

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7>

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНОЙ И АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ БЕЛКА ХИМОЗИНА В ЭВОЛЮЦИОННОМ РЯДУ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Научная статья

Антонова Е.И.^{1,*}, Ачилов А.Б.², Фирсова Н.В.³, Ленгесова Н.А.⁴

¹ORCID : 0000-0002-3686-9686;

³ORCID : 0000-0002-9907-8857;

⁴ORCID : 0000-0001-7512-6386;

^{1, 2, 3, 4} Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова, Ульяновск, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (antonov_67[at]mail.ru)

Аннотация

В статье представлены результаты по сравнительному анализу аминокислотной и нуклеотидной последовательности экзонов химозина в области каталитического центра (в положении 25-220) млекопитающих различных сред обитания, с различным рационом питания используя инструменты филогенетического анализа. Получены данные по выравниванию нуклеотидной и аминокислотной последовательности экзонов химозина, определены консервативные и переменные участки, проведен попарный сравнительный анализ нуклеотидной и аминокислотной идентичности, определен спектр встречаемости аминокислот по белку в целом и в области каталитического центра. В ходе филогенетического анализа по дендрограмме, построенной для нуклеотидной последовательности гена химозина, выделены клады шести групп, которые сформировали представители анализируемых семейств. Полученные данные, могут использоваться для прогнозирования пищеварительных и иммунных функций белка на клеточном уровне.

Ключевые слова: химозин, 3D модели белка, выравнивание аминокислотной и нуклеотидной последовательности, эволюционный ряд позвоночных млекопитающих.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE NUCLEOTIDE AND AMINO ACID SEQUENCE OF THE CHYMOSIN PROTEIN IN THE MAMMALIAN EVOLUTIONARY SERIES

Research article

Antonova E.I.^{1,*}, Achilov A.B.², Firsova N.V.³, Lengesova N.A.⁴

¹ORCID : 0000-0002-3686-9686;

³ORCID : 0000-0002-9907-8857;

⁴ORCID : 0000-0001-7512-6386;

^{1, 2, 3, 4} Research Center for Fundamental and Applied Problems of Bioecology and Biotechnology Ulyanovsk State Pedagogical University named after. I.N. Ulyanova, Ulyanovsk, Russian Federation

* Corresponding author (antonov_67[at]mail.ru)

Abstract

The article presents the results of comparative analysis of amino acid and nucleotide sequence of chymosin exons in the region of the catalytic centre (position 25-220) of mammals of different habitats with different diets using phylogenetic analysis tools. Data on nucleotide and amino acid sequence alignment of chymosin exons were obtained, conserved and variable regions were determined, pairwise comparative analysis of nucleotide and amino acid identity was performed, and the spectrum of amino acid occurrence was determined for the protein as a whole and in the region of the catalytic centre. In the course of phylogenetic analysis, the dendrogram constructed for the nucleotide sequence of the chymosin gene was used to identify clades of six groups, which were formed by representatives of the families analysed. The data obtained can be used to predict the digestive and immune functions of the protein at the cellular level.

Keywords: chymosin, 3D protein models, amino acid and nucleotide sequence alignment, evolutionary lineage of vertebrate mammals.

Введение

Химозин (Chn, EC 3.4.23.4), неонатальная желудочная аспарагиновая пепсиноподобная протеаза молодых млекопитающих, вызывает свертывание молока посредством расщепления пептидных связей κ-казеина (κCS) на участке Met105-Phe106 и применяется для производства сыров [5], [37], [50], [51]. Фактически, использование Chn при производстве сыра считается одним из самых ранних биологических применений ферментов, а остатки сыра датируются примерно 3000-2800 годами до н.э. [1], [2], [3], [4]. Chn синтезируется как пре-прохимозин, который расщепляется до зрелого белка Chn за счет отщепления 16-ти аминокислот, который образуют гидрофобный сигнальный пептид [4], [5].

Клеточные сигнальные аспарагиновые протеазы (APS) повсеместно распространены в природе и выполняют разнообразные функции от пищеварения до участия в формировании иммунитета [3], [8], [9], [11]. APS разделены на различные семейства на основе гомологии, структуры и чувствительности к пепстатину [12], [13]. APS включают в себя пять надсемейств и 16 семейств. Большинство принадлежат к семейству A1 – пепсиноподобных APS. Структурно

пепсиноподобные AP обычно определяются двумя гомологичными доменами, которые охватывают два каталитических остатка аспарагиновой кислоты в триплете Asp-Thr/SerGly [3], [6], [11], [16].

Хотя роль Chn в свертывании молока и производстве сыра хорошо известна, в то же время анализ эволюционной динамики в ряду позвоночных аминокислотной и нуклеотидной последовательности крайне актуальна, в связи с тем, что Chn был обнаружен у большого числа видов, как наземных, так и водных млекопитающих [2], [17]. Анализ аминокислотных последовательностей и кодирующих последовательностей белков (экзонов) занимает центральное место в изучении молекулярной эволюции. Среди основных инструментов — построение филогенетических деревьев, которые собираются на основе алгоритмов, учитывающих количество несопадающих аминокислот или оснований между выровненными последовательностями.

Обоснования исследования белков заключаются в наличии механизмов мутаций и последующего отбора, которые приводят к изменению в кодирующей последовательности гена и, соответственно, в аминокислотной последовательности белка в процессе эволюции [18], [19], [20], [22]. Так, в частности, дупликация и делеция генов являются мощными драйверами эволюционных изменений, которые иллюстрируются изменчивым ферментативным спектром, участвующим в переваривании белков позвоночных, включая Chn, и являются реакцией на общие факторы окружающей среды (среда обитания, терморегуляция, рацион питания) [23].

Потеря генов долгое время считалась второстепенной движущей силой адаптивной эволюции. Тем не менее, в настоящее время потеря генов рассматривается в качестве ключевого фактора в формировании эволюционных изменений [24], [25]. Генетический репертуар генов желудка в ряду позвоночных, является хорошим примером ведущей роли потери генов в адаптивной фенотипической изменчивости [3], [15], [26]. Анализ последовательности гена и первичной структуры аспарагиновых протеиназ птиц и млекопитающих (куриный эмбриональный пепсиноген, ренин и пепсиноген человека, химозин быка) выявил сходство в организации генов, и эти результаты подтверждают мнение о том, что эти гены ферментов произошли от общего предкового гена. Напротив, в аспарагиновых протеиназах *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *M. pusillus* и *M. Miekhey*, в первичной структуре интрон не обнаружен. Однако в генах аспарагиновой протеиназы *Rhizopus niveus* и аспарагиноврй протеиназы *A. awamori* были обнаружены 1 и 3 коротких интронах соответственно, но их экзон-интронные соединения находились в других положениях, нежели в генах аспарагиновых протеиназ млекопитающих и птиц [27]. Семейство генов пепсина широко распространено, но распределено хаотично в ряду млекопитающих, подвержено псевдогенизации, и как указывалось выше, потери гена [40], [41]. Несмотря на псевдогенный статус у человека, Chn обнаружен у нескольких видов млекопитающих, рептилий и птиц, костистых рыб [40], [42], у приматов, кожнокрылых, грызунов, китообразных и непарнокопытных [3]. Chn является псевдогеном у человека за счет сдвига рамки считывания и последующего преждевременного стоп-кодона, вызванного делецией в экзоне 4 [43].

