

## ДВЕ ИЗОФОРМЫ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 *Xenopus laevis*

© 2011 г. М. Г. Шарапов\*, В. И. Новоселов, Е. Е. Фесенко, В. К. Равин

Институт биофизики клетки Российской академии наук,

Пушино, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

Принята к печати 31.03.2011 г.

Геном шпорцевой лягушки, *Xenopus laevis*, кодирует два гена пероксиредоксина 6: *xen1* (Acc. no. EMBL Data Bank – BC054278) и *xen2* (Acc. no. EMBL Data Bank – BC054309). Оба гена клонированы и экспрессированы в *Escherichia coli*. Аминокислотные последовательности ферментов Xen1 и Xen2 сходны на 95%, они обладают одинаковой пероксидазной активностью, имеют одинаковые оптимумы температуры и pH и одинаковую термостабильность. Гены пероксиредоксина 6 ксенопуса существенно отличаются по времени экспрессии в ходе онтогенеза: ген *xen2* экспрессируется на всех стадиях развития, несколько более интенсивно после стадии 0–5, а ген *xen1* начинает экспрессироваться позже – на стадиях развития 47–48 ч. Экспрессия гена *xen2* возрастает после инкубации эмбрионов в среде с пероксидом водорода. Сравнение аминокислотных последовательностей белков Xen1 и Xen2 показывает, что только второй может обладать фосфолипазной активностью, поскольку его аминокислотная последовательность содержит остатки активного центра фосфолипазы A2 (Ser31, His25, Asp139).

**Ключевые слова:** пероксиредоксины, экспрессия генов, эмбриональное развитие, *Xenopus laevis*.

TWO PEROXIREDOXINS 6 OF *Xenopus laevis*, by M. G. Sharapov\*, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko, V. K. Ravin (Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, Moscow Region, 149290 Russia; \*e-mail: sharapov.mars@gmail.com). Two different genes of peroxiredoxin 6 are encoded in the genome of *Xenopus laevis*: *xen1* (Acc.no. EMBL Data Bank – BC054278) and *xen2* (Acc.no. EMBL Data Bank – BC540309). Both genes were cloned and expressed in *Escherichia coli*. Proteins were purified and analyzed. The amino acid sequences of the enzymes Xen1 and Xen2 are 95% identical with the same peroxidase activity, pH and temperature optimums, as well as thermostability, being approximately equal. The expression of peroxiredoxin 6 genes significantly differ during ontogenesis of *X. laevis*. The expression of *xen1* starts on a later stage of development 47–48, while the gene *xen2* is expressed on all stages of development with the same increase starting from stage 0–5. The level of *xen2* expression in embryos increased after incubation in presence of hydrogen peroxide. The comparison of amino acid sequences of proteins Xen1 and Xen2 shows that only the enzyme Xen2 may have phospholipase activity, since it has residues of phospholipase A2 active center: Ser31, His25, Asp139.

**Keywords:** peroxiredoxins, genes expression, embryonic development, *Xenopus laevis*.

Во всех аэробных организмах образуются побочные продукты кислородного дыхания – активные формы кислорода (АФК), которые играют двойную роль в клетке. При высоких концентрациях они токсичны для клеток и служат причиной развития окислительного стресса, а при физиологически допустимых концентрациях могут выступать в роли вторичных переносчиков (мессенджеров), участвующих в регуляции многочисленных клеточных процессов [1]. Токсическое действие АФК предотвращается в организме за счет функционирования антиоксидантной защиты. Наиболее важные пред-

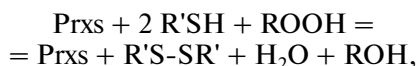
ставители ферментов-антиоксидантов – супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1), каталаза (КФ 1.11.1.6), глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9), глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18), глутамилцистеинсинтазы (КФ 2.3.2.2), глутатионредуктазы (КФ 1.8.1.7), тиоредоксины (КФ 1.8.1.9) и пероксиредоксины (КФ 1.11.1.15).

Пероксиредоксины (Prxs), образующие суперсемейство селен-независимых пероксидаз, открыты около 20 лет назад [2–4]. Они осуществляют ферментативную деградацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, органиче-

Принятые сокращения: *xen*(1, 2) – ген пероксиредоксина 6; Prx – пероксиредоксин; ГПТБ – гидропероксид *трет*-бутила; АФК – активные формы кислорода.

\* Эл. почта: sharapov.mars@gmail.com

ских гидропероксидов и пероксинитрита [5], по общей схеме:



где R'SH — низкомолекулярный тиол-восстановитель, ROOH — гидропероксид (R — органическая или неорганическая группа).

Prxs обнаружены в различных про- и эукариотических организмах. Они подразделяются на шесть типов: Prx 1-5 имеют два активных остатка цистеина и используют тиоредоксин или глутатион как субстрат-восстановитель; Prx6 имеет один активный остаток цистеина и использует глутатион в реакции каталитического восстановления  $H_2O_2$  и различных органических гидропероксидов [3, 6, 7]. В отличие от других пероксиредоксинов, Prx6 восстанавливает гидропероксиды фосфолипидов и обладает активностью фосфолипазы  $A_2$  [8–10]. Ген *prx6* экспрессируется почти во всех тканях млекопитающих [11–13]. По-видимому, фермент имеет уникальное значение в антиоксидантной защите у млекопитающих, так как утрата его функции не может быть компенсирована экспрессией других генов. Так, мыши, нокаутированные по гену *prx6*, несмотря на нормальное развитие, высокочувствительны к окислительному стрессу и обладают низкой степенью выживаемости в условиях гипероксии. При этом следует отметить, что у таких мутантов уровни экспрессии генов других антиоксидантных ферментов (таких как каталаза, глутатионпероксидаза и супероксиддисмутаза) у мышей дикого типа не различаются [14, 15]. Экспрессия гена *prx6* увеличивается у новорожденных крыс и приматов, а также при гипероксии у взрослых животных [16, 17].

