

doi:10.18699/VJ16.16-o (In Russ.)]

10. Kohany O., Gentles A.J., Hankus L., Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics*, 2006, vol. 25, iss. 7, p. 474.
11. Jurka J. Repeats in genomic DNA: mining and meaning. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1998, vol. 8, pp. 333-337.
12. Capy P., Vitalis R., Langin T. *et al.* Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor? *J. Mol. Evol.*, 1996, vol. 42, pp. 359-368.
13. Smit A.F.A., Riggs A.D. Tiggers and other DNA transposon fossils in the human genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, pp. 1443-1448.
14. Shao H., Tu Z. Expanding the diversity of the *IS630-Tc1-mariner* superfamily: discovery of a unique DD37E transposon and reclassification of the DD37D and DD39D transposons. *Genetics*, 2001, vol. 159, iss. 3, pp. 1103-1115.
15. Zhang H.H., Shen Y.H., Xiong X.M. *et al.* Identification and evolutionary history of the DD41D transposons in insects. *Genes Genom.*, 2016, vol. 38, pp. 109-117, doi: 10.1007/s13258-015-0356-4.
16. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, pp. 1792-1797.
17. Saitou N., Nei M. The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, vol. 4, pp. 406-425.
18. Tamura K., Stecher G., Peterson D. *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, vol. 30, pp. 2725-2729.

### В ГЕНОМЕ СОМА *ICTALURUS PUNCTATUS* ОБНАРУЖЕН НОВЫЙ ГЕН, КОДИРУЮЩИЙ ФЕРМЕНТ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ЛДГ/МДГ

Пузакова Л.В., Пузаков М.В.

ФГБУН Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, РФ

e-mail: kvluda@yandex.ru

**Аннотация.** При *in silico* исследовании генов, кодирующих ферменты из суперсемейства ЛДГ/МДГ у различных организмов, мы обнаружили, что аминокислотная последовательность канального сома *Ictalurus punctatus*, кодируемая геном *Mdh1*, значительно отличается от продуктов генов *Mdh1* других животных. Обнаруженная последовательность имеет консервативный домен, характерный для ферментов суперсемейства ЛДГ/МДГ, однако ни с одним из ферментов этого суперсемейства существенного сходства у нее нет. Таким образом, нами обнаружен ген, кодирующий новый фермент из суперсемейства ЛДГ/МДГ, который мы обозначили как *unLdh/Mdh* (*unknown Ldh/Mdh*).

**Ключевые слова:** лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, ЛДГ, МДГ, энергетический обмен.

### IN THE GENOME OF CATFISH *ICTALURUS PUNCTATUS* DISCOVERED NEW GENE ENCODING AN ENZYME LDH/MDH SUPERFAMILY

Puzakova L.V., Puzakov M.V.

The A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS

Nakhimova av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

e-mail: puzakov@ngs.ru

**Abstract.** *In silico* studies of genes encoding enzymes from LDH/MDH superfamily in different organisms, we found that the aminoacid sequence of the channel catfish *Ictalurus punctatus*, encoded by the *Mdh1* gene, is significantly different from the products of the *Mdh1* genes other animals. The detected sequence has a conservative domain specified for the enzymes of the LDH/MDH superfamily, however, it has no significant similarity to any enzyme of this superfamily. Thus, we detected a gene encoding a new enzyme from the LDH/MDH superfamily, which we designated as *unLdh/Mdh* (*unknown Ldh/Mdh*).

**Key words:** malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, LDH, MDH, metabolism.

Ферменты суперсемейства ЛДГ/МДГ участвуют в реакциях углеводного обмена (см. табл. 1). Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует заключительный шаг анаэробного гликолиза, где происходит восстановление пирувата цитозольным НАДН до лактата. С помощью этой реакции обеспечивается регенерация НАД<sup>+</sup> из НАДН без участия митохондриальной дыхательной цепи при гипоксии. Лактат выводится в кровь и утилизируется, превращаясь в печени в глюкозу, или при доступности кислорода превращается в пируват, который вступает в общий путь катаболизма, окисляясь до CO<sub>2</sub> и воды.