В отличие от других членов семейства пепсинов, мало что известно об эволюционной истории, распространении и функции Chn в линиях млекопитающих, несмотря на то, что Chn демонстрирует консервативную четвертичную структуру и каталитические остатки, он проявляет необычный профиль с низкой общей протеолитической активностью и высокой специфичностью к к-казеину молока [2], [8], [15], [30]. Так, в частности, филогенетический анализ на основе ДНК и аминокислотных последовательностях гена Chn девятнадцати видов млекопитающих, рыб, птиц, рептилий и грызунов, выявил идентичность в диапазоне от 64% до 98% [27], [31]. Аминокислотный сравнительный анализ рекомбинантного химозина (rChn) марала, быка и верблюда выявил, что последовательности зрелых химозинов оказались идентичными на 92,6%. rChn быка и верблюда имеют схожие третичные структуры, при этом идентичность их первичных структур составляет всего 84,8%. rChn быка и марала содержит больше отрицательно заряженных аминокислот [32]. Построена модель пространственной структуры rChn лося с позиции топографии положительных и отрицательных поверхностных зарядов в сравнении с rChn коровы и верблюда. Ранее исследователи получили и изучили rChn овцы (*Ovis aries*), козы (*Capra hircus*), буйвола (*Bubalus arnee bubalis*) и верблюда (*Camelus dromedarius*) [33], [34], [35], [36]. Позднее были получены и изучены rChn яка (*Bos grunniens*), альпаки (*Vicugna pacos*) и алтайского марала (*Cervus elaphus sibiricus*) [37], [38], [39].

Повторяющаяся инактивация Chn раскрывает эволюционные взаимодействия между пищеварительной и иммунной системами, регулируемого псевдогенизацией [3]. Роль Chn в передаче IgG изучалась исключительно у жвачных животных, Chn расщепляет кCS и запускает высвобождение сывороточного белка, который содержит IgG, в кишечный тракт для неселективного всасывания в течение первых часов после рождения [3], [44], [45], [46].

Картина псевдогенизации гена Chn, по-видимому, совпадает с приобретением новых стратегий передачи иммунитета, как ранее предполагалось для плотоядных животных, приматов и грызунов, за исключением жвачных животных [3], [47], [48], [49]. Хотя активность Chn напрямую связана со свертываемостью молока, она коррелирует с переносом иммуноглобулинов, зависящим от молозива и наличия ингибиторов трипсина в молозиве, что обеспечивает дополнительную защиту от ферментативного переваривания в тонком кишечнике [3], [15], [48]. В связи с этим было высказано предположение, что такое видоспецифичное распределение является результатом диетической адаптации, результатом приобретения пассивного переноса материнского иммунного иммуноглобулина G (IgG) – «*иммунная гипотеза*». Однако стратегии передачи IgG у разных млекопитающих различаются, так в частности у человека, например, IgG передается от матери к плоду на последних стадиях беременности (материнский перенос).

В связи с этим цель нашего исследования – выявить отличительную особенность аминокислотной и нуклеотидной последовательности Chn млекопитающих различных сред обитания, с различным рационом питания используя инструменты филогенетического анализа, для получения данных, которые могут использоваться для прогнозирования функции белка на клеточном уровне.

Методы и принципы исследования

Нуклеотидная последовательность экзонов гена Chn была получена из базы данных NCBI в разделе Gene: *Camelus bactrianus ferus* (XP_006194819.1), *Bos Bosgrunniens* (JX839990.1), *Bos Taurus* (NP851337.1), *Bubalus bubalis*

(XP006065015.1), *Ovis aries* (NP001009804.1), *Capra hircus* (NP001272688.1), *Camelus dromedaries* (NP_001290503.1), *Rattus norvegicus* (NP_064476.1), *Cervus canadensis* (MT225406.1), *Delphinapterus leucas* (XM_022583844.1), *Tupaia chinensis* (XM_006149562.1), *Vicugna pacos* (XM_031680278.1), *Alces alces alces* (MT542132.1), *Capreolus pygargus* (WGN96205.1). Множественное выравнивание (Multiple Sequence Alignment) нуклеотидных последовательностей проводилось с помощью базы данных EMBL-EBI (Великобритания) во вкладке CLUSTAL OMEGA.

Аминокислотная последовательность экзонов была получена из базы данных UniProt [52]. Выравнивание аминокислотной последовательности производилась с использованием базы данных EMBL-EBI: Множественное выравнивание проводили во вкладке Multiple Sequence Alignment в разделе CLUSTAL OMEGA (Великобритания), парное – во вкладке Pairwise Sequence Alignment в разделе EMBOSS Needle.

Множественное выравнивание гомологичных последовательностей консервативных участков экзонов в области каталитического центра (в положении 25-220) было получено с помощью редактора выравнивания биологических последовательностей BioEdit. Редактирование и улучшение визуализации проводилось во вкладке Graphic View [21]. Полученные данные визуализированы с помощью Excel с цветовым указанием семейств и сравниваемыми представителями семейств.

Филогенетический анализ проводили с использованием программы UniPro UGENE. Для построения филогенетического дерева использована модель Phylip Neighbor-Joining (Phylip Neighbor-Joining model), методом максимального правдоподобия на основе модели Tamura-Nei models [53], [54], [55], принимая во внимание различия в скорости замены между нуклеотидами и неравенство частот нуклеотидов, а также методом Neighbor-Joining method (NJ) для создания филогенетических (эволюционных) и фенетических (сходство на основе признаков) деревьев, на основе матрицы расстояний как метод минимальной эволюции [56].

Моделирование и визуализация трехмерной структуры. 3D модель химозина *Camelus dromedaries* построена в программе rcsb.org/3d-view/1CMS.

Статистическая обработка данных и визуализация полученных результатов проводилась с использованием пакетов программного обеспечения Prism 8.0.1 (Graphpad, USA) и Microsoft Excel.

Основные результаты и обсуждение

Анализируемые группы животных относятся к классу плацентарных млекопитающих водной и наземной среды обитания (рис. 1). Выбор для исследования представителей семейств определяется тем, что ген Chn данных представителей широко используется в качестве источника рекомбинантного химозина (rChn), ген интегрируется в состав экспрессионных челночных плазмид с дальнейшим включением в геном клеток продуцентов (*E.coli*, *Pichia pastoris*, также известная как *Komagataella phaffi*, *Kluyveromyces Lactis*, *Aspergillus niger* и др.) для синтеза белка Chn [3], [21], [37], [57].

