

ГЕНЕТИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ВИТАМИНОЛОГИИ

В. Н. ТОЦКИЙ, С. А. ПЕТРОВ, А. В. ЗАПОРОЖЧЕНКО

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Украина;
e-mail: caphgen@ukr.net; caphgen_onu@mail.ru

Узагальнено результати сучасних досліджень, виконаних на перехресті вітамінології та генетики. Використано публікації, що було надруковано після завершення блискучої наукової діяльності академіка Р. В. Чаговеця — дослідника, який стояв у джерел формування сучасного генетико-біохімічного напрямку у вітамінології.

В огляді міститься інформація останніх років із трьох актуальних проблем біохімії та генетики:

- дослідження структури, функцій та генетичної детермінації білків, які зв'язують і транспортують вітаміни;

- з'ясування генетичної детермінації ферментів синтезу вітамінів;

- дослідження ролі вітамінів та їхніх похідних у регуляції функцій геному.

Підкреслюється, що генетико-біохімічні дослідження у вітамінології, незважаючи на їхню актуальність і важливе наукове значення, ще не отримали належного розвитку, що стримує вирішення низки практичних задач мікробіологічної промисловості, медицини та тваринництва.

К л ю ч о в і с л о в а: вітаміни, біосинтез, транспортування, генетична детермінація вітамінів.

Современная витаминология достигла значительных успехов в изучении механизмов мембранного транспорта, метаболизма и функциональной роли витаминов [1, 2]. Детально исследованы не только коферментные, но и некоферментные [3] функции витаминов, их мембранные и генетические эффекты.

Оказалось, что некоторые наследственные болезни животных и человека связаны с генетическими дефектами, имеющими отношение к транспорту, метаболизму, связыванию с белками и биологической активности известных витаминов и коферментов [4].

В разработке всех этих проблем весьма значителен вклад ученых украинской школы витаминологов, одним из основателей которой был академик Р. В. Чаговец.

Благодаря тесному сотрудничеству ученых-витаминологов Института биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины (Р. В. Чаговец, А. Г. Халмуратов, Г. В. Донченко, Ю. М. Пархоменко и др.) и Одесского национального университета им. И. И. Мечникова (А. Я. Розанов, В. Н. Тоцкий, С. А. Петров, Л. М. Карпов, А. В. Запорожченко и др.) исследовано биологическое взаимодействие многих витаминов и коферментов, изучено их регулирующее влияние на функцию мембран и конкретных ферментов, исследованы механизмы мембранного транспорта витаминов и коферментов. Результаты этих исследований опубликованы в многочисленных журнальных статьях и монографиях [3, 5–7 и др.].

В последние два десятилетия в витаминологии сложилось совершенно новое, очень перспективное научное направление, посвященное изучению генетической детерминации белков, имеющих отношение к связыванию, транспорту и метаболизму витаминов, проявлению их функциональных эффектов. К успехам этого направления следует отнести также выяснение путей влияния отдельных витаминов, в первую очередь жирорастворимых, на функцию генетического аппарата клетки и регуляцию ими процессов эмбрионального развития [8], дифференцирования клеток [8], апоптоза [9, 10] и др. Эти блестящие достижения биохимиков, генетиков, молекулярных биологов и других специалистов стали возможными благодаря внедрению в витаминологию новых, современных методов исследования с высокой разрешающей способностью.

Всю довольно обширную литературу, накопившуюся по проблемам указанного генетико-биохимического направления в витаминологии, в рамках одной статьи рассмотреть невозможно. Поэтому в данном обзоре акцент сделан в основном на генетико-молекулярные аспекты биологического транспорта и метаболизма наиболее изученного в этом отношении витамина В₁ (тиамина и его производных). Генетическая детерминация обмена и функций других витаминов и коферментов менее изучена и в данном обзоре рассматривается лишь фрагментарно.

Основные направления указанных генетико-молекулярных исследований в витаминологии:

- изучение генетической детерминации белков, обеспечивающих связывание и биологический транспорт витаминов и их производных;

- выяснение роли конкретных локусов и аллельных генов в детерминации ферментативных механизмов синтеза и катаболизма витаминов и коферментов;

- исследование роли витаминов и их производных в качестве регуляторов функций генома.

В научных разработках этих направлений имеются заметные достижения, открывающие новые перспективы в витаминологии.

В рамках данной статьи мы коснемся лишь той информации, которая появилась при проведении исследований в этих направлениях в последние годы.

Белки — транспортеры витаминов, их генетическая детерминация

Многочисленными исследованиями установлено, что проникновение витаминов в клетки и субклеточные структуры — это результат не только простой диффузии, но и специализированных систем переноса, главным образом облегченной диффузии и активного транспорта, осуществляющихся при участии мембранных белков-переносчиков и других белков. Роль конкретных белков в мембранном и гуморальном транспорте витаминов сегодня можно считать установленной [6, 7, 11–13]. Получены доказательства генетической детерминации отдельных компонентов транспортных систем для витаминов у прокариот и эукариот [7, 14–16 и др.]. Получены мутанты бактерий, грибов и эукариотических клеток по локусам, детерминирующим белки транспорта витаминов и коферментов [17–20 и др.]. Наибольшее количество работ, выполненных в этом направлении, посвящено витамину В₁.

Способность клеток микроорганизмов поглощать тиамин против градиента концентрации была показана в исследованиях лаборатории под руководством академика Р. В. Чаговца еще в 1966–1969 гг. на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [21, 22]. В это же время Т. Кавасака и соавторы [19], изучая проникновение [¹⁴C]-тиамина в клетки *Escherichia coli*, высказали предположение об участии в этом процессе белка-переносчика. Был получен мутант *E. coli*, лишенный способности поглощать тиамин из среды, но обладающий более высокой тиаминпирофосфаткиназной (ТПФ-киназой) активностью, чем исходный штамм. Единственный генетический дефект указанных мутантных клеток — нарушенный биосинтез белка-переносчика тиаминна и, как следствие, утрата ими биологической функции. Было установлено, что поглощение ти-

амина клетками *E. coli* угнетается аналогами тиаминна и тиаминфосфатами, способными конкурировать за тиаминсвязывающий белок. Это позволило признать наличие в клетках *E. coli* системы транспорта, общей для тиаминна и его фосфорилированных производных [23]. Сходные механизмы активного транспорта тиаминна были обнаружены и в других микробных клетках, в частности *Lactobacillus fermentii* [24], *Bacillus cereus* [25], *Saccharomyces cerevisiae* [26]. Во всех случаях была выявлена специфическая транспортная система для тиаминна, характеризующаяся кинетикой насыщения и зависящая от источников энергии, величины рН, наличия некоторых ионов и АТФ [25, 27 и др.]. В дальнейшем появилось много работ, посвященных выделению и идентификации тиаминсвязывающих белков, ответственных за его транспорт у микроорганизмов [28, 29 и др.].

