

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ИНТЕРФЕЙСЫ КАК МИШЕНИ ЛЕКАРСТВ: ОБЩИЙ ДЛЯ ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТ-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ МОТИВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОФЕРМЕНТА ОТ ЕГО ПРОДУЦЕНТОВ

© 2023 В.А. Алешин^{1,2}, В.И. Буник^{1,2,3*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, отдел биокинетики,
119234 Москва, Россия; электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

² Сеченовский Университет, кафедра биохимии, 119048 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 08.02.2023

После доработки 22.03.2023

Принята к публикации 10.04.2023

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP), фосфорилированная форма витамина В6, является коферментом многочисленных реакций, включая те, что меняются и/или имеют прогностическое значение при раке. Вследствие высокой реакционной способности PLP, в том числе к клеточным белкам, предполагается, что он может напрямую передаваться от белков-доноров к использующим его акцепторам. Цель данной работы состоит в идентификации предполагаемого данной гипотезой интерфейса для связывания ограниченного числа доноров PLP, а именно пиридоксалькиназы (PdxK), пиридокс(ам)ин-5'-фосфатоксидазы (PNPO) и PLP-связывающего белка (PLPBP), множеством PLP-зависимых ферментов. Экспериментально подтвержденные комплексы между донорами и акцепторами PLP показывают взаимодействие PdxK и PNPO с наиболее представленными структурными типами акцепторов PLP (типы I и II), а PLPBP — с акцепторами редких структурных типов III и V. Общий мотив во множестве PLP-зависимых ферментов типов I и II определен путем выравнивания последовательностей и трехмерных структур экспериментально подтвержденных партнеров PdxK и PNPO. Мотив простирается от поверхности PLP-зависимых ферментов до центров связывания PLP и представлен поверхностной альфа-спиралью, частично скрытым бета-тяжом и неупорядоченными участками структуры. Патогенность мутаций ферментов человека в мотиве или рядом с ним, но вне активных центров подтверждает функциональное значение мотива, который может быть интерфейсом для переноса кофермента в комплексах PLP-зависимых ферментов с ферментами синтеза PLP. Специфические аминокислотные остатки этого общего мотива могут быть использованы для создания селективных ингибиторов доставки кофермента PLP-зависимым ферментам, критически важным для пролиферации опухолевых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: CBS, PdxK, PNPO, PLPBP, пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент, TAT, метаболизм витамина В6, метаболизм аминокислот, метаболизм одноуглеродных фрагментов.

DOI: 10.31857/S0320972523070138, EDN: FYKHQZ

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты, использующие пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) в качестве кофермента, имеют более 300 различных каталитических функций и принадлежат к пяти из семи существующих

ЕС-классов [1]. Многие из этих реакций, в особенности те, которые связаны с метаболизмом аминокислот, имеют решающее значение не только для метаболических перестроек, лежащих в основе злокачественной трансформации, но и для элиминации злокачественных клеток.

Принятые сокращения: AVAT — ГАМК-трансаминаза; CBS — цистатионин β-синтаза; dpaL — диаминопропионат-аммиак-лиаза; GOT — аспаратаминотрансфераза; PdxK — пиридоксалькиназа; PL — пиридоксаль; PLP — пиридоксаль-5'-фосфат; PLPBP — PLP-связывающий белок, также известный как PROSC; PNPO — пиридокс(ам)ин-5'-фосфат-оксидаза; SHMT — серингидроксиметилтрансфераза; SDSL — сериндегидратаза-подобный белок; SRR — серинацемаза; TAT — тирозинаминотрансфераза.

* Адресат для корреспонденции.

Например, PLP-зависимые трансаминазы управляют активацией и дифференцировкой Т-клеток, необходимых для противоопухолевого ответа [2]. Снижение уровня PLP-зависимой тирозинаминотрансферазы (TAT), кодируемой геном *TAT*, определяет патогенность гепатоцеллюлярной карциномы [3], при этом низкая экспрессия катаболических ферментов тирозина предсказывает неблагоприятный исход [4]. Различные типы рака демонстрируют изменения в экспрессии PLP-зависимой цистатинин- β -синтазы (CBS), связанные с неблагоприятным прогнозом, что соответствует существенной роли фермента в метаболизме одноуглеродных фрагментов, включающих реакции метилирования и транссульфурирования [5, 6].

PLP является основным компонентом пула витаминов В6, содержание которого в сыворотке крови и эритроцитах соответствует диапазону микромолярных концентраций [7, 8]. PLP гидролизуется до пиридоксала (PL) либо неферментативно, либо с помощью многочисленных фосфатаз, включая PLP-специфическую фосфатазу (PLPP или хронофин), которая находится под контролем индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF1, регулирующего метаболизм Т-клеток [2]. В качестве белков-доноров PLP известны два продуцирующих PLP фермента — пиридоксалькиназа (PdxK, ген *PDXK*) и пиридокс(ам)ин-5'-фосфатоксидаза (PNPO, ген *PNPO*) — и PLP-связывающий белок (PLPBP, ген *PLPBP*), который связывает PLP ковалентно с образованием основания Шиффа между альдегидной группой PLP и остатком лизина PLPBP [9–11].

При раке изменяются как PLP-зависимые реакции, так и метаболизм витамина В6. Маркеры вызванной воспалением дегградации предшественника PLP пиридоксала коррелируют с заболеваемостью раком, особенно для рака легкого, в значительной степени обусловленного воспалением [12]. Образование PLP из PL с помощью PdxK и активности PLP-зависимой орнитиндекарбоксилазы (ген *ODC1*) и митохондриальной аспартатаминотрансферазы (ген *GOT2*) являются ключевыми для пролиферации клеток миелоидного лейкоза [13]. В отличие от уровня мРНК PdxK, уровень самого фермента увеличивается при раке легкого, и это увеличение коррелирует с хорошим прогнозом [14]. В целом, анализ изменений метаболизма витамина В6 в различных раковых клетках указывает на очень сложную взаимосвязь между его изменениями и прогнозом заболевания. Так, дефицит В6 вреден для раковых клеток, но он также способствует

злокачественной трансформации нормальных клеток, стимулируя повреждение в них ДНК и ослабляя иммунный ответ [15]. Фармакологическая регуляция специфических PLP-зависимых реакций может предоставить новые инструменты для селективной борьбы с различными видами рака, поскольку они существенно зависят от некоторых из этих реакций. Несмотря на ряд известных ингибиторов PLP-зависимых ферментов, создание новых ингибиторов для эффективной регуляции PLP-зависимых процессов *in vivo* продолжается [16].

И PLP, и его каталитически неактивный предшественник PL представляют собой реакционноспособные альдегиды, которые могут модифицировать группы $-NH_2$ в белках и низкомолекулярных соединениях. Последние включают аминоксиуксусную кислоту, широко используемую для ингибирования PLP-зависимых трансаминаз. Химическая реакционная способность объясняет токсичность PLP и PL в чрезмерных концентрациях. Например, в концентрации 0,5 мМ эти витамины намного эффективнее убивают различные раковые клетки, чем пиридоксамин или пиридоксин [17]. В этой связи было высказано предположение, что в биосистемах PLP передается непосредственно от белков-доноров к ферментам, использующим PLP в качестве кофермента (акцепторам PLP) [18–20]. Однако среди ферментов, использующих PLP в качестве кофермента, выделяют до семи структурных типов без значительной гомологии [1, 21]. Таким образом, в рамках гипотезы о прямой передаче PLP три известных белка-донора PLP — PdxK, PNPO и PLPBP — должны образовывать специфические комплексы со множеством структурно разных белков-акцепторов PLP. Другими словами, гипотеза подразумевает существование подмножеств акцепторов PLP с общими структурными мотивами, позволяющими каждому подмножеству связывать PdxK, и/или PNPO, и/или PLPBP. Цель данной работы — обнаружить такие структурные мотивы, подразумеваемые гипотезой о прямом переносе PLP от его доноров к акцепторам, в множестве структурно различных акцепторов PLP. Для этого после идентификации экспериментально подтвержденных взаимодействий между акцепторами и донорами PLP мы определили локальное сходство негомологичных белков-акцепторов PLP, взаимодействующих с тем или иным донором, используя информацию о последовательностях и трехмерных структурах акцепторов. В результате был обнаружен общий мотив наиболее представленных структурных типов PLP-зависимых ферментов (типы I и II), который может

служить интерфейсом для связывания PdxK или PNPO с последующим переносом PLP от этих доноров к акцепторам типов I и II.

