

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ КОНСЕРВАТИВНЫХ УЧАСТКОВ ФОСФОФРУКТОКИНАЗЫ-1

П. Ю. Пинчук

Витебский государственный университет имени П.М. Машерова, пр-т Московский 33,
210038, г. Витебск, Республика Беларусь, polina_mileeva@mail.ru

Данная работа посвящена исследованию молекулярной эволюции и функциональной значимости консервативных участков фосфофруктокиназы-1 (PFK-1). В ходе работы были проанализированы нуклеотидные и аминокислотные последовательности PFK-1 у шести модельных организмов (*Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Biomphalaria glabrata*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*), а также у человека (*Homo sapiens*) для установления контрольных данных. Филогенетический анализ, основанный на множественном выравнивании последовательностей, выявил эволюционный порядок видов и позволил определить консервативные участки PFK-1 с помощью метода моделирования трехмерных структур. Полученные данные позволяют более точно определить эволюционные взаимосвязи и функциональную роль консервативных участков PFK-1, что имеет перспективы для исследований метаболизма и разработки лекарственных средств.

Ключевые слова: консервативные участки; молекулярная эволюция, модельные организмы, фосфофруктокиназа-1.

MOLECULAR EVOLUTION AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF CONSERVED SITES OF PHOSPHOFRUCTOKINASE-1

P. Yu. Pinchuk

Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Moskovskiy Avenue, 33,
210038, Vitebsk, Republic of Belarus, polina_mileeva@mail.ru

This work is devoted to the study of the molecular evolution and functional significance of conserved regions of phosphofructokinase-1 (PFK-1). In the course of the work, nucleotide and amino acid sequences of PFK-1 were analyzed in six model organisms (*Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Biomphalaria glabrata*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*), as well in humans (*Homo sapiens*) to establish control data. Phylogenetic analysis based on multiple sequence alignment revealed the evolutionary order of species and allowed us to determine the conserved regions of PFK-1 using the method of modeling three-dimensional structures. The obtained data allow us to more accurately determine the evolutionary relationships and the functional role of the conserved regions of PFK-1, which has prospects for metabolic studies and drug development.

Keywords: conserved sites; molecular evolution, model organisms, phosphofructokinase-1.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2025-1-355-359>

Фосфофруктокиназа-1 (PFK-1), относится к классу трансферазы (EC:2.7.1.11) и является ключевым ферментом гликолиза. Понимание регуляции активности данного фермента необходимо для объяснения адаптации клеток к различным метаболическим состояниям и для разработки лекарственных препаратов при заболеваниях, связанных с нарушением метаболизма углеводов [1]. Консервативность определенных участков в структуре PFK-1 на протяжении эволюции свидетельствует о фундаментальной значимости этих областей для ее функции. Различают несколько типов регуляции фосфофруктокиназы-1. Аллостерическая регуляция осуществляется посредством ингибирования АТФ, цитратом и фосфоенолпируватом, а также

активации АМФ и фруктозо-2,6-бисфосфатом (F-2,6-ВР). Регуляция активности F-2,6-ВР осуществляется гормональными сигналами и метаболической доступностью субстратов. При низких значениях рН наблюдается дополнительное снижение активности фосфофруктокиназы-1. Кроме аллостерической регуляции, экспрессия и активность PFK-1 контролируются на уровне транскрипции и подвергаются посттрансляционным модификациям. Например, глюкагон косвенно подавляет активность PFK-1, снижая уровень F-2,6-ВР. Взаимодействие с другими молекулами, такими как серотонин, может дополнительно регулировать активность фермента и его внутриклеточное расположение [2].

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей PFK-1 у разных модельных организмов позволит определить высококонсервативные участки, которые отвечают за ключевые функции фермента. Это необходимо для изучения механизмов катализа и аллостерической регуляции PFK-1.

Целью данного исследования является определение и анализ консервативных участков PFK-1 у шести модельных организмов с использованием методов биоинформатики и структурного моделирования, что позволит установить связь между эволюционной консервативностью и функциональной значимостью отдельных аминокислотных остатков.