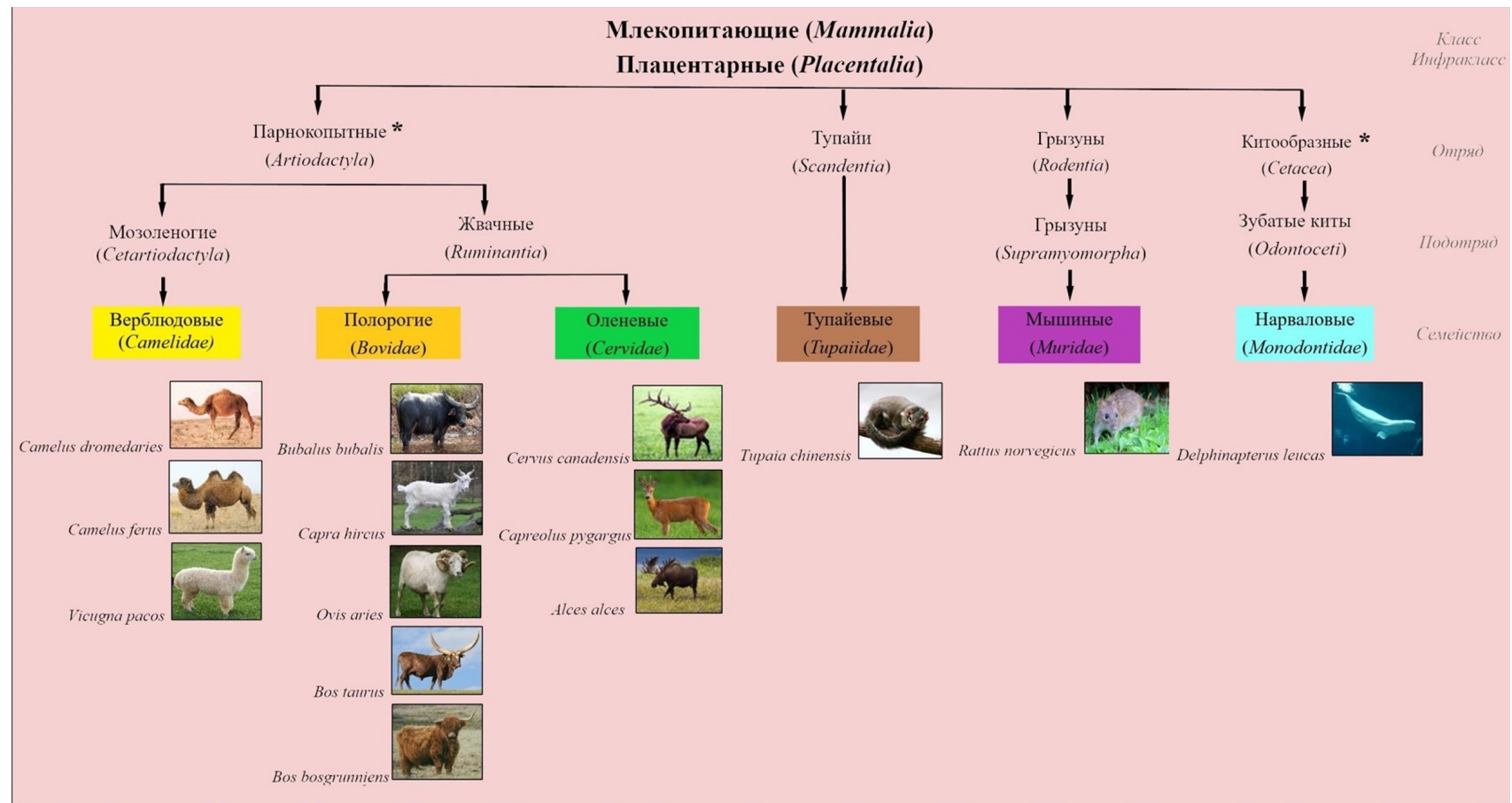


Рисунок 1 - Анализируемые представители семейств класса млекопитающие (Mammalia)

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7.1>

Примечание: * - отряды парнокопытные (Artiodactyla) и китообразные (Cetacea) объединяются в парафилетический отряд китопарнокопытные (Cetartiodactyla)

Ген *Chn* состоит из 381 аминокислотного остатка (1143 нп) включает в себя 8 интронов и 9 экзонов. *Chn* отличается необычным сочетанием ферментативных свойств, проявляет высокую специфичность в отношении единственной пептидной связи в молекуле к-CN и низкую общую протеолитическую активность, что определяет его биологические функции, способствует его полному усвоению в желудочно-кишечном тракте новорожденных [58]. В связи с этим нами проведен сравнительный анализ именно нуклеотидной и соответственно аминокислотной последовательности экзонов в области каталитического центра (рис. 2, 3), с предварительным выравниванием и дальнейшим определением консервативных и варьируемых участков (рис. 4, 5, 6, 7, 8).

Наиболее консервативными остатками аминокислот и их позиции, после выравнивания по всем представителям семейств, являются – Lys-Gly-K (26-28), Leu-Arg (30-31), Leu-Lys-Glu (34-36), Gly-Leu-Leu-Glu-Asp-Phe-Leu (38-44), Gln (47), Ser (52), Gly (59), Pro-Leu-Thr (65-67), Tyr-Leu-Asp (69-71), Tyr-Phe-Gly (74-76), Ile-Tyr (78-79), Gly-Thr-Pro (81-83), Gln-Glu-Phe (85-87), Val (89), Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ser (91-96), Trp-Val-Pro-Ser (99-102), Tyr-Cys (104-105), Ser (107), Val-Cys (109-110), H (113), Arg-Phe-Asp-Pro (115-118), Ser (121), Thr-Phe (123-124), Lys-Pro-Leu (129-131), Tyr-Gly-Thr-Gly-Ser (135-139), Leu (142), Tyr-Asp-Thr-Val-Thr-Val-Ser (146-152), Ile-Val (154-155), Gln-Thr-Val-Gly-Leu-Ser-Thr (159-165), Pro-Gly (168-169), Phe-Thr-Tyr (172-173), Phe-Asp-Gly- Ile-Leu- ly (177-182), Ala-Tyr-Pro (184-186), Ala (188), Tyr-Ser (192-193), Pro (195), Phe-Asp (197-198), Met-Met (200-201), Leu-Val-Ala (205-207), Asp (209), Phe- Ser-Val-Tyr (211-214), Arg (217) и Gln (220). Наибольшее количество замен одной аминокислоты среди анализируемых представителей выявлено у *Rattus norvegicus* (21 аминокислота, 12%). У *Delphinapterus leucas* (4 аминокислоты, 2,3%), *Tupaia chinensis* (3 аминокислоты, 1,7%), *Alces alces* (1 аминокислота, 0,6%).

Общий процент представленности аминокислот белка *Chn* (рис. 5, 6) выявил, что в наименьшем количестве представлены аминокислоты His и Trp, самая большая представленность Ser, Leu, Val и Glu. В области каталитического центра также в меньшем числе встречаются His и Trp, но дополнительно снижается количество Asn. Каталитический центр обогащен аминокислотами – Gly, Leu, Ser, Phe, Thr. Особо необходимо отметить, что фенилаланин (Phe) в большей мере представлен именно в области каталитического центра, в сравнении с его встречаемостью в общей протяженности белка. Следовательно, в общей аминокислотной последовательности *Chn* и в области каталитического центра в меньшей мере присутствуют положительно заряженные и ароматические аминокислоты, а в области каталитического центра снижается количество полярных незаряженных аминокислот. Также по всей протяженности белка отмечается большое количество полярных незаряженных, алифатических и отрицательно заряженных аминокислот. Тогда как в области каталитического центра, спектр аминокислот расширяется наряду, с алифатическими, полярными незаряженными, отмечаются нейтральные и ароматические (которыми обогащен каталитический центр).