Специфические белки, отвечающие за гуморальный и трансмембранный транспорт тиаминна и других витаминов, были выявлены также у высших эукариот. Оказалось, что специфические транспортные белки сыворотки крови, клеточные белки-рецепторы и белки-акцепторы необходимы для транспорта и функциональных отправлений не только водорастворимых витаминов и коферментов, но и жирорастворимых витаминов — ретинола и ретиноевой кислоты, витамина D и его производных, α-токоферола, витамина К.

Мировая литература, посвященная механизмам биологического транспорта водорастворимых витаминов и коферментов, а также жирорастворимых витаминов и их производных, обобщена в двух монографиях, одним из авторов которых является и Р. В. Чаговец [6, 7]. Несмотря на недостаточную изученность транспорта отдельных витаминов и некоторую противоречивость опубликованных данных, участие в транспорте специфических белков и, следовательно, генетическая детерминированность транспорта витаминов и коферментов сегодня не вызывает сомнений.

Все белки, имеющие отношение к транспорту витаминов и их производных, в зависимости от их локализации и конкретного участия в процессе транспорта, можно классифицировать следующим образом:

- белки сыворотки крови, связывающие витамины и доставляющие их к клеткам;
- белки клеточных мембран, контактирующие с витаминами и способствующие их проникновению в клетки. Из них важнейшими являются белки-переносчики, или, как часто их называют, белки-транспортеры;
- внутриклеточные белки, связывающие ви-

таміны, среди которых можно выделить: а) группу белков-акцепторов, доставляющих витамины в соответствующие отделы клетки, где реализуется их биологические эффекты, и б) группу белков-рецепторов, непосредственно реализующих или способствующих проявлению биологических эффектов витаминов.

Отдельные цитоплазматические белки, по видимому, могут быть как белками-рецепторами, так и белками-переносчиками, в связи с чем разделение внутриклеточных белков, связывающих витамины, на указанные группы весьма условно.

Белки биологических жидкостей, в основном крови, которые связывают витамины, выполняют функцию доставки этих биоактивных соединений к отдельным клеткам и органам. Образование белково-витаминных комплексов в значительной степени повышает растворимость лигандов в водной фазе, защищая их от ферментативных воздействий и преждевременной инактивации. Известно, например, что в отдельных случаях жирорастворимые витамины проникают в клетки в составе указанных белково-витаминных комплексов. В сыворотке крови показано наличие белков, специфически связывающих витамины А, D, Е и К. Взаимодействие жирорастворимых витаминов с белками крови способствует их специфическому переносу через мембраны клеток. Наличие мембранных белков, связывающих жирорастворимые витамины и отождествляемых с рецепторами и переносчиками [17, 18, 30], свидетельствует в пользу генетически детерминированных механизмов переноса и реализации функций этих веществ.

Относительно недавно подтверждена способность некоторых стероидных соединений, в том числе 25-(ОН)-витамина D₃, поступать в клетки путем опосредуемого рецепторами переноса через мембраны комплекса стероид-переносчик [31]. У мышей 25-(ОН)-витамин D₃ в составе комплекса с переносчиком (витамин D-связывающим белком плазматической мембраны) фильтруется через почечный клубочек и подвергается реабсорбции в проксимальных канальцах посредством эндоцитозного рецептора мегалина. Эндоцитоз необходим для сохранения 25-(ОН)-витамина D₃, последующей доставки его в клетки и превращения в гормональную форму – 1,25-(ОН)₂-витамин D₃.

Таким образом, ранее постулированные [6, 7] для витаминов механизмы проникновения через мембраны – простая диффузия, облегченная диффузия и активный транспорт – сегодня дополнены и углублены новыми данными о белках, связывающих и транспортирующих витамины.

Оказалось, что в некоторых случаях в роли связывающих и транспортирующих витамины белков могут выступать ферменты. Так, например, при инкубации с цитозольной фракцией печени α-токоферилхинон связывается с белком, который отличается от белка-переносчика α-токоферола [32]. Тщательный биохимический анализ показал, что белковым компонентом, связывающим α-токоферилхинон, является фермент глутатион-S-трансфераза. В комплексе с этим ферментом α-токоферилхинон может транспортироваться к местам обмена и экскреции с желчью.

Хотя системы транспорта и метаболизма витаминов отождествлять не следует, между ними может быть четкое взаимодействие. Так, например, в митохондриях печени крысы происходит гидролиз тиаминпирофосфата (ТПФ) в тиаминмонофосфат. Фермент, осуществляющий эту реакцию, локализован в митохондриальном матриксе. Образующийся в реакции тиаминмонофосфат проникает через митохондриальную мембрану с помощью специфического переносчика, не обладающего ферментативной активностью [33].

В последние годы появились единичные работы, посвященные изучению структуры и генетической детерминации белков-переносчиков и рецепторов витаминов. Для этой цели используются современные методы молекулярной генетики и молекулярной биологии – рестрикционное картирование, методы ПЦР, обратной транскрипции, клонирования кДНК, использования меченых зондов и т.п.

Так, например, показано [34], что трансплацентарный перенос пантотената, биотина и липоата происходит при участии Na⁺-зависимого белка-транспортера. В работе описано выделение клона кДНК такого белка плаценты крысы. После трансфекции этой кДНК в клетки HeLa в них индуцируется синтез белка-транспортера, активного в транспорте витаминов.

