

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФЕРМЕНТА CATHEPSIN A ЧЕЛОВЕКА И МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Пинчук Полина Юрьевна

Магистрант кафедры химии и естественнонаучного образования учреждения образования «Витебский государственный университет имени

П.М. Машерова», г. Витебск

polina_mileeva@mail.ru

Чиркин Александр Александрович

д. б. н., профессор кафедры химии и естественнонаучного образования учреждения образования «Витебский государственный университет имени

П.М. Машерова», г. Витебск

chir@tut.by

*Цель данной работы заключается в сравнении аминокислотных последовательностей и поиске сайтов связывания в третичной структуре фермента Cathepsin A (CTSA) у мыши (*Mus musculus*), свиньи (*Sus scrofa*), курицы (*Gallus gallus domesticus*), данио-рерио (*Danio rerio*) и моллюска (*Biomphalaria glabrata*) по отношению к человеку (*Homo sapiens*). Результаты работы позволяют рекомендовать изученных животных в качестве модельных организмов для изучения фермента Cathepsin A в биофармацевтических и биомедицинских исследованиях протеолиза.*

Ключевые слова: *катепсин А; модельные организмы; биоинформатика; ранг; clustalX.*

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THE CATHEPSIN A ENZYME OF HUMAN AND MODEL ORGANISMS

Pinchuk Polina Yurievna

Master student of the Department of Chemistry and Natural Science Education of the educational establishment "Vitebsk State University named after P.M.

Masherov", Vitebsk

polina_mileeva@mail.ru

Chirkin Alexandr Alexandrovich

Dr.B.Sc., Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education of the Educational Institution "Vitebsk State University named after P.M.

Masherov", Vitebsk

chir@tut.by

*The purpose of this work is to compare amino acid sequences and search for binding sites in the tertiary structure of the Cathepsin A (CTSA) enzyme in mice (*Mus musculus*), pigs (*Sus scrofa*), chickens (*Gallus gallus domesticus*), zebrafish (*Danio rerio*) and shellfish. (*Biomphalaria glabrata*) in relation to humans (*Homo sapiens*). The results of the work allow us to recommend the studied animals as model organisms*

for studying the Cathepsin A enzyme in biopharmaceutical and biomedical studies of proteolysis.

Keywords: *cathepsin A; model organisms; bioinformatics; rank; ClustalX.*

Введение. Катепсины являются наиболее распространенными лизосомальными протеазами. Современные исследования раскрыли многие разносторонние функции катепсинов в лизосомах. Тем не менее, внеклеточные катепсины в основном активируются при патологических состояниях и вовлечены в широкий спектр заболеваний, включая рак и сердечно-сосудистые заболевания. Воспользовавшись дифференциальной экспрессией катепсинов при патологических состояниях многие исследования сосредоточены на использовании катепсинов в качестве диагностических маркеров и терапевтических мишеней.

Катепсин А представляет собой многофункциональный лизосомальный белок, который действует как карбоксипептидаза и образует комплексы с гликозидазами при рН от 4,5 до 5,5. Он проявляет амидазную и эстеразную активность при рН 7,0 [1]. Одна молекула катепсина А состоит из 438 аминокислотных остатков, собранных в две субъединицы – кортикальную и апикальную с молекулярными массами 32 кДа (Ala1-Arg284) и 20 кДа (Met285-Tyr438), соответственно.

Наследственный дефицит или точечные мутации в аминокислотной последовательности катепсина А (Q21R, S23Y, W37R, S61L, V104M, L208P, Y221N, Y351C, M365T, G389S, F398V) ингибируют образование димерных форм и комплексов с гликозидазами [2]. Деграция и инактивация β -галактозидазы и нейраминидазы отражаются вторичным дефицитом этих ферментов, что приводит к накоплению галактозаминогликанов и сиалогликосахаридов и, как следствие, к болезням накопления – мукополисахаридозу IV типа и галактосиалидозу [3].

