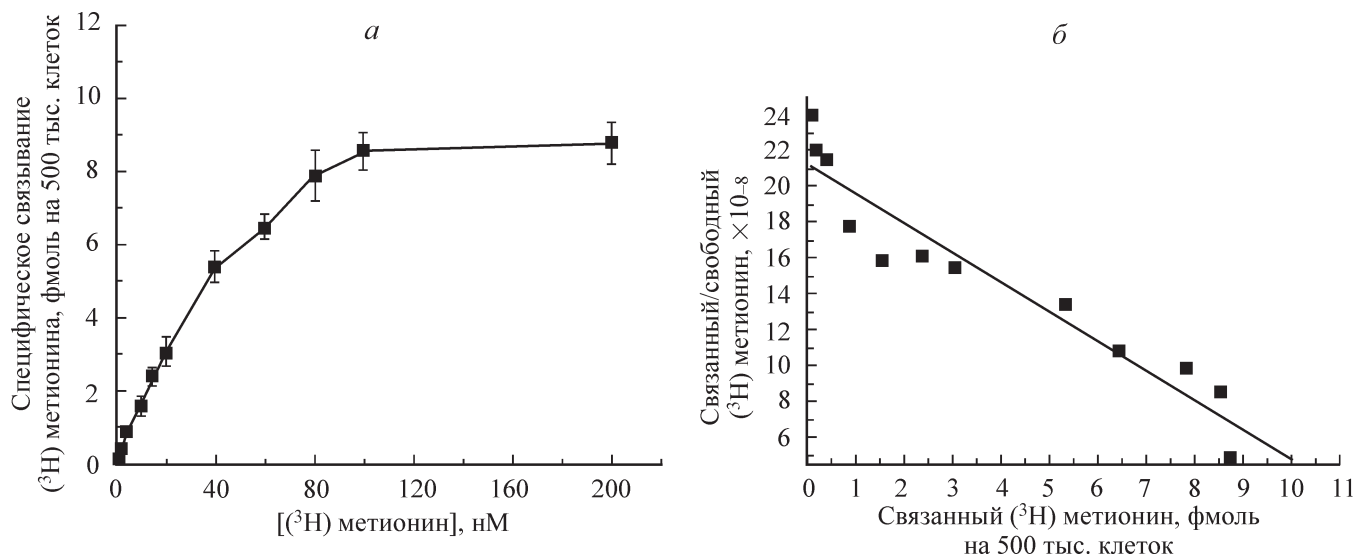


Рис. 3. Специфическое связывание L-[метил- ^3H]метионина с инфузориями *Dileptus anser* (а) и преобразование кривых связывания в координатах Скэтчарда (б).

ляцию ГЦ серотином и аланином, за исключением небольшого (на 14 %) снижения ГЦ эффекта серотонина у *T. pyriformis*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу чувствительности ГЦ инфузорий к серотонину и в случае *D. anser* — к аланину. Предполагается также, что ГТФ-связывающие белки, родственные гетеротримерным G-белкам позвоночных, не вовлечены в регуляторные эффекты серотонина и аланина на активность ГЦ инфузорий.

Влияние аминокислот и серотонина на активность циклаз инфузорий указывает на присутствие специфичных к ним рецепторов. С целью их идентификации изучали связывание инфузорий с мечеными радиолигандами — [метил- ^3H]метионином, [3,5- ^3H]тирозином, [2,3- ^3H]аланином и [^3H]серотином. Показано, что метионин и серотонин специфично связываются с поверхностными рецепторами инфузорий (рис. 3—6). В случае связывания [метил- ^3H]метионина с *D. anser* и *T. pyriformis* значения K_D