Идентифицированы также индивидуальные гены, кодирующие синтез тиаминтранспортных белков. В частности, у *Saccharomyces cerevisiae* обнаружен и клонирован ген TH17, кодирующий белок-транспортер тиамин [14]. Добавление в питательную среду тиамин приводит к снижению в клетках гриба содержания иРНК, кодирующей синтез тиаминтранспортирующего белка. Аналогичный ген, кодирующий структуру белка-транспортера тиамин, идентифицирован у *Schizosaccharomyces pombe* [35].

Как показали исследования последних лет [11, 36, 37 и др.], аскорбиновая кислота (АК) транспортируется в клетки человека с помощью двух натрий-аскорбат-котранспортеров (SVCT1 и SVCT2), а дегидроаскорбиновая кислота – с по-

мощью переносчика глюкозы [15]. Переносчик SVCT2 широко экспрессируется в клетках и тканях на уровне иРНК, но лишь специализированные клетки способны к прямому транспорту АК. Авторы провели молекулярный анализ экспрессии SVCT2 и выявили транскрипт, кодирующий укороченную форму этого транспортера АК. В кДНК последнего выявили делецию длиной 345 нуклеотидов без сдвига рамки считывания. Кодирующая укороченная форма SVCT2 кДНК, экспрессированная в клетках 293Т, была затем обнаружена в составе плазматической мембраны этих клеток. Выяснилось, однако, что укороченный белок не является переносчиком и не способен к транспорту АК. иРНК этого белка подвергается альтернативному сплайсингу, в результате которого синтезируется белок, подавляющий транспортную функцию SVCT2 и, в меньшей степени, SVCT1 по доминантно-негативному типу. ПЦР-анализ кДНК, изолированной из меланоцитов, способных к транспорту АК, свидетельствует о преобладании изоформ переносчика с нормальной по длине полипептидной цепью, в то время как клетки HL-60, неспособные поглощать АК, содержат преимущественно мутантную форму SVCT2. Авторы полагают, что регуляция транспорта АК в клетки человека может происходить с помощью альтернативного генопродукта – укороченной формы SVCT2, подавляющей функцию обоих нормальных АК-переносчиков.

В другой работе [38] сообщается о получении клона кДНК SVC12 из линии клеток трофобласта человека; при экспрессии в клетках APPE SVC12 обеспечивает транспорт аскорбата по Na^+ -зависимому механизму. Сравнив аминокислотные последовательности SVC12 разного происхождения, авторы показали, что клонированный переносчик гомологичен SVC12 крысы.

Существует мнение [37], что, по крайней мере, в некоторые типы клеток витамин С доставляется только в окисленной форме. Так, например, при изучении линии бессмертных эндотелиальных клеток ретинальных капилляров крысы показано [37], что через гематоретинальный барьер транспортируется исключительно дегидроаскорбиновая кислота с помощью переносчика глюкозы. В дальнейшем дегидроаскорбиновая кислота превращается в аскорбиновую.

Транспорт с участием белков-переносчиков в последние годы был подтвержден для биотина [13], тиамин [12], витамина B_{12} [39], фолата [40] и других витаминов в опытах с клетками кишечника, печени и др.

Совсем недавно удалось показать, что в мембранах отдельных клеток животных и человека

содержатся Na^+ -зависимые мультивитаминные транспортеры [34, 41]. Установлено [41], что Na^+ -зависимый транспорт биотина в кератиноциты человека сильно угнетается липоевой кислотой, пантотеновой кислотой и дезтиобиотином, но не биоцитином или биотинметилэфиром. Авторы полагают, что кератиноциты человека экспрессируют Na^+ -зависимый мультивитаминный переносчик, предпочитающий пантотенат и содержащий высокоаффинный транспортный компонент, специфичный для биотина.

Группа авторов [34], выявившая у млекопитающих Na^+ -зависимую транспортную систему, отвечающую за перенос пантотената, биотина и естественных метаболитов липоата, провела более детальное изучение переносчика. Авторами установлена нуклеотидная последовательность кДНК указанного мультивитаминного транспортера (SMVT), состоящего из 634 аминокислотных остатков (M_m 68,6 кДа) и имеющего 12 потенциальных трансмембранных доменов. Обнаружены гомологичные последовательности аминокислот у SMVT и известных членов семейства Na^+ -зависимых переносчиков глюкозы. Нозерн-блоттинг показал, что SMVT-транскрипты присутствуют во всех тестируемых тканях млекопитающих.

Исходя из представленных данных, есть основания полагать, что участки генома, ответственные за кодирование транспортных белков для витаминов и коферментов, намного экономичнее, чем может казаться на первый взгляд.

Не меньший интерес представляют молекулярно-биологические исследования структуры и функций транспортеров и внутриклеточных рецепторов жирорастворимых витаминов. Этот интерес в первую очередь относится к ядерным рецепторам, опосредующим влияние этих витаминов на функцию генетического аппарата клетки.

Примером таких исследований может быть работа [42], в которой методом молекулярного моделирования, мечения по сродству и сайт-направленного мутагенеза определены стратегически важные аминокислотные остатки и домены ядерного рецептора, взаимодействующего с 3-бром-ацетатным аналогом 1α -25-(OH)- D_3 . Последний соединялся исключительно с Cys-288 связывающего домена ядерного рецептора. Авторами предложена модель связывающего домена, согласно которой он включает спиральный участок канонического ядерного рецептора с единственной β -шпилькой, и рассмотрены возможные стерические и химические взаимодействия между лигандом и рецепторным белком.

Подводя итог сказанному, нельзя не отметить, что подобные работы являются единичны-

ми. Учитывая структурное разнообразие витаминов и их производных, а также возможные тканевые и видовые различия белков-транспортеров и белков-рецепторов, приходится с горечью признать, что молекулярная организация и генетическая детерминация этих белков практически не изучена.