В качестве материала были взяты нуклеотидные (NS) и аминокислотные (AAS) последовательности фермента PFK-1 из базы данных KEGG. В роли модельных организмов использовали следующих животных: *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Biomphalaria glabrata*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*. Сравнительный анализ последовательностей проводили на сервере EMBOSS Needle. Для множественного выравнивания последовательностей использовали программу SnapGene, где в качестве алгоритма выравнивания применяли ClustalOmega с порогом совпадения >85 %. Для построения филогенетического дерева использовали программу MEGA X. Трехмерные структуры PFK-1 всех исследуемых организмов были смоделированы на сервере SWISS-MODEL, по шаблону 3D-структуры человека 8W2G взятой из банка данных PDB. Для оценки консервативных участков в 3D-моделях использовали программу ConSurf.

На рисунке 1 представлены результаты сравнительного анализа первичных последовательностей фермента.

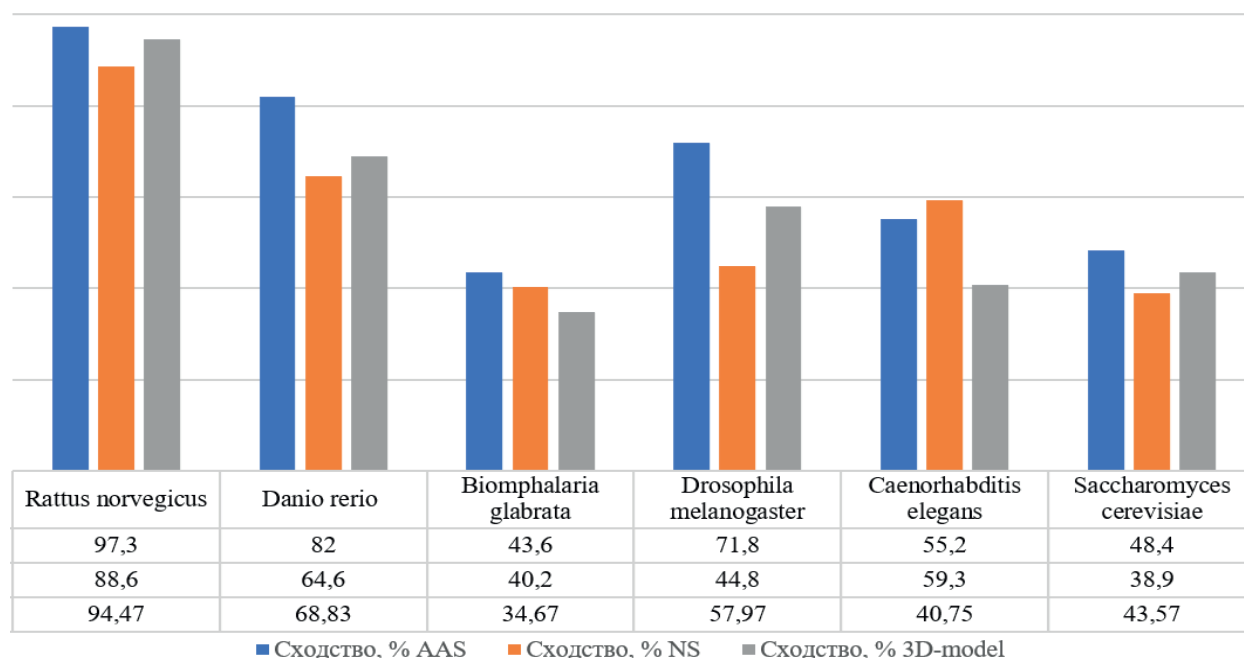


Рис. 1. Сравнительный анализ первичных последовательностей фосфофруктокиназы-1

Анализ первичных последовательностей показал значительные различия в идентичности фермента ПФК-1 между модельными организмами по отношению к человеку. Высокий процент сходства характерен для *Rattus norvegicus* (97,3 % по аминокислотным последовательностям и 88,6 % по нуклеотидным последовательностям), такой результат характеризует их филогенетическую близость. У остальных организмов значение схожести варьирует от 82,0 % до 43,6 % по аминокислотным последовательностям и от 64,6 % до 38,9 % по нуклеотидным последовательностям в ряду: *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Biomphalaria glabrata*. Эти данные подтверждают дивергентную эволюцию фосфофруктокиназы-1, отражающую адаптацию к различным метаболическим условиям.

При проведении множественного выравнивания аминокислотных последовательностей было обнаружено 7 высококонсервативных участков ПФК-1, которые имеют полное совпадение последовательностей (у 4 из 7 организмов) с некоторым сдвигом. Результаты выравнивания представлены в таблице.