Шпорцевая лягушка (*X. laevis*) — один из хорошо изученных и удобных модельных объектов, который часто используется для оценки влияния токсичных соединений и загрязнений окружающей среды (тяжелые металлы, радиация и т.п.) на эмбриональное развитие (FETAХ test) [18]. Кроме того, ксенопус используется при исследовании биохимических, клеточных, морфологических и физиологических аспектов оплодотворения и развития позвоночных [19, 20, 21]. Морфологические изменения в ходе развития лягушки (в том числе, формирование органов и начало их функционирования) подробно описаны [22], что позволяет достаточно точно определить стадию развития головастика. Таким образом, и функционирование антиоксидантных систем позвоночных в ходе раннего онтогенеза удобно исследовать на этой модели.

В настоящем сообщении описаны две изоформы пероксиредоксина 6 шпорцевой лягушки.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объект исследования.** Шпорцевые лягушки получены из Института биологии развития РАН (Москва). Самкам инъецировали хорионический гонадотропин человека (500 IU). Спустя 16 ч получали икру и оплодотворяли ее суспензией спермы. Доля оплодотворенной икры достигала 80%. Эмбрионы содержали в аквариуме при температуре 20°C. Стадии развития определяли, используя описание Ньюкопа (Nieuwkoop) и Фабера (Faber) [22]. Эмбрионы различных стадий замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

**Выделение РНК.** Головастики и эмбрионы замораживали в жидком азоте, затем растирали в керамической ступке, добавляли 2 мл буфера D (25 мМ цитрат натрия, pH 4.0, 4 М гуанидинизотиоцианат, 0.5% саркозил, 0.1 М β-меркаптоэтанол), 0.2 мл 2 М ацетата натрия, 2.2 мл фенола, насыщенного водой, и 2.2 мл смеси хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 49 : 1. Суспензию встряхивали в течение 20 с и центрифугировали (18000 g, 15 мин, 4°C). Отбирали водную фазу, повторяли экстракцию равным объемом хлороформа, центрифугировали (15 мин при 18000 g), отбирали водную фазу и осаждали РНК равным объемом изопропанола при –20°C в течение 16 ч. Затем раствор центрифугировали (18000 g, 15 мин, 4°C), осадок промывали 70%-ным этанолом, подсушивали, растворяли в 0.3 мл буфера D и повторяли осаждение РНК изопропанолом (–20°C, 3 ч). Осадок РНК промывали 70%-ным этанолом, подсушивали и растворяли в 100 мкл деионизированной воды. Качество РНК определяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (по сохранности рибосомной 18S и 28S РНК), концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (“NanoDrop Technologies”, США). Концентрация РНК составляла около 500 нг/мкл. Раствор РНК хранили при –80°C.

**Обратная транскрипция и ПЦР.** Перед обратной транскрипцией (ОТ) раствор РНК обрабатывали ДНКазой RQ1 (“Promega”, США) в соответствии с инструкцией фирмы, затем РНК очищали на колонке “QiaGen” (Германия). Для ОТ использовали тотальную РНК (по 1 мкг для каждой стадии развития), обратную транскриптазу Mint (“Евроген”, Россия) и стандартный праймер олиго-dT<sub>15</sub>. Полученную в результате обратной транскрипции кДНК использовали для ПЦР с праймерами, специфичными для генов *xen1* и *xen2*. Поскольку эти гены отличаются лишь небольшим числом замен нуклеотидов, определяли “критическую” температуру отжига праймеров, при которой не наблюдается перекрестного образования ПЦР продуктов. Другими словами, при этой температуре с праймерами на ген *xen1* получается фрагмент только гена *xen1*, но не гена *xen2*,

Олигонуклеотиды

Праймер	Нуклеотидная последовательность	№ в EMBL
xen-1.F	5'-CAGCAC <u>CATATG</u> CCAGGTATCCTGCTAG-3'	BCO054278
xen-1.R	5'-CATTC <u>CTCGAG</u> TTGTGGCTGAGGTGTGTA-3'	
xen-2.F	5'-TT <u>CATATG</u> CCTGGAATCCTGCTAGGAG-3'	BCO054309
xen-2.R	5'-AA <u>CTCGAG</u> TTGTGGCTGTGCAGTGTATCTC-3'	
в – actin. F	5'-ATCATGTTTGAGACTTTCAA-3'	AAA49638
в – actin. R	5'-TTGCGTTCAGGCGGGGCAAT- 3'	

Примечание. F – прямой, R – обратный праймер; курсивом выделены и подчеркнуты точки рестрикции.

и наоборот. Эта температура, в условиях наших опытов, составляла 58.5°C. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в таблице.

Для ПЦР использовали высокоточную ДНК-полимеразу Tersus (“Евроген”, Россия) в следующем режиме: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров 58.5°C – 30 с, синтез 72°C – 60 с. В качестве контроля проводили ПЦР с праймерами на ген цитосклетного β-актина (тип 5), экспрессия которого существенно не изменяется во время развития [23].