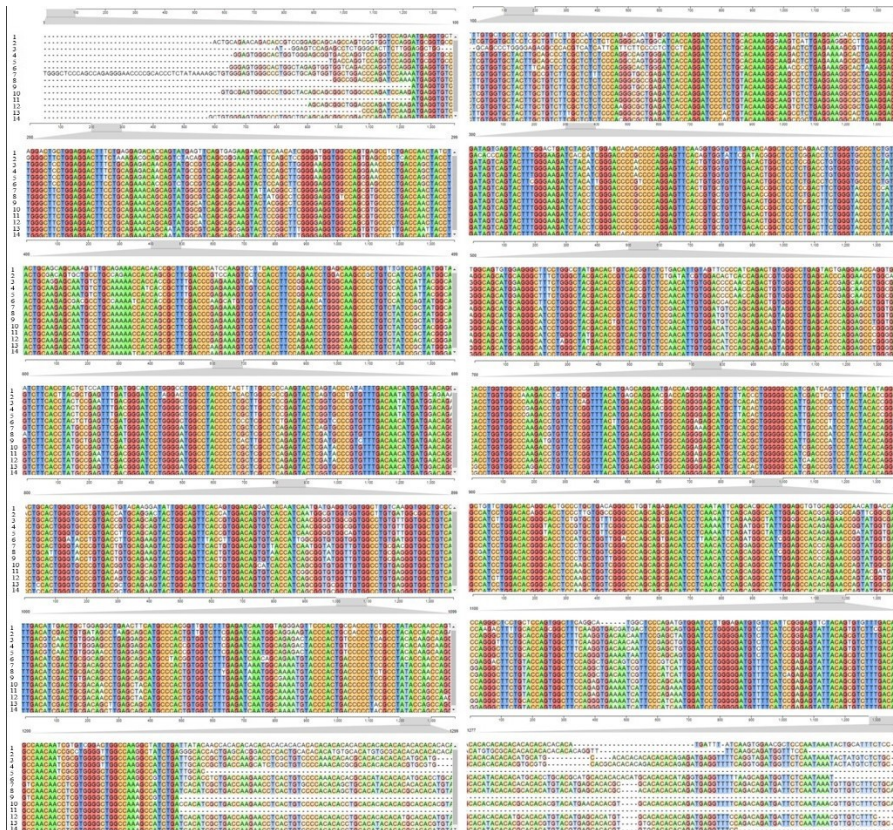


Рисунок 2 - Выравнивание кодирующей нуклеотидной последовательности гена химозина исследуемых семейств позвоночных животных:

1 - *R. norvegicus*; 2 - *T. chinensis*; 3 - *V. pacos*; 4 - *C. ferus*; 5 - *C. dromedarius*; 6 - *D. leucas*; 7 - *C. canadensis*; 8 - *A. alces*; 9 - *C. pygargus*; 10 - *B. bubalis*; 11 - *B. grunniens*; 12 - *B. taurus*; 13 - *O. aries*; 14 - *C. hircus*

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7.2>

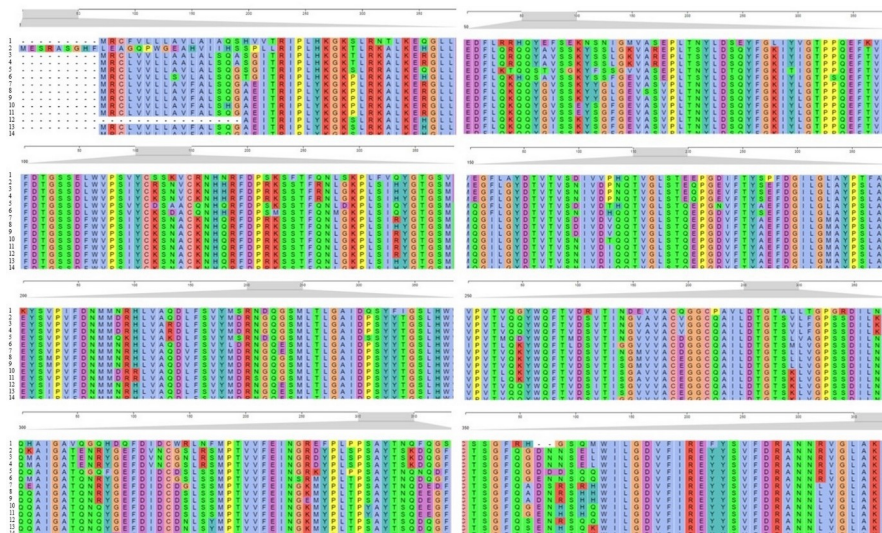


Рисунок 3 - Выравнивание аминокислотной последовательности гена химозина исследуемых семейств позвоночных животных:

1 - *R. norvegicus*; 2 - *V. pacos*; 3 - *C. dromedarius*; 4 - *C. ferus*; 5 - *T. chinensis*; 6 - *D. leucas*; 7 - *C. canadensis*; 8 - *A. alces*; 9 - *C. pygargus*; 10 - *C. hircus*; 11 - *O. aries*; 12 - *B. bubalis*; 13 - *B. taurus*; 14 - *B. grunniens*

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7.3>

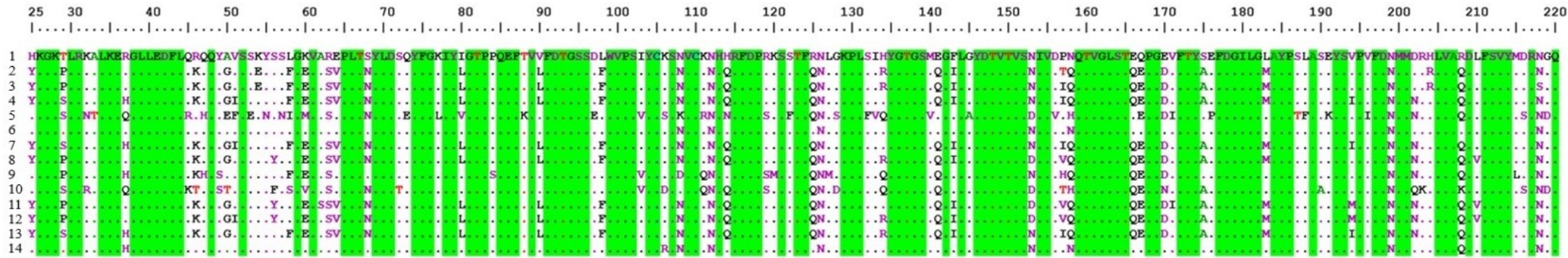


Рисунок 4 - Консервативные участки (или отдельные аминокислоты) каталитического (активного центра) гена химозина исследуемых семейств позвоночных животных (выделены зеленым):