Тем не менее интересы медицины и животноводства выдвигают на порядок дня мировой науки задачу выделения генов белков-переносчиков и рецепторов витаминов с целью трансформации клеток с генетическими дефектами транспорта и обмена этих веществ. О первых успешных попытках получения этих генов сообщают исследователи, работающие с микроорганизмами. Так, например, из мутантных клеток *Saccharomyces cerevisiae* выделен ген TPN1 — первый известный ген, кодирующий белок-транспортер витамина B₆ [43]. Аминокислотные замены, приводящие к потере функциональной активности этого белка, локализованы в трансмембранном домене 4, а всего белок имеет 12 трансмембранных доменов. Экспрессия гена TPN1 усиливается при уменьшении концентрации витамина B₆ в среде.

Генетическая детерминация ферментов синтеза витаминов

Новым направлением в области изучения генетического контроля витаминного статуса организма является исследование генной детерминации белков, участвующих в биосинтезе витаминов.

Основная масса этих исследований выполнена на микроорганизмах — бактериях и грибах — и посвящена тиамину. Было установлено, что непосредственно в биосинтезе тиамин участвуют продукты четырех основных генов, которые сходны у разных по систематическому положению бактерий и низших грибов. Это гены *thi1*, *thi2*, *thi3* и *thi4*. Для трех из них функции установлены точно. Так, *thi2* контролирует биосинтез тиазолового фрагмента тиамин, *thi3* — пиримидинового фрагмента [44], а *thi4* контролирует объединение этих двух фрагментов [45]. В отношении *thi1* имеются данные о том, что он совместно с *thi2* участвует в биосинтезе тиазолового компонента, однако, по крайней мере, у арабидопсиса он контролирует весь процесс биосинтеза тиамин [20]. Так, в частности, в настоящее время ген *thi1* выделен из мутантной линии *tz-201 Arabidopsis thaliana*; оказалось, что он ответственен за весь биосинтез тиамин. Точечные мутации в этом гене приводят к потере способности синтезировать витамин [20]. Выделенный из *Arabidopsis thaliana* ген *thi1* участвует не только в биосинтезе тиамин, но и в защите клеточной

ДНК от повреждений [46]. Вполне возможно, что выделенный из арабидопсиса фрагмент ДНК представляет собой полифункциональный ген или кластер генов.

Показано участие гена *thi1* в биосинтезе тиазолового компонента у *Salmonella typhimurium*. Этот ген не регулируется ТПФ на уровне транскрипции в отличие от других генов, участвующих в биосинтезе тиамин [47].

У *Neurospora crassa* ген *thi4* кодирует фермент, участвующий в соединении тиазолового и пиримидинового компонентов при биосинтезе тиамин. Ген *thi4* содержит десять интронов, длина которых колеблется от 57 до 200 п.н. Этот ген сходен с аналогичным геном *Saccharomyces cerevisiae*. Экспрессия данного гена не репрессируется тиамин [45].

В клетках *Schizosaccharomyces pombe* ген *thi2* ответствен за синтез тиазола. В присутствии тиамин или его тиазолового фрагмента синтез иРНК гена *thi2* существенно снижается. Ген *thi3*, участвующий в синтезе пиримидинового фрагмента тиамин, также регулируется тиамин. Гены *thi1*, *tnr1*, *tnr2* и *tnr3* участвуют в регуляции экспрессии гена *thi3* [44].

У *Saccharomyces cerevisiae* гены *thi2* и *thi3* также участвуют в синтезе тиазолового и пиримидинового фрагментов тиамин [48].

У *Schizosaccharomyces pombe* ген *pho(4)* кодирует фосфатазу тиаминфосфатов, необходимую для их переноса через клеточную мембрану. Ген *thi3*, кодирующий биосинтез пиримидиновой части тиамин, аллелен тиаминрепрессирующему гену *nmt1* [35].

Идентифицированы *thi*-гены, кодирующие тиаминпирозофосфокиназу. Экспрессия этих генов строго контролируется самим тиамин. Синтезы самого ТПФ и ТПФ-зависимых ферментов генетически скоординированы [49].

Однако, кроме этих основных генов, участвующих в биосинтезе тиамин, обнаружены и некоторые другие, также регулирующие образование в клетках этого витамина. Так, в частности, показано, что в клетках *Salmonella typhimurium* локус *apbA*, картированный на 10,5 мин хромосомы, участвует в биосинтезе тиамин [50].

В клетках *Kluyveromyces lactis* был открыт ген *rag3*, который является гомологом гена *pdh2* у *Saccharomyces cerevisiae*. Установлена его функция. Ген *rag3* кодирует синтез белка, который необходим для транскрипции двух генов, участвующих в биосинтезе тиамин. Кроме того, этот белок частично репрессирует работу гена пируватдегидрогеназы [51].

При исследовании двух фенотипов *Salmonella typhimurium* установлено, что биосинтез тиа-

мина связан с локусом *apbE*. Авторы считают, что этот локус ответствен за синтез как тиазоловой, так и пиримидиновой частей молекулы тиамина. Продуктом гена *apbE* является мембрано-связанный липопротеин с молекулярной массой 36 кДа, который участвует в биосинтезе тиамина [52].

Показано, что в клетках *Aspergillus oryzae* экзогенный тиамин способен регулировать ген *thiA*, который участвует в биосинтезе тиамина. Один из двух интронов в этом гене в своей 5'-нетранслируемой области содержит участки (А и В), четко связанные с эффективностью биосинтеза тиамина. Делеция любого из участков облегчает репрессию гена тиамином и сплайсинг интрона в иРНК при ингибировании тиамином. В связи с этим предполагается, что участки А и В необходимы для эффективного сплайсинга. Таким образом, установлен факт регуляции тиамином процесса сплайсинга. По-видимому, участки А и В являются частями ТПФ-связывающего домена, который был ранее найден в гене *thiA* [53].

Установлено [54], что у *Salmonella enterica* ген *stm4066* участвует в биосинтезе тиамина, так как кодируемый им белок является киназой аминоксидазолирибозиды — промежуточного продукта синтеза тиамина. Кроме того, получены данные, что гены, отвечающие за биосинтез тиамина, непосредственно связаны с геном, кодирующим пируваткиназу [55].