Функциональная значимость найденного мотива подтверждается патогенными мутациями аминокислотных остатков внутри мотива или рядом с ним, не входящих в активные центры ферментов. Такие мутации известны для моногенных заболеваний, связанных с вариантами PLP-зависимой цистатионин- β -синтазы или тирозинаминотрансферазы человека [22, 23]. Поскольку измененная экспрессия этих ферментов связана со злокачественной трансформацией и плохим прогнозом, фармакологическая регуляция белок-белковых взаимодействий, участвующих в переносе PLP в активные центры этих ферментов, может представлять собой новую стратегию разработки специфических ингибиторов отдельных PLP-зависимых реакций. Такая стратегия может быть основана на существовании специфических для отдельных PLP-зависимых ферментов аминокислотных остатков в структуре общего для типов I и II мотива.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформатический поиск мотива. Для поиска консервативных мотивов в PLP-зависимых ферментах на основе последовательностей использовали программу GLAM2, версии 5.4.1 [24], доступную на онлайн-сервере (<https://meme-suite.org>, по состоянию на 25 сентября 2022 г.). Получая в качестве входных данных выбранные последовательности, этот алгоритм находит мотивы через локальные выравнивания с гэпами. Входные последовательности были определены нашим поиском опубликованных данных об экспериментально выявленных взаимодействиях с донорами PLP. Использовались рекомендуемые параметры алгоритма, но мотив должен был находиться во всех последовательностях.

Визуализация и выравнивание структур. PyMOL v1.7 (PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.) использовалась для визуализации белков, как описано в подписях к соответствующим рисункам. Белки представлены в виде моделей с разными цепями, показанными разными оттенками серого. Для ионов или лигандов используется стандартный цветовой код. Структуры загружаются из банка данных белков PDB. При необходимости использовали Protein-BLAST [25] для идентификации гомологов белков, имеющих в базе данных.

Для получения последовательностей белков структурного типа II млекопитающих, соответствующих мотиву белка диаминопропионат-аммиак-лиазы (draL), использовали выравнивание структур в программе PyMOL. Последовательности, соответствующие мотиву draL, в дальнейшем использовались для подготовки «лого» с помощью GLAM2.

Множественное выравнивание последовательностей. Множественное выравнивание последовательностей Clustal Omega [26] применялось для выравнивания последовательностей гомологичных белков (общая идентичность >30%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Взаимодействия PNPO, PdxK и PLPBP с PLP-зависимыми ферментами. Наш поиск по публикациям и находящимся в открытом доступе базам данных белок-белковых взаимодействий (BioGrid [27], IntAct [28], String [29]) выявил экспериментально подтвержденные физические взаимодействия между PLP-связывающими белками и тремя известными белками-донорами PLP (таблица).

Девять из двенадцати подтвержденных взаимодействий относятся к PLP-зависимым ферментам структурного типа I, т.е. к наиболее распространенному типу, включающему более 75% PLP-зависимых белков [1]. Однако среди подтвержденных партнеров доноров PLP есть и представители PLP-зависимых белков менее распространенных структурных типов II, III и V (таблица). Найденные взаимодействия показывают, что белки структурного типа I взаимодействуют с PdxK, PNPO или с обоими ферментами, синтезирующими PLP (таблица). С другой стороны, наиболее изученный донор PLP — PdxK, для которой выявлено наибольшее количество белков-партнеров, демонстрирует связывание PLP-зависимых ферментов структурно различных типов I и II (таблица). Наконец, два известных партнера PLPBP, включая самого PLPBP, претерпевающего гомоолигомеризацию, относятся к разным структурным типам III и V. Кодируемый *PLPBP* белок и его бактериальные ортологи демонстрируют высокое структурное сходство с *N*-концевым доменом некоторых PLP-зависимых ферментов, таких как бактериальная аланинрацемемаза и эукариотическая орнитиндекарбоксилаза, но для PLPBP не было обнаружено ферментативной активности [34, 35].

Таким образом, опубликованные данные о подтвержденных взаимодействиях между

Экспериментально подтвержденные взаимодействия PLP-зависимых ферментов с белками-донорами PLP

Донор PLP	№	PLP-зависимый фермент	Организм, метод идентификации	Тип	Ссылка
PdxK	1	4-аминобутиратаминотрансфераза, <i>ABAT</i> , P80404, EC: 2.6.1.19	человек, ко-фракционирование и масс-спектрометрия	I	[30]
	2	орнитинаминотрансфераза, <i>OAT</i> , P04181, EC: 2.6.1.13	человек, ко-фракционирование и масс-спектрометрия	I	[30]
	3	аспартатаминотрансфераза, <i>GOT1</i> , W5PS88, EC: 2.6.1.1	овца, эмиссионная анизотропия и аффинная хроматография	I	[31]
	4	аланинаминотрансфераза, <i>GPT</i> , A0A287BMB4, EC: 2.6.1.2	свинья, поляризация флуоресценции и поверхностный плазмонный резонанс	I	[20]
	5	глутаматдекарбоксилаза, <i>GAD1</i> , P48319, EC: 4.1.1.15	свинья, поляризация флуоресценции и поверхностный плазмонный резонанс	I	[20]
	6	серингидроксиметилтрансфераза, <i>glyA</i> , Q7SIB6, EC: 2.1.2.1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> , поверхностный плазмонный резонанс	I	[32]
	7	Диаминопропионат-аммиак-лиаза, <i>dpaL</i> , P40817, EC: 4.3.1.15	<i>Salmonella typhimurium</i> , поверхностный плазмонный резонанс	II	[32]
PNPO	8	серингидроксиметилтрансфераза, <i>SHMT1</i> , P07511, EC: 2.1.2.1	кролик, поляризация и кинетика флуоресценции	I	[33]
	9	аспартатаминотрансфераза, <i>aspC</i> , P00509, EC: 2.6.1.1	<i>Escherichia coli</i> , поляризация флуоресценции и кинетика	I	[33]
	10	L-треонинальдолаза, <i>ltaE</i> , P75823, EC: 4.1.2.48	<i>E. coli</i> , поляризация флуоресценции и кинетика	I	[33]
PLPBP	11	гликогенфосфорилаза, <i>PYGB</i> , P11216, EC: 2.4.1.1	человек, химическая сшивка и масс-спектрометрия	V	[34]
	12	белок гомеостаза PLP, <i>PLPBP</i> , O94903	человек, химическая сшивка и масс-спектрометрия	III	[34]

Примечание. PLP-зависимые ферменты приведены вместе с названиями кодирующих их генов и идентификаторами Uniprot.

белками-донорами и акцепторами PLP показывают: (1) PdxK может направлять свой продукт PLP к ферментам-акцепторам структурных типов I и II; (2) PdxK и PNPO могут иметь общих партнеров среди ферментов-акцепторов структурного типа I; (3) PLPBP взаимодействует с белками-акцепторами PLP более редких структурных типов III и V.

Анализ последовательностей на предмет локального сходства с использованием GLAM2 (версия 5.4.1) [24] выявил мотив, общий для всех PLP-зависимых партнеров PdxK (таблица, №№ 1–7), показанный на рис. 1, а. В хорошем соответствии с существованием общих партнеров PdxK и PNPO, таких как серингидроксиметилтрансфераза (SHMT) и аспартатаминотрансфераза (GOT) (таблица), сходный мотив был обнаружен при поиске с использованием последовательностей партне-

ров и PNPO, и PdxK (рис. 1, б). В этом случае мотив становится на пять остатков короче на N-конце и на два остатка длиннее – на C-конце (рис. 1, панель б в сравнении с панелью а). То есть объединение партнеров PdxK и PNPO слегка модифицирует лишь концевые части мотива, не затрагивая его основную часть.