1 - *C. dromedarius*; 2 - *C. hircus*; 3 - *O. aries*; 4 - *B. taurus*; 5 - *R. norvegicus*; 6 - *C. ferus*; 7 - *B. grunniens*; 8 - *C. canadensis*; 9 - *D. leucas*; 10 - *T. chinensis*; 11 - *A. alces*; 12 - *C. pygargus*; 13 - *B. bubalis*; 14 - *V. pacos*

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7.4>

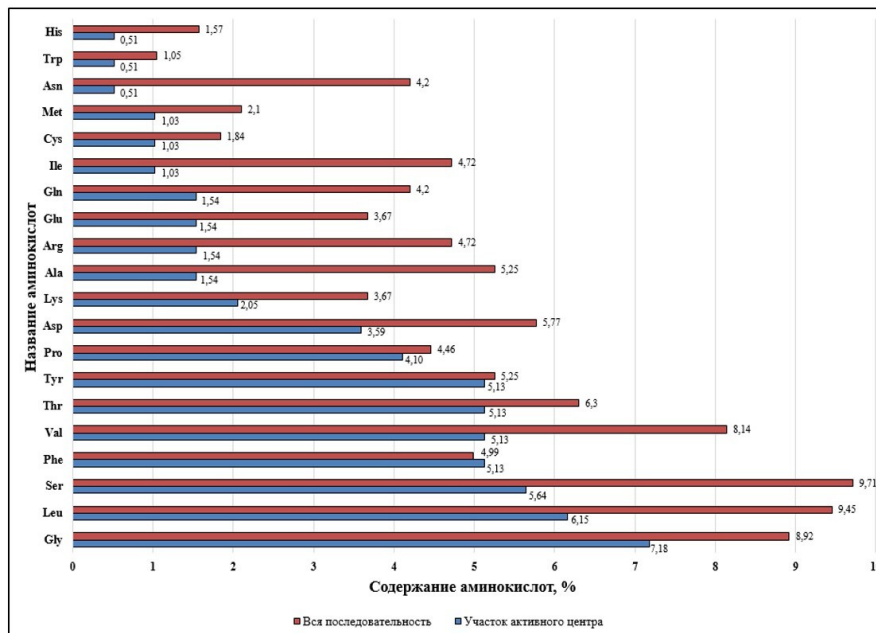


Рисунок 5 - Анализ содержания аминокислот в каталитическом центре и во всей аминокислотной последовательности химозина анализируемых семейств животных
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7.5>

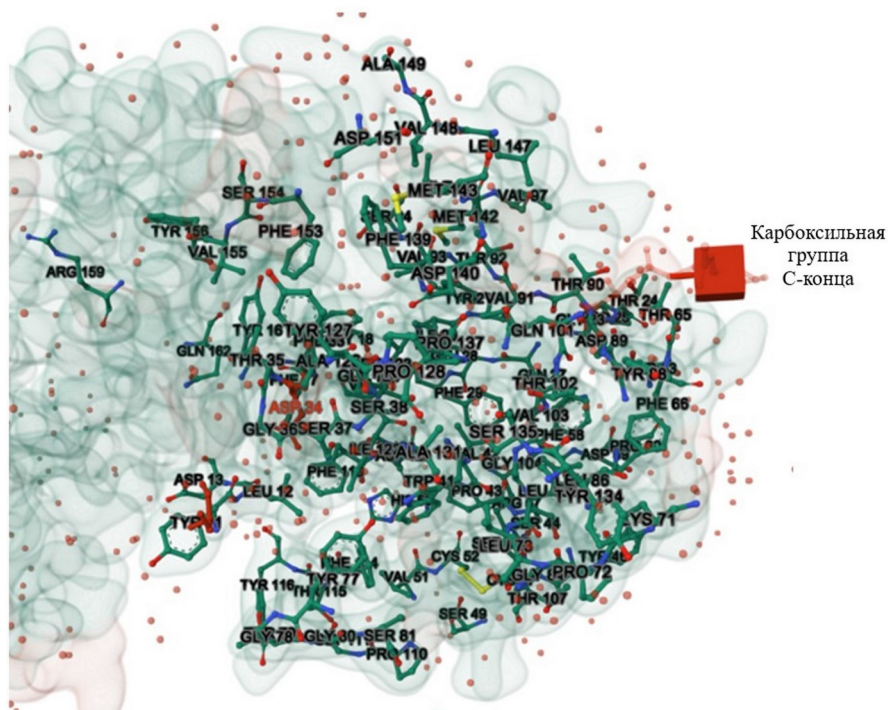


Рисунок 6 - 3D-модель каталитического центра белка химозина *Camelus dromedaries* с обозначением консервативных участков (синий и зеленые цвета)
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7.6>

Сравнительный попарный анализ нуклеотидной последовательности каталитического центра выявил, что нижний предел идентичности составляет 74% верхний – 95% (рис. 7). Наибольшее количество консервативных участков в области каталитического центра в группах диапазона:

- первая группа от 95-93% идентичности – отмечается между семействами *Cervidae* и *Bovidae*;
- вторая группа в диапазоне идентичности от 88-90% – отмечена у представителя семейства *Delphinapterus leucas* с *Camelidae* (*C.ferus* и *C.dromedaries*), *Cervidae* и *Bovidae*. А также у представителя семейства *Camelidae* с *B.bubalis* и *B.Bosgrunniens* (семейство *Bovidae*);
- третья группа в диапазоне идентичности от 85-87% – у представителей семейства *Camelidae* (*C.ferus* и *C.dromedaries*), с *Cervidae* и *Bovidae*. А также у *V.pacos* (семейство *Camelidae*) с *B.Bosgrunniens* (семейство *Bovidae*) и *D.leucas*;
- четвертая группа диапазон идентичности от 79-85% отмечен у *T.chinensis* (семейство *Tupaiidae*) с *Camelidae*, *Cervidae*, *Bovidae* и *Delphinapterus leucas*. А также *V.pacos* (семейство *Camelidae*) с *Cervidae*, *Bovidae*;
- пятая группа – идентичность представителя семейства *Muridae* (семейства *R.norvegicus*) в сравнении с другими семействами самая низкая – 74%.