составили 7.5 и 35.6 нМ, значения V_{\max} — 10.2 и 2.2 фмоль метионина на 500 тыс. дилептусов и 1000 тыс. тетрахимен соответственно. В пересчете на одну клетку *D. anser* и *T. pyriformis* число связывающих мест для метионина, являющихся, как мы полагаем, метиониновыми рецепторами, составило 12000 и 1320. В случае связывания [^3H]серотонина с *D. anser* и *T. pyriformis* значения K_D составили 2.7 и 4.7 нМ, значения V_{\max} — 3.2 и 2.7 фмоль серотонина на 500 тыс. дилептусов и 1000 тыс. тетрахимен соответственно. В пересчете на одну клетку *D. anser* и *T. pyriformis* число связывающих мест для серотонина составило 3840 и 1620. Тирозин и аланин специфично связывались только с инфузориями *D. anser*. Значения K_D в этом случае составили 285 и 138 нМ, что значительно выше таковых для метионина и серотонина. Значения V_{\max} для тирозина и аланина составили 5.1 и 1.6 фмоль аминокислоты на 500 тыс. клеток. Эти данные свидетельствуют о присутствии специфичных рецепторов ко всем исследованным ве-

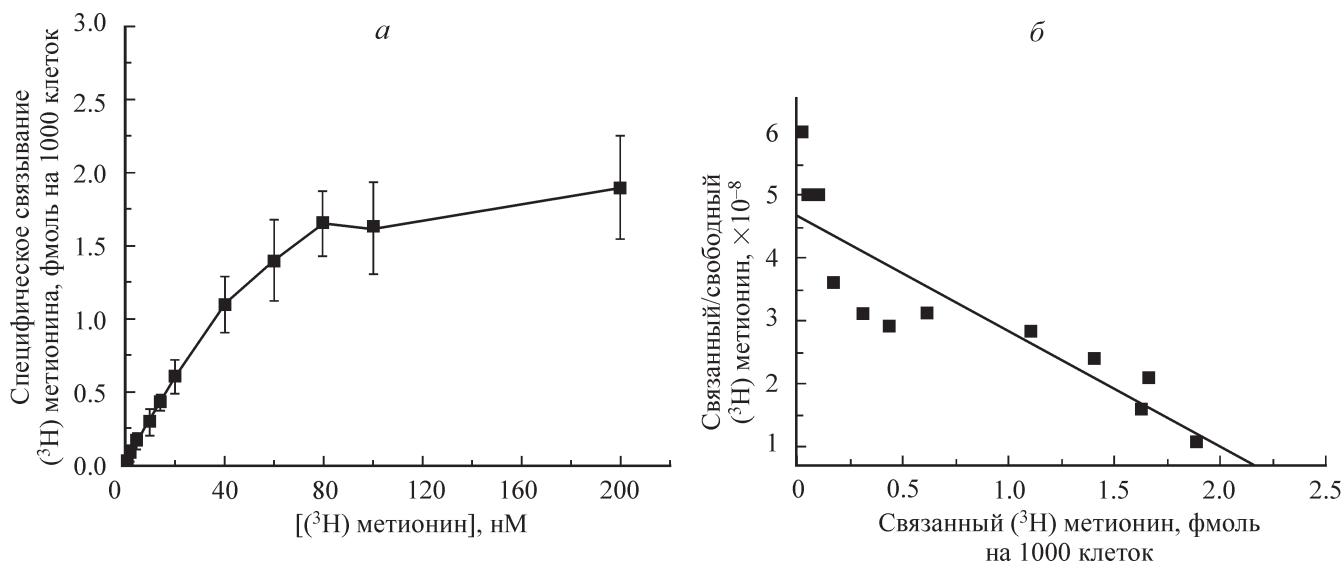


Рис. 4. Специфическое связывание L-[метил- ^3H]метионина с инфузориями *Tetrahymena pyriformis* (а) и преобразование кривых связывания в координатах Скэтчарда (б).

