

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.  
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**АКТИВНОСТЬ 15-ЛИПОКСИГЕНАЗЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ  
ПРИ СТРЕССЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 5 курса 531 группы  
Специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика  
Биологического факультета  
Шереметьевой Веры Александровны

Научный руководитель

к.б.н., доцент

Га -  
03.06.2019г.  
(число, подпись)

А. А. Галицкая

Зав. кафедрой

д.б.н., профессор

Коннова  
(число, подпись)  
03.06.2019г.

С. А. Коннова

Саратов 2019

## **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящий момент употребление человеком продуктов с повышенным содержанием нитритов не является редкостью, поскольку они содержатся во многих пищевых продуктах от мясных и колбасных изделий до свежих овощей. Общеизвестно, что соли азотной кислоты негативным образом сказываются на структуре и функциях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Ситуация может в значительной степени усугубляться дополнительным поступлением соединений аминной природы, включая ароматические амины, которые содержатся в копченых и соленых продуктах. Повреждение эпителиальных клеток ЖКТ, в свою очередь, ведет к высвобождению полиненасыщенных жирных кислот из липидного слоя эпителиоцитов, запуская процессы перекисного окисления, накопления свободных радикалов и, как следствие, воспалительной реакции.

Липоксигеназы (LOX) (EC 1.13.11) – цитоплазматические ферменты класса оксидоредуктаз, которые катализируют стереоспецифические реакции окисления полиненасыщенных жирных кислот, относящихся к эйкозановому ряду. Предполагается, что эти ферменты могут принимать участие в перекисном окислении липидов клеточных мембран, в развитии и дифференцировке клеток, в патогенезе сердечно-сосудистых, гиперпролиферативных и нейродегенеративных заболеваний.

Целью данной работы является определение активности 15-липоксигеназы (15-LOX) в стенках желудка белых беспородных крыс при хроническом химическом стрессе.

Для достижения поставленной нами цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определить изменение активности 15-LOX стенок желудка крыс при длительном сочетанном действии нитрита натрия и *m*-толуидина.
2. Выявить степень гомологии липоксигеназ крысы и человека

**Структура дипломной работы:** работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и приложения. Основная часть

включает в себя обзор литературы, составленный на основе анализа 60 источников, экспериментальной части. Литературный обзор состоит из трех глав: общая характеристика липоксигеназ, структура и типы муцинов, факторы, влияющие на состояние слизистой оболочки желудка.

## ***ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ***

### ***ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ***

#### ***Материалы и методы исследования***

В процессе бионформатического анализа использовалась база данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей UniProt. Для построения трехмерных моделей белков обращались к программе SWISS-MODEL. При выравнивании нескольких аминокислотных последовательностей пользовались инструментом BLAST (версия 1.14.0) от NCBI. Визуализация множественного выравнивания осуществлялась в программе Jalview версии 2.10.5. Поиск доменов проводился в базе данных Pfam 32.0.

Эксперимент проводили на самках белых беспородных крысах в возрасте от 8 до 12 месяцев массой 290-350 граммов (n=15). Животные получали *m*-толуидин в концентрации 25мкг/кг/сутки с пищей и нитрит натрия (0,2 %) с питьевой водой в течение 9 месяцев. Контролем служили животные, которые содержались на стандартном пищевом рационе. Активность 15-LOX в стенках желудков крыс определяли спектрофотометрически, в качестве субстрата использовали линолевую кислоту.

Все эксперименты были проведены не менее, чем в трех биологических и трех аналитических повторностях. Статистическую обработку проводили при помощи программы MS Excel 2013, полученные результаты представлены для степени достоверности 99%.

#### ***Результаты и обсуждение.***

Было выявлено, что в результате продолжительной интоксикации аминов и нитритов активность 15-LOX в стенках желудка самок белых

беспородных крыс возрастает почти на 40% с высоким уровнем достоверности, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса. Полученные данные представлены на рисунке 1.

