

МОЛЕКУЛЯРНО-СТРУКТУРНАЯ ГОМОЛОГИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ ЧЕЛОВЕКА И МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

П.Ю. Пинчук, А.А. Чиркин
Витебск, ВГУ имени П.М. Машерова

В биохимии и молекулярной биологии сайт связывания – это участок молекулы белка, который специфично связывается с другой молекулой (лигандом). Связывание молекулы фермента с субстратом в сайте связывания может быть обратимым и необратимым. Ферменты обеспечивают катализ, поскольку более прочно связываются с переходными состояниями, чем субстраты и продукты. Связывание ферментов с субстратами определяет термодинамически выгодное для протекания реакции взаимное расположение функциональных групп молекул субстрата, что препятствует побочным реакциям. Известны 7 типов ферментов, способных катализировать ферментативные реакции живых организмов: оксидоредуктазы (КФ1), трансферазы (КФ2), гидролазы (КФ3), лиазы (КФ4), изомеразы (КФ5), лигазы (КФ6), транслоказы (КФ7). В энзимологии выделяют понятие активный центр – это область фермента, где молекулы субстрата связываются и подвергаются химической реакции. Его формируют аминокислотные остатки, которые образуют временные связи с субстратом (сайт связывания), и остатки, которые катализируют превращения этого субстрата (каталитический сайт). Сайты связывания бывают одноцепочечными, образованными одной полипептидной цепью и многоцепочечными, которые связывают более одной белковой цепи, как правило, на границах раздела белков или рядом с ними. Структура сайтов связывания играет важную роль в эволюции живых организмов. Известны также скрытые сайты связывания, которые временно образуются в форме «апо» или индуцируются связыванием лиганда (субстрата). Учет таких сайтов увеличивает размер протеома человека, способного реагировать на эволюционные, геномные и эпигеномные влияния. Сайты связывания исследуют с помощью: метода опорных векторов и баз данных «CryptoSite» [1].

Целью работы был сравнительный анализ методами биоинформатики молекулярно-структурной гомологии ферментов обмена углеводов, играющих важнейшую роль в обеспечении биоэнергетики живых организмов, у модельных организмов (представителей беспозвоночных и млекопитающих) по сравнению с человеком.

Материал и методы. Проведен анализ ферментов обмена углеводов у человека (*Homo sapiens*), лабораторной крысы (*Rattus norvegicus*) и легочного пресноводного моллюска (*Biomphalaria glabata*, с полностью аннотированным геномом) и ближайшего родственника, обитающего в поверхностных водах Республики Беларусь легочного пресноводного моллюска, катушка роговая (*Planorbarius corneus*). Для изучения процесса гликолиза использовали аминокислотные и нуклеотидные последовательности 12 ферментов: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ЕС:1.2.1.12), гексокиназа (ЕС:2.7.1.1), глюкокиназа (ЕС:2.7.1.2) (не специфичный для моллюска фермент), фосфофруктокиназа (ЕС:2.7.1.11), пируваткиназа (ЕС:2.7.1.40), АДФ-зависимая глюкокиназа (ЕС:2.7.1.147), фосфоглицераткиназа (ЕС:2.7.2.3), альдолаза (ЕС:4.1.2.13), энолаза (ЕС:4.2.1.11), триозофосфатизомераза-1 (ЕС:5.3.1.1), глюкозо-6-фосфат изомераза (ЕС:5.3.1.9), фосфоглицератмутаза (ЕС:5.4.2.11). Белковые последовательности 12 ферментов были взяты из базы данных KEGG. Поиск гомологичных аминокислот у крысы и моллюска, а также поиск нуклеотидных последовательностей и их сравнение было выполнено в программе BLAST с помощью инструментов Tblastn. Выравнивание и определение процента схожести аминокислотных последовательностей был выполнен с помощью инструмента EMBOSSNeedle с использованием матрицы BLOSUM62.

После выравнивания и сравнения белковых последовательностей в программе SWISS-MODEL были построены третичные структуры белков. В программе PyMol были определены сайты связывания ферментов.

Результаты и их обсуждение. Сходства первичных структур ферментов, участвующих в процессе гликолиза, по сравнению с человеком для крысы находилось в пределах от 93,9% до 98,7% по аминокислотным последовательностям и от 81,2% до 90,3% по нуклеотидным последовательностям. Для моллюска биомфалария глабрата сходство по аминокислотным последовательностям составило от 31,9% до 84,7%, по нуклеотидным последовательностям – от 29,6% до 68,6%. Все полученные данные приведены в таблице.

