

# ХРОМАТИН-РЕМОДЕЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР FACT И ЕГО РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО РОСТА *ASPERGILLUS* SPP. ПРИ АСПЕРГИЛЛЕЗЕ

<sup>1,2</sup>Богданов К.В. (ст.н.с.), <sup>1</sup>Игнатьева С.М. (зав. лаб.)

<sup>1</sup>НИИ медицинской микологии им.П.Н.Кашкина ГОУ ДПО СПб МАПО; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет (СПбГМУ) им. акад. И.П. Павлова, Отдел Молекулярно-Генетических Технологий, Санкт-Петербург, Россия

© Богданов К.В., Игнатьева С.М., 2008

Хроматин-ремоделирующий белковый комплекс FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*) патогенных *Aspergillus* spp., вызывающих аспергиллез, состоит из нескольких субъединиц, кодируемых разными генами *pob3/ssrp1*, *cdc68/spt16*, *nhr6*. Субъединицы белка FACT участвуют в повышении транскрипции и репликации хроматина, регулируют транскрипцию генов, контролирующих клеточный рост, и поддерживают стабильность генома. Специфическая N-концевая аминокислотная последовательность компонента *Pob3/SSRP1* комплекса FACT *Aspergillus fumigatus* не имеет гомологии ни с одним белком человека из всемирной базы данных PubMed и содержит особый мотив USP7, который определяет его связывание с белками, контролирующими апоптоз. Мы полагаем, что компонент *Pob3/SSRP1* может выступать в качестве потенциальной мишени для создания антимикотиков, подавляющих спорообразование и клеточный рост патогенных грибов через регуляцию транскрипции, репликации и репарации, исключая путь ингибирования биосинтеза эргостерола и других компонентов клеточной мембраны.

**Ключевые слова:** апоптоз, аспергиллез, *Aspergillus* spp., клеточный рост, регуляция, FACT

## CHROMATIN REMODELING FACTOR FACT AND ITS ROLE IN REGULATION *ASPERGILLUS* SPP. CELL GROWTH IN ASPERGILLOSIS

<sup>1,2</sup>Bogdanov K.V. (senior research worker),  
<sup>1</sup>Ignatieva S.M. (head of laboratory)

<sup>1</sup>Kashkin Research Institute of Medical Mycology of SEI APE SPb MAPE; <sup>2</sup>St.Petersburg Pavlov State Medical University, Division for Molecular Genetic Technologies, Saint Petersburg, Russia

© Bogdanov K.V., Ignatieva S.M., 2008

The genus *Aspergillus* includes a variety of related fungi which cause aspergillosis in immunocompetent patients. The fungi produce a chromatin remodeling factor FACT that consists of some subunits encoded by three genes: *pob3/ssrp1*, *cdc68/spt16*, *nhr6*. FACT complex enhances chromatin transcription and replication, promotes genome stability and allows to transcribe the genes that are involved in regulation of cell growth. Blast sequence analysis using database of PubMed shown that *Pob3/SSRP1* component of FACT of *Aspergillus fumigatus* contains a predictive N-terminal specific sequence without homology to known human proteins. The specific sequence of *Pob3/SSRP1* includes USP7 motif, providing its interaction with some proteins that are implicated in apoptosis. We propose that *Pob3/SSRP1* component of FACT can present a new potential target for antifungal drugs to suppress sporulation and microbial cell growth through the regulation of transcription, replication and reparation, excluding inhibition of ergosterol biosynthesis pathway in aspergillosis.

