

УДК 577.150.2

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЕРВИЧНЫХ СТРУКТУР
ГЛЮКОАМИЛАЗ ИЗ ASPERGILLUS AWAMORI
И SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Кожокина О.М.¹, Ковалева Т.А.²

¹ГОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия
им. Н.Н. Бурденко» Росздрава

²ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

С помощью программы Gene Vee на основе результатов секвенирования осуществлено сравнение первичных структур глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* и *Saccharomyces cerevisiae*. Получена оценка степени их гомологичности; подтверждена вероятность участия остатков Asp, Glu, Trp в катализе реакции гидролиза крахмала.

Ключевые слова: глюкоамилаза, первичная структура, сравнительный анализ, гомологичность.

Исследование свойств глюкоамилаз различного происхождения приобретает особую значимость в связи с применением их в различных отраслях промышленности в роли биокатализаторов. Поиск путей регулирования биокаталитической активности ферментов неразрывно связан с расшифровкой закономерностей и молекулярного механизма катализа реакции гидролиза субстрата. Для решения данной задачи, наряду с определением функциональных свойств энзимов, необходимо проведение их структурного анализа.

Для выявления константных областей аминокислотных последовательностей ферментов с помощью программы Gene Vee (<http://www.genebee.msu.ru/genebee.html>)

осуществлено сравнение сиквенсов субъединицы глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* X100 и молекулы глюкоамилазы из *Saccharomyces cerevisiae*, размещенных в INTERNET National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) и Protein Brookhaven Database (<http://www.rcsb.org>).

Сравнительный анализ первичных структур глюкоамилаз из *Asp. awamori* и *S. cerevisiae* показал их гомологичность на 13,1%. Наиболее часто на протяжении рассматриваемых полипептидных цепей наблюдаются корреляции одиночных гомологичных остатков; встречаемость гомологичных дуплетов и триплетов гораздо ниже (табл. 1).

Таблица 1

Частота встречаемости гомологичных аминокислотных остатков
в первичных структурах глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* и *Saccharomyces cerevisiae*

Аминокислота	Частота встречаемости	Аминокислота	Частота встречаемости
аланин	11	триптофан	4
валин	8	аспарагин	-
лейцин	4	глутамин	2
изолейцин	-	серин	47
глицин	5	треонин	36
пролин	12	лизин	1
цистеин	2	аргинин	-
метионин	-	гистидин	-
аспарагиновая кислота	8	глутаминовая кислота	7
фенилаланин	-	тирозин	2

Из табл. 1 видно, что основное количество гомологичных звеньев представ-

лено остатками Ser и Thr. Данные аминокислоты являются гидроксилсодержащими

и ответственны за активное взаимодействие белковой макромолекулы с молекулами воды, обеспечивая хорошую растворимость фермента. Кроме того, Ser и Thr способны к образованию эфиров фосфорной и органических кислот и служат местом присоединения углеводных компонентов в гликопротеидах [1, 3].

Наличие значительного числа гомологичных остатков Asp и Glu, а также Trp позволяет предположить участие данных аминокислот в катализе реакции гидролиза крахмала, осуществляемом глюкоамилазами как плесневого, так и дрожжевого происхождения [1, 3].

В табл. 2 представлен полный аминокислотный состав глюкоамилаз из Asp.

awamori и *S. cerevisiae*. Анализ аминокислотного состава глюкоамилаз различного происхождения показал высокую устойчивость фермента из Asp. awamori к органическим растворителям, одна субъединица которого содержит 27,15% остатков с алкильными боковыми цепями (Ala, Val, Leu, Ile, Met); для молекулы глюкоамилазы из *S. cerevisiae* данная величина составляет лишь 17,65%. Большое количество остатков Ser и Thr (для субъединицы молекулы глюкоамилазы из Asp. awamori 14% и 12% соответственно, для целой молекулы из *S. cerevisiae* – 25,7% и 25,32%) обеспечивает гилратацию белковой глобулы вследствие образования системы водородных связей.

Таблица 2

Аминокислотный состав глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* и *Saccharomyces cerevisiae*

Аминокислота	<i>Aspergillus awamori</i> (субъединица)		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	количество	% от общего числа	количество	% от общего числа
аланин	59	9,59	85	6,33
валин	39	6,34	94	7
лейцин	43	7	22	1,64
изолейцин	25	4,07	32	2,38
глицин	47	7,64	43	3,2
пролин	24	3,9	141	10,5
цистеин	9	1,46	20	1,49
метионин	1	0,16	4	0,3
гистидин	5	0,81	5	0,37
фенилаланин	21	3,41	14	1,04
тирозин	27	4,39	22	1,64
триптофан	19	3,09	8	0,6
аспарагин	21	3,41	35	2,61
глутамин	17	2,76	19	1,41
серин	86	13,98	345	25,69
треонин	73	11,87	340	25,32
лизин	12	1,95	30	2,23
аргинин	18	2,93	1	0,07
аспарагиновая кислота	44	7,15	14	1,04
глутаминовая кислота	25	4,07	69	5,14
Общее число	615		1343	

Из табл. 2 видно, что в состав субъединицы молекулы глюкоамилазы из Asp. awamori входят 9 остатков цистеина, SH-группы которых образуют 3 дисульфидных мостика и свободную тиольную группу в каталитическом домене и 1 S-S связь в крахмалсвязывающем участке. В молекуле энзима из *S. cerevisiae* имеется 20 Cys (по 10 на каждую субъединицу). Однако,

возможно не все остатки Cys участвуют в образовании дисульфидных связей. Вероятно, число S-S мостиков в расчете на одну субъединицу составляет не более трех [2, 4-6].