Таблица 1 – Ферменты из суперсемейства ЛДГ/МДГ и их субстраты/продукты

Код по классификации	Фермент	Субстрат/продукт	Субстрат/продукт	Литературный источник
EC 1.1.1.27	L-лактатдегидрогеназа	(S)-лактат	пируват	[1]
EC 1.1.1.28	D-лактатдегидрогеназа	(R)-лактат	пируват	[1]
EC 1.1.1.338	(2R)-3-сульфолактат-дегидрогеназа (NADP+)	(R)-3-сульфолактат	3-сульфопируват	[2]
EC 1.1.1.37	Цитоплазматическая малатдегидрогеназа  Митохондриальная малатдегидрогеназа	(S)-малат	оксалоацетат	[3]
EC 1.1.1.38	малатдегидрогеназа (оксалоацетат-декарбоксилирующая)	(S)-малат оксалоацетат	пируват пируват	[4]
EC 1.1.1.39	малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая)	(S)-малат	пируват	[5]
EC 1.1.1.40	малатдегидрогеназа (оксалоацетат-декарбоксилирующая) (NADP+)	(S)-малат оксалоацетат	пируват пируват	[6]
EC 1.1.1.82	малатдегидрогеназа (NADP+)	(S)-малат	оксалоацетат	[7]
EC 1.1.1.83	D-малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая)	(R)-малат	пируват	[8]
EC 1.1.1.85	3-изопропилмалат-дегидрогеназа	(2R,3S)-3-изопропилмалат  (2R,3S)-3-изопропилмалат  (2S)-2-изопропил-3-оксосукцинат	4-метил-2-оксопентаноат  (2S)-2-изопропил-3-оксосукцинат  4-метил-2-оксопентаноат	[9]

Малатдегидрогеназа (МДГ) катализирует взаимопревращение оксалоацетата и малата, используя НАД/НАДН коэнзимную систему. МДГ очень распространенный фермент. Для него было обнаружено несколько изоформ, различающихся внутриклеточной локализацией и их специфичностью к коэнзимам НАД или НАДН. В клетках эукариот были найдены, по меньшей мере, две изоформы ферментов. Одна изоформа обнаружена в митохондриях, она является принципиальной для цикла Кребса. Другая изоформа работает в цитоплазме - участвует в курсировании малата/аспартата. Этот челночный обмен уменьшает эквивалент через митохондриальную мембрану в форме малат/оксалоацетат скорее, чем в форме НАД/НАДН.

При исследовании *in silico* генов, кодирующих ферменты из суперсемейства ЛДГ/МДГ, у представителей различных таксонов организмов мы обнаружили в геноме канального сома *Ictalurus punctatus* ген *Mdh1*, продукт которого в базе данных NCBI идентифицирован как цитоплазматическая малатдегидрогеназа (МДГ1). При множественном выравнивании аминокислотных последовательностей цитоплазматической малатдегидрогеназы различных организмов было установлено, что МДГ1 *I. punctatus* очень сильно отличается от МДГ1 всех остальных таксонов, в том числе и по наиболее консервативным областям, которые идентичны у всех без исключения групп. На рисунке 1, на котором изображено филогенетическое дерево, построенное на основе множественного выравнивания аминокислотных последовательностей МДГ1, видно, что белок канального сома сформировал отдельную ветвь, далеко отстоящую от рыб (*Danio rerio*). Следовательно, аминокислотная последовательность МДГ1 канального сома не является цитоплазматической малатдегидрогеназой. В связи с этим мы дали новое название этому гену - *unLdh/Mdh* (*unknown Ldh/Mdh*).

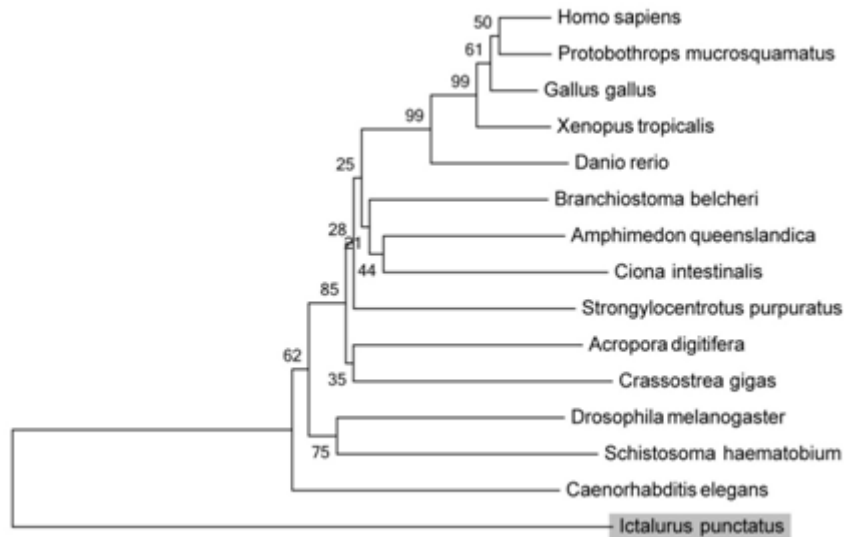


Рисунок 1 – Эволюционный анализ цитоплазматической малатдегидрогеназы у различных таксонов животных