**Key words:** apoptosis, aspergillosis, *Aspergillus* spp., cell growth, FACT, regulation

Аспергиллез развивается на фоне иммунодефицита, вызванного иммуносупрессивной терапией, инфекционными болезнями и злокачественными новообразованиями. Как правило, он поражает пациентов, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) или костного мозга (ТКМ), трансплантацию органов, распространен среди больных, страдающих ВИЧ, гепатитами В, С и другими инфекциями, а также онкологическими заболеваниями, включая группу больных гемобластомами. Аспергиллез представляет собой инфекционное заболевание, причиной которого является распространение в организме человека патогенных грибов *Aspergillus* spp. Основным возбудителем болезни является *A. fumigatus*, который определяют в 90% случаев аспергиллеза [1]. В остальных случаях (10%) выявляют другие представители рода *Aspergillus* spp., а именно: *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans* и др. *Aspergillus* spp. могут вызывать различные заболевания: аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА), аспергиллему, хронический некротизирующий аспергиллез и, наиболее тяжело поддающийся лечению, инвазивный аспергиллез (ИА). Как правило, первично у большинства больных регистрируют поражения дыхательных путей. Однако, по причине ангиотропности, *Aspergillus* spp. могут проникать и в сосуды, вызывать тромбозы, способствуя гематогенной диссеминации с поражением различных органов, например, головного мозга, кожи и подкожной жировой клетчатки, костей, печени, почек и др.

Диагностику аспергиллеза проводят в несколько этапов с использованием различных лабораторных методов. Так, первоначально микроскопируют мазок, полученный из мокроты больного, отделяемого из носа, биоптата бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), спинномозговой жидкости (СМЖ), реже — периферической крови и засевают полученный образец на питательную среду. В случаях, когда цитологам не удается отличить *Aspergillus* spp. от других патогенных грибов, проводят иммунологическое исследование (ИФА) или молекулярно-биологический анализ (ПЦР). ИФА на полисахарид галактоманнан, представляющий собой компонент клеточной стен-

ки гриба, высвобождаемый в процессе роста мицелия, особенно эффективен для ранней диагностики ИА [2]. Коммерческий кит для определения галактоманна в сыворотке крови человека (ELISA Platelia *Aspergillus* kit, Bio-Rad) в настоящее время широко зарекомендовал себя как чувствительный и специфичный метод выявления антигена *Aspergillus* spp. Однако этот метод может приводить к ложноположительным результатам. Причинами названного явления могут быть: проведение больным цитостатической химиотерапии, трансплантации костного мозга, назначение ряда антибактериальных препаратов, присутствие полисахарида галактоманна в некоторых продуктах питания [3]. Также применение ИФА может быть ограничено по причине возможных перекрестных реакций с экзоантигенами других грибов и некоторых бактерий [4, 5]. Высокая чувствительность и специфичность ПЦР для определения участка нуклеотидной последовательности ДНК, кодирующего одну из субъединиц рибосомного белка *Aspergillus* spp., позволяет рекомендовать применение этого метода исследования в лаборатории одновременно с ИФА или независимо от него, особенно, в случаях, ограничивающих чувствительность ИФА [6, 7].

В настоящее время лечение аспергиллеза проводят антимикотиками, которые относят к четырем разным группам химических препаратов, обладающих выраженным фунгицидным действием. Среди них: полиены, азолы, аллиламины и эхинокандины. Большинство антимикотиков оказывает прямое или косвенное действие на эргостерол, компонент клеточной мембраны *Aspergillus* spp. Так, полиены, к которым относят и высокотоксичный амфотерицин В, взаимодействуют с эргостеролом клеточной мембраны гриба и образуют поры или каналы, которые повышают ее проницаемость [8]. Устойчивость к амфотерицину В у мутированных штаммов грибов приводит к повышению концентрации эргостерола в их клеточной мембране [9]. Аллиламины, в свою очередь, блокируют синтез эргостерола путем ингибирования мембрано-ассоциированной скваленэпоксидазы, кодируемой геном *erg1* [10]. Действие азолов (имидазолы и триазолы) связано с ингибированием фермента стерол-14- $\alpha$ -диметилазы, цитохром Р450-зависимой ферментной системы, кодируемой геном *sur51* (*sur51A* или *sur51B*) [11]. Названное ингибирование нарушает биосинтез эргостерола и ведет к накоплению 14- $\alpha$ -метил-стеролов и впоследствии — к повреждению некоторых мембран — ассоциированных ферментативных систем. Эхинокандины угнетают синтез 1,3- $\beta$ -D-глюкана — основного компонента клеточной стенки *Aspergillus* spp. [8]. Таким образом, все перечисленные антимикотики обладают терапевтическим действием через эргостерол или пути его биосинтеза.