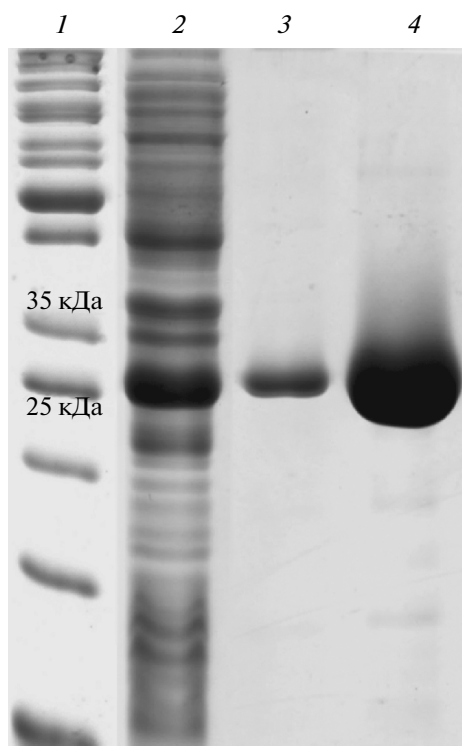
Продукты амплификации отбирали на разных циклах ПЦР (20, 25, 30, 35 циклов) и анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Интенсивности соответствующих полос сравнивали для определения уровня экспрессии генов *xen1* и *xen2*.

**Клонирование генов, выделение и очистка ферментов.** Для синтеза кодирующей последовательности генов использовали РНК, полученную из головастиков на стадии развития 63–64 ч. Полученные в результате ОТ-ПЦР фрагменты подвергали электрофорезу в 0.8%-ной агарозе, фрагменты вырезали из геля, очищали на колонке (“Цитокин”, Россия) и обрабатывали рестриктазами NdeI и XhoI (“Fermentas”, Литва). После этого фрагменты лигировали с плазмидой pET23b (“Novagen”, США), обработанной теми же рестриктазами. Лигазную смесь использовали для трансформации бактерий *E. coli* BL (DE3). Несколько полученных таким образом клонов BL (*xen1*) и BL (*xen2*) секвенировали и отбирали клоны, последовательности нуклеотидов в которых совпадают с последовательностями, представленными в GenBank. В результате были получены конструкции, в которых кодирующие последовательности генов *xen1* и *xen2* поставлены под контроль промотора T7, а соответствующие белки на карбоксильном конце содержат шесть остатков гистидина (His-tag). Ранее установлено, что при-

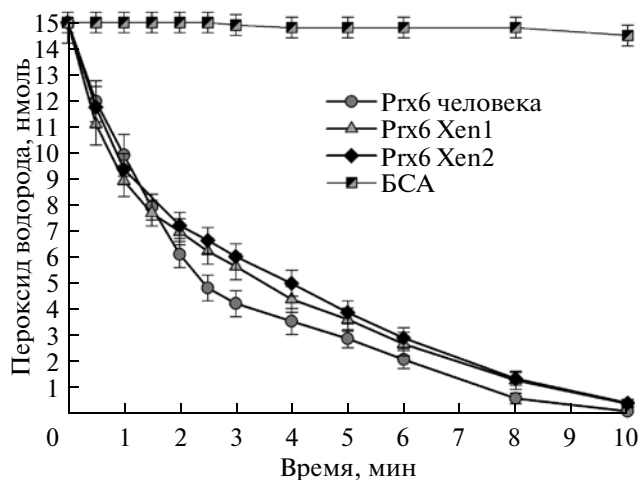
сутствие His-tag на карбоксильном конце Prx6 влияет на активность фермента [8, 24].

Для препаративного получения ферментов клоны выращивали в питательной среде LB в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) и хлорамфеникола (20 мкг/мл) в ферментере Ф-301 (Россия) при 37°C и интенсивной аэрации. Экспрессию генов *xen1* и *xen2* индуцировали, добавляя ИПТГ (до конечной концентрации 1 мМ) в среду культивирования при оптической плотности 0.6 о.е. (λ = 600 нм). После индукции бактерии культивировали еще в течение 4 ч, затем собирали центрифугированием (1500 g, 20 мин). Осадок ресуспендировали в буфере для связывания с агарозой Ni-NTA (15 мМ Трис-НСl, pH 7.8, 10 мМ имидазол) и разрушали ультразвуком. Дебрис удаляли центрифугированием в течение 20 мин при 18000 g. Аффинную хроматографию на агарозе Ni-NTA проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (“Invitrogen”). Полученные препараты ферментов диализовали против 7 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7.4, содержащего 150 мМ NaCl, концентрировали с помощью концентраторов Vivaspin 20 (“Sartorius”, Германия), замораживали и хранили при –20°C. Чистоту ферментов оценивали с помощью электрофореза в 12.5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Чистота ферментов составляла ≥95% (рис. 1).

**Оценка пероксидазной активности по степени защиты плазмидной ДНК от продуктов реакции Фентона.** Способность Prx6 защищать плазмидную ДНК от АФК, вызывающих одно- или двуни-тевые разрывы ДНК в условиях реакции Фентона, оценивали согласно схеме, опубликованной ранее [25, 26] с небольшими модификациями. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 7 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 6 нг/мкл плазмидной ДНК (pBluescript II KS+), 3 мкМ FeCl<sub>3</sub>, 5 мМ ДТТ, фермент (Xen1, Xen2) в различной концентрации. Смесь инкубировали



**Рис. 1.** Очистка белка Xen1. 1 – Маркер молекулярной массы белков; 2 – бактериальный нефракционированный лизат; 3, 4 – белок после очистки на агарозе Ni-NTA, по 2 мкг и 20 мкг соответственно. Такой же результат получен очистке белка Xen2.