Сравнение рис. 1, г и 1, д показывает, что найденный мотив, общий для всех партнеров PdxK и PNPO, имеет сходную вторичную структуру в PLP-зависимых ферментах разных структурных типов I и II. Мотив представлен альфа-спиралью, бета-цепью и соединительной и C-концевой петлями. Мотив в структурах всех перечисленных в таблице партнеров, взаимодействующих с PdxK и PNPO, показан на дополнительном рис. S1 в Приложении. Примечательно, что в ферментах структурного типа I обнаруженный мотив был ранее

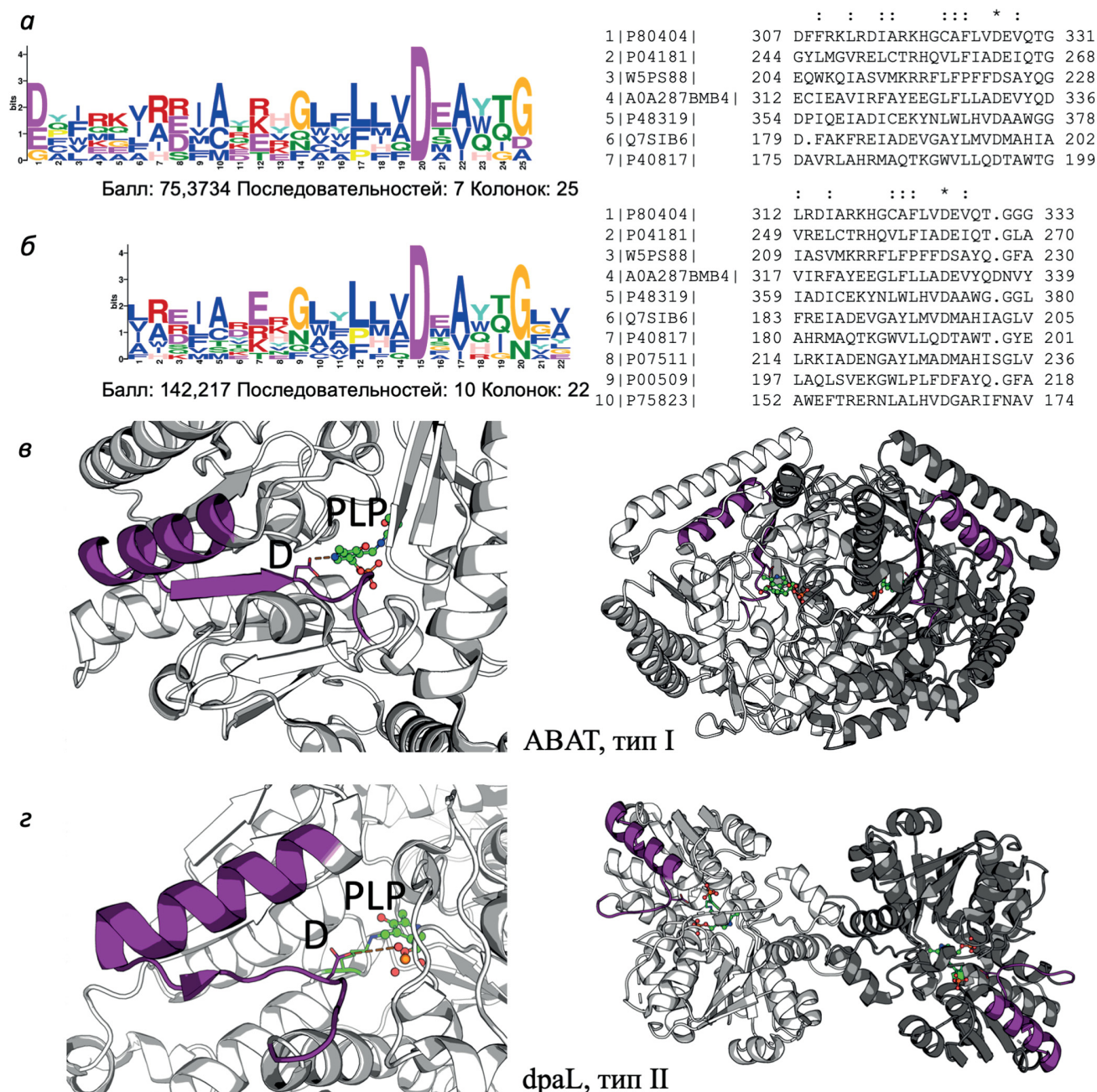


Рис. 1. Общий идентифицированный GLAM2 мотив PLP-связывающих ферментов, которые взаимодействуют с донорами PLP – PdxK и PNPO. *a* – Логотип и последовательности мотива, обнаруженные в связывающихся с PdxK ферментах млекопитающих и бактерий; *б* – логотип и последовательности мотива, обнаруженные в связывающихся с PdxK и PNPO ферментах млекопитающих и бактерий. *в* – Детальный вид мотива (слева) и его локализации в димерной структуре (справа) ГАМК-трансаминазы (ABAT, тип I, структура: 4ZSW); *г* – детальный вид мотива (слева) и его локализация в димерной структуре (справа) диаминопропионат-аммиак-лиазы (draL, тип II, структура: 5YGR). Номера последовательностей на панелях (*a*) и (*б*) идентичны таковым в таблице

идентифицирован как специфический именно для этого типа структурный элемент, причем у этих ферментов конец бета-тяжа включает консервативный остаток аспартата, который взаимодействует с PLP [21, 36]. В результате нашей работы этот общий мотив был найден и в ферментах структурного типа II, которые взаимодействуют с теми же донорами PLP,

что и ферменты структурного типа I (таблица, рис. 1). Важно отметить, что спираль и петли мотива доступны окружающей среде и в димерных формах ферментов (рис. 1, *г* и *д*; дополнительный рис. S1 в Приложении), что указывает на возможность участия обнаруженного общего мотива в гетерологических белок-белковых взаимодействиях.

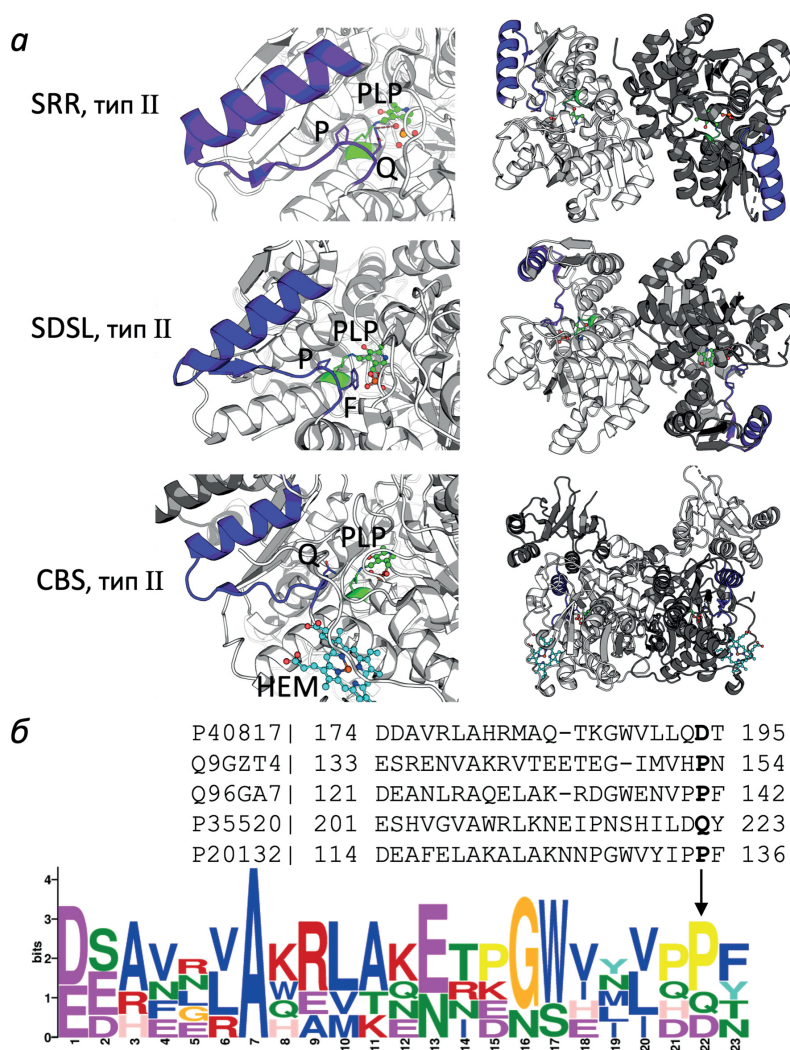


Рис. 2. Идентификация общего мотива PLP-зависимых ферментов в белках структурного типа II млекопитающих с использованием мотива, обнаруженного во взаимодействующем с PdxK бактериальном белке структурного типа II draL. **a** – Общий мотив белков структурного типа II млекопитающих, показанный синим, соответствует фиолетовому мотиву в белке draL, показанном на рис. 1. В явном виде показаны остатки, выровненные с консервативным аспаратом в мотиве PLP-зависимых ферментов структурного типа I. PLP в активном центре показан зеленым, гем в CBS (HEM) показан голубым. Увеличенное изображение мотива в мономерах (слева) сопровождается визуализацией мотива в димерах ферментов (справа). Используются следующие структуры PDB: серинрацемемаза (SRR) – 6ZSP; сериндегидратаза-подобный белок (SDSL) – 2RKVB; цистатионин-β-синтаза (CBS) – 4COO. **b** – Последовательности, соответствующие мотиву белка draL, полученные после структурного выравнивания PLP-зависимых ферментов структурного типа II, и логотип мотива. Для получения логотипа в качестве известного PLP-зависимого фермента структурного типа II человека использована и L-сериндегидратаза/L-треониндезаминаза (61% идентичности с SDSL), для которой не получена кристаллическая структура. Последовательность L-сериндегидратазы/L-треониндезаминазы добавлена с использованием множественного выравнивания последовательностей Clustal Omega с гомологичными белками структурного типа II. Остатки мотива PLP-зависимых ферментов структурного типа II, выровненные с консервативным остатком аспартата в мотиве PLP-зависимых ферментов структурного типа I и в белке draL типа II, выделены жирным шрифтом и отмечены стрелкой на логотипе мотива. Используемые на рисунке идентификаторы Uniprot: P40817 – draL; Q9GZT4 – SRR; Q96GA7 – SDSL; P35520 – CBS; P20132 – L-сериндегидратаза/L-треониндезаминаза