Результаты множественного выравнивания аминокислотных последовательностей

Организм	Идентификатор консервативного участка	Локальные позиции	Длина консервативного участка	Аминокислотная последовательность
Homo sapiens	Pf-1	198-201	4	Ser, His, Gln, Arg
	Pf-2	206-217	12	Glu, Val, Met, Gly, Arg, His, Cys, Gly, Tyr, Leu, Ala, Leu
	Pf-3	300-303	4	Gln, Arg, Gly, Gly
	Pf-4	467-470	4	Gly, Thr, Lys, Arg
	Pf-5	529-534	6	Ser, Asn, Asn, Val, Pro, Gly
	Pf-6	570-573	4	Glu, Thr, Met, Gly
	Pf-7	577-581	5	Gly, Tyr, Leu, Ala, Thr
Rattus norvegicus	Pf-1	198-201	4	Ser, His, Gln, Arg
	Pf-2	206-217	12	Glu, Val, Met, Gly, Arg, His, Cys, Gly, Tyr, Leu, Ala, Leu
	Pf-3	300-303	4	Gln, Arg, Gly, Gly
	Pf-4	467-470	4	Gly, Thr, Lys, Arg
	Pf-5	529-534	6	Ser, Asn, Asn, Val, Pro, Gly
	Pf-6	570-573	4	Glu, Thr, Met, Gly
	Pf-7	577-581	5	Gly, Tyr, Leu, Ala, Thr
Danio rerio	Pf-1	200-203	4	Ser, His, Gln, Arg
	Pf-2	208-219	12	Glu, Val, Met, Gly, Arg, His, Cys, Gly, Tyr, Leu, Ala, Leu
	Pf-3	302-305	4	Gln, Arg, Gly, Gly
	Pf-4	469-470	4	Gly, Thr, Lys, Arg
	Pf-5	531-536	6	Ser, Asn, Asn, Asn, Pro, Gly
	Pf-6	572-575	4	Glu, Thr, Met, Gly
	Pf-7	579-583	5	Gly, Tyr, Leu, Ala, Thr
Drosophila melanogaster	Pf-1	200-201	4	Ser, His, Gln, Arg
	Pf-2	208-219	12	Glu, Val, Met, Gly, Arg, His, Cys, Gly, Tyr, Leu, Ala, Leu

Организм	Идентификатор консервативного участка	Локальные позиции	Длина консервативного участка	Аминокислотная последовательность
<i>Drosophila melanogaster</i>	Pf-3	302-305	4	Gln, Arg, Gly, Gly
	Pf-4	539-544	6	Ser, Asn, Asn, Val, Pro, Gly
	Pf-5	580-583	4	Glu, Thr, Met, Gly
	Pf-7	587-591	5	Gly, Tyr, Leu, Ala, Thr
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Pf-1	191-194	4	Ser, His, Gln, Arg
	Pf-2	199-210	12	Glu, Val, Met, Gly, Arg, His, Cys, Gly, Tyr, Leu, Ala, Leu
	Pf-3	293-296	4	Gln, Arg, Gly, Gly
	Pf-4	532-537	5	Ser, Asn, Asn, Pro, Gly
	Pf-5	573-576	4	Glu, Thr, Met, Gly
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Pf-2	63-72	7	Glu, Val, Met, Gly, Gly, Tyr, Leu
	Pf-4	391-395	5	Asn, Asn, Val, Pro, Gly

Некоторые участки (Pf-2, Pf-3), практически идентичны у всех исследованных видов. Можно предположить, что они могут участвовать в связывании лигандов, катализе или поддержании структуры фермента. Несмотря на консервативность последовательностей, наблюдается изменение расположения этих участков, что свидетельствует о способности PFK-1 к структурно-функциональным изменениям. Различия в количестве и длине участков, особенно у *Biomphalaria glabrata* и *Caenorhabditis elegans*, указывают на видоспецифические адаптации. Некоторые последовательности (Pf-1, Pf-3, Pf-4, Pf-5, Pf-7) имеют более широкое распространение и определяются у большинства исследованных организмов, что подчеркивает их фундаментальную роль.