В клетках *Rhizobium etli* гены *thiCOGE* кодируют ферменты биосинтеза тиамина. Эти гены транскрибируются совместно с нетранслируемым участком, содержащим 211 оснований. Последовательность из 38 оснований четко связана с 5'-участками генов биосинтеза тиамина. Авторы считают, что регуляция тиамином экспрессии вышеописанных генов осуществляется на уровне посттрансляционных механизмов [56].

Было показано, что у *Escherichia coli* в биосинтезе тиамина вовлечен ген *iscS*. Этот ген участвует в биосинтезе 5-гидрокси-4-метилтиазолового компонента тиамина. В частности, этот ген кодирует фермент, мобилизующий серу с последующей ее передачей на терминальный углерод карбоксилата с образованием тиокарбоксилата. В этом процессе принимает также участие ген *thiI*. Ген *iscS* причастен также к биосинтезу NAD [57].

Стало известно, что гены, участвующие в биосинтезе витаминов, непосредственно влияют на способность организма к симбиозу. Так, в частности, установлена взаимосвязь между возможностью синтеза витаминов у *Mesorhizobium* sp. и их способностью к симбиозу с *Lotus corniculatus*. Эта взаимосвязь реализуется на генном уровне в так называемом “острове симбиоза”, содержащем

500 хромосомных генетических элементов [58].

Ряд исследований свидетельствует о том, что в процесс биосинтеза тиамина вовлечены тесно сцепленные и взаимодействующие друг с другом гены, так называемые “генные семьи”.

У дрожжей Бейкера установлено существование “генной семьи”, состоящей из трех генов, которая регулирует пути биосинтеза тиамина [59]. Два члена этой семьи являются изофункциональными и кодируют гидроксиметилпиримидинфосфокиназу, которая функционирует на заключительных этапах биосинтеза тиамина. Кроме того, показано, что во всех трех генах, входящих в “семью”, содержится по два домена, каждый из которых соответствует индивидуальным генам прокариот, что свидетельствует, по мнению авторов, о “расплывании” генов в ходе эволюции [59].

По мнению некоторых исследователей [60], у прокариот в процесс биосинтеза тиамина вовлечено не менее 12 генов. Эти гены идентифицированы. Три из них необходимы для биосинтеза тиазола (*thiFSGH*, *thiI* и *dxs*), один необходим для биосинтеза пиримидина (*thiC*), один — для соединения тиазола и пиримидина (*thiE*) и четыре являются генами киназ (*thiD*, *thiM*, *thiL* и *PdxK*). Специфические процессы, катаболизируемые ферментами — белками ThiEF, Dxs, ThiDM и PdxK, реконструированы *in vitro*. Ген *thiS* был идентифицирован как ген тиокарбоксилатазы, отвечающий за включение серы. Идентифицированы также гены, кодирующие тиаминтранспортную систему (*thiBPQ*) [60].

Изучены “семейства генов”, участвующих в биосинтезе и метаболизме тиамина и пиридоксина в клетках дрожжей. Установлено, что такими семействами являются SNZ1-3 и SNO1-3. В условиях недостатка пиридоксина SNZ1 и SNO1 были необходимы для роста дрожжей, в то время как SNZ2, SNZ3, SNO2 и SNO3 не требовались. Авторы считают, что SNZ1 и SNO1 связаны с биосинтезом пиридоксина, а SNZ2, SNZ3, SNO2 и SNO3 — с биосинтезом тиамина [61].

Как видно из представленной информации, данные о генетической детерминации синтеза витаминов чрезвычайно скудны и в основном относятся к тиамину. Сказанное свидетельствует о том, что это перспективное направление на стыке витаминологии и генетики нуждается в дальнейшей разработке.

Генетические эффекты витаминов и коферментов

Изучение прямого и опосредованного влияния витаминов на генетический аппарат клетки представляет собой актуальное и очень важное направление биохимии и генетики. К сожалению

нию, и в этой области нерешенных проблем значительно больше, чем успехов и достижений.

С учетом известных данных о путях влияния витаминов и их производных на функцию клеток генетические эффекты этих соединений можно разделить на две группы:

- эффекты, проявляющиеся непосредственно на уровне ДНК — при этом витамины и их производные могут выступать в роли низкомолекулярных компонентов (эффекторов) специфических регуляторов репликации, транскрипции, репарации и рекомбинации;

- эффекты, проявляющиеся на эпигенетическом уровне и заключающиеся в модулировании процессинга, сплайсинга, трансляции, свободнорадикальных процессов, функции мембран и т.п.

Непосредственное участие жирорастворимых витаминов в регуляции экспрессии генов давно известно [62–64], однако конкретные механизмы этого участия стали известными совсем недавно.

Современные представления об участии витаминов А и D в регуляции экспрессии генов, отвечающих за дифференцировку клеток, рассматриваются в ряде статей и монографий [18, 65, 66 и др.]. Оказалось, что гормональные формы витаминов А и D вместе с другими гормонами, например тиреоидными, являются факторами, ответственными за переключение экспрессии определенных генов в процессе дифференциации клеток и за смену фаз и стадий индивидуального развития эукариот. Гормоны активируют гены не во всех клетках, а только в клетках-мишенях, содержащих специфические белки-рецепторы. Одним из важнейших рецепторов, необходимых для индивидуального развития эукариот, является ядерный рецептор ретиноевой кислоты (РРК), способный взаимодействовать со специфическими участками ДНК, расположенными в области энхансеров компетентных генов. Известно два примера, демонстрирующих конкретное участие жирорастворимых витаминов в процессах развития, а также их кооперацию с другими гормонами при активации генов. Один из примеров — активация ретиноевой кислотой гена гормона роста в эпитуитарных клетках гипофиза. Этот ген стимулируется не только ретиноевой кислотой, но и тиреоидными гормонами, рецептор которых способен присоединяться к тем же последовательностям ДНК, что и РРК.

Не исключается, что РРК и рецептор тиреоидных гормонов образуют димер и вместе присоединяются к ближайшему к гену роста энхансеру, оказывая синергическое влияние на активность этого гена.