На следующем этапе исследования были разработаны процедуры для идентификации мотива в PLP-зависимых ферментах структурного типа I и II, физическое взаимодействие которых с продуцентами PLP неизвестно. Как упоминалось выше, во всех ферментах структурного типа I этот мотив был идентифицирован ранее как общий структурный элемент, соседствующий с PLP-связывающим остатком

аспартата активного центра [36]. Добавление последовательностей ферментов структурного типа I тирозинтрансминазы (P17735) и кинуренинтрансминазы 1 (Q16773) к последовательностям 10 известных партнеров PdxK и PNPO, показанным в таблице, с последующим повторным поиском локального сходства с помощью GLAM2 позволяет не только обнаружить мотив в целевых белках, для которых

взаимодействие с донорами PLP экспериментально не установлено, но и улучшить параметры результатов поиска GLAM2 (дополнительный рис. S2 в Приложении).

Выявление общего мотива партнеров PdxK среди ферментов структурного типа II является более сложной задачей, поскольку взаимодействующая с PdxK бактериальная *draL* не имеет ортологов у млекопитающих. Поэтому для идентификации общего мотива, найденного в диаминопропионат-аммиак-лиазае, были выбраны известные человеческие PLP-зависимые ферменты структурного типа II, такие как серинрацемемаза (SRR, Q9GZT4), сериндегидратаза-подобный белок (SDSL, Q96GA7) и цистатионин- β -синтаза (CBS, P35520) (рис. 2). Их последовательности были добавлены к тем, что показаны на рис. 1, по отдельности или все вместе. Запуск GLAM2 для этих наборов последовательностей снижает качество результатов. Более того, такой поиск не позволяет надежно идентифицировать мотив с характерной вторичной структурой. Плохой результат GLAM2 может быть связан с тем, что белки структурного типа II могут иметь очень разные последовательности. Например, последовательность CBS имеет удлинение, соответствующее связывающему гем участку, которое отсутствует у других ферментов структурного типа II (рис. 2, *a*). Проблема решается с помощью структурного выравнивания белка *draL* и ферментов структурного типа II человека. Применение этого подхода позволяет идентифицировать общий структурный мотив у бактериального белка *draL* и белков структурного типа II млекопитающих: SRR, SDSL и CBS (рис. 2, *a*). Примечательно, что и в ферментах структурного типа II С-конец общего мотива находится вблизи PLP (рис. 2, *a*), аналогично белкам структурного типа I, где консервативный остаток аспартата на С-конце мотива взаимодействует с атомом азота PLP (рис. 1). В SRR и N-концевая часть мотива является частью активного центра. Так, аминокислотные остатки в начале (R135) и конце (петля H152-P153-N154) структурного мотива SRR, общего для PLP-зависимых ферментов структурных типов I и II, участвуют в связывании субстрата SRR и стабилизации PLP-имина соответственно [37]. Участие концевых частей общего мотива в формировании активного центра подтверждает роль мотива в доставке PLP к активным центрам акцепторов от доноров кофермента.

Возможность существования у акцепторов PLP специфического мотива для связывания PNPO была изучена с использова-

нием доступных данных о трех партнерах PNPO (таблица). Из-за малого количества белков-партнеров параметры достоверности найденного мотива были ожидаемо низкими. Более того, найденный таким образом мотив не сохранялся при добавлении в поиск последовательностей гомологичных ферментов, таких как серингидроксиметилтрансфераза человека, аспартаминотрансфераза *Bacillus* sp. и L-треонинальдолаза из *Pseudomonas* sp. Наконец, обнаруженные таким образом мотивы не имеют единой вторичной структуры, несмотря на принадлежность анализируемых белков одному и тому же структурному типу I. Таким образом, количество известных PLP-зависимых партнеров PNPO (таблица) недостаточно для надежной идентификации специфического для PNPO интерфейса взаимодействия. То же самое относится и к поиску мотива партнеров PLPBP, для которого известны лишь два партнера.

Патогенные мутации в тирозинаминотрансферазе (тип I) и цистатионин- β -синтазе (тип II) внутри или вблизи найденного общего мотива указывают на его функциональную значимость. Согласно гипотезе прямого переноса PLP от белков-доноров к акцепторам, общий мотив PLP-зависимых ферментов может участвовать в таком переносе, формируя интерфейс для гетерологического взаимодействия. В этом случае точечные мутации внутри мотива или поблизости от него должны быть патогенными, несмотря на их локализацию вне активного центра. Скрининг человеческих вариантов на патогенность таких мутаций был проведен для TAT (тип I) и CBS (тип II). Как было показано во введении, эти ферменты вовлечены в злокачественную трансформацию клеток.

Из 20 точечных мутаций TAT, вызывающих синдром Рихнера–Хэнхарта (тирозинемия II типа) [38–44], три находятся в пределах мотива (A237P) или близки к нему (L201R, L273P) (рис. 3, *a*). Повышенный уровень тирозина в плазме крови и болезненные гиперкератотические бляшки возникают у пациентов с мутациями L201R и L273P TAT, локализованными в пределах 5 Å от мотива в альфа-спирали и бета-листе соответственно. Введение положительного заряда (L201R) или нарушение вторичной структуры интерфейса, показанное на рис. 3, *a* фиолетовым цветом, при замене остатка лейцина бета-листа на пролин (L273P) может мешать правильному межбелковому взаимодействию. В случае мутации TAT A237P [41] повышенный уровень тирозина сопровождается не поражением кожи, а умеренными психическими расстройствами.

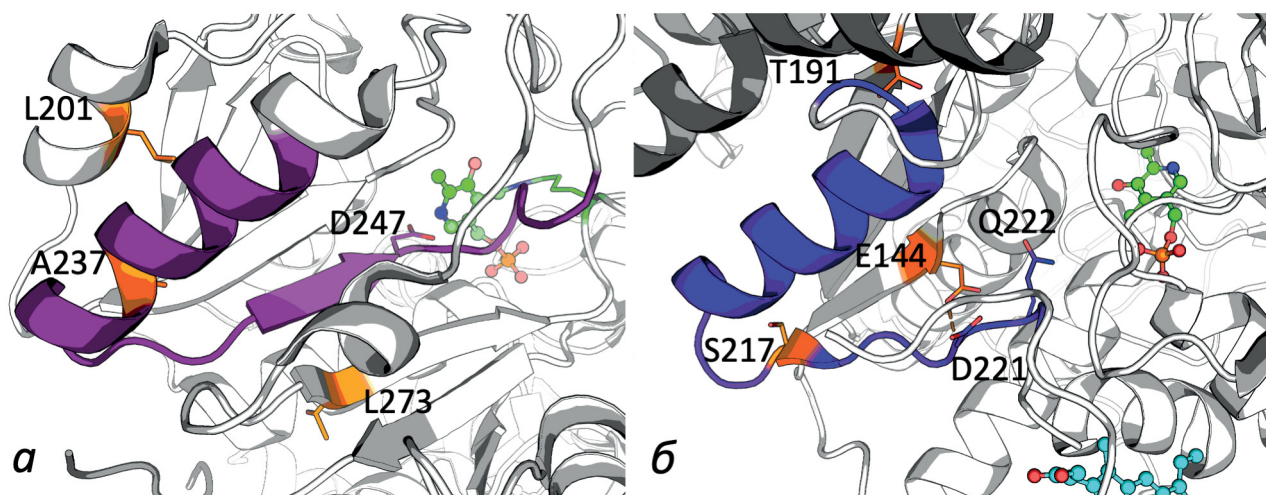


Рис. 3. Патогенные мутации TAT и CBS внутри или рядом с общим мотивом PLP-зависимых белков. *а* – Мутации TAT внутри альфа-спирали мотива (A237P) и в пределах 5 Å от мотива (L201R и L273P). *б* – Мутации CBS внутри бета-тяжа мотива (S217F) и вблизи него (T191M – в 3,5 Å от мотива и E144K – в 2,9 Å от мотива). В нативной CBS E144 образует водородную связь с N-атомом D221 мотива, предшествующего остатку Q222 вблизи центра связывания PLP

Таким образом, структурное нарушение альфа-спирали мотива у мутанта A237P более критично для физиологии, чем косвенные эффекты мутаций L201R и L273P вблизи мотива. Тот факт, что все три мутации сильно влияют на катализ, но расположены близко к поверхности белка и далеко от активного центра, хорошо согласуется с предполагаемой функциональной ролью идентифицированного мотива в качестве интерфейса для переноса PLP.