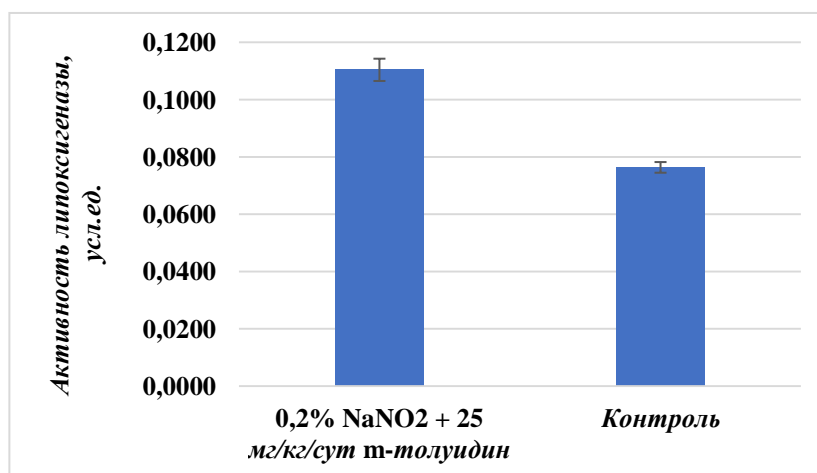


Рисунок 1 – Изменение активности липоксигеназы-15 в стенках желудков крыс после длительной интоксикации, усл.ед.

### ***Биоинформатический анализ липоксигеназ***

Аминокислотные последовательности 15-липоксигеназы крысы и человека были найдены в базе данных белков UniProt. Затем было проведено выравнивание данных с помощью сервиса Clustal Omega на сайте EMBL-EBI. В результате была оценена степень гомологичности, она составила 74%. Это говорит о высокой степени родства этих ферментов.

Для подтверждения полученного результата была использована программа BLAST сервиса NCBI. Для каждого из белков была построена карта локального сходства и были определены функционально активные домены липоксигеназ крысы и человека. Было показано, что начальные, каталитические и концевые участки белков хорошо выровнены. Полученные результаты представлены на рисунках 2. Параметр Query-cover говорит о том, что последовательности были выровнены полностью, значение E-value равно 0, следовательно, выравнивание достоверно. При этом процент сходства исследуемых белков составляет 75%.

Descriptions

Sequences producing significant alignments

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [Graphics](#) [Multiple alignment](#)

| Description                                                                                                             | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--------------|
| <input type="checkbox"/> sp P16050 LOX15_HUMAN Arachidonate 15-lipoxygenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALOX15 PE=1 SV=3 | 1036      | 1036        | 100%        | 0.0     | 75%   | Query_179359 |

Рисунок 2 - Некоторые параметры выравнивания белковых последовательностей липоксигеназ человека и крысы, полученные с использованием сервиса BLAST

Помимо этого, были построены трехмерные модели исследуемых белков (рисунок 3) и определены аминокислоты, входящие в активные центры молекул. Для липоксигеназы 15 человека это аминокислоты с 360 по 365 и с 540 по 544. Для липоксигеназы 15 крысы с 361 по 366 и с 540 по 544 соответственно.

Всё это свидетельствует о сходстве выполняемых белками функций и их гомологии.