Другой пример совместного действия гормонов в онтогенезе — регуляция активности гена остеокальцина, продукт которого необходим для поглощения кальция костями в процессе их развития. Этот ген одновременно стимулируется как ретиноевой кислотой, так и витамином D₃, причем белки-рецепторы подобных соединений присоединяются к одним и тем же энхансерам [18, 65]. Именно таким способом они запускают дифференциацию незрелых клеток остеобластов в зрелые клетки кости. Ген остеокальцина регулируется также еще двумя белками — продуктами генов *jun* и *fos*. Эти белки конкурируют с рецепторами ретиноевой кислоты и витамина D₃ за одни и те же энхансеры и вызывают противоположный эффект — угнетают дифференциацию.

Следует отметить, что в противоположность гормонам, ретиноевая кислота проявляет активность почти во всех типах клеток. Известны, по крайней мере, три различных рецептора этого гормона у позвоночных животных, из которых один, а именно α-рецептор, наиболее универсален — он обнаружен практически во всех типах клеток. Этот факт вполне согласуется с современными представлениями о роли ретиноевой кислоты как универсального морфогена в индивидуальном развитии.

Интересно, что в разных линиях клеток карциномы человека 4-гидроксифенилретионамид — синтетическое соединение, обладающее более широким спектром действия, чем ретиноевая кислота, — индуцирует активность клеточной транскриптазы, которая строго коррелирует с торможением роста клеток и апоптозом. Антипролиферативное действие на опухолевые клетки человека выявлено также у витамина K [10]. Показано, что кратковременная обработка клеток лимфомы витамином K₃ (2,3-дигидро-2-метил-1,4-нафтохинон-2-сульфонатом) вызывает повреждение геномной ДНК. Дальнейшее культивирование клеток в присутствии витамина K₃ приводит к снижению экспрессии гена *c-myc*, ингибированию репликации ДНК и к апоптозу.

О способности витамина E влиять на экспрессию отдельных генов свидетельствует работа [30]. У крыс, в корме которых отсутствовал витамин E, экспрессия иРНК для белка-переносчика α-токоферола не изменялась. Однако при последующем скармливании таким крысам пищи, содержащей α- или δ-токоферол (или оба изомера), уровень экспрессии иРНК для белка-переносчика α-токоферола в клетках печени возрастал. Таким образом, оба изомера токоферола способны индуцировать транскрипцию гена белка-переносчика α-токоферола.

Влияние на транскрипцию могут оказывать

также водорастворимые витамины и коферменты. Так, у *S. cerevisiae* идентифицирован двухгенный оперон, участвующий в биосинтезе тиамин. Гены этого оперона – *thiMD* – кодируют 4-метил-5-(β-оксиэтил)тиазолкиназу и 4-амино-5-гидроксиметил-2-метилпиримидинкиназу соответственно. Функция этих генов регулируется тиаминпирофосфатом на уровне транскрипции [67].

Биологическим эффектам витаминов на эпигеномном уровне посвящена очень большая литература, обобщенная в ряде обзорных статей и монографий [6, 7, 64, 68, 69 и др.]. Тем не менее влияние витаминов и их производных на основные молекулярно-генетические процессы – такие как процессинг и сплайсинг, кроссинговер, трансляция и посттрансляционные модификации белков – практически не изучено. Тем не менее появились данные о том, что витамины и их производные могут выполнять роль низкомолекулярных эффекторов при регуляции этих процессов белками, рибозимами и мессенджер-РНК. Так, в частности, показано, что иРНК, кодирующая фермент биосинтеза тиамин у *E. coli*, может связывать тиамин и его фосфаты без участия белков [16]. Этот комплекс, взаимодействуя со связывающим центром рибосомы, тормозит экспрессию генов синтеза тиамин на уровне трансляции. Указанный механизм “рибосомовыключения” может служить эволюционным предшественником аналогичного механизма с участием белков [16].

Для расшифровки механизмов регуляции биосинтеза витаминов на уровне трансляции соответствующих ферментов ключевую роль сыграли исследования R. R. Breaker [16]. Этим автором установлено, что у бактерий некоторые иРНК ферментов синтеза витаминов могут принимать альтернативные формы, благодаря наличию в их начале некодирующей последовательности, способной связывать витамины и их производные. Эти последовательности в составе иРНК получили название выключателей рибосом (*riboswitches*), ибо присоединение к ним витамина (при наличии его в питательной среде) автоматически выключает трансляцию иРНК для фермента синтеза данного витамина. Таким образом, подобные иРНК транслируются только по мере необходимости. R. R. Breaker выявил указанные “выключатели рибосом” в иРНК многих генов, контролирующих синтез отдельных витаминов, в частности витамина B₁, а также белков-транспортёров для тиамин и кобаламина. Исследователи создали укороченные иРНК, названные *thiM* и *thiC*, для гена, который кодирует фермент, необходимый для синтеза тиамин. Та-

кие иРНК содержали последовательности, взаимодействующие с рибосомами, а также участки связывания тиамин и тиаминпирофосфата (ТПФ). Эти иРНК исследователи рассекали нуклеазами в присутствии или в отсутствие тиамин и ТПФ. Возникшие фрагменты имели разную длину в зависимости от наличия в среде того или иного соединения. Тем самым была доказана возможность возникновения различных конформаций иРНК, из которых лишь одна способна связываться с тиамин. Авторы предполагают, что взаимодействие витаминов с иРНК является одним из главных механизмов регуляции биосинтеза этих веществ.

Этот далеко не полный обзор современной литературы свидетельствует о том, что на стыке генетики и витаминологии сложилось качественно новое научное направление, посвященное разработке генетико-биохимических и молекулярно-биологических проблем витаминологии. К сфере этого направления относится выделение и изучение структуры белков, связывающих и транспортирующих витамины, выяснение генетической детерминации ферментов биосинтеза витаминов у бактерий, грибов и растений, изучение белков-транспортёров витаминов и коферментов. Важной и перспективной проблемой представляется хромосомное картирование генов указанных белков и ферментов, их выделение и клонирование с целью изучения нуклеотидных последовательностей и последующего использования в генетикоинженерных проектах. Решение этих задач осуществляется с помощью самых современных методов исследования – аффинной хроматографии, электрофореза, применения меченых зондов, секвенирования, получения кДНК, реконструкции транспортных систем в мембранах мутантов, дефектных по транспорту витаминов и т.п.