Сравнительный попарный анализ аминокислотной идентичности (рис. 7) выявил различия с нуклеотидной. Так, в частности, нижний предел идентичности аминокислотной последовательности каталитического центра составляет 71-75%, верхний – 92-94%. Группы диапазона идентичности также отличаются:

- первая группа – 92-94%, полностью соответствует выявленной в первой группе нуклеотидной идентичности;
- вторая группа – диапазон идентичности составляет 85-87%. Также, как и в случае с нуклеотидной идентичностью, отмечено соответствие у представителя семейства *Delphinapterus leucas* с *Camelidae*, *Cervidae* и *Bovidae*. Отличием является то, что у представителей семейства *Camelidae* (*C.ferus* и *C.dromedaries*), аминокислотная идентичность выявлена не с *B.bubalis* и *B.Bosgrunniens* (семейство *Bovidae*), а с *T.chinensis* (семейство *Tupaiidae*) и *Delphinapterus leucas*;
- третья группа диапазон идентичности составляет 83-84%. Все представители семейства *Camelidae* (также, как и нуклеотидная идентичность) проявляют идентичность с *Cervidae* и *Bovidae*. А также отличительной особенностью является идентичность между *T.chinensis* (семейство *Tupaiidae*) и *Delphinapterus leucas*;
- четвертая группа диапазон идентичности от 81-82% отличием от выявленной нуклеотидной идентичности является лишь то, что у *V.pacos* (семейство *Camelidae*) идентичность выявлена с *Delphinapterus leucas*;
- пятая группа – идентичность 77-80% отмечена у *V.pacos* (семейство *Camelidae*) с *Cervidae* и *Bovidae* (кроме *B.bubalis*) и с *T.chinensis* (семейство *Tupaiidae*);
- шестая группа идентичность составляет 71-75% и полностью соответствует пятой группе по нуклеотидной идентичности гена *Chn*.

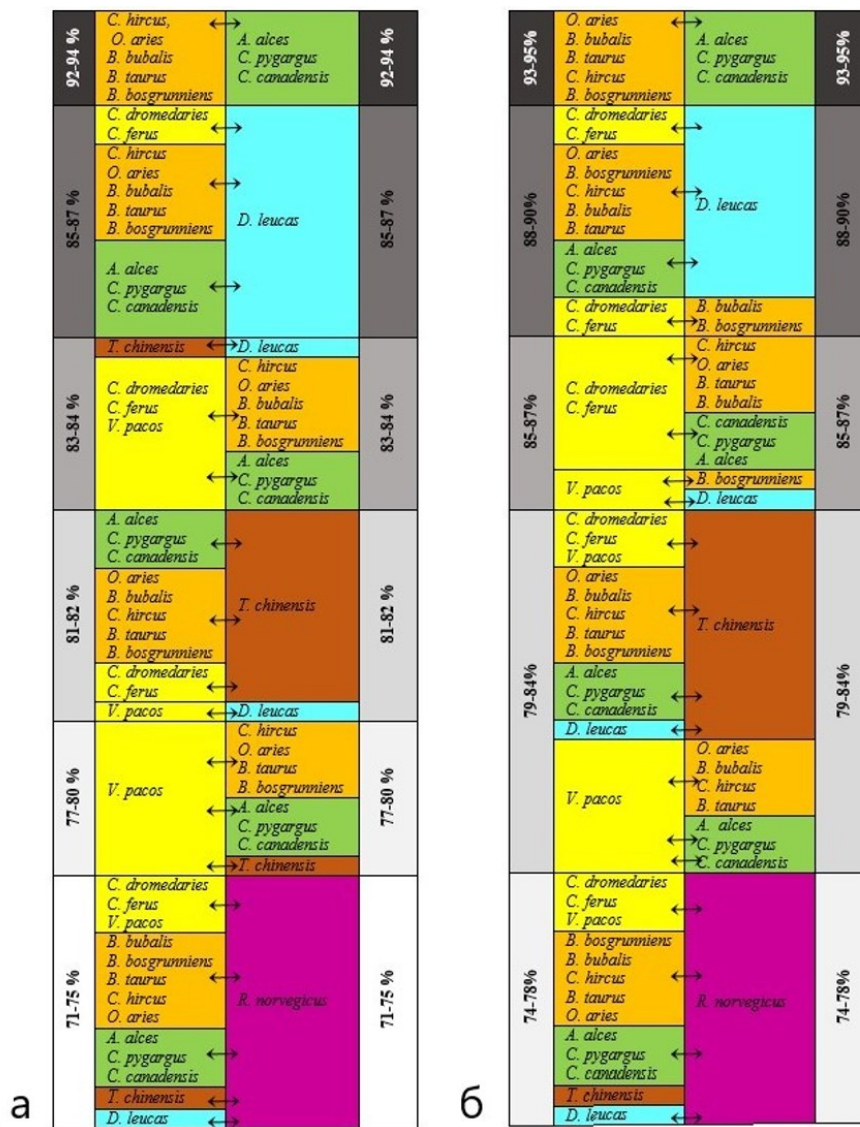


Рисунок 7 - Парное сравнение аминокислотной (а) и нуклеотидной (б) идентичности каталитического участка химозина у представителей анализируемых семейств
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7.7>

У представителей анализируемых семейств в процентном соотношении (рис. 8) в каталитическом центре Chp больше всего аминокислоты Ser (8,2-11,0%), Gly (7,9-9,2%), Val (7,1-9,0%) и Leu (8,0-9,5%). Также отмечено, что Ser, как представитель полярных незаряженных аминокислот, в большей мере присутствует у *Delphinapterus leucas* – 11,0%, *T. chinensis* – 10,0% и *Camelidae* (*C. ferus* – 10,0%, *C. dromedarius* – 9,7%, *V. pacos* – 10,3%). Нейтральная аминокислота Gly большая частота встречаемости больше всего у семейства *Bovidae* (*C. hircus* и *O. aries* – 9,2%) и *Camelidae* (*V. pacos* – 9,2%). Алифатическая аминокислота Val в большей мере отмечена у представителей семейства *Muridae* (*R. norvegicus* – 9,0%), *Cervidae* (*C. pygargus* – 8,4%, *C. canadensis* – 8,7%) и *Camelidae* (*C. ferus* – 8,4%). Алифатическая аминокислота Leu у *Camelidae* (*C. ferus* – 9,2%, *C. dromedarius* – 9,5%) и *Delphinapterus leucas* – 9,2%.

Достаточно редко встречаются такие аминокислоты, как Trp (1,1-1,3%), Cys (1,5-1,9%), His (1,1-2,6%) и Met (1,8-2,9%). Самая редко встречающаяся ароматическая аминокислота – Trp, процентное содержание находится в пределах 1,1–1,3% и не проявляет выраженных отличий распределения у представителей анализируемых семейств. Серосодержащая аминокислота Cys также является редко встречающейся, содержание которой колеблется в пределах 1,8–1,9%, за исключением одного из представителей *Camelidae* (*V. pacos* – 1,5%) и *Bovidae* (*B. bubalis* – 1,6%). Положительно заряженные аминокислоты His в равной степени редко встречаются у представителей семейства *Bovidae* (1,1 – 1,6%), *Camelidae* (1,1 – 1,6%), *Tupaiidae* (1,3%) и большинства представителей *Camelidae* (1,6%, кроме *V. pacos* – 2,6%). У семейств *Muridae* и *Delphinapterus leucas* (*R. norvegicus* – 2,6% и *D. leucas* – 2,1%). Серосодержащая аминокислота Met отмечена у представителей семейства *Cervidae* (2,6 - 2,89%), *Camelidae* (*V. pacos* – 1,8%) и *Muridae* (*R. norvegicus* – 2,1%).