Для изучения активности лизосомального фермента используют модельные организмы (мыши, свиньи, обезьяны). Однако из-за этических причин и дороговизны их применение сокращается. В то же время эксперименты на клеточных культурах не решают многие проблемы межклеточного взаимодействия в тканях организма, требуют специального оборудования, реагентов и специалистов морфологов.

Для достижения поставленной цели используется следующий алгоритм: поиск аминокислотных последовательностей → их парное выравнивание и оценка степени гомологии первичных структур → расчёт коэффициента схожести двух последовательностей → расчёт ранга для каждого параметра → поиск 3D-модели белка человека → сравнение 3D-моделей фермента модельных организмов → поиск активного сайта и лагиндов.

Поиск аминокислотных последовательностей осуществлялся на сервере UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Парное выравнивание первичных структур осуществлялась в программе ClustalX. Расчёт коэффициента схожести осуществлялся в этой же программе. Оценка степени гомологии первичных структур производилась на сайте BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для этого загружали аминокислотную последовательность в FASTA-формате человека и исследуемого животного. Полученные данные заносили в таблицу документа Microsoft Excel и рассчитали ранги для каждого параметра. Поиск 3D-модели белка человека осуществлялась на сайте RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>). Сравнение 3D-моделей фермента катепсин А модельных организмов осуществлялся с помощью ресурса SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Поиск активного сайта и лигандов был выполнен с помощью этого же ресурса.

Результаты и их обсуждение

Полученные материалы позволяют положительно решить вопрос об использовании тканей мыши, свиньи, курицы, данио-рерио и легочных пресноводных моллюсков для моделирования патологических процессов человека, связанных с нарушениями системы протеолиза. Кроме того, из тканей высших млекопитающих и моллюсков доступно выделение фермента катепсин А, который может найти применение в фармакодинамических исследованиях регуляторов протеолиза и заместительной терапии.

Таблица 1 – Оценка гомологии первичных аминокислотных последовательностей фермента Cathepsin A с использованием ресурса BLAST

Организмы	BLAST					Clustal
	Score	Query cover	Expected value	Identities	Positives	
<i>Mus musculus</i>	2208	95%	0.0	88%	93%	0,12447
<i>Sus scrofa</i>	2261	95%	0.0	90%	95%	0,10692
<i>Gallus gallus domesticus</i>	1690	93%	0.0	68%	80%	0,32692
<i>Danio rerio</i>	1606	94%	0.0	64%	78%	0,36966
<i>Biomphalaria glabrata</i>	1315	98%	0.0	53%	69%	0,42685

Результат биоинформатического анализа первичных аминокислотных последовательностей фермента Cathepsin A человека и других модельных организмов с использованием ресурса BLAST представлен в таблице 1.

В результате биоинформатического анализа оказалось, что наиболее высокий процент гомологии характерен для мыши и свиньи – 88% и 90%, соответственно. Для курицы, рыбы и моллюска характерен средний уровень гомологии – 68%, 64% и 53%, соответственно. Данные можно считать

достоверными, так как процент покрытия запроса колеблется в промежутке 93-98%, что является достаточно высоким показателем.

Таблица 2 – Оценка рангов данных параметров

Организмы	Ранги				
	Score	Query cover	Expected value	Identities	Positives
1	2	3	4	5	6
<i>Mus musculus</i>	2	2	1	2	2
<i>Sus scrofa</i>	1	2	1	1	1
<i>Gallus gallus domesticus</i>	3	5	1	3	3
<i>Danio rerio</i>	4	4	1	4	4
<i>Biomphalaria glabrata</i>	5	1	1	5	5

Результат статистического анализа с расчётом ранга каждого параметра отображён в таблице 2. По результатам статистического анализа организмом с самым низким рангом и тем самым с наибольшей степенью гомологии оказалась свинья (ранг равен 1). Организм, имеющий наименьшую степень гомологии – *Biomphalaria glabrata* (ранг равен 5).