Несмотря на значительные отличия белка канального сома от малатдегидрогеназы, при анализе в базе консервативных последовательностей [10] выяснилось, что обнаруженный нами белок *unLdh/Mdh* имеет консервативный домен pfam02615, характерный для ферментов суперсемейства ЛДГ/МДГ. Для того, чтобы выяснить какой фермент кодирует ген канального сома, мы сравнили *unLdh/Mdh* с другими ферментами, входящими в суперсемейство ЛДГ/МДГ (см. табл. 2). В анализ были включены 15 аминокислотных последовательностей – 5 из семейства лактатдегидрогеназ, 9 из семейства малатдегидрогеназ и последовательность, кодируемая геном *unLdh/Mdh*.

Таблица 2 – Оценка эволюционного расхождения между аминокислотными последовательностями ферментов суперсемейства ЛДГ/МДГ. Показано число аминокислотных различий на сайт между последовательностями. В анализ включены 15 аминокислотных последовательностей. Все позиции, содержащие пробелы и недостающие данные были исключены. Анализ осуществлен с помощью пакета программ MEGA6.0 [11]

	Белок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	L-лактагидрогеназа: А EC 1.1.1.27 (AC 000186)														
2	L-лактагидрогеназа: В EC 1.1.1.27 (AC 000162)	0.245													
3	L-лактагидрогеназа: С EC 1.1.1.27 (AC 000186)	0.227	0.307												
4	D-лактагидрогеназа EC 1.1.1.28 (AC 000175)	0.859	0.865	0.853											
5	(2R)-3-сульфолактагидрогеназа (НАДФ+) EC 1.1.1.338 (NC 023138)	0.902	0.908	0.896	0.908										
6	Цитоплазматическая малатгидрогеназа EC 1.1.1.37 (NC 005113)	0.804	0.798	0.798	0.902	0.871									
7	Митохондриальная малатгидрогеназа EC 1.1.1.37 (NC 005111)	0.834	0.822	0.840	0.890	0.902	0.798								
8	Малатгидрогеназа (оксалоацетат-декарбоксилирующая) EC 1.1.1.38 (NC 000018)	0.871	0.877	0.871	0.926	0.914	0.908	0.890							
9	Малатгидрогеназа (декарбоксилирующая) EC 1.1.1.39 (NT 033778)	0.871	0.865	0.859	0.896	0.908	0.908	0.908	0.515						
10	Малатгидрогеназа (оксалоацетат-декарбоксилирующая) (НАДФ+) EC 1.1.1.40 (NC 005107)	0.859	0.877	0.859	0.945	0.890	0.859	0.865	0.448	0.528					
11	Малатгидрогеназа (НАДФ+) EC 1.1.1.82 (NW 002789720)	0.847	0.822	0.840	0.896	0.883	0.877	0.871	0.865	0.890	0.883				
12	D-малатгидрогеназа (декарбоксилирующая) EC 1.1.1.83 (NC 015676)	0.877	0.877	0.877	0.945	0.908	0.957	0.920	0.890	0.902	0.883	0.920			
13	3-изопронималатгидрогеназа EC 1.1.1.85 (NW 005178446)	0.896	0.908	0.914	0.920	0.914	0.951	0.902	0.896	0.896	0.914	0.902	0.816		
14	Малатгидрогеназа 1В EC 1.1.1.- (NC 000067)	0.804	0.853	0.853	0.896	0.920	0.834	0.877	0.926	0.902	0.883	0.920	0.920	0.908	
15	<b>Белок <i>unLdh/Mdh</i> (NC 030429)</b>	0.914	0.908	0.908	0.902	0.810	0.951	0.914	0.908	0.896	0.890	0.877	0.926	0.896	0.920

В результате проведенного исследования мы обнаружили, что *unLdh/Mdh* существенно отличается от всех ферментов как из семейства малатдегидрогеназ, так и лактатдегидрогеназ – различие составляет от 0,81 до 0,95. Наименьшее различие (0,81) с ферментом (2R)-3-сульфолактатдегидрогеназой (НАДФ+), наибольшее 0,95 с цитоплазматической малатдегидрогеназой. Таким образом, было подтверждено, что *unLdh/Mdh* не является геном, кодирующим ни МДГ1, ни другой известный фермент суперсемейства ЛДГ/МДГ. Это совершенно иной фермент из суперсемейства ЛДГ/МДГ, функция которого пока не изучена.