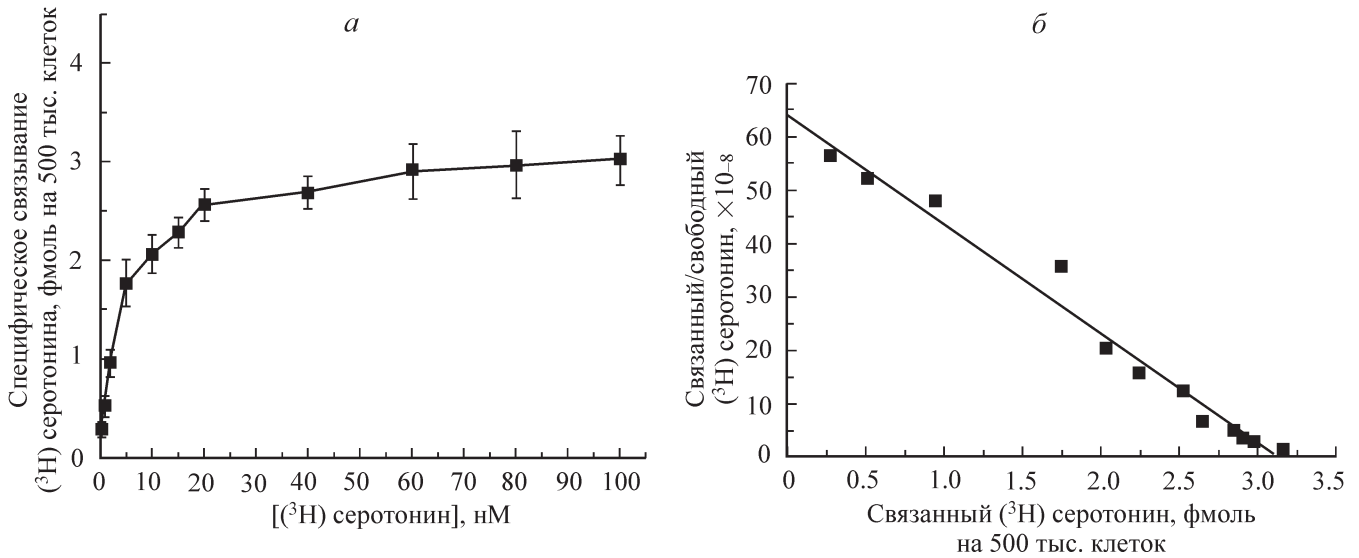


Рис. 5. Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ серотонина с инфузориями *Dileptus anser* (а) и преобразование кривых связывания в координатах Скэтчарда (б).

ществам на поверхности инфузорий *D. anser*. При этом метионин и серотонин связываются с рецепторами *D. anser* с высокой аффинностью, в то время как тирозин и аланин — с низкой. Для *T. pyriformis* показано, что серотонин связывается с рецепторами с высоким средством, метионин ему в этом существенно уступает, в то время как специфическое связывание в случае аланина и тирозина отсутствует.

Обсуждение

Ранее нами были изучено влияние 20 природных α -аминокислот на активность АЦ и ГЦ *D. anser* и *T. pyriformis* и обнаружено, что некоторые из них, взятые в концентрации 10^{-4} М, влияют на активность ферментов (Шпаков и др., 2011а). В частности, стимулирующее влияние на активность циклаз оказывали метионин, тирозин

и аланин, а также гормон серотонин, производный триптофана. Следует отметить, что стимуляция АЦ серотином у *T. pyriformis* была обнаружена еще 40 лет назад (Rosenszweig, Kindler, 1972), но механизмы действия гормона на фермент и его связывание с рецепторами инфузорий не были изучены. Цель настоящего исследования — выяснение молекулярных механизмов влияния метионина, тирозина, аланина и серотонина на активность циклаз инфузорий *D. anser* и *T. pyriformis* и идентификация специфических к ним рецепторов.

Среди изученных нами веществ наиболее активным регулятором циклаз у инфузорий был серотонин, выполняющий функции нейрогормона у многоклеточных организмов. Стимулирующие АЦ эффекты серотонина у инфузорий по величине были близки таковым для АЦ эффектов гормона у высших эукариот (Кузнецова, Шпаков, 1994). Поскольку сурамин, ингибитор $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримерных G-белков, эффективно подавлял АЦ эффекты серото-