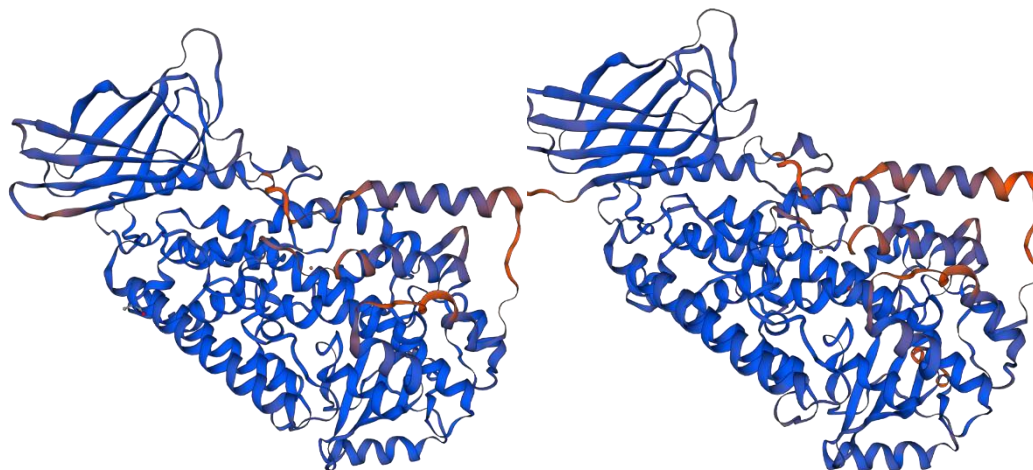


Рисунок 3 - Трехмерные модели фермента 15-LOX крысы (слева) и человека (справа), построенные с помощью сервиса SWISS- MODEL

На следующем этапе проводили сравнение нескольких липоксигеназ, таких как 15-, 12- и 5-LOX, человека и крысы, с целью выявления сходства между ферментами одного организма. Для человека наиболее сходными оказались ферменты 15- и 12- LOX. В то время как 5-LOX значительно

отличалась от исходной последовательности 15-LOX (рисунок 4).

| Description                                                                                                                      | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|--------------|
| <input type="checkbox"/> sp P18054 LOX12_HUMAN Arachidonate 12-lipoxygenase_12S-type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALOX12 PE=1 SV=4 | 897       | 897         | 100%        | 0.0     | 65.46%     | Query_147014 |
| <input type="checkbox"/> sp P09917 LOX5_HUMAN Arachidonate 5-lipoxygenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALOX5 PE=1 SV=2             | 512       | 512         | 100%        | 3e-178  | 39.68%     | Query_147015 |

Рисунок 4 – Результаты множественного выравнивания 15-LOX, 12-LOX и 5-LOX человека

Аналогичная работа была проведена для ферментов крыс. Степень гомологии незначительно отличалась для исследуемых последовательностей и составляла 58% и 39% для 12-LOX и 5-LOX относительно 15-LOX соответственно (рисунок 5).

Число абсолютно консервативных позиций составляет 29 % с учетом окраски Blosum62 при пороге идентичности 100 %.

| Description                                                                                                                          | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|-------------|
| <input type="checkbox"/> sp F1LQ70 LOX12_RAT Arachidonate 12-lipoxygenase_12S-type OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Alox12 PE=1 SV=1 | 816       | 816         | 100%        | 0.0     | 58.43%     | Query_67986 |
| <input type="checkbox"/> sp P12527 LOX5_RAT Arachidonate 5-lipoxygenase OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Alox5 PE=1 SV=3             | 504       | 504         | 100%        | 5e-175  | 39.56%     | Query_67987 |

Рисунок 5 – Результаты множественного выравнивания 15-LOX, 12-LOX и 5-LOX крысы

Выравнивание последовательностей ферментов осуществлялось в программе Jalview. Оно представлено в раскраске Blosum62, при этом был выставлен порог идентичности 70% для липоксигеназ человека (рисунок 6). В случае с липоксигеназами крыс дело обстоит немного иначе. В этом случае порог идентичности составляет 60%, что отражает Раскраска Blosum62, (рисунок 7).

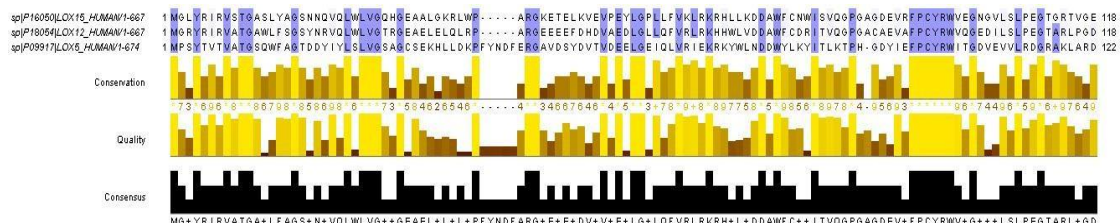


Рисунок 6 – Фрагмент множественного выравнивания последовательностей 15-LOX, 12-LOX и 5-LOX человека, выполненное в программе Jalview