Несмотря на наметившийся прогресс в лечении аспергиллеза и применение четырех разных групп антимикотиков, действие этих препаратов остается

узкоспецифичным, так как направлено исключительно на повреждение клеточной мембраны *Aspergillus* spp. Кроме того, токсичность и резистентность, возникающие у больных в ответ на антимикотическую терапию, повышают риск развития рецидива заболевания или его прогрессирования. Поэтому поиск новых лекарственных препаратов, связывающих другие мишени в клетках патогенных грибов, и менее токсичных для пациента, представляет несомненный интерес. С этой целью недавно проводили анализ генома *Aspergillus* spp. и поиск консервативных нуклеотидных последовательностей, которые могли бы выступать в качестве потенциальных мишеней для широкого спектра лекарств, обладающих выраженным фунгицидным действием [12, 13].

Среди 240 генов, названных в качестве предполагаемой мишени антимикотиков, ген *cdc68/spt16*, продукт которого является компонентом хроматин-ремоделирующего фактора FACT и контролирует клеточный цикл, заслуживает особого внимания. CDC68/Spt16 является одним из ключевых белков, необходимых для спорообразования и роста вегетативных клеток *Saccharomyces cerevisiae* [14]. Известно, что CDC68/Spt16 участвует в образовании комплекса FACT (230 кДа), состоящего из двух субъединиц — CDC68/Spt16 (140 кДа) и Pob3/SSRP1 (80 кДа), повышающего транскрипцию и репликацию хроматина у всех эукариот, включая человека (рис. 1 А, Б).

У дрожжевых грибов комплекс FACT (CDC68 и Pob3) часто обнаруживают в ассоциации с белком небольшого размера Nhr6, который повышает связывание FACT с ДНК и облегчает доступ ферментов, контролирующих процесс репарации ДНК [15, 16]. Недавно было показано, что Nhr6 и FACT повышают чувствительность связывания специфических участков нуклеосомной ДНК к ДНКазе I, что может способствовать реорганизации нуклеосомы, предшествующей репликации и транскрипции хроматина [17, 18]. Белок Nhr6 несет в своем составе аминокислотную последовательность, свойственную только высокоподвижной группе (high mobility group) белков, содержащих мотив HMG, который опосредует взаимодействия типа белок-ДНК [17, 19]. У млекопитающих и плодовой мушки *Drosophila melanogaster* Nhr6 представляет собой один из доменов в составе белка SSRP1 (Pob3 и Nhr6). Известно, что субъединица Spt16 комплекса FACT повышает реакцию элонгации транскрипции с участием РНК-полимеразы II благодаря удалению гистоновых димеров H2A-H2B из нуклеосомы во время транскрипции участка хроматина. После завершения транскрипции Spt16 восстанавливает целостность нуклеосомы [20]. Названный процесс элонгации транскрипции имеет место во время прохождения интерфазы митоза. С другой стороны, внутриклеточная локализация комплекса FACT была обнаружена и на метафазных хромосомах человека, в клетках линии HeLa (рак шейки матки) во время митоза с использованием метода белковой