**Рис. 2.** Peroxidазная активность Rgx6 человека, Xen1 и Xen2. Отрицательный контроль – фосфорилированный БСА. Концентрации ферментов 0.3 мг/мл, температура 37°C. Активность ферментов определяли по линейному участку (1-я минута реакции) кривой восстановления пероксида водорода.

при 37°C в течение 1 ч. В качестве положительно-го контроля использовали Rgx6 человека, а в качестве отрицательного – фосфорилированный БСА

(“Promega”) в тех же концентрации, что и ферменты Xen1 и Xen2. Пробы анализировали при помощи электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле. Защитный эффект проявляется в том, что суперскрученная форма плазмидной ДНК сохраняется. В качестве меры пероксидазной активности принимали концентрацию фермента, обеспечивающую сохранение 50% плазмидной ДНК в суперскрученной форме.

**Определение пероксидазной активности в реакциях с пероксидом водорода и гидропероксидом трет-бутила.** Peroксидазную активность Rgx6 определяли, как описано ранее [27], с небольшими модификациями. Реакционная смесь (150 мкл) состоит из 7 мМ фосфатного буфера, pH 7.4, содержащего 150 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ, 100 мкМ пероксида водорода (“Calbiochem”, Германия) или 100 мкМ гидропероксида трет-бутила (ГПТБ) (“Sigma”), а также ферменты в концентрации 0.3 мг/мл. В качестве положительного контроля использовали Rgx6 человека в концентрации 0.3 мг/мл, который получен нами ранее [24]. В качестве отрицательного контроля использовали фосфорилированный БСА (“Promega”, США) в концентрации 0.3 мг/мл. Реакцию проводили при 37°C и останавливали, добавляя 50 мкл 0.6 М HCl. Затем добавляли 100 мкл 10 мМ Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> и 50 мкл 2.5 М KSCN, что приводит к образованию комплексного соединения железа красного цвета. Концентрация пероксида пропорциональна интенсивности окраски, которую измеряли при длине волн 492 нм на приборе Multiscan Plus (Финляндия).

**Определение оптимума pH и температуры пероксидазной активности.** Оптимум pH определяли по изменению пероксидазной активности Rgx6 по отношению к ГПТБ при различных значениях pH в 50 мМ Na-фосфатном (pH 4.5–7.5) и 50 мМ Na-карбонатном буферах (pH 7–9). За 100% активности принимали то значение, при котором наблюдается максимальная активность. Температурный оптимум определяли при pH 7.4 по изменению активности фермента при разных температурах. За 100% активности принимали то значение, при котором наблюдается максимальная активность в реакции с ГПТБ.

**Определение термостабильности Rgx6.** Термостабильность Rgx6 определяли по остаточной пероксидазной активности после инкубации фермента при различных температурах (от 37 до 60°C) в течение 30 мин и после добавления восстановителя (ДТТ до конечной концентрации 2 мМ) определяли активность в реакции с ГПТБ при 37°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ферменты Xen1 и Xen2 практически не отличаются друг от друга по каталитическим и физи-

ко-химическим свойствам. Концентрация фермента Prx6 человека, при которой обеспечивается сохранение 50% ДНК плазмиды в суперскрученной форме, составляет 0.16 мг/мл [24], а ферментов Xen1 и Xen2 – 0.30 мг/мл и 0.35 мг/мл соответственно. Оба фермента имеют одинаковую активность в реакции восстановления пероксида водорода (рис. 2). Удельную активность ферментов определяли по линейному участку кривых восстановления субстратов на первой минуте реакции. Для пероксида водорода удельная активность Prx6 человека составляет 130 нмоль/мин/мг белка, а удельная активность Xen1 и Xen2 – 135 нмоль/мин/мг белка. Удельная активность Prx6 человека по отношению к гидропероксиду *трет*-бутила составляет 90 нмоль/мин/мг белка, а удельная активность Xen1 и Xen2 – 80 нмоль/мин/мг белка.

Не обнаружено также существенных различий между Xen1 и Xen2 по оптимумам температуры и pH (рис. 3а, б) и термостабильности (рис. 4) пероксидазной активности. Интересно отметить, что активность обоих ферментов Prx6 ксенопуса сохраняется при более низких температурах, чем активность фермента человека. Так, более 50% активности ферментов лягушки сохраняется вплоть до температуры 12.5°C, а фермента человека – только до 25°C (рис. 3а).

Однако существенные отличия между изоформами Prx6 *X. laevis* обнаруживаются в картине зависимости уровня экспрессии генов *xen1* и *xen2* от стадии развития эмбрионов. Так, ген *xen1* экспрессируется только на поздних стадиях развития (начиная со стадии 47), а ген *xen2* – на всех стадиях развития (рис. 5). Экспрессия гена *xen2* резко возрастает под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 6). Так, инкубация оплодотворенной икры ксенопуса (стадии развития 0–5) в Na-фосфатном буфере (pH 7.4) с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 мМ) при 22°C в течение 2 ч приводит примерно к трехкратному увеличению уровня экспрессии гена *xen2* (рис. 6).