Из более чем 130 точечных мутаций CBS [22, 45–48] одна (S217F) находится в поверхностной части общего мотива PLP-зависимых ферментов (рис. 3, б). Несмотря на локализацию вне активного центра, эта мутация приводит к 25-кратному снижению активности CBS по сравнению с диким типом и гомоцистинурией [48]. Существенная роль остатка S217 в функционировании CBS хорошо согласуется с его участием в формировании белкового комплекса для доставки PLP от его доноров в активный центр CBS. Другими патогенными мутациями CBS вблизи мотива и за пределами активного сайта являются T191M и E144K (рис. 3, б). Их патогенность можно также объяснить нарушением предполагаемого гетерологического взаимодействия с донорами PLP и/или процесса переноса PLP. В случае мутации T191M это может быть связано с более объемным и более гидрофобным остатком метионина по сравнению с остатком тирозина в нативной CBS. Мутация T191M, широко распространенная в Испании, Португалии и Южной Америке, характеризуется разнообразными фенотипическими симптомами, поражающими скелет, глаза и ЦНС [46]. При-

мечательно, что пациенты с заменой T191M не реагируют на терапию витамином B6. Такая невосприимчивость ожидаема для мутаций, нарушающих не биосинтез PLP, а его доставку от доноров к акцепторам посредством гетерологических белок-белковых взаимодействий, в которых предполагается участие идентифицированного общего мотива. Мутация E144K CBS изменяет заряд на коротком расстоянии от петли мотива, содержащей несколько заряженных остатков (рис. 3, в), что может нарушать ионные взаимодействия, потенциально участвующие в переносе PLP. Интересно, что у пациентов с E144K CBS наблюдается положительный ответ на введение B6. Вероятно, повышенная продукция PLP при большем насыщении продуцентов PLP их субстратом может стимулировать PLP-зависимую модификацию остатка K144 в комплексе мутантной CBS с продуцентами PLP, приводя к частичной компенсации вызываемых мутацией электростатических эффектов, нарушающих перенос. Восстановление нарушенного переноса PLP в модифицированной таким образом мутантной CBS может объяснить терапевтический эффект введения B6 у этого мутанта, отсутствующий у мутанта T191M. Другие механизмы терапевтического действия B6 при мутациях, нарушающих гетерологические взаимодействия, могут быть основаны на аллостерической регуляции продуцентов PLP их субстратами и продуктами [18, 49], поскольку такая регуляция белков-доноров может усиливать нарушенные мутациями гетерологические взаимодействия с акцепторами PLP.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

PLP-зависимые ферменты принадлежат семи структурным типам [1], при этом 76% относятся к структурному типу I, за которым следует структурный тип II (12%), тип III (5%) и другие типы (7%) (рис. 4). Такое распределение сохраняется и для экспериментально определенных взаимодействий акцепторов PLP с донорами PLP (таблица). Так, 75% (9 из 12 белков) принадлежат типу I, а остальные 25% распределяются между структурными типами II, III и V (8% для каждого из структурных типов, представленных 1 из 12 белков). Таким образом, подтвержденные взаимодействия соответствуют встречаемости структурных типов PLP-зависимых белков. Все основные типы структур, включая редкий тип V, взаимодействуют с донорами PLP, что свидетельствует в пользу гипотезы о переносе PLP в гетерологических акцепторно-донорных комплексах.

Существование общих партнеров PdxK и PNPO, т.е. серингидроксиметилтрансферазы и аспаратаминотрансферазы (таблица), свидетельствует в пользу участия общего мотива акцепторов PLP в связывании как PdxK, так и PNPO (рис. 1). Однако ввиду ограниченного числа подтвержденных взаимодействий PNPO мы не можем исключить специфических центров связывания PdxK и PNPO белками-акцепторами.

Представленные в таблице взаимодействия показывают, что партнеры PdxK и PNPO принадлежат к структурным типам I и II. В ре-

зультате в партнерах PdxK/PNPO был найден общий для PLP-зависимых ферментов структурных типов I и II мотив с характерной вторичной структурой, который может выступать в качестве интерфейса при взаимодействии данного множества белков с PLP-донорами PdxK и PNPO. У структурного типа I данный мотив включает консервативный остаток аспартата, участвующий в связывании PLP в активных центрах PLP-зависимых ферментов [21]. Однако в ферментах структурного типа II остаток аспартата не консервативен, так как способ взаимодействия с коферментом PLP отличается от такового в ферментах структурного типа I. Тем не менее и в ферментах структурного типа II С-концевая часть общего мотива вносит вклад в связывание PLP. Такая особенность предоставляет дополнительное свидетельство в пользу участия общего мотива в переносе PLP. Имеющиеся данные о связывании PLP с его донорами и акцепторами не противоречат переносу PLP из сайтов его синтеза в PdxK или PNPO в каталитические центры, использующие PLP. В соответствии с общим представлением о том, что продукты ферментативных реакций связаны со своими продуцентами не так прочно, как коферменты, взаимодействие PLP с ферментами млекопитающих, продуцирующими PLP, характеризуется константами от 10^{-7} – 10^{-6} М (PNPO) до 10^{-5} М (PdxK) [50–52], в то время как животные белки-акцепторы PLP имеют более высокое сродство к PLP: ГАМК-трансаминаза имеет $K_d \approx 10^{-9}$ М [53], орнитин-аминотрансфераза – $K_d \approx 10^{-7}$ М [54].

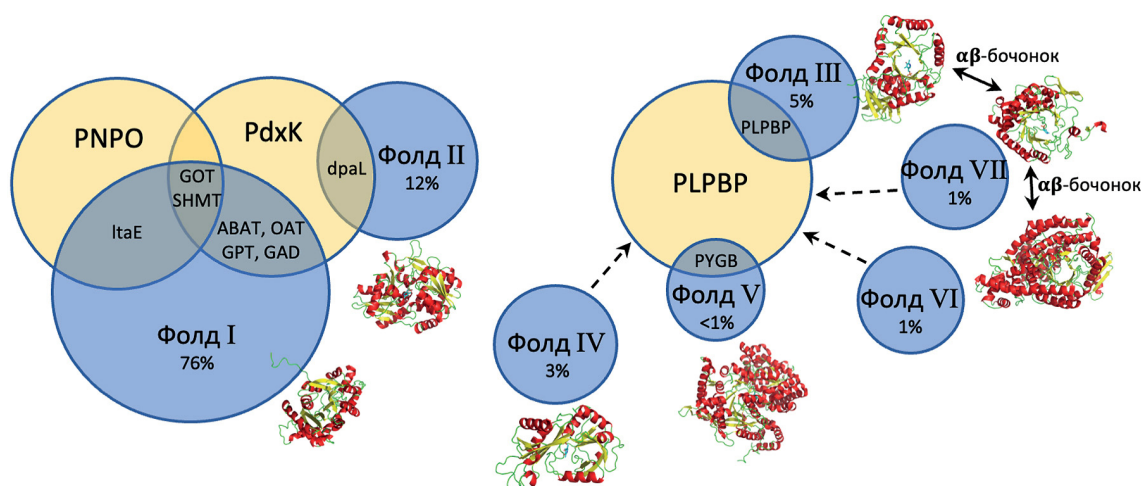


Рис. 4. Образование гетерологических комплексов между белками-акцепторами PLP (синие круги) и тремя потенциальными донорами PLP (желтые круги). Структурные типы репрезентативных белков-акцепторов PLP показаны рядом с синими кругами. Процент акцепторов PLP, принадлежащих каждому структурному типу, указан согласно Percudani et al. [1]. Охарактеризованные белок-белковые взаимодействия (таблица) обозначены аббревиатурами отдельных белков: LTA – L-треонинальдолаза; GOT – аспаратаминотрансфераза; SHMT – серингидроксиметилтрансфераза; ABAT – 4-аминобутиратаминотрансфераза; OAT – орнитинаминотрансфераза; GPT – аланинаминотрансфераза; GAD – глутаматдекарбоксилаза; dpaL – диаминопропионат-аммиак-лиаза; PYGB – гликогенфосфорилаза. Гипотетическое взаимодействие PLPBP с белками редких структурных типов IV, VI и VII указано пунктирными стрелками

В отличие от партнеров PdxK и PNPO, представленных наиболее многочисленными структурными типами I и II, третий донор PLP млекопитающих, PLPBP, взаимодействует с PLP-зависимыми белками редких структурных типов V (гликогенфосфорилаза) и III (ауто-олигомеризация) (таблица, рис. 4). Структурные типы VI и VII, характерные для очень небольшого числа акцепторов PLP [1] и потому отсутствующие в исходной классификации PLP-зависимых ферментов [21], имеют ту же структуру альфа-бета-бочонка, что и тип III. Отсюда можно предположить, что эти акцепторы PLP также получают PLP от PLPBP, как показано на рис. 4 пунктирными стрелками. Таким образом, в отличие от PdxK и PNPO, передающих PLP белкам наиболее распространенных структурных типов I и II, PLPBP может быть нужен для передачи кофермента акцепторам PLP редких структурных типов, таких как типы III–VII (рис. 4).