Обнаружено, что количество остатков Asp, Glu в молекуле глюкоамилазы из Asp. awamori в 4 раза превышает данную

величину для фермента дрожжевого происхождения.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлена гомологичность первичных структур глюкоамилаз из *Asp. awamori* и *S. cerevisiae* на ~13%. Обнаружена высокая степень корреляции одиночных аминокислотных остатков. Выявлено, что основное количество гомологичных звеньев представлено остатками Ser и Thr, обеспечивающих хорошую гидратацию ферментов и служащих местами присоединения углеводных компонентов в гликопротеидах. Наличие значительного числа гомологичных остатков Asp и Glu, а также Trp позволяет предположить участие данных аминокислот в катализе реакции гидролиза крахмала, осуществляемом

глюкоамилазами как плесневого, так и дрожжевого происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Галич И.П. Амилазы микроорганизмов. Киев: Наук. думка, 1987. 192 с.
2. Кантор Ч. Биофизическая химия. М.: Мир, 1984. Т. 1. 336 с.
3. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. Тбилиси: Мецниереба, 1984. 154 с.
4. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. М.: Наука, 1992. 358 с.
5. Шерман С.А. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. Минск: Наука и техника, 1989. 240 с.
6. Шульц Г. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982. 360 с.

COMPARATIVE ANALYSIS OF PRIMERY STRUCTURE OF GLUCOAMYLASES FROM ASPERGILLUS AWAMORI AND SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Kozhokina O.M.¹, Kovaleva T.A.²

¹*Voronezh State Medical Academy*

²*Voronezh State University*

It has carried out comparison of the primary structure of glucoamylases from *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae* with use of programme Cene Bee on the basis of sequencing. It has obtained estimation of the degree of homology, it has confirmed probability of participation of Asp, Glu, Trp residues in the catalysis of hydrolysis of starch.

Keywords: glucoamylase, primary structure, comparative analysis, homology

УДК 611.424:612.64

НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ФОРМИРОВАНИЯ ШЕЙНОЙ ЧАСТИ ГРУДНОГО ПРОТОКА У ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Петренко В.М.

*ГОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная медицинская
академия имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия*

Шейная часть грудного протока без дуги образуется у плодов человека 3-го месяца из дорсокаудального отроста левого яремного лимфатического мешка в процессе расчленения мешка зачатками шейных лимфатических узлов, содержит три клапана.

Ключевые слова: грудной проток, шейная часть, плод

Введение

Шейная часть грудного протока (ГП) человека имеет сложную и вариативную топографию, у плодов описывается, начиная с 4-5 мес, когда множественные лимфатические узлы обособились, а лимфатические мешки редуцировались [1-2]. По данным F..Sabin [6], ГП вырастают из двух яремных лимфатических мешков (ЯЛМ) венозного происхождения. По O..Kampmeier [4], шейная часть ГП возникает из вакуолей в мезенхиме около кардинальных вен и их притоков, сразу непарная. S..Putte [5] обнаружил ряд изолированных закладок лимфатической системы, вероятно, венозного происхождения – лимфатические мешки и сплетения, ГП; разрастаясь, они объединяются. По моим данным [3], парная закладка ГП у эмбрионов 14-15 мм длины (начало 7-й нед) определяется на уровне II-VIII грудных позвонков как каудальный приток дорсокаудального отроста ЯЛМ (уровень I грудного – VII шейного позвонков). ГП формируется выключаясь из кровотока венами – передней супракардинальной, позади прекардинальной вены, и грудной субкардинальной, вентромедиально от посткардинальной вены. Крупный клапан соединения ЯЛМ и прекардинальной вены находится на уровне VII шейного позвонка. У эмбрионов 6-7 нед происходит разгибание головы с удлинением шеи. В результате растущие зачатки тимуса в эти сроки как будто опускаются. У эмбрионов 19-25 мм длины (7-7,5 нед) они проходят в верхнюю апертуру грудной клетки, через паратрахе-

альные лимфатические сплетения, впереди левой плечеголовной вены, дуги аорты. Супрааортальная часть ГП находится рядом с паратрахеальными сплетениями, позади ветвей дуги аорты, они тормозят каудальное смещение зачатков тимуса, особенно левого. Кровоток по дуге аорты справа налево, пульсация дуги могут стимулировать аналогичный по направлению лимфоток в паратрахеальном сплетении и преимущественный рост его левой части. Редукция связей ГП с правым ЯЛМ (и супрааортального отрезка правого ГП) происходит у плодов 9-10 нед, что показано мной методом инъекции синей массы Герота. Недавно я получил новый материал по данному вопросу.

Материал и методы

Срезы 7 зародышей человека 25-36 мм длины (7,5-8,5 нед) в трех основных плоскостях и поперечные срезы шейногрудной части 8 плодов человека 45-79 мм длины (9,5-12 нед) толщиной 5-7 мкм были окрашены гематоксилином и эозином, пикрофуксином, импрегнированы нитратом серебра. ГП 2 плодов человека 40 и 48 мм длины (9-9,5 нед) были инъецированы синей массой Герота.

Результаты

У эмбриона 8 нед правый и левый ГП с эндотелиальными стенками и (косо)поперечными анастомозами идут от сплетения поясничных стволов к ЯЛМ. У плода 9 нед краниальная часть ГП становится непарной и сохраняется в области левого венозного угла шеи. Эндотелий ГП окружают тонкие ретикулярные волокна.