масс-спектрометрии [21]. Также было показано, что субъединица Pob3/SSRP1 комплекса FACT вовлекается в процесс митоза и контролирует точное расхождение хромосом во время анафазы [22]. Кроме того, было обнаружено, что делеция гена *pob3/ssrp1* у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* приводит к задержке расхождения хромосом при участии микротрубочек веретена деления во время анафазы на 10%. Полная дисфункция *pob3* приводит к повышению вероятности анеуплоидии более чем в 20 раз. Недавно было обнаружено, что субъединица Spt16 комплекса FACT может вовлекаться в процесс митоза. Так, у низших эукариот *Tetrahymena thermophila* белок CDC68/Spt16 ассоциируется с микротрубочками веретена деления в процессе деления клетки [23]. Кроме того, CDC68/Spt16 взаимодействует с компонентом кинетохорного комплекса у высших эукариот, белком AF15q14/KNL-1/Sp105p, что, по-видимому, определяет точность расхождения хромосом во время митоза, так как AF15q14 ассоциируется и с микротрубочками веретена деления [24]. С другой стороны, CDC68/Spt16 вовлекается и в регуляцию транскрипции генов, контролирующих клеточный рост в течение интерфазы митоза [25]. В этом случае белковый комплекс Spt16-Sp105p/AF15q14, по-видимому, участвует в регуляции клеточного роста через РНК-полимеразу II, благодаря которой изменяется спектр транскрибируемых генов, контролирующих клеточный рост. Ген *cdc68/spt16*, кодирующий белок CDC68/Spt16, был обнаружен и у *Aspergillus* spp. (*A. fumigatus*, *A. nidulans*) [12, 26]. Он встречается только у эукариот и не описан у прокариот, включая *Escherichia coli*. Это может свидетельствовать в пользу утверждения о принципиальной разнице в регуляции генной транскрипции и организации генома эукариот и прокариот.

Аналог нуклеотидной последовательности гена *cdc68/spt16*, *osspt16* недавно был также обнаружен и у растений семейства злаковых *Oryza sativa* [27]. Следует отметить, что в геноме *O. sativa* нуклеотидная последовательность гена *osspt16* была обнаружена на хромосомах 8 и 4. Причем, на хромосоме 4 представлена его полная копия, тогда как на хромосоме 8 — укороченный вариант его нуклеотидной последовательности, который выполняет функцию промотора гена *rpl27* и повышает его транскрипционную активность. У растений *Arabidopsis thaliana* и человека в тканях с повышенной клеточной пролиферацией, компоненты Spt16 и SSRP1 комплекса FACT локализуются вблизи РНК-полимеразы II и активно транскрибируемых областей генома (эхроматин), что подтверждает участие Spt16 и SSRP1 в регуляции транскрипции генов, контролирующих

клеточный рост [28, 29]. Недавно Бурман с коллегами показали, что истощение внутриклеточных запасов белкового комплекса FACT у грибов, включая *Aspergillus* spp., приводит к их быстрой гибели [26]. Именно поэтому компоненты Spt16/CDC68 и SSRP1/Pob3 белкового комплекса FACT могли бы выступать в качестве предпочтительной мишени для действия антимиотиков нового поколения, ингибирующего направленно процессы спорообразования и клеточного роста патогенных грибов.

Недавно мы провели сравнительный анализ аминокислотных последовательностей компонентов белкового комплекса FACT человека *Homo sapiens* и патогенного гриба *A. fumigatus* из всемирной базы данных PubMed с помощью программы BLAST (EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms) по методу NEEDLE (global). Результаты анализа представлены на рис. 2 (а, б). Гомология-идентичность аминокислотных последовательностей белков человека *Homo sapiens* и патогенного гриба *A. fumigatus* CDC68(Spt16), Pob3(SSRP1) составляет 56%/37% и 39%/24% соответственно. Также нам удалось обнаружить с помощью программы BLAST специфическую аминокислотную последовательность, состоящую из 20 аминокислот (159-179 aa) и локализованную в компоненте Pob3/SSRP1 белкового комплекса FACT *A. fumigatus*. Эта последовательность не встречается в комплексе FACT человека и не имеет гомологии ни с одним белком человека из всемирной базы данных PUBMED. При анализе названной последовательности с помощью программы Search for Functional sites in the proteins (согласно серверу ELM, Великобритания), используемой для поиска сайтов связывания белков, показано, что исследуемая последовательность содержит особый мотив USP7 с двумя сайтами связывания с белками MDM2 и P53, которые вовлекаются преимущественно в апоптоз.