Недавнее исследование партнеров PLPBP показало, что среди них преобладают белки, участвующие в организации цитоскелета и клеточном делении, а не PLP-зависимые ферменты [34]. Поэтому основная функция PLPBP не обязательно включает доставку PLP к апоферментам. Участие PLP в организации цитоскелета и клеточных делений подтверждается и связью с этими процессами фосфатазы PLP, известной как хронофин. Помимо гидролиза PLP до PL, хронофин является фосфатазой кофилина [55] — ключевого регулятора контролируемой фосфорилированием динамики актинового цитоскелета. Ассоциация как PLPBP, так и PLP фосфатазы с организацией цитоскелета и делением клеток [34, 55] предполагает недооцененную в настоящее время роль витамина B6 в этих процессах.

Таким образом, мы идентифицировали общий для большинства PLP-зависимых ферментов мотив, простирающийся от белковой поверхности до сайтов связывания PLP. Конформационная динамика мотива при связывании доноров PLP может обеспечить образование канала для обмена PLP. Например, участвующая в переносе PLP открытая конформация активного центра глутаматдекарбоксилазы [19] может стабилизироваться белок-белковыми взаимодействиями с донором PLP. Структурно сходный в очень разных белках, использующих PLP, мотив может быть интерфейсом для присоединения множества белков-акцепторов PLP к ограниченному числу PLP-доноров. Конформационные изменения в гетерологическом комплексе могут сближать активные центры белков-доноров и акцеп-

торов PLP, способствуя межбелковому переносу кофермента. Патогенность человеческих мутаций вне активного сайта, но внутри или рядом с идентифицированным мотивом свидетельствует в пользу такой функции мотива. Поскольку компоненты белковых комплексов, связанных с базовыми функциями клеток, обычно коэкспрессируются [56], об образовании белковых комплексов может косвенно свидетельствовать сопряженная экспрессия продуцентов и PLP-зависимых белков. Действительно, в гепатоцеллюлярной карциноме, для которой характерно снижение функций PLP-зависимых ферментов структурного типа I (TAT) и структурного типа II (CBS) [4, 57], подавляется и продуцент PLP PNPO [58].

Хотя идентифицированный общий мотив разных ферментов-акцепторов PLP обладает сходной структурой и консервативными остатками, необходимыми для взаимодействия с донорами PLP, в каждом белке-акцепторе имеются и специфические для него остатки. Это открывает возможности для разработки пептидных препаратов, избирательно блокирующих интерфейс доставки PLP в представляющих терапевтический интерес ферментах, таких как CBS, усиление функции которой при некоторых видах рака связано с плохим прогнозом [5, 6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально установленные белок-белковые взаимодействия и имеющиеся в настоящее время структурные данные позволили идентифицировать общий для множества PLP-зависимых ферментов структурных типов I и II мотив, который может служить интерфейсом между этими ферментами и продуцирующими PLP PdxK или PNPO. Функциональное значение мотива в межбелковом переносе PLP объясняет патогенность мутаций внутри или вблизи мотива вне активного центра. Взаимодействия PLPBP свидетельствуют о его связывании с PLP-зависимыми белками редких структурных типов III–VII.

Вклад авторов. В.А. Алешин провел поиск литературы и исследовательскую работу, проанализировал и графически представил результаты, написал начальный вариант статьи; В.И. Буник руководила исследованием, анализировала результаты, создала концепцию и написала окончательный вариант статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-54-7804).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо ис-

следований с участием людей или животных в качестве объектов, не считая общедоступной из баз данных информации.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 88, вып. 7, 2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Percudani, R., and Peracchi, A. (2009) The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families, *BMC Bioinformatics*, **10**, 273, doi: 10.1186/1471-2105-10-273.
2. Bargiela, D., Cunha, P. P., Veliça, P., Foskolou, I. P., Barbieri, L., Rundqvist, H., and Johnson, R. S. (2022) Vitamin B6 metabolism determines T cell anti-tumor responses, *Front. Immunol.*, **13**, 837669, doi: 10.3389/fimmu.2022.837669.
3. Fu, L., Dong, S.-S., Xie, Y.-W., Tai, L.-S., Chen, L., Kong, K. L., Man, K., Xie, D., Li, Y., Cheng, Y., Tao, Q., and Guan, X.-Y. (2010) Down-regulation of tyrosine aminotransferase at a frequently deleted region 16q22 contributes to the pathogenesis of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, **51**, 1624-1634, doi: 10.1002/hep.23540.
4. Nguyen, T. N., Nguyen, H. Q., and Le, D. H. (2020) Unveiling prognostics biomarkers of tyrosine metabolism reprogramming in liver cancer by cross-platform gene expression analyses, *PLoS One*, **15**, e0229276, doi: 10.1371/journal.pone.0229276.
5. Ascensão, K., and Szabo, C. (2022) Emerging roles of cystathionine β -synthase in various forms of cancer, *Redox Biol.*, **53**, 102331, doi: 10.1016/j.redox.2022.102331.
6. Zhu, H., Blake, S., Chan, K. T., Pearson, R. B., and Kang, J. (2018) Cystathionine β -synthase in physiology and cancer, *BioMed Res. Int.*, **2018**, 3205125, doi: 10.1155/2018/3205125.
7. Van den Eynde, M. D. G., Scheijen, J. L. J. M., Stehouwer, C. D. A., Miyata, T., and Schalkwijk, C. G. (2021) Quantification of the B6 vitamers in human plasma and urine in a study with pyridoxamine as an oral supplement; pyridoxamine as an alternative for pyridoxine, *Clin. Nutr.*, **40**, 4624-4632, doi: 10.1016/j.clnu.2021.05.028.
8. Vasilaki, A. T., McMillan, D. C., Kinsella, J., Duncan, A., O'Reilly, D. S. J., and Talwar, D. (2008) Relation between pyridoxal and pyridoxal phosphate concentrations in plasma, red cells, and white cells in patients with critical illness, *Am. J. Clin. Nutr.*, **88**, 140-146, doi: 10.1093/ajcn/88.1.140.
9. Tremino, L., Forcada-Nadal, A., Contreras, A., and Rubio, V. (2017) Studies on cyanobacterial protein PipY shed light on structure, potential functions, and vitamin B6-dependent epilepsy, *FEBS Lett.*, **591**, 3431-3442, doi: 10.1002/1873-3468.12841.
10. Ramos, R. J., Albersen, M., Vringer, E., Bosma, M., Zwakenberg, S., Zwartkruis, F., Jans, J. J. M., and Verhoeven-Duif, N. M. (2019) Discovery of pyridoxal reductase activity as part of human vitamin B6 metabolism, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1863**, 1088-1097, doi: 10.1016/j.bbagen.2019.03.019.
11. Wilson, M. P., Plecko, B., Mills, P. B., and Clayton, P. T. (2019) Disorders affecting vitamin B6 metabolism, *J. Inherit. Metab. Disease*, **42**, 629-646, doi: 10.1002/jimd.12060.
12. Zuo, H., Ueland, P. M., Eussen, S. J. P. M., Tell, G. S., Vollset, S. E., Nygård, O., Midttun, Ø., Meyer, K., and Ulvik, A. (2014) Markers of vitamin B6 status and metabolism as predictors of incident cancer: The Hordaland Health Study, *Int. J. Cancer*, **136**, 2932-2939, doi: 10.1002/ijc.29345.
13. Chen, C.-C., Li, B., Millman, S. E., Chen, C., Li, X., Morris, J. P., Mayle, A., Ho, Y.-J., Loizou, E., Liu, H., Qin, W., Shah, H., Violante, S., Cross, J. R., Lowe, S. W., and Zhang, L. (2020) Vitamin B6 addiction in acute myeloid leukemia, *Cancer Cell*, **37**, 71-84.e77, doi: 10.1016/j.ccell.2019.12.002.
14. Galluzzi, L., Vitale, I., Senovilla, L., Olaussen, K. A., Pinna, G., Eisenberg, T., Goubar, A., Martins, I., Michels, J., Kratassiouk, G., Carmona-Gutierrez, D., Scoazec, M., Vacchelli, E., Schlemmer, F., Kepp, O., Shen, S., Tailler, M., Niso-Santano, M., Morselli, E., Criollo, A., et al. (2012) Prognostic impact of Vitamin B6 metabolism in lung cancer, *Cell Rep.*, **2**, 257-269, doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.017.
15. Contestabile, R., di Salvo, M. L., Bunik, V., Tramonti, A., and Verni, F. (2020) The multifaceted role of vitamin B6 in cancer: Drosophila as a model system to investigate DNA damage, *Open Biol.*, **10**, 200034, doi: 10.1098/rsob.200034.
16. Tran, J. U., and Brown, B. L. (2022) Structural basis for allostery in PLP-dependent enzymes, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 884281, doi: 10.3389/fmolb.2022.884281.
17. Matsuo, T., and Sadzuka, Y. (2019) *In vitro* anti-cancer activities of B6 vitamers: a Mini-review, *Anticancer Res.*, **39**, 3429-3432, doi: 10.21873/anticancer.13488.