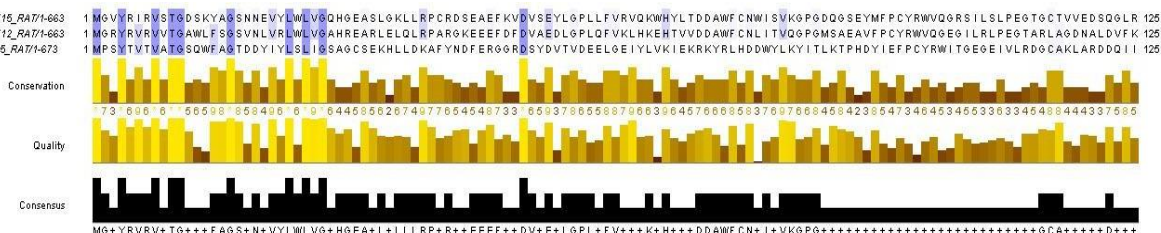


Рисунок 7 – Фрагмент множественного выравнивания последовательностей 15-LOX, 12-LOX и 5-LOX крысы, выполненное в программе Jalview

При этом количество абсолютно консервативных позиций составляет всего 2,4%. Такой результат, вероятно, может давать последовательность липоксигеназы-5, которая значительно отличается от 15- и 12-LOX. Из выравнивания видно, что наиболее схожие участки расположены в промежутке между 1 и 29 аминокислотами, что наводит на мысль о наличии функционально похожих сайтов на данном участке последовательности.

Поиск функциональных доменов выполняли в базе данные Pfam. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Функциональные домены липоксигеназ человека и крысы

| LOX | Человек | Крыса |
|-----|---------|-------|
| 15  |         |       |
| 12  |         |       |
| 5   |         |       |



В структуре липоксигеназ различают два функциональных домена. Один – небольшой N-концевой был найден в разнообразных мембранных белках или липидах. Он называется доменом PLAT (Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin) или LH2 (Lipoxygenase homology) и образует бета-сэндвич, состоящий из двух  $\beta$ -листов по четыре  $\beta$ -нити каждый. Причем в доменах липоксигеназы-5 имеются сайты связывания кальция. Данный фермент является индуцируемым, экспрессия его белков происходит при активации провоспалительных сигнальных путей на фоне повышения внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$ . В C-концевом домене фермента присутствуют субстрат-связывающий карман и каталитическое негемовое железо.

С использованием ресурса MuHits в C-концевой последовательности удалось выявить следующие мотивы: железосвязывающие области, сайт липопротеидного прикрепления прокариотической мембраны.

Затем были построены объемные модели 12-LOX и 5-LOX человека и крысы (рисунки 8 и 9 соответственно). На них четко прослеживается двухдоменная структура:  $\beta$ -складки N-концевого домена и  $\alpha$ -спирали C-концевого.

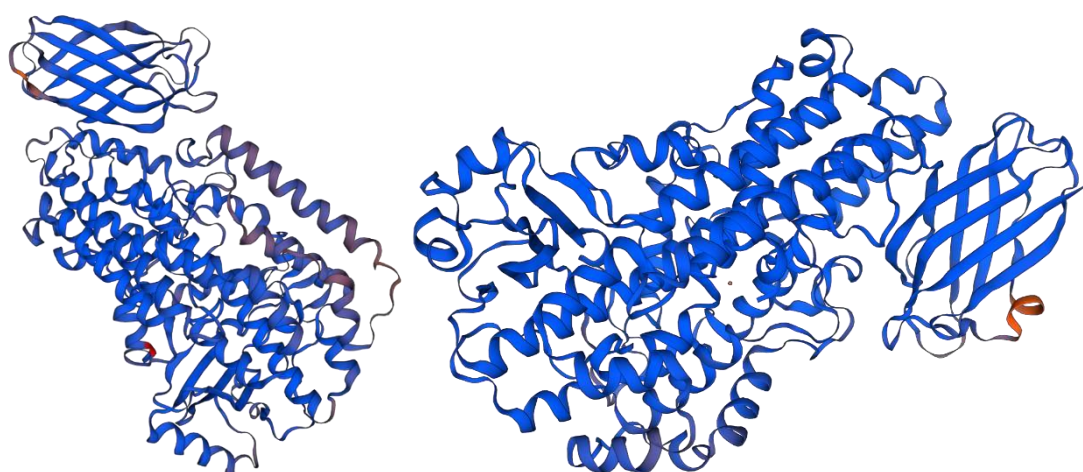


Рисунок 8 - Трехмерные модели фермента 12-LOX человека (слева) и крысы (справа), построенные с помощью сервиса SWISS-MODEL



