

МОДЕЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КАТАБОЛИЗМА МОЛЕКУЛ

Пинчук П.Ю.

*Магистрант кафедры химии и естественнонаучного образования
учреждения образования «Витебский государственный университет имени
П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь
polina_mileeva@mail.ru*

Чиркин А.А.

*д. м. н., профессор кафедры химии и естественнонаучного образования
учреждения образования «Витебский государственный университет имени
П.М. Машерова», г. Витебск, Беларусь
chir@tut.by*

*В статье представлены данные о молекулярно-структурной гомологии 5 лизосомальных ферментов у моллюска (*Biomphalaria glabrata*), мыши (*Mus musculus*) и свиньи (*Sus scrofa domesticus*) по отношению к человеку (*Homo sapiens*). Результаты работы позволяют рекомендовать изученных животных в качестве модельных организмов для исследования возможности получения препаратов для заместительной терапии и использования данных организмов на доклинических стадиях анализа эффективности субстанций для управления катаболизмом молекул в клетках.*

Ключевые слова: модельные организмы; пероксиредоксин-б; пальмитоил-протеинтиоэстераза 1, сульфогидролаза; N-ацетилглюкозамин-б-сульфатаза; N-ацетилгалактозамин-б-сульфатаза; фосфорилаза

MODEL ORGANISMS FOR STUDYING MOLECULE CATABOLISM

Pinchuk P.Yu.

*Master student of the Department of Chemistry and Natural Science Education
of the educational establishment "Vitebsk State University named after P.M.
Masherov", Vitebsk, Belarus
polina_mileeva@mail.ru*

Chirkin A.A.

*Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Chemistry and
Natural Science Education of the Educational Institution "Vitebsk State University
named after P.M. Masherov", Vitebsk, Belarus
chir@tut.by*

*The article presents data on the molecular-structural homology of 5 lysosomal enzymes in a mollusk (*Biomphalaria glabrata*), a mouse (*Mus musculus*) and a pig (*Sus scrofa domesticus*) in relation to humans (*Homo sapiens*). The results of the work make it possible to recommend the studied animals as model organisms for studying the possibility of obtaining drugs for substitution therapy and using these organisms at the preclinical stages of analyzing the effectiveness of substances for controlling the cellular molecules catabolism.*

Key words: *model organisms; peroxiredoxin-6; palmitoyl-protein thioesterase 1; sulphohydrolase; N-acetylglucosamine-6-sulfatase; N-acetylgalactosamine-6-sulfatase; phosphorylase*

Введение. Лизосомы — это одномембранные органеллы, содержащие гидролитические ферменты, способные разрушать многие виды биомолекул. В содержимом лизосом поддерживается значение pH ~4,5–5,0, что оптимально для ферментов, участвующих в гидролитическом распаде молекул. Помимо деградации полимеров, лизосомы участвуют в различных клеточных процессах, включая секрецию, восстановление плазматической мембраны, апоптоз, передачу клеточных сигналов и энергетический метаболизм [1,2]. Поэтому лизосомы представляют интерес как объекты, из которых могут быть выделены ферменты для заместительной терапии, а также клетки, содержащие лизосомы (практически все типы кроме эритроцитов) могут использоваться для тестирования биологически активных субстанций в доклинических испытаниях. При этом актуальной задачей является подбор клеточных систем и модельных организмов, обладающих лизосомальными ферментами, близкими по строению и функциям к аналогичным ферментам человека.

При использовании баз данных ExplorEnz - The Enzyme Database, IUBMB Enzyme Nomenclature, ExPASy - ENZYME nomenclature database, BRENDA, the Enzyme Database, KEEG Enzyme были отобраны 5 ферментов, участвующих в распаде различных биополимеров: Peroxiredoxin-6 (EC: 1.11.1.27), Palmitoyl-protein thioesterase 1 (EC: 3.1.2.22), Sulphohydrolase (EC: 3.10.1.1), N-acetylglucosamine-6-sulfatase (EC: 3.1.6.14) и Phosphorylase (EC: 2.4.1.1). Пероксиредоксин-6 является тиол-специфической пероксидазой, которая катализирует восстановление пероксида водорода и органических гидропероксидов до воды и спиртов, соответственно. Кроме того, может восстанавливать короткоцепочечные гидропероксиды органических, жирных кислот и фосфолипидов, обладает фосфолипазной активностью. Эти активности зависят от связывания с фосфолипидами при кислом pH (лизосомы) и с окисленными фосфолипидами при цитозольном значении pH. Участвует в защите клеток от окислительного стресса путем детоксикации пероксидов и в гомеостазе фосфолипидов [3]. Пальмитоилпротеингидролаза/тиоэстераза - это фермент, который удаляет ацильные группы (пальмитат и др.), связанные с остатками цистеина в белках или пептидах во время лизосомальной деградации. Этот фермент катализирует реакцию: пальмитоил[белок] + H₂O ⇌ пальмитат + белок. Эти ферменты принадлежат к семейству гидролаз, в частности тех, которые действуют на тиоэфирные связи. Систематическое название этого класса ферментов - пальмитоил[протеин] гидролаза. Другие широко используемые названия включают пальмитоил-протеинтиоэстеразу и пальмитоил-(протеин) гидролазу. Эти ферменты участвуют также в удлинении жирных кислот в митохондриях [4,5]. Сульфогидролаза катализирует реакцию N-сульфо-D-глюкозамин + H₂O → D-глюкозамин + сульфат. N-