**Антиоксидантный метаболизм на ранних стадиях развития ксенопуса**

Уровень концентрации АФК в клетках и межклеточном пространстве крайне важен в ходе раннего эмбрионального развития позвоночных. С одной стороны, АФК регулируют экспрессию генов, энергетический метаболизм, дифференцировку и деление клеток, развитие тканей и органов, а с другой – они могут стать причиной возникновения различных патологий (тератом) и даже гибели эмбриона [1, 28, 29]. Таким образом, при нормальном развитии эмбриона уровень АФК в организме строго регулируется. В настоящее время сведения о функционировании антиоксидантных систем в ходе эмбриогенеза позвоночных фрагментарны и неполны. Важные дан-

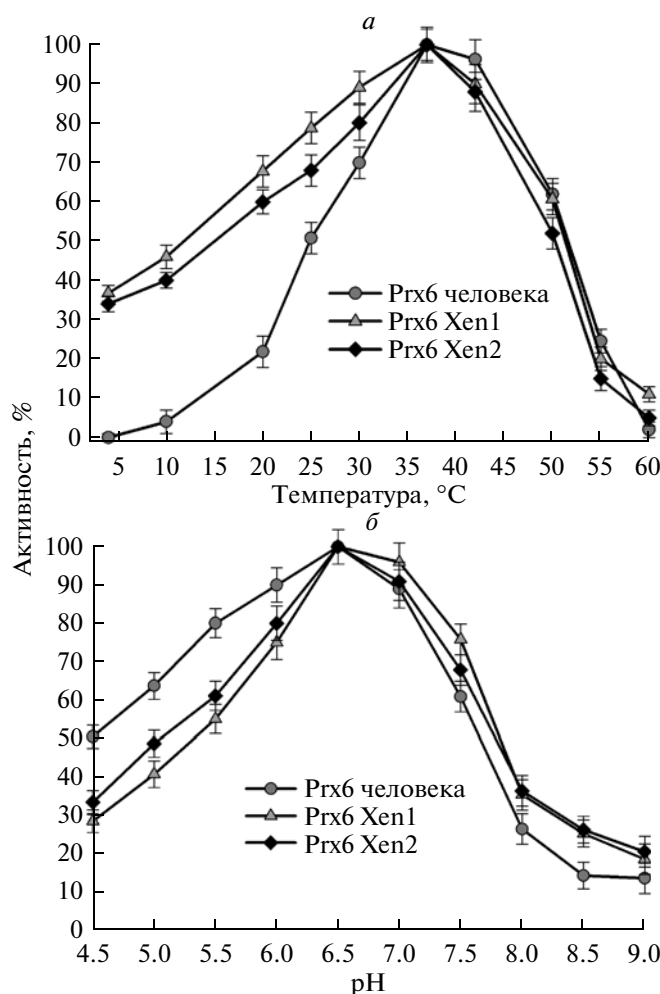


Рис. 3. а – Зависимость активности Prx6 человека, Xen1 и Xen2 от температуры. За 100% принято значение активности при температуре 37°C. б – Зависимость активности ферментов от pH. За 100% принято значение активности при pH 7.4.

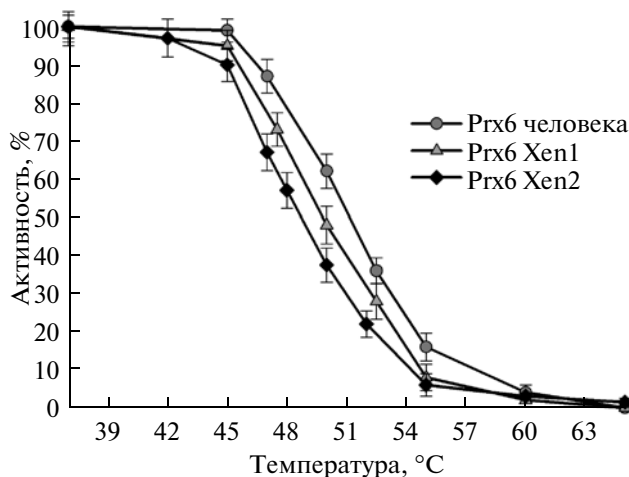
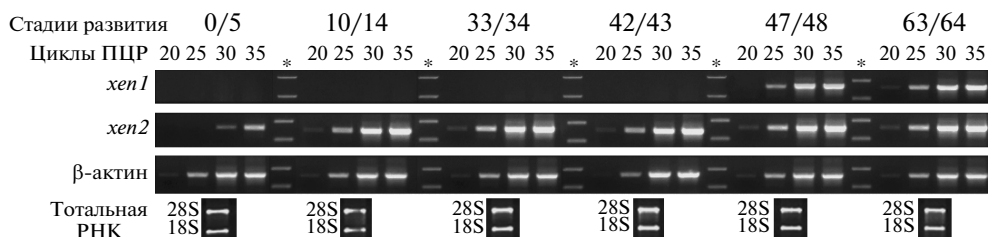


Рис. 4. Термостабильность Prx6 человека, Xen1 и Xen2. По оси ординат отложена пероксидазная активность Prx6 после 30 мин прогревания при указанной температуре. За 100% принята активность при температуре 37°C без предварительного прогревания.



**Рис. 5.** Зависимость экспрессии генов *xen1* и *xen2* от стадии развития ксенопуса. Электрофорез продуктов ОТ ПЦР для разных стадий развития: 0–5 – начало дробления; 10–14 – начало гаструляции; 33–34 – начало сердцебиения и появление меланофор; 42–43 – активное жаберное дыхание; 47–48 – прекращается кровообращение в жабрах, легкие сформированы; 63–64 – метаморфоз практически закончен. Детали см. в [22]. Звездочкой отмечен маркер молекулярных весов ДНК (850 и 400 п.н.).