Относительно представленности других аминокислот среди представителей анализируемых семейств можно отметить, что положительно заряженная аминокислота Arg меньше всего отмечается у всех представителей *Bovidae* (2,4 – 3,2%), *Tupaiidae* (*T. chinensis* – 2,6%) и *Delphinapterus leucas* (*D. leucas* – 2,9%) и более всего у всех представителей *Camelidae* (4,4 – 4,7%) и *Muridae* (*R. norvegicus* – 4,5). Полярная незаряженная аминокислота Glu менее всего представлена у *Tupaiidae* (2,6%). Положительно заряженной аминокислоты Lys меньше всего у *Tupaiidae*

(3,2%), *Muridae* (2,6%) и *Delphinapterus leucas* (2,9%). Такие аминокислоты алифатические как Asn, Pro, Ala, Ile и ароматическая Tyr не имеют ярко выраженных различий среди представителей анализируемых семейств. Тогда как ароматическая аминокислота Phe больше всего в каталитическом центре Chp у *Muridae* (7,1%), нейтральная аминокислота Gln – у *Bovidae* (6,3 – 7,1%) и *Tupaiidae* (7,1%), отрицательно заряженная аминокислота Asp и полярная незаряженная Thr – у *Tupaiidae* (7,4 – 7,6%).

Общий показатель консервативности по аминокислотному составу каталитического участка в положении 25 - 220 составляет 67% (118 идентичности из 175).

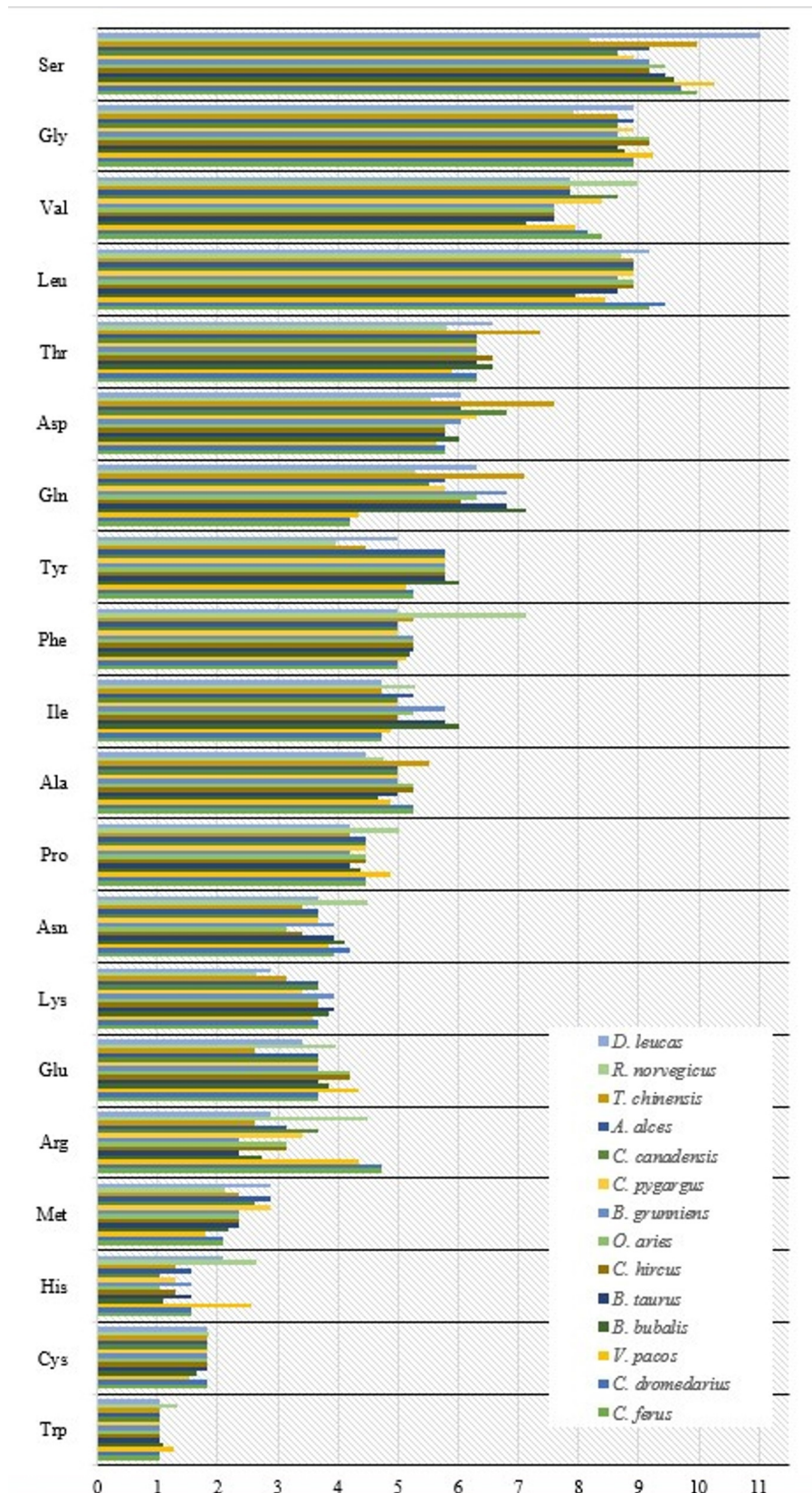


Рисунок 8 - Встречаемость аминокислот в области каталитического центра представителей анализируемых семейств
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7.8>

В ходе филогенетического анализа на дендрограмме (рис. 9), построенной для нуклеотидной последовательности гена химозина, можно выделить клады шести групп:

- группа I состоит из трёх видов семейства *Camelidae* (*C. Dromedaries*, *Camelus ferus*, *Vicugna pacos*);
- группа II включает три вида семейства *Cervidae* (*A. Alce*, *C. Canadensis*, *C. pygargus*);
- группа III – входят 5 видов семейства *Bovidae*, образующие две подгруппы.

В целом топология дерева трех групп соответствует топологии деревьев, построенных для других участков генома видов отряда *Cetartiodactyla*.

Отдельно стоят группы:

- группа IV – семейство *Delphinapterus leucas*;
- группа V – *Muridae* (семейства *R.norvegicus*)
- группа VI – *T.chinensis* (семейство *Tupaiidae*).