Сравнение структуры белков-транспортёров, выделенных из разных источников и взаимодействующих с разными витаминами, указывает на их значительную гомологию и филогенетическое родство. Весьма новой можно считать информацию о наличии в клетках поливитаминных белков-транспортёров, обеспечивающих трансмембранный перенос разных по структуре веществ одной белковой молекулой. Дегидроаскорбиновая кислота, например, может транспортироваться переносчиком глюкозы, а этот факт вместе с другими свидетельствует о возможном существовании в клетках полифункциональных белков-транспортёров.

Таким образом, современные молекулярно-биологические исследования в витаминологии существенно обогащают новой информацией ге-

нетику, мембранологію і інші сусідні науки, що підтверджує думку про пріоритетність і високої наукової значимості цих досліджень.

Враховуючи це слід визнати, що генетико-біохімічне напрямлення в вітамінології сьогодні знаходиться лише в початку свого шляху. Потрібні значущі зусилля вчених усього світу для того, щоб досягнення цього наукового напрямлення стали достоянням мікробіологічної промисловості, практичної медицини і тваринництва. Сподіваємося, що внесок українських вітамінологів і генетиків в ці зусилля світової науки буде важливим і корисним.

GENETICO-BIOCHEMICAL PROBLEMS OF VITAMINOLOGY

V. N. Totksy, S. A. Petrov,
A. V. Zaporozhchenko

Mechnikov Odessa National University, Ukraine;
e-mail: caphgen@ukr.net; caphgen_onu@mail.ru

S u m m a r y

The results of up-to-date researches made on the interaction of vitaminology and genetics are assumed. Publications, which were issued after the completion of superlative scientific career of academician R. V. Chagovets, the scientist who stood at the source of up-to-date genetical-biochemical trend in vitaminology were used in the paper.

Information of the last years concerning three urgent problems of biochemistry and genetics is presented:

- studies of the structure, functions and genetic determination of vitamin-binding and transporting proteins;
- investigation of genetic determination of vitamin synthesis enzymes;
- study of vitamins and their derivatives role in genome function regulation.

It is stressed in the review that genetical-biochemical investigations in vitaminology, despite their urgency and scientific importance, had not been developed in the right way. This makes the meeting of practical needs of microbiological industry, medicine and animal breeding more difficult.

К е у в о р д с: vitamins, biosynthesis, transport, genetic determination.

1. *Laforenza U., Patrini C., Mazzarello P., Poloni M., Rindi G.* // *Histochem.* 1990. **34**, N 4. P. 249–257.
2. *Poggi V., Rindi G., Patrini C. et al.* // *Eur. J. Pediatr.* 1999. **148**, N 4. P. 307–311.
3. *Петров С. А.* Регуляция тиамином и его ме-

- таболитами процесса образования и обмена аминокислот и кетокислот в организме. Автореф. ... докт. биол. наук. Минск. 1992. 48 с.
4. *Спиричев В. Б., Барашнев Ю. И.* Врожденные нарушения обмена витаминов. М.: Медицина. 1977. 216 с.
5. *Пархоменко Ю. М., Черныш И. Ю., Протасова З. С., Донченко Г. В.* // *Укр. биохим. журн.* 1990. **62**, № 6. С. 52–58.
6. *Халмуратов А. Г., Тоцкий В. Н., Чаговец Р. В.* Транспорт жирорастворимых витаминов. К.: Наукова думка. 1980. 213 с.
7. *Халмуратов А. Г., Тоцкий В. Н., Чаговец Р. В.* Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов. К.: Наукова думка. 1982. 280 с.
8. *Lane M. A., Chen A. C., Roman Sh. D. et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1999. **96**, N 23. P. 13524–13529.
9. *Chiantore M. V., Giandomenico V., De Luca L. M.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1999. **254**, N 3. P. 636–641.
10. *Коваленко Д. В., Зеленін З. В.* // *Биохимия.* 1999. **64**, № 4. С. 558–563.
11. *Song J., Kwon O., Daruwala R., Eck P.* // *J. Biol. Chem.* 2002. **277**, N 18. P. 15252–15260.
12. *Said H. M., Balamarugan K., Subramanian V. S., Marchant J. S.* // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003. **285**. P. 973–977.
13. *Balamarugan K., Ortiz A. and Said H. M.* // *Mucosal Biology.* 2003. Veterans affairs medical center, Long Beach 90822; University of California, Irvine, California, 92697.
14. *Singleton C. K.* // *Gene.* 1997. **199**, N 1–2. P. 111–121.
15. *Lutchenko E. A., Carcamo I. M and Godle D. W.* // *Mol. et Cell Biol.* 2004. **24**, N 8. P. 3150–3156.
16. *Lewis R.* RNA // *The Scientist.* 2003. **17**. P. 4–29.
17. *Quadro L., Blaner W., Salchow D. J. et al.* // *EMBO Journal.* 1999. **18**, N 17. P. 4633–4644.
18. *Yuritca P. W., Remus L. S., Whitfield J. K. et al.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2000. **267**, N 3. P. 813–819.
19. *Kawasaki T., Miyata L., Esaki K., Nose Y.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1969. **131**, N 1. P. 223–230.
20. *Papini-Terzi F. S., Galhardo R. S., Farias L. P. et al.* // *Plant Cell Physiol.* 2003. **44**, N 8. P. 856–860.
21. *Пархоменко Ю. М., Чаговец Р. В.* // *Укр. біохім. журн.* 1967. **39**, № 4. С. 438–443.
22. *Чаговец Р. В., Рыбина А. А., Пархоменко Ю. М. и др.* Тиамин. М.: Наука. 1978. С. 5–26.
23. *Matsura A., Iwashima A., Nose Y.* // *J. Vitaminol.* 1972. **18**, N 1. P. 29–33.