В ходе анализа консервативных позиций в третичной структуре фосфофруктокиназы-1 человека и пресноводной улитки *Biomphalaria glabrata*, выполненный с помощью программы ConSurf, было установлено значительное сходство в расположении высококонсервативных аминокислотных остатков. У фермента человека к числу высококонсервативных участков относятся: аргинин в позиции 76 (Arg76), аспарагиновая кислота в позиции 297 (Asp297), глицины в позициях 49 и 50 (Gly49, Gly50), а также серин в позиции 62 (Ser62). Предположительно, они участвуют в формировании функционально важных участков. В гомологичных областях фермента *Biomphalaria glabrata* наблюдается высокая консервативность аргинина в позиции 34 (Arg34, гомологичный Arg76), аспарагиновой кислоты в позиции 396 (Asp396, гомологичный Asp297), серина в позициях 48 и 49 (Ser48, Ser49, гомологичные Gly49 и Gly50), а также глутамина в позиции 50 (Gln50, потенциально гомологичный Ser62).

Обнаруженная высокая степень консервативности в эволюционно отдаленных видах подтверждает необходимость определенных аминокислотных остатков в функционировании PFK-1. Высокая степень схожести предполагает их вовлеченность в ключевые процессы, такие как катализ, связывание субстратов и поддержание стабильной трехмерной структуры фермента.

Филогенетическое дерево, изображенное на рисунке 2, демонстрирует ожидаемую структуру, отражающую эволюционные взаимосвязи между исследуемыми видами.

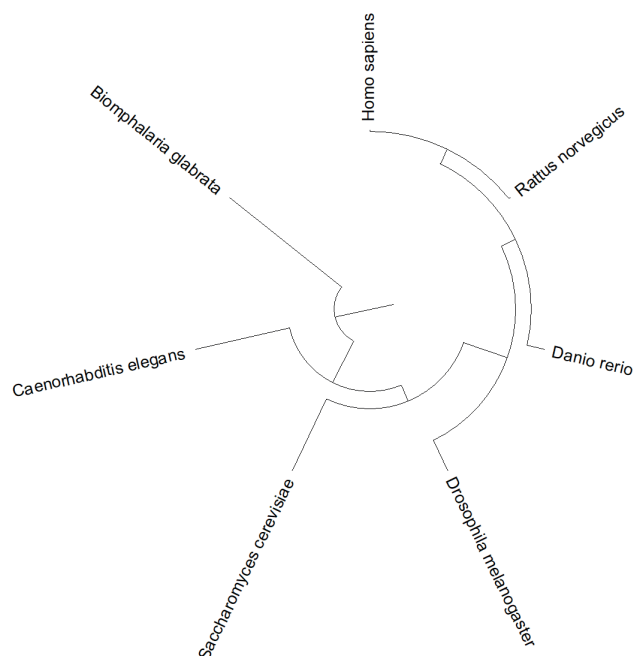


Рис. 2. Филогенетическое дерево фермента фосфофруктокиназы-1

Наблюдается разделение на несколько основных ветвей. Одна ветвь объединяет млекопитающих (*Homo sapiens* и *Rattus norvegicus*), показывая высокую степень родства. Другая ветвь включает в себя позвоночных (*Danio rerio*), которая отходит от млекопитающих раньше, что было доказано в результате сравнительного анализа. Отдельные ветви представляют оставшиеся организмы, при чем наиболее удаленной ветвью по отношению к человеку является *Biomphalaria glabrata*. Это демонстрирует значительную дивергенцию последовательностей фосфофруктокиназы-1.

Таким образом, высокая схожесть консервативных участков PFK-1 указывает на их фундаментальную важность в активности фермента. Значительные различия в последовательностях, наблюдаемые у филогенетически удаленных организмов, подтверждает гипотезу о дивергентной эволюции, обусловленной адаптацией к различным метаболическим условиям. Консервативность ключевых аминокислот подчеркивает важность этих участков для функционирования PFK-1. Вариации в других участках, особенно у *Biomphalaria glabrata* и *Caenorhabditis elegans*, вероятно, отражают адаптацию к различным условиям среды.

Библиографические ссылки

1. The kinetics and regulation of phosphofructokinase from *Teladorsagia circumcincta*. Walker L. R. et al. [Электронный ресурс] // *Experimental Parasitology*. 2012. Т. 130. №. 4. С. 348. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489412000495> (дата обращения: 24.02.2025).
2. Analysis of phosphofructokinase-1 activity as affected by pH and ATP concentration. Wang C. et al. [Электронный ресурс] // *Scientific Reports*. 2024. Т. 14. №. 1. С. 21192. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-72028-4> (дата обращения: 24.02.2025).