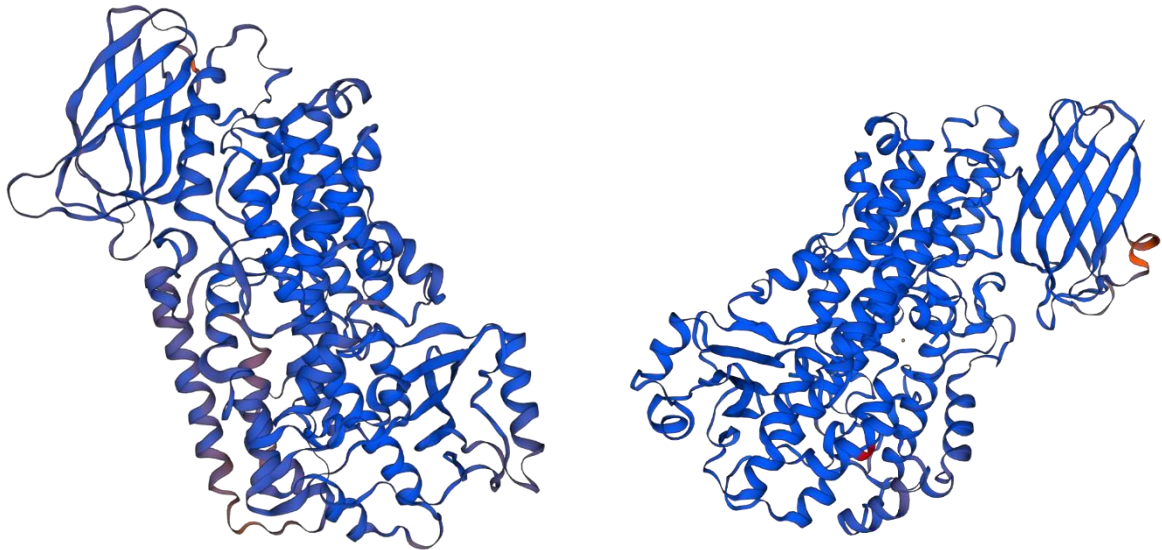


Рисунок 9 - Трехмерные модели фермента 5-LOX человека (слева) и крысы (справа), построенные с помощью сервиса SWISS-MODEL

### ***ЗАКЛЮЧЕНИЕ***

Значение LOX в патогенезе заболеваний желудочно-кишечного тракта и других систем органов организма является значимым ввиду постоянного поступления токсических соединений с пищей и питьем. Точные механизмы и конкретные физиологические эффекты на данный момент остаются недостаточно изученными, поэтому требуют дополнительных исследований.

В ходе проделанной работы была определена активность липоксигеназы-15 в стенках желудков лабораторных животных при химической интоксикации *m*-толуидином и нитритом натрия.

Так же произведен биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей ряда липоксигеназ крысы и человека, а именно: 15-LOX, 12-LOX и 5-LOX с использованием различных сервисов и программ. Определена степень гомологии исследуемых белков. Причем сходство между ферментами человека выше, чем между теми же ферментами крыс. Построены трехмерные структуры исследуемых белков.

## ВЫВОДЫ

1. Длительное введение в рацион лабораторных животных нитритов и аминов негативно влияют на состояние слизистой оболочки желудка и приводят к увеличению липоксигеназной активности на 37 %.

2. Исходя из высокой степени гомологичности исследуемых ферментов, полученные результаты с большой долей вероятности могут быть перенесены на человека.

3. Установлено, что степень гомологичности для 15-LOX человека и крысы составляет 75 %.

4. Установлено, что степень гомологичности липоксигеназ-5, -12 и -15 для крыс в пределах 38-58 %, а для человека в пределах 40-65 %.