24. *Neujahr H. Y.* // Acta Chem. Scand. 1963. **17**, N 7. P. 1902–1906.
25. *Toburen-Bots J., Hagedorn H.* // Arch. Microbiol. 1977. **133**, N 1–2. P. 23–31.
26. *Iwashima A., Nose Y.* // J. Bacteriol. 1976. **128**, N 3. P. 855–857.
27. *Iwashima A., Wakabayashi Y., Nose Y.* // Biochim. Biophys. Acta. 1975. **413**, N 2. P. 243–247.
28. *Henderson G. B., Zevely E. M., Kander R. I., Huennekens F. M.* // J. Supramol. Struct. 1977. **6**, N 2. P. 239–247.
29. *Nishimune T., Hayashi R.* // Anal. Biochem. 1973. **53**, N 1. P. 282–287.
30. *Fechner H., Schlame M., Guthmann F. et al.* // Biochem. J. 1998. **331**, N 2. P. 577–581.
31. *Nykjaer A., Dragun D., Walter D. et al.* // Cell. 1999. **96**, N 4. P. 507–515.
32. *Makoto A., Guji S., Hiroyuki A., Keiso J.* // FEBS Lett. 1998. **436**, N 3. P. 424–426.
33. *Barile M., Valenti D., Briffo C. et al.* // Ibid. **435**, N 1. P. 6–10.
34. *Prasad P. D., Wang H., Kekuda R. et al.* // J. Biol. Chem. 1998. **273**, N 13. P. 7501–7506.
35. *Schweingruber A. M., Dlugonski J., Edenharter E., Schweingruber M. E.* // Curr. Genet. 1991. **19**, N 4. P. 249–254.
36. *Laggner H., Besau V., Goldenberg H.* // Eur. J. Biochem. 1999. **262**. P. 659–665.
37. *Ken-ichi H., Akito M., Kazunori K. et al.* // Investig. Ophthalmol. and Visual Science. 2004. **45**. P. 1232–1239.
38. *Rajan D. P., Kuang W., Dutta B. et al.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1999. **262**, N 3. P. 762–768.
39. *Idriss J. M., Jonas A. J.* // J. Biol. Chem. 1991. **226**, N 15. P. 9438–9441.
40. *Balamarugan K., Said H. M.* / Mucosal Biology. 2003. Veterans affairs medical center, Long Beach 90822; University of California, Irvine, California. 92697.
41. *Grafe F., Wohlrab W., Neubert R. H., Brand-sch M.* // J. of Investigat. Dermatol. 2003. **120**. P. 428–433.
42. *Swany N., Xu W., Paz N et al.* // Biochemistry. 2000. **39**, N 40. P. 12162–12171.
43. *Stolz U. and Vielreicher.* // J. Biol. Chem. 2003. **278**, N 21. P. 18990–18996.
44. *Zurlinden A., Schweingruber M. E.* // Gene. 1992. **117**, N 1. P. 141–143.
45. *Akiyama M., Nakashima H.* // Curr. Genet. 1996. **30**, N 1. P. 62–67.
46. *Chabregas S. M., Luche D. D., Farias L. P. et al.* // Plant Mol. Biol. 2001. **46**, N 6. P. 639–650.
47. *Webb E., Claas K., Downs D. M.* // J. Bacteriol. 1997. **179**, N 13. P. 4399–4402.
48. *Nishimura H., Kawasaki Y., Kaneko Y. et al.* // Ibid. 1992. **174**, N 14. P. 4701–4706.
49. *Hohmann S., Meacock P. A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1998. **1385**, N 2. P. 201–219.
50. *Downs D. M., Petersen L.* // J. Bacteriol. 1994. **176**, N 16. P. 4858–4864.
51. *Tizzani L., Meacock P., Frontali L., Wesolowski-Louvel M.* // FEMS Microbiol. Lett. 1998. **168**, N 1. P. 25–30.
52. *Beck B. J., Downs D. M.* // J. Bacteriol. 1998. **180**, N 4. P. 885–891.
53. *Kubodera T., Watanabe M., Yoshiuchi K. et al.* // FEBS Lett. 2003. **555**, N 3. P. 516–520.
54. *Dougherty M., Downs D. M.* // J. Bacteriol. 2003. **185**, N 1. P. 332–339.
55. *Christian T., Downs D. M.* // Can. J. Microbiol. 1999. **45**, N 7. P. 565–572.
56. *Miranda-Rios J., Navarro M., Soberon M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. **98**, N 17. P. 9736–9741.
57. *Lauhon C. T., Kambampati R.* // J. Biol. Chem. 2000. **275**, N 26. P. 20096–20103.
58. *Sullivan J. T., Brown S. D., Yocum R. R., Ronson C. W.* // Microbiology. 2001. **147**, Pt 5. P. 1315–1322.
59. *Llorente B., Fairhead C., Dujon B.* // Mol. Microbiol. 1999. **32**, N 6. P. 1140–1152.
60. *Begley T. P., Downs D. M., Ealick S. E. et al.* // Arch. Microbiol. 1999. **171**, N 5. P. 293–300.
61. *Rodriguez-Navarro S., Llorente B., Rodriguez-Manzanegue M. T. et al.* // Yeast. 2002. **19**, N 14. P. 1261–1276.
62. *Душейко А. А., Блажевич М. А.* // Укр. биохим. журн. 1976. **48**, № 2. С. 249–263.
63. *Донченко Г. В.* / Витамины. К.: Наук. думка. 1975. **8**. С. 43–60.
64. *Спиричев В. Б.* Витамины / Под ред. М. И. Смирнова. М.: Медицина. 1974. С. 89–124.
65. *Weaver R. F., Hedrick Ph. W.* Genetics. Third edition. Wm. C. Brown Publishers. 1997. 638 p.
66. *Тоцький В. М.* Генетика. 2-е видання. Одеса: Астропринт. 2002. 710 с.
67. *Petersen L. A., Downs D. M.* // J. Bacteriol. 1997. **179**, N 15. P. 4894–4900.
68. *Четыркин С. В., Чернухина Л. А., Донченко Г. В.* // Биополимеры и клетка. 2000. **16**, № 4. С. 247–259.
69. *Четыркин С. В.* // Укр. биохим. журн. 2000. **72**, № 3. С. 12–24.