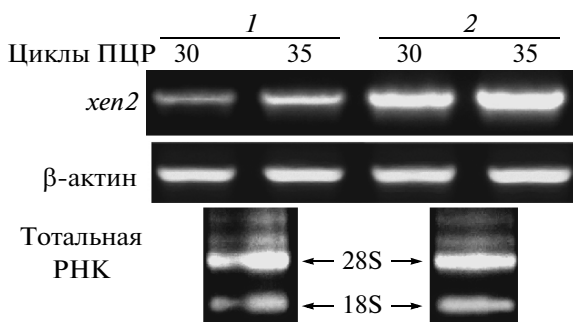
ные о функционировании антиоксидантных систем в течение первых 7 дней эмбриогенеза ксенопуса (стадии 22–48) получены в работе Риццо (Rizzo) и соавт. [30]. Изучение активности различных ферментов антиоксидантной защиты на ранних этапах развития эмбрионов показывает, что вначале (стадии развития 22–36) основными компонентами антиоксидантной защиты являются каталаза и супероксид-дисмутаза, позднее (стадии развития 40–48) заметно увеличивается (в 10 раз) активность глутатионовой системы – глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы (в 2 раза) и глутатионпероксидазы (в 5 раз), в то время как активность супероксид-дисмутазы и каталазы увеличивается лишь в 1.5–2.0 раза [30]. Нами впервые исследовано значение двух изоформ P<sub>rx6</sub> при антиоксидантной защите в ходе ранних этапов онтогенеза ксенопуса. По нашим данным транскрипция гена *xen2* происходит на всех стадиях развития эмбрионов, затем она увеличивается после 5-ой стадии и выходит на плато после 14-ой стадии развития. Интересно отметить, что приблизительно в этот период (стадии развития 8–9 эмбрио-

на), ввиду активного дробления клеток и начала формирования зародышевых листков, резко возрастает синтез мРНК [31]. В этот же период резко увеличивается и продукция АФК. Например, на эмбрионах травяной лягушки показано, что при переходе от стадии развития 9 к стадии 12 происходит приблизительно четырехкратное увеличение интенсивности свободнорадикальных процессов [32, 33]. По-видимому, с этим связано увеличение транскрипционной активности гена *xen2* после пятой стадии. В отличие от гена *xen2*, ген *xen1* экспрессируется в эмбрионах ксенопуса значительно позднее – начиная со стадии 47–48. Используемый нами метод оценки транскрипции позволяет отмечать лишь качественные изменения экспрессии (да/нет), и он мало пригоден для точных количественных оценок. Поэтому на основе наших данных нельзя исключить некоторого изменения уровня экспрессии гена *xen2* при переходе от стадии 10–14 до стадий 33–34 и 42–43. Однако отсутствие экспрессии гена *xen1* на ранних стадиях развития вплоть до стадии 42–43 нашим методом определяется достоверно (рис. 5).

### Сравнение ферментов *Xen1* и *Xen2*

На рис. 7 представлено сравнение аминокислотных последовательностей ферментов *Xen1* и *Xen2*, которые содержат остатки, входящие в пероксидазный активный центр (His39, Cys47, Arg132) [7], но только белок *Xen2* имеет неповрежденный липазный мотив (Gly-X-Ser-X-Gly, где X – любая аминокислота) и фосфолипазную триаду (Ser32, His26, Asp140) [34]. Это дает основание предположить, что помимо пероксидазной, *Xen2* может обладать активностью фосфолипазы А2.

Роль фосфолипазной активности P<sub>rx6</sub> пока изучена недостаточно, однако есть данные, указывающие на ее важное значение в метаболизме фосфолипидов сурфактанта легких [13, 35]. Есть также предположение, что P<sub>rx6</sub> выполняет роль своеобразного “включателя” апоптоза. Когда кон-



**Рис. 6.** Индукция экспрессии гена *xen2* в оплодотворенных ооцитах (стадии развития 0–5). 1 – Отрицательный контроль без пероксида водорода; 2 – в присутствии 0.1 мМ пероксида водорода, время инкубации 2 ч.

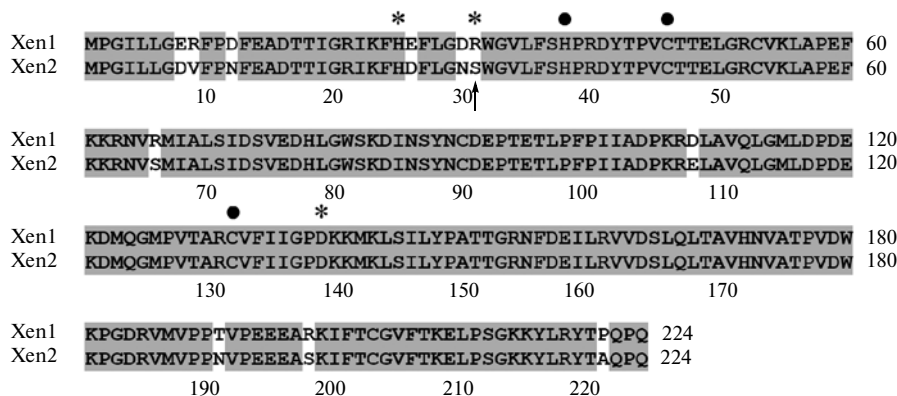


Рис. 7. Сравнение аминокислотных последовательностей Xen1 и Xen2. Аминокислотные остатки пероксидазного активного центра отмечены точками, фосфолипазного активного центра – звездочками. Замена в фосфолипазном активном центре Xen1 отмечена стрелкой.