18. Barile, A., Battista, T., Fiorillo, A., di Salvo, M. L., Malatesta, F., Tramonti, A., Ilari, A., and Contestabile, R. (2021) Identification and characterization of the pyridoxal 5'-phosphate allosteric site in *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100795, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100795.
19. Giardina, G., Montioli, R., Gianni, S., Cellini, B., Paiardini, A., Voltattorni, C. B., and Cutruzzola, F. (2011) Open conformation of human DOPA decarboxylase reveals the mechanism of PLP addition to Group II decarboxylases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20514-20519, doi: 10.1073/pnas.1111456108.
20. Cheung, P. Y., Fong, C. C., Ng, K. T., Lam, W. C., Leung, Y. C., Tsang, C. W., Yang, M., and Wong, M. S. (2003) Interaction between pyridoxal kinase and pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes, *J. Biochemistry*, **134**, 731-738, doi: 10.1093/jb/mvg201.
21. Grishin, N. V., Phillips, M. A., and Goldsmith, E. J. (1995) Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases, *Protein Sci.*, **4**, 1291-1304, doi: 10.1002/pro.5560040705.
22. Poloni, S., Sperb-Ludwig, F., Borsatto, T., Weber Hoss, G., Doriqui, M. J. R., Embirucu, E. K., Boasorte, N., Marques, C., Kim, C. A., Fischinger Moura de Souza, C., Rocha, H., Ribeiro, M., Steiner, C. E., Moreno, C. A., Bernardi, P., Valadares, E., Artigalas, O., Carvalho, G., Wanderley, H. Y. C., Kugele, J., et al. (2018) CBS mutations are good predictors for B6-responsiveness: a study based on the analysis of 35 Brazilian Classical Homocystinuria patients, *Mol. Genet. Genomic Med.*, **6**, 160-170, doi: 10.1002/mgg3.342.
23. Natt, E., Kida, K., Odievre, M., Di Rocco, M., and Scherer, G. (1992) Point mutations in the tyrosine aminotransferase gene in tyrosinemia type II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9297-9301, doi: 10.1073/pnas.89.19.9297.
24. Frith, M. C., Saunders, N. F., Kobe, B., and Bailey, T. L. (2008) Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions, *PLoS Comput. Biol.*, **4**, e1000071, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000071.
25. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402, doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
26. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 539, doi: 10.1038/msb.2011.75.
27. Oughtred, R., Rust, J., Chang, C., Breitkreutz, B. J., Stark, C., Willems, A., Boucher, L., Leung, G., Kolas, N., Zhang, F., Dolma, S., Coulombe-Huntington, J., Chatr-Aryamontri, A., Dolinski, K., and Tyers, M. (2021) The BioGRID database: a comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions, *Protein Sci.*, **30**, 187-200, doi: 10.1002/pro.3978.
28. Hermjakob, H., Montecchi-Palazzi, L., Lewington, C., Mudali, S., Kerrien, S., Orchard, S., Vingron, M., Roechert, B., Roepstorff, P., Valencia, A., Margalit, H., Armstrong, J., Bairoch, A., Cesareni, G., Sherman, D., and Apweiler, R. (2004) IntAct: an open source molecular interaction database, *Nucleic Acids Res.*, **32**, D452-455, doi: 10.1093/nar/gkh052.
29. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., and von Mering, C. (2021) The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D605-D612, doi: 10.1093/nar/gkaa1074.
30. Wan, C., Borgeson, B., Phanse, S., Tu, F., Drew, K., Clark, G., Xiong, X., Kagan, O., Kwan, J., Bezginov, A., Chessman, K., Pal, S., Cromar, G., Papoulas, O., Ni, Z., Boutz, D. R., Stoilova, S., Havugimana, P. C., Guo, X., Malt, R. H., et al. (2015) Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes, *Nature*, **525**, 339-344, doi: 10.1038/nature14877.
31. Kim, Y. T., Kwok, F., and Churchich, J. E. (1988) Interactions of pyridoxal kinase and aspartate aminotransferase emission anisotropy and compartmentation studies, *J. Biol. Chem.*, **263**, 13712-13717, doi: 10.1016/s0021-9258(18)68299-7.
32. Deka, G., Kalyani, J. N., Jahangir, F. B., Sabharwal, P., Savithri, H. S., and Murthy, M. R. N. (2019) Structural and functional studies on *Salmonella typhimurium* pyridoxal kinase: the first structural evidence for the formation of Schiff base with the substrate, *FEBS J.*, **286**, 3684-3700, doi: 10.1111/febs.14933.
33. Ghatge, M. S., Karve, S. S., David, T. M., Ahmed, M. H., Musayev, F. N., Cunningham, K., Schirch, V., and Safo, M. K. (2016) Inactive mutants of human pyridoxine 5'-phosphate oxidase: a possible role for a noncatalytic pyridoxal 5'-phosphate tight binding site, *FEBS Open Bio*, **6**, 398-408, doi: 10.1002/2211-5463.12042.
34. Fux, A., and Sieber, S. A. (2020) Biochemical and proteomic studies of human pyridoxal 5'-phosphate-binding protein (PLPBP), *ACS Chem. Biol.*, **15**, 254-261, doi: 10.1021/acscchembio.9b00857.
35. Ito, T., Iimori, J., Takayama, S., Moriyama, A., Yamauchi, A., Hemmi, H., and Yoshimura, T. (2013) Conserved pyridoxal protein that regulates ile and val metabolism, *J. Bacteriol.*, **195**, 5439-5449, doi: 10.1128/jb.00593-13.
36. Schneider, G., Käck, H., and Lindqvist, Y. (2000) The manifold of vitamin B6 dependent