ацетилглюкозамин-6-сульфатаза катализирует реакцию N-ацетил-D-глюкозамин-сульфат + H₂O → N-ацетил-D-глюкозамин + сульфат. Кроме того, фермент осуществляет гидролиз 6-сульфатных групп N-ацетил-D-глюкозамин 6-сульфатных звеньев гепарансульфата и кератансульфата и относится к классу гидролаз, расщепляющих связи сера-азот [8, 9]. Гликогенфосфорилаза - один из ферментов семейства фосфорилазы (EC 2.4.1.1). Гликогенфосфорилаза катализирует лимитирующую стадию гликогенолиза у животных, высвобождая глюкозо-1-фосфат из концевой альфа-1,4-гликозидной связи: (α-1,4-гликогенная цепь)_n + P_i ⇌ (α-1,4-гликогенная цепь)_{n-1} + α-D-глюкозо-1-фосфат. В гликогене остается на одну молекулу глюкозы меньше, а свободная молекула глюкозы находится в форме глюкозо-1-фосфата. Чтобы использовать его для метаболизма, он должен быть преобразован в глюкозо-6-фосфат ферментом фосфоглюкомутазой. Хотя реакция обратима *in vitro*, внутри клетки фермент работает только в прямом направлении, поскольку концентрация неорганического фосфата намного выше, чем концентрация глюкозо-1-фосфата [10].

Цель работы – выявить процент идентичности (молекулярно-структурной гомологии) лизосомальных ферментов у моллюска (*Biomphalaria glabrata*), мыши (*Mus musculus*) и свиньи (*Sus scrofa domestica*) по отношению к человеку (*Homo sapiens*).

Материал и методы. Поиск и отбор нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки человека, осуществлялся на сервере <https://www.ensembl.org>; поиск гомологичных последовательностей для моллюсков и млекопитающих осуществлялся на сервере <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> при помощи ресурса BLAST; описание белков для человека было взято с ресурса <https://www.uniprot.org>; парное выравнивание и сравнение последовательностей человека и моллюсков выполнено в программе MEGA 5.2.; построение 3D-структур ферментов для моллюсков осуществлялось на сервере <https://swissmodel.expasy.org> по шаблону 3D-структуры ферментов человека и млекопитающих, найденных в банке данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот <http://www.rcsb.org>. В работе использован следующий алгоритм: поиск нуклеотидной последовательности → построение аминокислотных последовательностей сравниваемых белков → их парное выравнивание и оценка степени гомологии первичных структур NS (нуклеотидные последовательности) AAS (аминокислотные последовательности) → оценка третичных структур по архитектуре молекул и их доменной организации [11]. Исследование мотивов и строения активных центров ферментов не входило в задачи данной работы.

Результаты и их обсуждение. Предварительно была исследована молекулярно-структурная гомология катаболических ферментов человека и свиньи. Ферменты этих млекопитающих хорошо изучены, о чем свидетельствует высокий процент покрытия как по нуклеотидным последовательностям (94-100%), так и по аминокислотным последовательностям (96-100%). Гомология

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

изученных ферментов по нуклеотидным последовательностям ожидаемо оказалась в пределах 93,3-85,1%, а по аминокислотным последовательностям – в пределах 93,3-87,8%. Полученные данные доказывают, что свинья является наилучшим модельным организмом для человека, однако эти животные дороги по стоимости и условиям содержания.