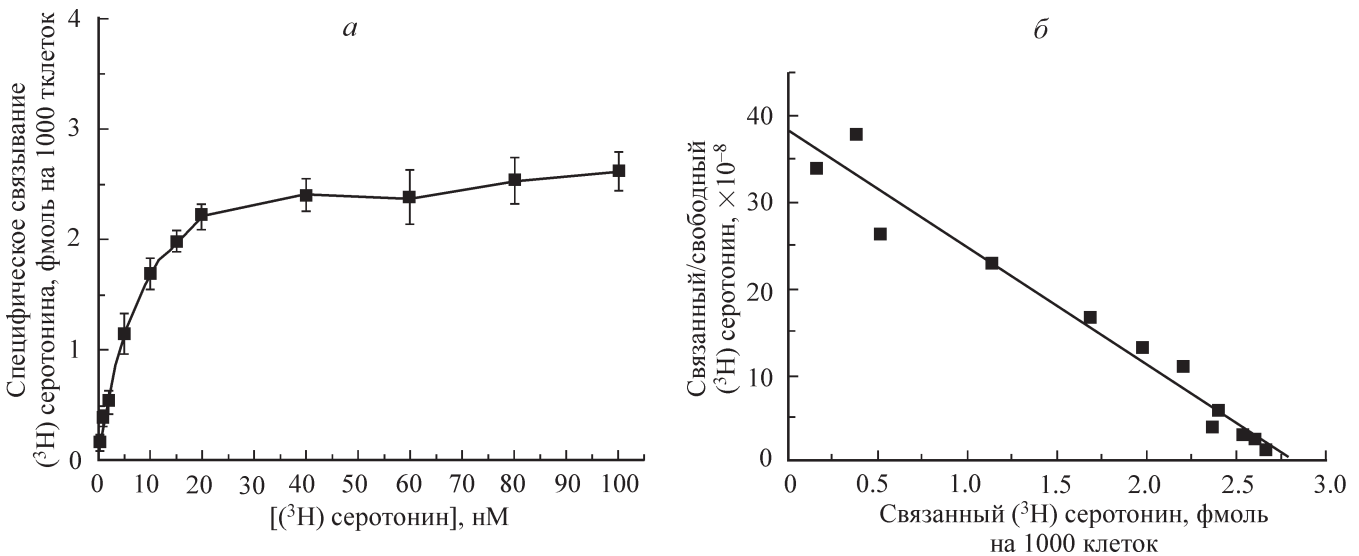


Рис. 6. Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ серотонина с инфузориями *Tetrahymena pyriformis* (а) и преобразование кривых связывания в координатах Скэтчарда (б).

нина, можно предположить, что действие гормона на АЦ инфузорий реализуется через ГТФ-связывающие белки, родственные G-белкам позвоночных. В этой связи следует отметить, что серотониновые рецепторы серпантинного типа, которые у позвоночных животных отвечают за большинство физиологических эффектов гормона, также сопряжены с гетеротримерными G-белками. Гетеротримерные G-белки, сопряженные с поверхностными рецепторами и участвующие в передаче сигналов к внутриклеточным эффекторным системам, в настоящее время идентифицированы у ряда представителей низших эукариот — амёбы *Dictyostelium discoideum*, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, большинства аскомицетов и базидиомицетов (Brzostowski et al., 2002; Krystofova, Borkovich, 2005; Slessareva, Dohlman, 2006; Shpakov, Pertseva, 2008). В геноме *D. discoideum* выявлено 12 типов α -субъединиц G-белков, которые близки к α -субъединицам G-белков позвоночных (Brzostowski et al., 2002). Ранее нами было показано, что у инфузорий *D. anser* и *T. pyriformis* также имеются функционально активные ГТФ-связывающие белки, компоненты регулируемых гормоноподобными веществами сигнальных систем (Деркач и др., 2002, 2003; Шпаков и др., 2010).

Нами установлено, что АЦ эффект серотонина у *T. pyriformis* зависит от присутствия низких концентраций Ca^{2+} , что указывает на вовлечение в эффекты гормона Ca^{2+} -зависимой формы АЦ, охарактеризованной нами ранее (Деркач и др., 2010). Необходимо отметить, что зависимые от Ca^{2+} формы АЦ выявлены у других одноклеточных, в том числе у инфузорий *Paramecium tetraurelia* (Gustin, Nelson, 1987), жгутиконосцев *Trypanosoma brucei* и *T. cruzi* (Paindavoine et al., 1992; D'Angelo et al., 2002) и гриба *Neurospora crassa* (Reig et al., 1984). Однако участие этих форм фермента в процессах передачи внешних сигналов в клетку до сих пор не было исследовано.