Таким образом, N-концевая специфическая последовательность белка SSRP1/Pob3 комплекса FACT может вовлекаться в регуляцию клеточного роста *Aspergillus* spp. через связывание с MDM2 и P53 патогенного гриба. Кроме того, нуклеотидная последовательность, ответственная за кодирование этого пептидного участка, может быть использована в качестве маркера для количественного определения *Aspergillus* spp. методом ПЦР (Q-PCR) в режиме реального времени. И, наконец, названная аминокислотная последовательность могла бы стать потенциальной мишенью для создания лекарственных препаратов, обладающих выраженным антифунгальным действием, ингибирующим спорообразование и вегетативный клеточный рост патогенных грибов.

## ЛИТЕРАТУРА

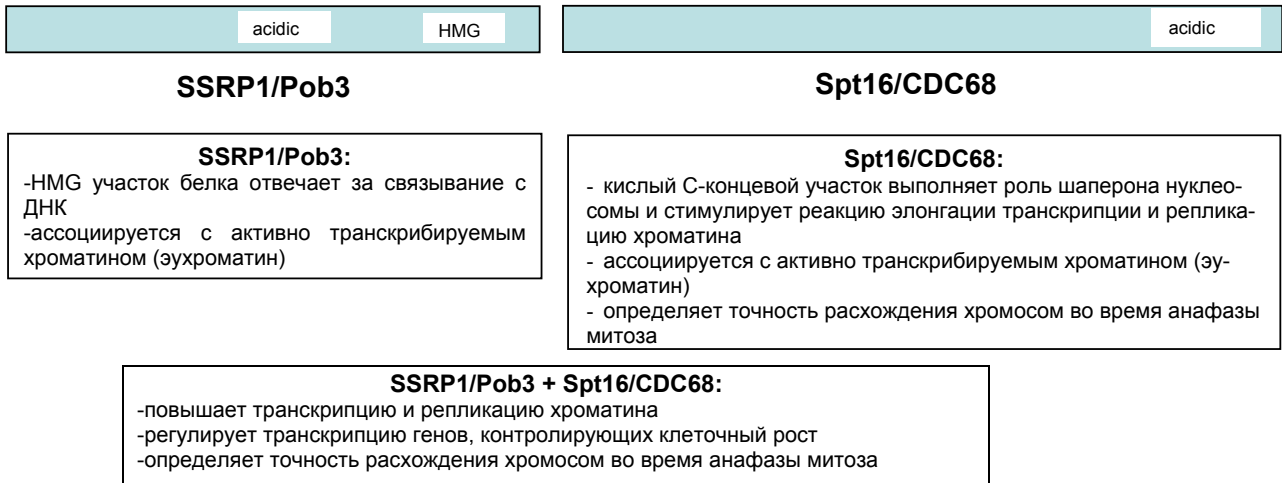
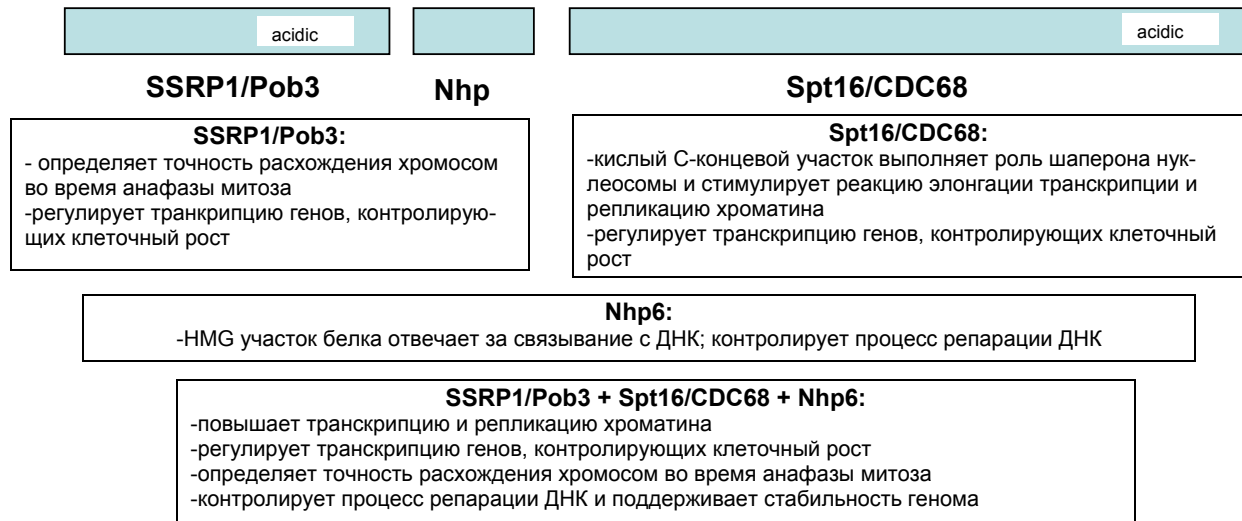
1. Latge J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis // Clin. Microbiol. Rev.-1999.-Vol.12.-P.310-50.
2. Becker M.J., de Marie S, Willemse D., et al. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model // J. Clin. Microbiol.-2000.-Vol.38.-P.1434-8.
3. Kirkpatrick C.H. & Windhorst D.B. Mucocutaneous candidiasis and thymoma // Am. J. Med.-1979.-Vol.66.-P.939-45.