Далее с помощью компьютерного анализа планируется изучить, у каких организмов представлен ген *unLdh/Mdh*, какова его транскрипционная активность и попытаться предсказать функцию кодируемого им фермента.

#### Список литературы / References:

1. Dennis D. and Kaplan N.O. D and L-lactic acid dehydrogenase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.*, 1960, vol. 235, pp. 810-818.
2. Denger K., Cook A.M. Racemase activity effected by two dehydrogenases in sulfolactate degradation by *Chromohalobacter salexigenis*: purification of (S)-sulfolactate dehydrogenase. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 2010, vol. 156, pp. 967-974.
3. McReynolds M.S. and Kitto G.B. Purification and properties of *Drosophila* malate dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, vol. 198, pp. 165-175.
4. Yamaguchi M. Studies on regulatory functions of malic enzymes. IV. Effects of sulfhydryl group modification on the catalytic function of NAD-linked malic enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 1979, vol. 86, pp. 325-333.
5. Saz, H.J. and Hubbard, J.A. The oxidative decarboxylation of malate by *Ascoris lumbricoides*. *J. Biol. Chem.*, 1957, vol. 225, pp. 921-933.
6. Walker D.A. Physiological studies on acid metabolism. Malic enzyme from *Kalanchoë crenata*: effects of carbon dioxide concentration. *Biochem. J.*, 1960, vol. 74, pp. 216-223.
7. Connelly, J.L., Danner, D.J. and Bowden, J.A. Branched chain  $\alpha$ -keto acid metabolism. I. Isolation, purification, and partial characterization of bovine liver  $\alpha$ -ketoisocaproic: $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 1968, vol. 243, pp. 1198-1203.
8. Stern J.R. and O'Brien R.W. Oxidation D-malic and  $\beta$ -alkylmalic acids wild-type and mutant strains of *Salmonella typhimurium* and by *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.*, 1969, vol. 98, pp. 147-151.
9. Calvo, J.M., Stevens, C.M., Kalyanpur, M.G. and Umbarger, H.E. The absolute configuration of alpha-hydroxy-beta-carboxyisocaproic acid (3-isopropylmalic acid), an intermediate in leucine biosynthesis. *Biochemistry*, 1964, vol. 3, pp. 2024-2027.
10. Marchler-Bauer A et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.*, 2017, vol. 45(D), pp. 200-203.

### ЯМР-АНАЛИЗ САМОАССОЦИИИ ТЕРДИЕНТИРОВАННЫХ ЦИКЛОМЕТАЛЛИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ Pt В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Мосунов А.А.<sup>1</sup>, Ельцов О.С.<sup>2</sup>, Сулейманова А.Ф.<sup>3</sup>, Кожевников В.Н.<sup>3</sup>, Евстигнеев М.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Севастопольский государственный университет

ул. Университетская 33, г. Севастополь, 299053, РФ

e-mail: AAMosunov@sevsu.ru

max\_evstigneev@mail.ru

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет

ул. Мира 19, г. Екатеринбург, 620002, РФ

<sup>3</sup>Нортумбрийский университет

Ньюкасл-на-Тайне, NE1 8ST, ВВ

**Аннотация.** Одной из ключевых особенностей плоских комплексов Pt (II) является их способность к самоагрегированию. Это явление обусловлено множеством межмолекулярных сил, в том числе основанных на взаимодействии с лигандами, а также металлофильными взаимодействиями Pt-Pt. Самоагрегирование широко использовалось для создания множества супрамолекулярных материалов. В поисках новых материалов, пригодных для самосборки, желательно получить информацию о силе межмолекулярных взаимодействий в комплексе. Исследование методом ЯМР титрования - это хорошо известный метод исследования таких взаимодействий, обеспечивающий информацию о величине связи в агрегатах комплексов Pt (II). В работе рассмотрено изучение процессов самоассоциации нейтральных циклометаллических комплексов в растворе. Проведено сравнение результатов ЯМР-исследования и вычислительного эксперимента. Для некоторых комплексов платины Pt (II) показано существование в растворе в виде агрегатов.

**Ключевые слова:** ЯМР-спектроскопия, самоассоциация, стэкинг-взаимодействие.