- enzymes, *Structure*, **8**, R1-R6, doi: 10.1016/s0969-2126(00)00085-x.
37. Graham, D. L., Beio, M. L., Nelson, D. L., and Berkowitz, D. B. (2019) Human serine racemase: key residues/active site motifs and their relation to enzyme function, *Front. Mol. Biosci.*, **6**, 8, doi: 10.3389/fmolb.2019.00008.
 38. Pasternack, S. M., Betz, R. C., Brandrup, F., Gade, E. F., Clemmensen, O., Lund, A. M., Christensen, E., and Bygum, A. (2009) Identification of two new mutations in the TAT gene in a Danish family with tyrosinaemia type II, *Br. J. Dermatol.*, **160**, 704-706, doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08888.x.
 39. Bouyacoub, Y., Zribi, H., Azzouz, H., Nasrallah, F., Abdelaziz, R. B., Kacem, M., Rekaya, B., Messaoud, O., Romdhane, L., Charfeddine, C., Bouziri, M., Bouziri, S., Tebib, N., Mokni, M., Kaabachi, N., Boubaker, S., and Abdelhak, S. (2013) Novel and recurrent mutations in the TAT gene in Tunisian families affected with Richner-Hanhart syndrome, *Gene*, **529**, 45-49, doi: 10.1016/j.gene.2013.07.066.
 40. Gokay, S., Kendirci, M., Ustkoyuncu, P. S., Kardas, F., Bayram, A. K., Per, H., and Poyrazoğlu, H. G. (2016) Tyrosinemia type II: Novel mutations in TAT in a boy with unusual presentation, *Pediatrics Int.*, **58**, 1069-1072, doi: 10.1111/ped.13062.
 41. Peña-Quintana, L., Scherer, G., Curbelo-Estévez, M. L., Jiménez-Acosta, F., Hartmann, B., La Roche, F., Meavilla-Olivas, S., Pérez-Cerdá, C., García-Segarra, N., Giguère, Y., Huppke, P., Mitchell, G. A., Mönch, E., Trump, D., Vianey-Saban, C., Trimble, E. R., Vitoria-Miñana, I., Reyes-Suárez, D., Ramírez-Lorenzo, T., and Tugores, A. (2017) Tyrosinemia type II: Mutation update, 11 novel mutations and description of 5 independent subjects with a novel founder mutation, *Clin. Genetics*, **92**, 306-317, doi: 10.1111/cge.13003.
 42. Hühn, R., Stoermer, H., Klingele, B., Bausch, E., Fois, A., Farnetani, M., Di Rocco, M., Boué, J., Kirk, J. M., Coleman, R., and Scherer, G. (1998) Novel and recurrent tyrosine aminotransferase gene mutations in tyrosinemia type II, *Hum. Genetics*, **102**, 305-313, doi: 10.1007/s004390050696.
 43. Maydan, G., Andresen, B. S., Madsen, P. P., Zeigler, M., Raas-Rothschild, A., Zlotogorski, A., Gutman, A., and Korman, S. H. (2006) TAT gene mutation analysis in three Palestinian kindreds with oculocutaneous tyrosinaemia type II; characterization of a silent exonic transversion that causes complete missplicing by exon 11 skipping, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **29**, 620-626, doi: 10.1007/s10545-006-0407-8.
 44. Charfeddine, C., Monastiri, K., Mokni, M., Laadjimi, A., Kaabachi, N., Perin, O., Nilges, M., Kassas, S., Keirallah, M., Guediche, M. N., Kamoun, M. R., Tebib, N., Ben Dridi, M. F., Boubaker, S., Ben Osman, A., and Abdelhak, S. (2006) Clinical and mutational investigations of tyrosinemia type II in Northern Tunisia: identification and structural characterization of two novel TAT mutations, *Mol. Genet. Metab.*, **88**, 184-191, doi: 10.1016/j.ymgme.2006.02.006.
 45. Moat, S. J., Bao, L., Fowler, B., Bonham, J. R., Walter, J. H., and Kraus, J. P. (2004) The molecular basis of cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency in UK and US patients with homocystinuria, *Hum. Mutat.*, **23**, 206, doi: 10.1002/humu.9214.
 46. Urreiziti, R., Asteggiano, C., Bermudez, M., Cordoba, A., Szlago, M., Grosso, C., de Kremer, R. D., Vilarinho, L., D'Almeida, V., Martinez-Pardo, M., Pena-Quintana, L., Dalmau, J., Bernal, J., Briceno, I., Couce, M. L., Rodes, M., Vilaseca, M. A., Balcells, S., and Grinberg, D. (2006) The p.T191M mutation of the CBS gene is highly prevalent among homocystinuric patients from Spain, Portugal and South America, *J. Hum. Genet.*, **51**, 305-313, doi: 10.1007/s10038-006-0362-0.
 47. Kraus, J. P. CBS mutation database. URL: <https://cbs.lfl.cuni.cz/>.
 48. Katsushima, F., Oliveriusova, J., Sakamoto, O., Ohura, T., Kondo, Y., Iinuma, K., Kraus, E., Stouracova, R., and Kraus, J. P. (2006) Expression study of mutant cystathionine β -synthase found in Japanese patients with homocystinuria, *Mol. Genet. Metab.*, **87**, 323-328, doi: 10.1016/j.ymgme.2005.09.013.
 49. Barile, A., Nogues, I., di Salvo, M. L., Bunik, V., Contestabile, R., and Tramonti, A. (2020) Molecular characterization of pyridoxine 5'-phosphate oxidase and its pathogenic forms associated with neonatal epileptic encephalopathy, *Sci. Rep.*, **10**, 13621, doi: 10.1038/s41598-020-70598-7.
 50. Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Ko, T.-P., Schirch, V., and Safo, M. K. (2003) Structure and properties of recombinant human pyridoxine 5'-phosphate oxidase, *Protein Sci.*, **12**, 1455-1463, doi: 10.1110/ps.0356203.
 51. Di Salvo, M. L., Mastrangelo, M., Nogués, I., Tolve, M., Paiardini, A., Carducci, C., Mei, D., Montomoli, M., Tramonti, A., Guerrini, R., Contestabile, R., and Leuzzi, V. (2017) Pyridoxine-5'-phosphate oxidase (Pnpo) deficiency: Clinical and biochemical alterations associated with the C.347g > A (P:Arg116Gln) mutation, *Mol. Genet. Metab.*, **122**, 135-142, doi: 10.1016/j.ymgme.2017.08.003.
 52. Kwok, F., and Churchich, J. E. (1979) Brain pyridoxal kinase. Mobility of the Substrate pyridoxal and binding of inhibitors to the nucleotide site, *Eur. J. Biochem.*, **93**, 229-235, doi: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb12815.x.
 53. Choi, S. Y., Churchich, D. R., and Churchich, J. E. (1985) Binding of new plp analogs to the catalytic domain of gaba transaminase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 346-353, doi: 10.1016/s0006-291x(85)80165-0.
 54. Montioli, R., Zamparelli, C., Borri Voltattorni, C., and Cellini, B. (2017) Oligomeric state and thermal

- stability of apo- and holo- human ornithine δ -aminotransferase, *Protein J.*, **36**, 174-185, doi: 10.1007/s10930-017-9710-5.
55. Gohla, A., Birkenfeld, J., and Bokoch, G. M. (2005) Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics, *Nat. Cell Biol.*, **7**, 21-29, doi: 10.1038/ncb1201.
 56. Webb, E. C., and Westhead, D. R. (2009) The transcriptional regulation of protein complexes; a cross-species perspective, *Genomics*, **94**, 369-376, doi: 10.1016/j.ygeno.2009.08.003.
 57. Kim, J., Hong, S. J., Park, J. H., Park, S. Y., Kim, S. W., Cho, E. Y., Do, I. G., Joh, J. W., and Kim, D. S. (2009) Expression of cystathionine beta-synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis, *Oncol. Rep.*, **21**, 1449-1454, doi: 10.3892/or_00000373.
 58. Mei, M., Liu, D., Tang, X., You, Y., Peng, B., He, X., and Huang, J. (2022) Vitamin B6 metabolic pathway is involved in the pathogenesis of liver diseases via Multi-Omics analysis, *J. Hepatocell Carcinoma*, **9**, 729-750, doi: 10.2147/JHC.S370255.

PROTEIN–PROTEIN INTERFACES AS DRUGGABLE TARGETS: A COMMON MOTIF OF THE PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE-DEPENDENT ENZYMES TO RECEIVE THE COENZYME FROM ITS PRODUCERS

V. A. Aleshin^{1,2} and V. I. Bunik^{1,2,3*}

¹ Department of Biokinetics, A. N. Belozersky Institute of Physicochemical Biology,
Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: aleshin_vasily@mail.ru; bunik@belozersky.msu.ru

² Department of Biochemistry, Sechenov University, 119048 Moscow, Russia

³ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Pyridoxal-5'-phosphate (PLP), a phosphorylated form of vitamin B6, acts as a coenzyme for numerous reactions, including those changed in cancer and/or associated with the disease prognosis. Since highly reactive PLP may modify cellular proteins, it is hypothesized to be directly transferred from its donors to acceptors. Our goal is to validate the hypothesis by finding common motif(s) in a multitude of the PLP-dependent enzymes for binding the limited number of the PLP donors, namely pyridoxal kinase (PdxK), pyridox(am)in-5'-phosphate oxidase (PNPO) and the PLP-binding protein (PLPBP). Experimentally confirmed interactions between the PLP donors and acceptors reveal that PdxK and PNPO interact with the PLP acceptors of folds I and II, while PLPBP – with those of folds III and V. Aligning the sequences and 3D structures of the identified interactors of PdxK and PNPO, we have found a common motif in the PLP-dependent enzymes of folds I and II. The motif extends from the enzyme surface to the neighborhood of the PLP binding site, represented by an exposed α -helix, a partially buried β -strand and residual loops. Pathogenicity of mutations in human PLP-dependent enzymes within or in the vicinity of the motif, but outside of the active sites, supports functional significance of the motif that may provide an interface for the direct transfer of PLP from the sites of its synthesis to those of the coenzyme binding. The enzyme-specific amino acid residues of the common motif may be used to develop selective inhibitors blocking PLP delivery to the PLP-dependent enzymes critical for proliferation of malignant cells.

Keywords: CBS, PdxK, PNPO, PLPBP, pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme, TAT, vitamin B6 metabolism, amino acid metabolism, 1-carbon metabolism