Значения K_D для специфического связывания серотонина с рецепторами, локализованными на поверхности инфузорий *D. anser* и *T. pyriformis*, составили 2.7 и 4.7 нМ, что близко к значениям K_D для связывания гормона с метаболитными и ионотропными серотониновыми рецепторами позвоночных (Heuring, Peroutka, 1987; Fletcher, Barnes, 1997; Weber et al., 1997). Это свидетельствует о том, что рецепторы инфузорий столь же специфичны к серотонину, как и серотониновые рецепторы более сложных организованных организмов. На основании этого можно сделать вывод о том, что эти рецепторы и сопряженные с ними сигнальные каскады сформировались на ранних этапах эволюции эукариот. Недавно было обнаружено, что рецепторы, которые с высоким сродством связываются с серотонином, мелатонином и другими индолоксогенными соединениями, присутствуют у некоторых прокариот, причем через них осуществляется регуляция таких жизненно важных процессов, как рост бактерий и их коммуникация (Rahman et al., 2005; Lee et al., 2007). Полученные нами данные позволяют предположить, что у инфузорий имеется чувствительная к серотонину сигнальная система, которая включает в себя специфичный к гормону рецептор, ГТФ-связывающие белки и фермент АЦ и сходна по ряду характеристик с чувствительной к серотонину АЦ системой высших эукариот.

Нами показано, что наряду с АЦ серотонин активирует ГЦ инфузорий. Эффекты серотонина на ГЦ, как мы полагаем, реализуются через формы фермента, которые не сопряжены с гетеротримерными G-белками, поскольку ингибирующее влияние сурамина на них не выявляется.

Это могут быть рецепторные формы ГЦ, образующие в мембране ионные каналы и наделенные специфической активностью ГЦ, которые обнаружены у инфузорий *T. pyriformis*, *T. thermophila* и *P. tetraurelia*, плазмодиев *Plasmodium falciparum* и *P. yoelii*, пироплазмодия *Theileria parva* (Linder, Schultz, 2002; Baker, Kelly, 2004), а также мембранно-связанные ГЦ, сходные по топологии с АЦ позвоночных, и цитозольные формы ГЦ, идентифицированные у амёбы *D. discoideum* (Roelofs et al., 2001). У *D. discoideum* регуляторами активности ГЦ являются внеклеточный цАМФ и фолиевая кислота (Manahan et al., 2004). Ранее нами было показано, что активность ГЦ *D. anser* и *T. pyriformis* регулируется внеклеточным цАМФ и некоторыми аминокислотами и сахарами (Шпаков и др., 2010, 2011а, 2011б). Данные о стимуляции ГЦ инфузорий серотонином, полученные в настоящем исследовании, указывают на то, что гормоны высших эукариот, производные аминокислот, могут являться эндогенными регуляторами цГМФ-зависимых сигнальных каскадов у одноклеточных организмов. В этой связи следует отметить, что ксантуреновая кислота, которая, как и серотонин, является производным аминокислоты триптофана, регулирует активность ГЦ малярийного плазмодия *P. falciparum* и контролирует таким образом его репродуктивную функцию (Muhia et al., 2001).

Среди изученных аминокислот только метионин эффективно стимулировал АЦ у обеих инфузорий, причем его эффекты ингибировались сурамином, что указывает на участие в них ГТФ-связывающих белков. Метионин с высоким сродством связывался с поверхностными рецепторами *D. anser* и *T. pyriformis*. Это свидетельствует о том, что его действие на АЦ реализуется через специфичные к метионину рецепторы, которые, вероятно, сопряжены с гетеротримерными G-белками. Данные о метиониновых рецепторах у других одноклеточных ограничиваются обнаружением рецептора GPR4 у базидиомицета *V. neoformans*, который связывается как с метионином, так и с пролином (Xue et al., 2006, 2008). Рецептор GPR4 гомологичен цАМФ-рецепторам *D. discoideum* и относится к рецепторам серпантинного типа, сопряженным с G-белками. На основании этого можно предположить, что рецептор GPR-4 через посредство G-белков сопряжен с ферментом АЦ. Нокаут гена, кодирующего рецептор GPR-4, приводит к нарушению процесса слияния клеток гриба в процессе спаривания (Xue et al., 2006). Следует отметить, что в отличие от серотонина метионин практически не влияет на активность ГЦ у обеих инфузорий.