4. Sanford J.P. The enigma of candiduria: Evolution of bladder irrigation with Amphotericin B for management — from anecdote to dogma and a lesson from Machiavelli // *Clin. Infect. Dis.*-1993.-Vol.16.-P.145-147.
5. Giacchino M., Chiapello N., Bezzio S., et al. *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay cross-reactivity caused by invasive *Geotrichum capitatum* // *J. Clin. Microbiol.*-2006.-Vol.44.-P.3432-4.
6. Challier S., Boyer S., Abachin E., Berche P. Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive Aspergillosis // *J. Clin. Microbiol.*-2004.-Vol.42.-P.844-6.
7. Loeffler J., Henke N., Hebart H., et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system // *J. Clin. Microbiol.*-2000.-Vol.38.-P.586-90.
8. Kartsonis N.A., Nielsen J., Douglas C.M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents // *Drug Resist Updat.*-2003.-Vol.6.-P.197-218.
9. Sterling T.R. & Merz W.G. Resistance to amphotericin B: emerging clinical and microbiological patterns // *Drug Resist Updat.*-1998.-Vol.1.-P.161-5.
10. Ryder N.S. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition // *Br. J. Dermatol.*-1992.-Vol.126, Suppl. 39.-P.2-7.
11. Lamb D., Kelly D., Kelly S. Molecular aspects of azole antifungal action and resistance // *Drug Resist Updat.*-1999.-Vol.2.-P.390-402.
12. Nierman W.C., Pain A., Anderson M.J., et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* // *Nature*.-2005.-Vol.438.-P.1151-6.
13. Liu M., Healy M.D., Dougherty B.A., et al. Conserved fungal genes as potential targets for broad-spectrum antifungal drug discovery // *Eukaryot Cell*.-2006.-Vol.5.-P.638-49.
14. Malone E.A., Clark C.D., Chiang A., Winston F. Mutations in SPT16/CDC68 suppress cis- and trans-acting mutations that affect promoter function in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.*-1991.-Vol.11.-P.5710-7.
15. Brewster N.K., Johnston G.C., Singer R.A. A bipartite yeast SSRP1 analog comprised of Pob3 and Nhp6 proteins modulates transcription // *Mol. Cell Biol.*-2001.-Vol.21.-P.3491-502.
16. Xue X. & Lehming N. Nhp6p and Med3p regulate gene expression by controlling the local subunit composition of RNA polymerase II // *J. Mol. Biol.*-2008.-Vol.379.-P.212-30.
17. Formosa T., Eriksson P., Wittmeyer J., et al. Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN // *EMBO J.*-2001.-Vol.20.-P.3506-17.
18. Ruone S., Rhoades A.R., Formosa T. Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form  $\gamma$ FACT complexes and to reorganize nucleosomes // *J. Biol. Chem.*-2003.-Vol.278.-P.45288-45295.
19. Wittmeyer J. & Formosa T. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein // *Mol. Cell Biol.*-1997.-Vol.17.-P.4178-90.
20. Belotserkovskaya R., Oh S., Bondarenko V.A., et al. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration // *Science*.-2003.-Vol.301.-P.1090-3.
21. Takata H., Uchiyama S., Nakamura N., et al. A comparative proteome analysis of human metaphase chromosomes isolated from two different cell lines reveals a set of conserved chromosome-associated proteins // *Genes Cells*.-2007.-Vol.12.-P.269-84.
22. Lejeune E., Bortfeld M., White S.A., et al. The chromatin-remodeling factor FACT contributes to centromeric heterochromatin independently of RNAi // *Curr. Biol.*-2007.-Vol.17.-P.1219-24.
23. Fujiu K. & Numata O. Identification and molecular cloning of *Tetrahymena* 138-kDa protein, a transcription elongation factor homologue that interacts with microtubules in vitro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*-2004.-Vol.315.-P.196-203.
24. Bogdanov K.V., Urata Y.N., Kuzumaki N., Takimoto M. Study of human gene D40 that is predominantly expressed in normal testis and cancer // *Proceedings of COE postdoctoral studies. Hokkaido University. 21 century COE.*-2005.-P.28-29.
25. Bogdanov K.V. & Takimoto M. The involvement of c-ABL and D40 (AF15q15/CASC5) proteins in the regulation of cell proliferation and cancer // *Tissue and Cell Biol.*-2008.-Vol. 2.-P.354-359.
26. Buurman E.T., Jiang W., McCoy M., et al. Validation of Cdc68p as a novel antifungal target // *Arch Microbiol.*-2002.-Vol.178.-P.428-36.
27. Ueda M., Arimura S., Yamamoto M.P., et al. Promoter shuffling at a nuclear gene for mitochondrial RPL27. Involvement of interchromosome and subsequent intrachromosome recombinations // *Plant. Physiol.*-2006.-Vol.141.-P.702-10.
28. Duroux M., Houben A., Růžicka K., et al. The chromatin remodelling complex FACT associates with actively transcribed regions of the *Arabidopsis* genome // *Plant J.*-2004.-Vol.40.-P.660-71.
29. Tan B.C. & Lee S.C. Nek9, a novel FACT-associated protein, modulates interphase progression. // *J. Biol. Chem.*-2004.-Vol.279.-P.9321-30.