Таблица – Сходство первичных структур ферментов углеводного обмена у модельных организмов

Название фермента	<i>Rattus norvegicus</i>		<i>Biomphalaria glabrata</i>	
	Аминокислотные последовательности, %	Нуклеотидные последовательности, %	Аминокислотные последовательности, %	Нуклеотидные последовательности, %
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	96,7	89,1	71,9	57,4
Гексокиназа	95,1	85,8	31,9	29,6
Глюкокиназа	96,3	88,4	-	-
Фосфофруктокиназа	96,5	87,3	44,8	43,8
Пируваткиназа	97,6	90,3	63,6	52,6
АДФ-зависимая глюкокиназа	95,8	89,0	59,4	51,1
Фосфоглицераткиназа	96,1	89,0	84,6	68,0
Альдолаза	98,7	90,0	69,6	58,6
Энолаза	93,9	81,2	84,7	68,6
Триозофосфатизомераза-1	96,4	88,5	57,9	54,0
Глюкозо-6-фосфат изомераза	94,4	86,1	78,7	62,4
Фосфоглицератмутаза	98,0	89,3	76,3	57,7

Как известно, в ходе эволюции скорости изменения аминокислотных последовательностей белков меняются быстрее, чем их структуры. Однако, информацию о структурных особенностях организации схожих ферментов можно получить путём сравнительного биоинформатического анализа не полноразмерных пространственных структур, а активных центров и сайтов связывания [2]. При построении третичных структур ферментов, у некоторых из них сайты связывания не сохранились: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, фосфофруктокиназа, триозофосфатизомераза 1 (только у моллюска); цитохром P450 (у крысы и моллюска); АДФ-зависимая глюкокиназа, глюкозо-6-фосфат изомераза, альдегиддегидрогеназа (человек, крыса, моллюск). У остальных ферментов (в зависимости от количества их изоформ) было обнаружено несколько участков цепей с активным центром и сайтами связывания, аминокислотные последовательности которых совпадали полностью или с некоторым сдвигом. Остановимся на каждом ферменте подробнее:

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа – в цепи обнаружено 23 активных сайта, 20 из которых совпадает с активными сайтами фермента крысы, но со сдвигом вперёд на две позиции. Активные сайты Phe11, Ile38 и Glu317 у крысы не найдены.

Гексокиназа – у человека и моллюска было обнаружено 29 активных сайтов, которые совпали. Со сдвигом вперёд у моллюска выявлено совпадение с активными сайтами человека в 27 случаях из 29. Не обнаружены активные сайты Ser88 и Lys418 для *Biomphalaria glabrata*. У человека и крысы совпали только 25 активных сайта без смещения. Сайты Pro157, Thr210 и Lys418 у крысы не найдены.

Глюкокиназа – не специфичный для моллюска фермент. У человека найдено 14 активных центра, которые совпадают с активными центрами крысы, причем 3 из них со сдвигом вперёд у человека – Glu256, Gln287, Glu290. По всей видимости у легочного пресноводного моллюска отсутствуют ферменты, вводящие в обмен веществ высокие концентрации циркулирующей глюкозы.

Фосфофруктокиназа – обнаружено полное совпадение 41 активного сайта у человека и крысы. У моллюска сайт связывания при построении третичной структуры не сохранился.

Пируваткиназа – 20 совпадений активных сайтов у человека и крысы. Найдены также два совпавших активных сайта у человека, крысы и моллюска, но с большим сдвигом: Arg489 и Gly514 – человек и крыса, у моллюска – Arg459 и Gly460.

Фосфоглицераткиназа – 28 активных сайтов у человека такие же, как и у крысы. Из них 9 встречаются у моллюска со сдвигом назад на три позиции – Asp21, Asn23, Arg36, His60, Arg63, Arg119, Gly163, Thr164 и Arg167.

Альдолаза – выявлены 8 активных сайтов у человека, которые совпадают с активными сайтами моллюска, причем 1 из них одинаково локализован – Lys108, остальные со сдвигом вперёд у человека. Кроме того, 11 активных сайтов человека полностью совпадают с активными сайтами крысы.

Энолаза – 5 активных сайтов совпадают у человека и крысы: Asp245, Glu293, Asp318, Lys343, Lys394. В то же время 11 активных сайтов полностью совпадают у человека и моллюска и 4 сайта – со сдвигом вперёд у человека: Gln166, Glu167, Glu210, Asp245.

Триозофосфатизомераза 1 – совпадение обнаружено только по одному активному сайту у человека и крысы со сдвигом вперёд – Gln224. У моллюска сайт связывания не сохранился.

Фосфоглицератмутаза – обнаружен 21 сайт полного совпадения связывания у всех трёх организмов. У человека и крысы полное совпадение, у человека и моллюска идёт сдвиг на одну позицию у моллюска.

Заключение. Полученные данные позволяют сделать заключение, что у исследованных модельных организмов достаточно высокая степень структурно-функциональной схожести, что особенно подтверждается при анализе ферментов гликолиза. По всей видимости компоненты общего пути катаболизма освобождения энергии функционируют однотипно у большинства живых организмов.

Исследование выполнено в рамках задания «Оценка состояния водных экосистем Белорусского Поозерья в условиях изменения климата и техногенного воздействия», подпрограммы 3 «Радиация и биологические системы» на 2021–2025 годы.

1. Биологическая химия: учебник / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, В.В. Хрусталеv. – Минск: Вышэйшая школа. – 2023. – 487 с.

2. Суплатов, Д.А. Сравнительный биоинформатический анализ структур активных центров эволюционно удаленных гомологов суперсемейства ферментов α,β -гидролаз / Д.А. Суплатов, В.К. Аржаник, В.К. Швядас // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2011. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitelnyy-bioinformaticheskiy-analiz-struktur-aktivnyh-tsentrov-evolyutsionno-udalennyh-gomologov-supersemeystva-fermentov-a-v> (дата обращения: 10.12.2023).