Аланин и тирозин стимулировали АЦ *D. anser* менее эффективно в сравнении с серотонином и метионином, а аланин в незначительной степени влиял на ГЦ. Обе аминокислоты с низким сродством связывались с поверхностными рецепторами инфузорий, а их эффекты были нечувствительны к сурамину. Все эти факты указывают на то, что действие аланина и тирозина на ферменты-циклазы *D. anser* осуществляется без участия гетеротримерных G-белков через низкоспецифичные рецепторы. В настоящее время рецепторы к аланину обнаружены только в обонятельных розетках атлантического лосося *Salmo salar*, причем высокоаффинное связывание с ними аланина ингибируется как аланином, так и близкими ему по структуре гидроксилсодержащими аминокислотами — треонином и серином (Lo et al., 1991). Тирозин, который является исходным веществом для синтеза катехоламинов и меланина, специфично связывается с рецепторами меланоцитов млекопитающих, регулирует активность

структурных и сигнальных белков, вовлеченных в меланогенез, и таким образом контролирует функции меланоцитов (Slominski, Paus, 1994; Slominski et al., 2011). На основании этих данных было высказано предположение о том, что предшественниками рецепторов для катехоламинов, меланина и других производных аминокислот у позвоночных животных являются рецепторы аминокислот, которые идентифицированы у одноклеточных и прокариот (Slominski et al., 2011). Раннее появление таких рецепторов в эволюции обусловлено необходимостью формирования у примитивных организмов системы специфического опознавания природных аминокислот, важнейших пищевых молекул, которые являются промежуточными веществами во многих биохимических реакциях и контролируют жизненно важные процессы в эукариотической клетке (Slominski et al., 2011). В отношении тирозина предполагается также, что он, связываясь со специфичными к нему рецепторами, регулирует защитные механизмы бактерий и одноклеточных организмов против воздействия жесткого ультрафиолетового излучения. Эти механизмы являются прототипом меланогенного механизма защиты кожных покровов у позвоночных животных. Поскольку у *D. anser* нами ранее были выявлены специфичные рецепторы к катехоламинам, с которыми с высоким сродством связывается адреналин, можно предположить, что тирозин, предшественник катехоламинов, связывается либо с родственными им рецепторами инфузорий, либо с самими этими рецепторами, но с низким сродством. В пользу этого свидетельствует тот факт, что адреналин и его аналоги, хотя и с низкой эффективностью, активируют АЦ и повышают внутриклеточный уровень цАМФ в клетках инфузорий (Шпаков и др., 2004).

Таким образом, нами показано, что метионин и серотонин специфично связываются с поверхностными рецепторами свободноживущих инфузорий *D. anser* и *T. pyriformis* и активируют у них активность ферментов-циклаз. Серотонин активирует обе циклазы (АЦ и ГЦ), в то время как метионин активирует только АЦ. Действие серотонина и метионина на АЦ осуществляется с участием ГТФ-связывающих G-белков, сходных по некоторым характеристикам с гетеротримерными G-белками позвоночных. Две другие аминокислоты, аланин и тирозин, связываются с рецепторами инфузорий с низкой аффинностью, а их регуляторное влияние отчетливо выявляется только в отношении АЦ *D. anser*. Полученные данные свидетельствуют о том, что у одноклеточных организмов имеются хемосигнальные системы, регулируемые аминокислотами и их производными, которые по структурно-функциональной организации сходны с гормональными сигнальными системами многоклеточных организмов и, как мы полагаем, являются их эволюционными предшественниками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00692).

Список литературы

Деркач К. В., Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Ирлина И. С., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2003. Регуляция аденилатциклазной системы инфузории *Tetrahymena pyriformis* гормональными и негормональными агентами и ее зависимость от уровня базальной активности аденилатциклазы. Журн. эволюц. биохим. физиол. 39 (4) : 332—338.

Деркач К. В., Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Успенская З. И., Перцева М. Н. 2002. Гормоночувствительная аденилатциклазная система инфузории *Dileptus anser*. Цитология. 44 (11) : 1129—1134.