Поступила в редакцию журнала 25.06.08

Рецензент: Н.П.Елинов



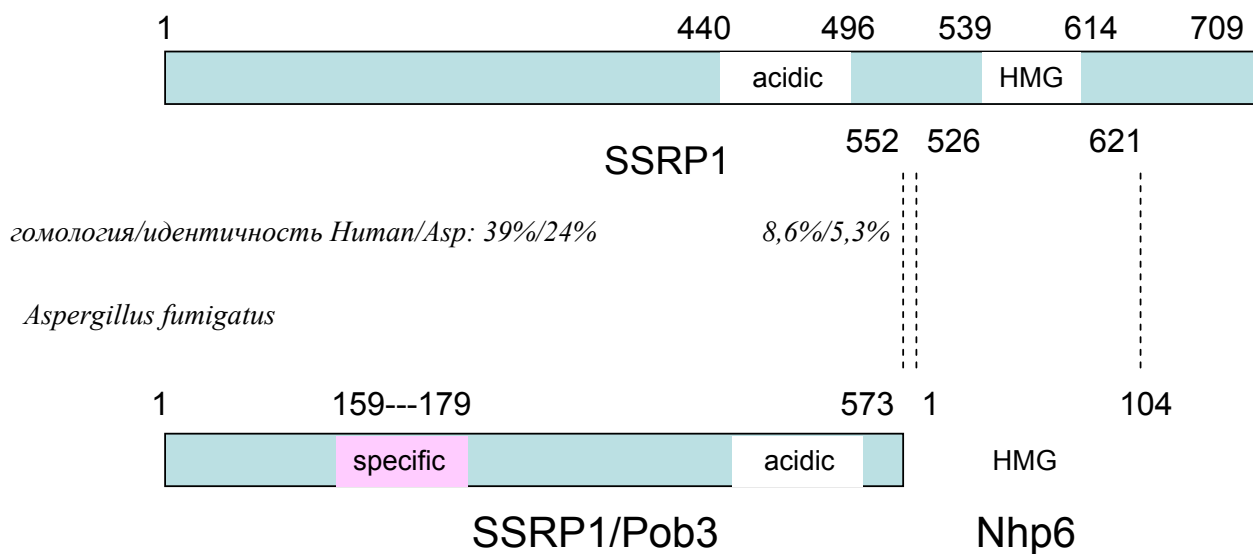
**А Животные****Б Грибы**

**Рис. 1.** Основные компоненты белкового комплекса FACT животных и аскомицетов, выполняемые ими функции.  
Компоненты белкового комплекса FACT животных (А),  
компоненты белкового комплекса FACT грибов аскомицетов (В).

Подписи к рисункам: acidic – кислая С-концевая аминокислотная последовательность;  
HMG – мотив, отвечающий за связывание ДНК.

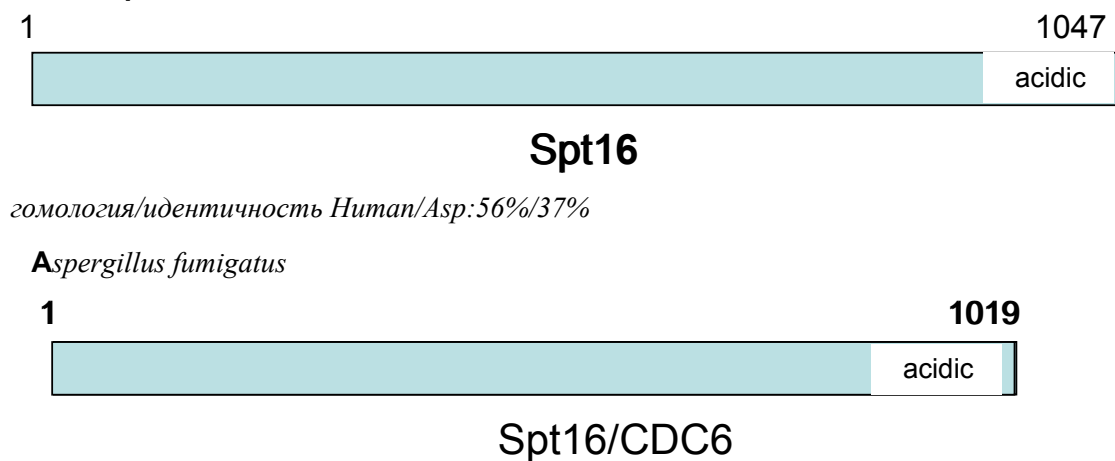
# А

## Homo sapiens



# Б

## Homo sapiens



**Рис. 2.** Структурная организация компонентов белкового комплекса FACT человека *Homo sapiens* и патогенного гриба *Aspergillus fumigatus*. Организация компонента SSRP1/Pob3 белкового комплекса FACT человека (А), организация компонентов SSRP1/Pob3 и Nhp6 белкового комплекса FACT патогенного гриба (Б).

Подписи к рисункам: specific – специфическая N-концевая аминокислотная последовательность, включает особый мотив USP7; acidic – кислая С-концевая аминокислотная последовательность; HMG – мотив, отвечающий за связывание ДНК