Результаты поиска сайтов связывания и лигандов приведены в таблице 3.

В результате поиска активных сайтов у модельных организмов большое количество совпадений было найдено у курицы и данио-рерио: Glu166, Asn72, Gly73, Gly74, Gys77, Ser167, His448 и Met449. У человека и моллюска 2 сайта связывания находятся рядом: у человека Asp462 и Met458, у моллюска Asp463 и Met459.

Заключение. Полученные данные доказывают, что мышь и свинья являются адекватными модельными организмами для человека. Однако близкое нахождение активных центров было найдено только с моллюском *Biomphalaria glabrata*, который является близким родственником с катушкой роговой *Planorbarius corneus*, обитающей в пресных водоёмах Беларуси. Сравнительный анализ первичных аминокислотных последовательностей фермента Cathepsin A у человека и *Biomphalaria glabrata* показал средний процент гомологии – 57,91%, с высоким процентом покрытия – 95%, также совпало и 2 связывающих лиганда – ацетат-ион (ACT) и глицерол (GOL). Следовательно, моллюск *Biomphalaria glabrata* может быть использован для изучения фермента Cathepsin A: анализ действия ингибиторов, активаторов, антиметаболитов, а также роли в системе протеолиза при фармакодинамических и биомедицинских исследованиях.

Таблица 3 – Активные сайты и лиганды модельных организмов

Вид	Активные сайты	Лиганды
<i>Homo sapiens</i>	Tyr211; Arg372; Arg375 Asn83; Gly84; Glu177	2×ACT
	Pro114; Leu465; Phe468	1×DMS
	Asn273; Tyr275; Asn276; Gly456; His457; Met458; Asp462 Ser210; Glu212; Gln213; Ser376; Asn378; Phe411; Ser414	2×GOL
	Pro105; Asp106; Thr339	1×NAG
	Gln422; Arg423; Lys442	1×SO ₄
<i>Mus musculus</i>	Asn96; Gly97; Gly98; Cys101; Glu190; Ser191	1×ACT
	Asn286; Tyr288; Asn289; His469; Met470; Asp474	1×GOL
	Ser223; Glu.225; Cln226; Ser388; Asn390; Phe423; Ser426	1×SO ₄
<i>Sus scrofa</i>	Asn98; Gly.99; Gly100; Cys103; Glu192; Ser193; His472	1×ACT
	Asn288; Tyr290; Asn291; Gly471, His472; Met473; Asp477	1×GOL
	Pro120; Asp121; Thr354	1×NAG
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Asn72; Gly73; Gly74; Cys77; Glu166; Ser167; His448	1×SO ₄
	Asn262; Tyr264; Asn265; Gly447; His448; Met449; Asp453	1×GOL
<i>Danio rerio</i>	Asn72; Gly73; Gly74; Cys77; Glu166; Ser167; His448.	1×ACT
	Asn262; Tyr264; Asn265; Gly447; His448; Met449; Asp453	1×GOL
	Cln414; Arg415; Lys433	1×SO ₄
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Asn75; Gly76; Gly77; Cys80; Glu169; Ser170; His458	1×ACT
	Asn270; Tyr272; Asn273; Gly457; His458; Met459; Asp463	1×GOL

Список литературы

1. A.V. Pshezhetsky, Lysosomal carboxypeptidase A / A.V. Pshezhetsky [et al.] // Hand-book of Proteolytic Enzymes. – 1998. – №2. – P. 1923–1929.
2. M. Shimoyo, Protective protein gene mutations in galactosialidosis / M. Shimoyo [et al.] // J Clin Invest. – 1993. - №91. – P.2393–2398.
3. J. Tranchemontagne, lysosomal carboxypeptidase activity in galactosialidosis / J. Tranchemontagne [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 1990. - №168. – P. 22–29.