Деркач К. В., Шпаков А. О., Успенская З. И., Юдин А. Л. 2010. Функциональная характеристика кальций-чувствительной аденилатциклазы инфузории *Tetrahymena pyriformis*. Цитология. 52 (11) : 967—976.

Кузнецова Л. А., Шпаков А. О. 1994. Рецепторы серотонина, участвующие в модуляции аденилатциклазной системы, в тканях позвоночных и беспозвоночных. Журн. эволюц. биохим. физиол. 30 (2) : 293—309.

Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И. 2011а. Влияние природных аминокислот и сахаров на активность циклаз инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и *Dileptus anser*. Журн. эволюц. биохим. физиол. 47 (2) : 128—135.

Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И. 2011б. Стимулирующее влияние глюкозы и циклического аденозинмонофосфата на активность аденилатциклазы и гуанилатциклазы инфузории *Tetrahymena pyriformis*. Бюл. эксперим. биол. мед. 152 (10) : 407—411.

Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Перцева М. Н. 2010. Регуляция циклическим аденозинмонофосфатом функциональной активности аденилатциклазной системы инфузории *Dileptus anser*. Журн. эволюц. биохим. физиол. 46 (2) : 119—125.

Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Шпакова Е. А., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2004. Молекулярные механизмы регуляторного влияния агонистов аденергических рецепторов на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы инфузорий *Dileptus anser* и *Tetrahymena pyriformis*. Цитология. 46 (4) : 317—325.

Baker D. A., Kelly J. M. 2004. Structure, function, and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. Mol. Microbiol. 52 : 1229—1242.

Brzostowski J., Johnson V., Kimmel A. 2002. G α -mediated inhibition of developmental signal response. Curr. Biol. 12 : 1199—1208.

D'Angelo M. A., Montagna A. E., Sanguineti S., Torres H. N., Flawia M. M. 2002. A novel calcium-stimulated adenylyl cyclase from *Trypanosoma cruzi*, which interacts with the structural flagellar protein paraflagellar rod. J. Biol. Chem. 277 : 35 025—35 034.

Fletcher S., Barnes N. M. 1997. Purification of 5-hydroxytryptamine₂ receptors from porcine brain. Br. J. Pharmacol. 122 : 655—662.

Garbers D. L., Murad F. 1979. Guanylate cyclase assay methods. Adv. Cyclic Nucl. Res. 10 : 57—67.

Gustin M. V., Nelson D. L. 1987. Regulation of ciliary adenylyl cyclase by Ca²⁺ in *Paramecium*. Biochem. J. 246 : 337—345.

Heuring R. E., Peroutka S. J. 1987. Characterization of a novel ³H-5-hydroxytryptamine binding site subtype in bovine brain membranes. J. Neurosci. 7 : 894—903.

Krystofova S., Borkovich K. A. 2005. The heterotrimeric G-protein subunits GNG-1 and GNB-1 form a G $\beta\gamma$ dimer required for normal female fertility, asexual development, and G α protein level in *Neurospora crassa*. Eukaryot. Cell. 4 : 365—378.

Lee J., Jayaraman A., Wood T. K. 2007. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. BMC Microbiology. 7 : 42.

Linder J. U., Schultz J. E. 2002. Guanylyl cyclases in unicellular organisms. Mol. Cell. Biochem. 230 : 149—158.

Lo Y. H., Bradley T. M., Rhoads D. E. 1991. L-alanine binding sites and Na⁺, K⁺-ATPase in cilia and other membrane fractions from olfactory rosettes of *Atlantic salmon*. Comp. Biochem. Physiol. 98 : 121—126.

Manahan V. L., Iglesias P. A., Long Y., Devreotes P. N. 2004. Chemoattractant signaling in *Dictyostelium discoideum*. Annu. Rev. Cell. Develop. Biol. 20 : 223—253.

Muhia D. K., Swales V. A., Deng W., Kelly J. M., Baker D. A. 2001. The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol. Microbiol. 42 : 553—560.

Paindavoine P., Rolin S., Van Assel S., Geuskens M., Jauniaux J. V., Dinsart V., Huet G., Pays E. 1992. A gene from the variant surface glycoprotein expression site encodes one of several transmembrane adenylate cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*. Mol. Cell. Biol. 12 : 1218—1225.