Поэтому был проведен сравнительный анализ катаболических ферментов человека и общепринятого модельного организма – мыши (*Mus musculus*). При сравнении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей исследованных ферментов человека и мыши выявлен высокий процент покрытия – 92-100%. Это характеризует высокую частоту использования мыши в качестве модельного организма. Гомология изученных ферментов по нуклеотидным последовательностям оказалась в пределах 93,3-82,7%, а по аминокислотным последовательностям – в пределах 94,7-85,6%. Полученные данные доказывают, что мышь также является адекватным модельным организмом для человека, однако по этическим соображениям и стоимости широкое использование высших млекопитающих во всем мире постепенно сокращается. Поэтому актуальным остается поиск более простых и доступных организмов, но имеющих достаточно высокую гомологию ферментов с аналогичными ферментами человека. Кандидатами на такую роль выступают легочные пресноводные моллюски, в частности *Biomphalaria glabrata*, геном которого аннотирован, и который является ближайшим родственным видом, распространенного моллюска в Республике Беларусь *Planorbarius corneus* (таблица 1).

Таблица 1. – Сравнительный биоинформатический анализ катаболических ферментов человека и моллюска *Biomphalaria glabrata*

Ферменты	Человек - моллюск		
	Тип последовательности	Покрытие	Гомология
Пероксиредоксин-б	NS	97%	66,67%
	AAS	97%	66,67%
Пальмитоил-протеинтиоэстераза 1	NS	89%	61,45%
	AAS	89%	61,45%
Сульфогидролаза	NS	94%	56,94%
	AAS	98%	56,84%
N-ацетилглюкозамин-б-сульфатаза	NS	51%	58,19%
	AAS	52%	57,93%
Фосфорилаза	NS	80%	69,59%
	AAS	80%	73,10%

При сравнении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей исследованных ферментов человека и моллюска обнаружен более низкий процент покрытия (по нуклеотидным последовательностям 97-51%, по

аминокислотным последовательностям 97-52%), причем нижний предел покрытия характерен только для одного фермента N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазы. Для остальных ферментов процент покрытия от 80% до 97%. Молекулярно-структурная гомология ферментов по нуклеотидным последовательностям составила 69,6-56,9%, а по аминокислотным последовательностям 73,1-56,8%. Наиболее высокая гомология отмечена для пероксиредоксина-6, пальмитоил-протеинтиоэстераза 1 и фосфорилазы.

Заключение. Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что моллюск *Biomphalaria glabrata* также, как мышь и свинья, может выполнять роль модельного организма при изучении катаболизма молекул в лизосомах человека.

Список литературы

1. Ohkuma, S. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents / S. Ohkuma, B. Poole // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1978. – Vol. 75 (7). – P. 3327–3331.
2. Settembre, C. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism / C. Settembre [et al.] // Nature Reviews Molecular Cell Biology. - 2013. – Vol. 14 (5). – P. 283–296.
3. Manevich, Y. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with Pi GST / Y. Manevich, S.I. Feinstein, A.B. Fisher // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol.101. – P. 3780-3785.
4. Camp, L.A. Assay and isolation of palmitoyl-protein thioesterase from bovine brain using palmitoylated H-Ras as substrate / L.A. Camp, S.L. Hofmann // Methods Enzymol. 1995. – Vol. 250. – P. 336-475.
5. Verkruyse, L.A. Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase / L.A. Verkruyse, S.L. Hofmann // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271. – P. 15831-15836.
6. Dietrich, C.P. Enzymic degradation of heparin. A sulphamidase and a sulphoesterase from *Flavobacterium heparinum* / C.P. Dietrich // Biochem. J. – 1969. – Vol. 111. – P. :91-95.
7. Mahuran, D. A rapid four column purification of 2-deoxy-D-glucoside-2-sulphamate sulphohydrolase from human liver / D. Mahuran, P. Clements, J. Hopwood // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – Vol. 757. – P. 359-365.
8. Basner, R. N-Acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase from human urine / R. Basner, H. Kresse, K.von Figura // J. Biol. Chem. – 1979. – Vol. 254. – P. 1151-1158.
9. Weissmann, B. A glucosamine O,N-disulfate O-sulfohydrolase with a probable role in mammalian catabolism of heparan sulfate / B. Weissmann, H. Chao, P. Chow // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980. - Vol. 97. – P. 827-833.
10. Fischer, E.H. The structure, function and control of glycogen phosphorylase / E.H. Fischer, A. Pocker, J.C. Saari // In: Campbell, P.N. and Greville, G.D. (Eds.), Essays in Biochemistry. – 1970: Academic Press, London and New York. - Vol. 6, - P. 23-68.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

11. Чиркин, А.А. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции / А.А. Чиркин [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хим. навук. – 2021. – Т. №. 57, №.2– С. 206-221.