центрация пероксидов превышает порог порядка 500 мк (что несовместимо с выживанием клеток), происходит необратимая инактивация пероксидазной активности Ргхб, но при этом его фосфолипазная активность резко возрастает, что может запускать механизм апоптоза [36]. Известно, что увеличение активности фосфолипазы А2 может приводить к приостановке клеточного цикла или к апоптозу [37, 38], поэтому есть основания полагать, что Ргхб тесно связан с процессами, регулируемыми клеточный цикл. Если у животных Ргхб обладает как пероксидазной, так и фосфолипазной активностью, то у растений этот фермент лишен фосфолипазной активности [12, 39, 40].

Из литературы известно, что у некоторых организмов имеется несколько активно экспрессирующихся генов *prxb*. Так, некоторые насекомые (дрозофила, тутовый шелкопряд, медведка) имеют, по крайней мере, два гена *prxb*. У дрозофилы имеется два гена, кодирующих пероксиредоксин 6 (*dpx2540* и *dpx6005*). Оба Ргхб дрозофилы (DRx2540 и DRx6005) имеют пероксидазный активный центр, однако фосфолипазный активный центр имеется только у DRx2540. Ген *dpx6005* экспрессируется на всех стадиях развития, а ген *dpx2540* – только у эмбрионов [41].

По-видимому, организмы, претерпевающие метаморфоз (насекомые, амфибии), должны иметь несколько генов *prxb* для адаптации к меняющемуся составу пероксидов в организме. У ксенопуса ген *xen2* экспрессируется на всех стадиях развития, а ген *xen1* – только на поздних стадиях (47–48). Из разнообразных физиологических изменений, происходящих в это период, пожалуй, наиболее значимым для метаболизма антиоксидантов является начало активного питания (стадии 45–46) [22], что может сопровождаться образованием новых пероксидов. Возможно, перок-

сиредоксин 6, кодируемый геном *xen1*, как раз предназначен для защиты от них.

Ферменты Xen1 и Xen2 по пероксидазной активности в реакциях с пероксидом водорода и гидропероксидом *трет*-бутила не отличаются также по приведенным выше физико-химическим свойствам, однако можно предположить, что эти ферменты могут отличаться друг от друга по субстратной специфичности при использовании других гидропероксидов. Это предположение нуждается в дальнейших исследованиях.

Работа получила финансовую поддержку программы Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология”, Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” ГК № 16.512.11.2169.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Magder S. 2006. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit. Care*. **10**, 208 (<http://ccforum.com/content/10/1/208>).
2. Kim K., Kim I., Lee K.Y., Rhee S.G., Stadtmen E.R. 1988. The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* **263**, 4701–4711.
3. Knoops B., Loumaye E., van der Eecken V. 2007. Evolution of peroxiredoxins. Peroxiredoxin system. *Subcell. Biochem.* **44**, 27–40.
4. Rhee S.G., Chae H.Z., Kim K. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1543–1552.
5. Fisher A.B., Dodia C., Manevich Y., Chen J.W., Feinstein S.I. 1999. Phospholipid hydroperoxides are

- substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **274**, 21326–21334.
6. Manevich Y., Feinstein S.I., Fisher A.B. 2004. Activation of the antioxidant enzyme 1-cys peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi-GST. *PNAS*. **101**, 3780–3785.
  7. Wood Z.A., Schreder E., Harris J.R., Poole L.B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40.
  8. Chen J.W., Dodia C., Feinstein S.I., Jain M.K., Fisher A.B. 2000. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J. Biol. Chem.* **275**, 28421–28427.
  9. Lien Y.C., Ling G., Gonder D.S., Feinstein S.I., Fisher A.B. 2009. Both peroxidase and phospholipase A2 activities of peroxiredoxin 6 play a role in its protection against oxidative stress. *FASEB J.* **23**, 614–617.
  10. Manevich Y., Shuvaeva T., Dodia C., Kazi A., Feinstein S.I., Fisher A.B. 2009. Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A (2) activities. *Arch. Biochem. Biophys.* **485**, 139–149.
  11. Kim H.S., Manevich Y., Feinstein S.I., Pak J.H., Ho Y.S., Fisher A.B. 2003. Induction of 1-cys peroxiredoxin expression by oxidative stress in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **285**, 363–369.
  12. Manevich Y., Fisher A. 2005. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defence and lung phospholipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1422–1432.
  13. Schremmer B., Manevich Y., Feinstein S.I., Fisher A.B. 2007. Peroxiredoxins in the lung with emphasis on peroxiredoxin VI. *Subcell. Biochem.* **44**, 317–344.
  14. Wang X., Phelan S.A., Forsman-Semb K., Taylor E.F., Petros C., Brown A., Lerner C.P., Paigen B. 2003. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **278**, 25179–25190.
  15. Nagy N., Malik G., Fisher A.B., Das D.K. 2006. Targeted disruption of peroxiredoxin 6 gene renders the heart vulnerable to ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **291**, 2636–2640.
  16. Mitsumoto A., Takanezawa Y., Okawa K., Iwamatsu A., Nakagawa Y. 2001. Variants of peroxiredoxins expression in response to hydroperoxide stress. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 625–635.
  17. Das K.C., Pahl P.M., Guo X.L., White C.W. 2001. Induction of peroxiredoxin gene expression by oxygen in lungs of newborn primates. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **25**, 226–232.
  18. Vismara C., Bernardini G., Bonfanti P., Colombo A., Camatini M. 1993. The use of *in vitro* fertilization in the frog embryo teratogenesis assay in xenopus (FETAX) and its applications to ecotoxicology. *Sci. Total Environ.* **1**, 787–790.
  19. Rizzo A.M., Gornati R., Rossi F., Bernardini G., Berra B. 1998. Effect of maternal diet on the distribution of phospholipids and their fatty acid composition in *Xenopus laevis* embryos. *J. Nutr. Biochem.* **10**, 44–48.
  20. Blitz I.L., Andelfinger G., Horb M.E. 2006. Germ layers to organs: using *Xenopus* to study “later” development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **17**, 133–145.
  21. Hoke R.A., Ankley G.T. 2005. Application of frog embryo teratogenesis assay – *Xenopus* to ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 2677–2690.
  22. Nieuwkoop P.D., Faber J. 1956. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematic and chronological survey of the development from the fertilized Egg till the end of metamorphosis. Amsterdam: North – Holland Publishing Company.
  23. Mohun T.J., Garrett N. 1987. An amphibian cytoskeletal-type actin gene is expressed exclusively in muscle tissue. *Development*. **101**, 393–402.
  24. Шарапов М.Г., Новоселов В.И., Равин В.К. 2009. Клонирование, экспрессия и сравнительный анализ пероксиредоксинов 6 различного происхождения. *Молекуляр. биология.* **43**, 505–511.
  25. Schneider J.E., Browning M.M., Floyd R.A. 1988. Ascorbate/iron mediation of hydroxyl free radical damage to PBR322 plasmid DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **5**, 287–295.
  26. Stacy R.A., Munthe E., Steinum T., Sharma B., Aalen R.B. 1996. A peroxiredoxin antioxidant encoded by dormancy-related gene, Per1, expressed during late development in aleurone and embryo of barley grains. *Plant Mol. Biol.* **31**, 1205–1216.
  27. Kang S.W., Baines I.C., Rhee S.G. 1998. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cystein. *J. Biol. Chem.* **273**, 6303–6311.
  28. Rudneva I.I. 1999. Antioxidant system of black sea animals in early development. *Comp. Biochem. Physiol.* **122**, 265–271.
  29. Kashiwagi K., Shinkai T., Kajii E., Kashiwagi A. 2005. The effects of reactive oxygen species on amphibian aging. *Comp. Biochem. Physiol.* **140**, 197–205.
  30. Rizzo A.M., Adorni L., Montorfano G., Rossi F., Berra B. 2007. Antioxidant metabolism of *Xenopus laevis* embryos during the first days of development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **146**, 94–100.
  31. Woodland H.K., Gurdon J.B. 1968. The relative rates of synthesis of DNA, sRNA, rRNA in endodermal region and other parts of *Xenopus laevis* embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **19**, 363.
  32. Мелехова О.П. 1976. Свободнорадикальные процессы в эмбриогенезе Ануга. *Онтогенез.* **7**, 131–140.
  33. Мелехова О.П., Коссова Г.В., Лимаренко И.М., Туровецкий Е.Е. 1988. Свободные радикалы в биохимической фракциях Ануга. *Известия АН СССР.* **6**, 851–856.
  34. Manevich Y., Reddy K.S., Shuvaeva T., Feinstein S.I., Fisher A.B. 2007. Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding. *J. Lipid Res.* **48**, 2306–2318.
  35. Wu Y.Z., Manevich Y., Baldwin J., Dodia C., Yu K., Feinstein S.I., Fisher A.B. 2006. Interaction of surfac-



- tant protein A with peroxiredoxin regulates phospholipase A2 activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 7515–7525.
36. Kim S.Y., Jo H.Y., Kim M.H., Cha Y.Y., Choi S.W., Shim J.H., Kim T.J., Lee K.Y. 2008. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent hyperoxidation of peroxiredoxin 6 (Prdx6) plays a role in cellular toxicity via up-regulation of iPLA2 activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 33563–33568.
37. Lauber K., Bohn E., Kröber S.M., Xiao Y.J., Blumenthal S.G., Lindemann R.K., Marini P., Wiedig C., Zobywalski A., Baksh S., Xu Y., Autenrieth I.B., Schulze-Osthoff K., Belka C., Stuhler G., Wesselborg S. 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell.* **113**, 717–730.
38. Song Y., Wilkins P., Hu W., Murthy K.S., Chen J., Lee Z., Oyesanya R., Wu J., Barbour S.E., Fang X. 2007. Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 suppresses proliferation and tumorigenicity of ovarian carcinoma cells. *Biochem J.* **406**, 427–436.
39. Haslekas C., Vikien M.K., Grini P.E., Nygaard V., Norgard S.H., Meza T.J., Aalen R.B. 2003. Seed l-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. *Plant Physiol.* **133**, 1148–1157.
40. Mowla S.B., Thomson J.A., Farrant J.M., Mudree S.G. 2002. A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyte viscosa* Baker. *Planta.* **215**, 716–726.
41. Radyuk S.N., Klichko V.I., Spinola B., Sohal R.S., Orr W.C. 2001. The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1090–1100.