Rahman M. A., Azuma Y., Fukunaga H., Murakami T., Sugi K., Fukushi H., Miura K., Suzuki H., Shirai M. 2005. Serotonin and melatonin, neurohormones for homeostasis, as novel inhibitors of infections by the intracellular parasite chlamydia. J. Antimicrob. Chemother. 56 : 861—868.

Reig J. A., Tellez-Inon M. T., Flawia M. M., Torres H. N. 1984. Activation of *Neurospora crassa* soluble adenylate cyclase by calmodulin. Biochem. J. 221 : 541—543.

Roelofs J., Snippe H., Kleineidam R. G., Van Haastert P. J. 2001. Guanylate cyclase in *Dictyostelium discoideum* with the topology of mammalian adenylate cyclase. Biochem. J. 354 : 697—706.

Rosenszweig Z., Kindler S. H. 1972. Epinephrine and serotonin activation of adenylate cyclase from *Tetrahymena pyriformis*. FEBS Lett. 25 : 221—223.

Shpakov A. O., Pertseva M. N. 2008. Signaling systems of lower eukaryotes and their evolution. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 269 : 151—282.

Slessareva J. E., Dohlman H. G. 2006. G protein signaling in yeast: new components, new connections, and new compartments. Science. 314 : 1412—1413.

Slominski A., Paus R. 1994. Towards defining receptors for L-tyrosine and L-dopa. Mol. Cell. Endocrinol. 99 : 7—11.

Slominski A., Zmijewski M., Pawelek J. 2011. L-tyrosine and L-DOPA as hormone-like regulators of melanocytes functions. Pigment Cell Melanoma Res. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00898.

Weber J. T., Hayataka K., O'Connor M. F., Parker K. K. 1997. Rabbit cerebral cortex 5HT_{1a} receptors. Comp. Biochem. Physiol. 117 : 19—24.

Xue V., Bahn Y. S., Cox G. M., Heitman J. 2006. G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*. Mol. Biol. Cell. 17 : 667—679.

Xue V., Hsueh Y. P., Heitman J. 2008. Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. FEMS Microbiol. Rev. 32 : 1010—1032.

Поступила 27 IX 2011

THE STUDY OF MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF NATURAL AMINO ACIDS AND SEROTONIN ON ADENYLYL AND GUANYLYL CYCLASES OF THE CILIATES

K. V. Derkach,¹ A. O. Shpakov,¹ * Z. I. Uspenskaya,² A. L. Yudin²

¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS
and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

* e-mail: alex_shpakov@list.ru

It has been previously shown that some amino acids and their derivatives are capable of regulating the activity of adenylyl cyclase (AC) and guanylate cyclase (GC) in free-living ciliates *Dileptus anser* and *Tetrahymena*. The aim of this work was to study the molecular mechanisms of action of methionine, tyrosine, alanine and neurohormone serotonin on the activity of enzymes-cyclases and the identification of their specific receptors in *D. anser* and *T. pyriformis*. Methionine and serotonin significantly increased the basal AC activity in both ciliates, and the AC effect of serotonin in *T. pyriformis* was carried out with the participation of Ca²⁺-dependent form of AC and heterotrimeric G proteins. AC stimulating effect of tyrosine and alanine was expressed weakly and only detected in *D. anser*. Serotonin is both ciliates and alanine in *D. anser* stimulated GC activity, whereas methionine and tyrosine had no effect on GC. Methionine and serotonin bind to surface receptors of the ciliates with high affinity. K_D for [methyl-³H] methionine binding to *D. anser* and *T. pyriformis* were 7.5 and 35.6 nM, and for [³H] serotonin binding were 2.7 and 4.7 nM, respectively. Alanine and tyrosine bind to the ciliates with low affinity. Thus, ciliates *D. anser* and *T. pyriformis* have chemosignaling systems regulated by amino acids and their derivatives and including the enzymes with cyclase activity. There is an assumption that these systems are similar to hormonal signaling systems of higher eukaryotes and are their predecessors.

Key words: adenylyl cyclase, amino acid, guanylyl cyclase, ciliate, methionine, receptor, serotonin, *Dileptus anser*, *Tetrahymena pyriformis*.