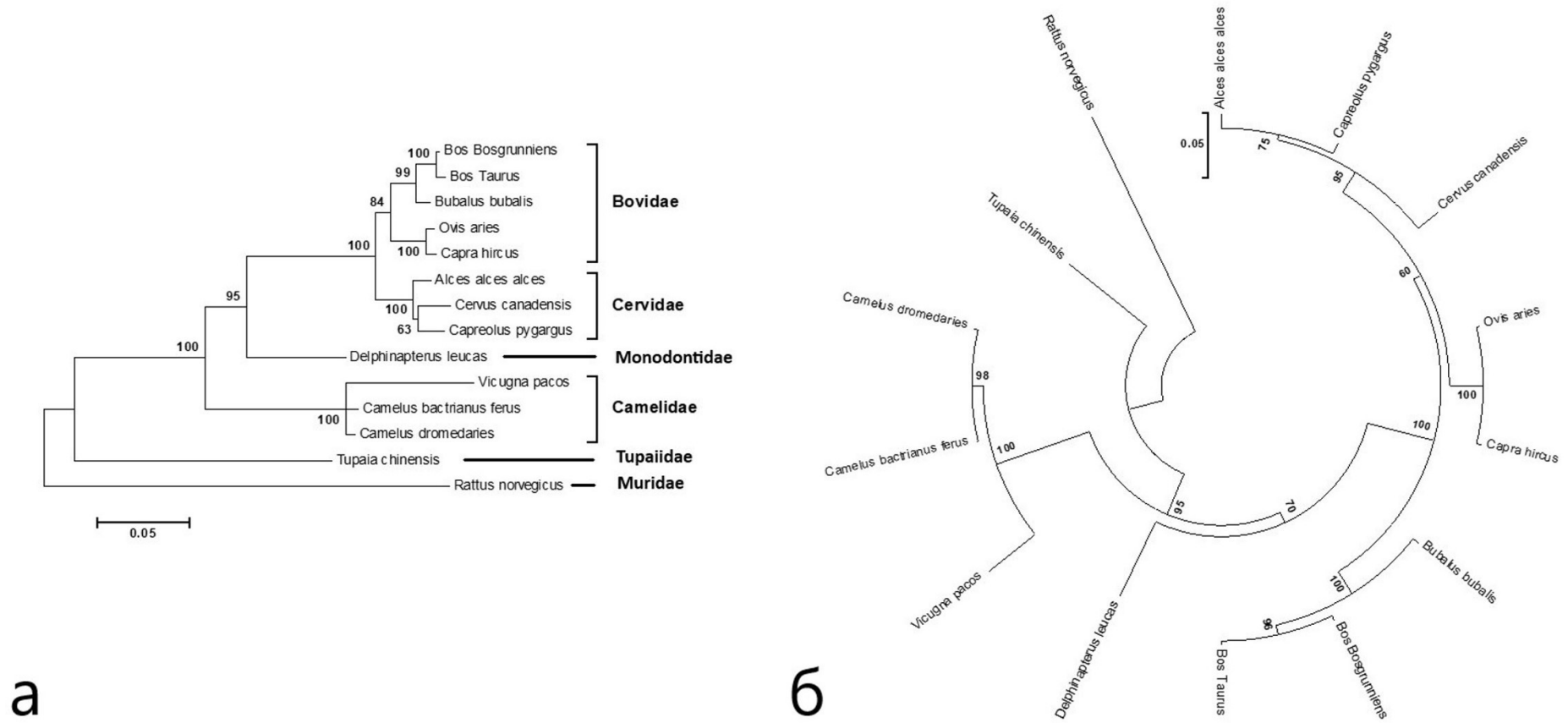


Рисунок 9 - Дендрограмма представителей анализируемых семейств построенная методом максимального правдоподобия на основе модели Tamura-Nei model (а) и метода присоединения соседей (Neighbor-Joining method) (б)
 DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.7.9>

Заключение

Исследования Chn были сосредоточены главным образом на характеристике биохимических, структурных и функциональных свойств для промышленных целей [1], [2], [3], [4], в то же время анализ эволюционной динамики в ряду позвоночных аминокислотной и нуклеотидной последовательности крайне актуальна [2], [17], в связи с тем, что Chn был обнаружен у большого числа видов, как наземных, так и водных млекопитающих [17]. Обоснованием для исследования белков заключается в механизмах мутаций, которые определяют изменения нуклеотидной последовательности гена и последовательно приводят к изменениям последовательности аминокислот в белке в процессе эволюции [18], [20], [22], [27]. Так, в частности, дупликация и делеция генов, потеря генов и псевдогенизация [15], [40], [41], [42] являются мощными драйверами эволюционных изменений, которые иллюстрируются изменчивым ферментативным спектром, участвующим в переваривании белков позвоночных включая Chn и являются реакцией на общие факторы окружающей среды, терморегуляции организма, рацион питания [23], соответственно рассматриваются в качестве ключевого фактора в формировании эволюционных изменений [24], [25], что определяется необходимостью в адаптивной фенотипической изменчивости с морфофункциональными последствиями для организмов [3], [15], [26]. Более того, APS выполняют разнообразные функции от пищеварения до участия в формировании иммунитета [3], [8], [11], [48]. Анализ генов Chn у разных млекопитающих выявил сходство в организации генов и эти результаты подтверждают мнение о том, что эти гены ферментов произошли от общего предкового гена [27].

Несмотря на то, что Chn демонстрирует высокую консервативность структуры и аминокислотных остатков в области каталитического центра [2], [8], [15], [30] в ходе наших исследований выявлено, что наиболее консервативными остатками аминокислот и их позиции в области каталитического центра являются – Lys-Gly-K (26-28), Leu-Arg (30-31), Leu-Lys-Glu (34-36), Gly-Leu-Leu-Glu-Asp-Phe-Leu (38-44), Gln (47), Ser (52), Gly (59), Pro-Leu-Thr (65-67), Tyr-Leu-Asp (69-71), Tyr-Phe-Gly (74-76), Ile-Tyr (78-79), Gly-Thr-Pro (81-83), Gln-Glu-Phe (85-87), Val (89), Phe-Asp-Thr-Gly-Ser-Ser (91-96), Trp-Val-Pro-Ser (99-102), Tyr-Cys (104-105), Ser (107), Val-Cys (109-110), H (113), Arg-Phe-Asp-Pro (115-118), Ser (121), Thr-Phe (123-124), Lys-Pro-Leu (129-131), Tyr-Gly-Thr-Gly-Ser (135-139), Leu (142), Tyr-Asp-Thr-Val-Thr-Val-Ser (146-152), Ile-Val (154-155), Gln-Thr-Val-Gly-Leu-Ser-Thr (159-165), Pro-Gly (168-169), Phe-Thr-Tyr (172-173), Phe-Asp-Gly- Ile-Leu- ly (177-182), Ala-Tyr-Pro (184-186), Ala (188), Tyr-Ser (192-193), Pro (195), Phe-Asp (197-198), Met-Met (200-201), Leu-Val-Ala (205-207), Asp (209), Phe- Ser-Val-Tyr (211-214), Arg (217) и Gln (220). В белке в целом меньше всего встречается His и Trp, самая большая представленность Ser, Leu, Val и Glu. В области же каталитического центра, также, как и в общем в белке, в меньшей мере встречаются His и Trp, но дополнительно снижается количество Asp. Каталитический центр обогащен аминокислотами – Gly, Leu, Ser, Phe, Thr. Особо необходимо отметить, что фенилаланин (Phe) в большей мере представлен именно в области каталитического центра, в сравнении с его встречаемостью в общей протяженности белка.

Сравнительный анализ, после выравнивания, нуклеотидной и аминокислотной последовательности в области каталитического центра Chn у представителей анализируемых семейств выявил, что самая высокая идентичность отмечается в обоих случаях между семействами *Cervidae*, *Bovidae* и *Camelidae* (*C. Dromedaries*, *Camelus ferus*). Наименьшая, у семейства *Muridae* (семейства *R.norvegicus*) со всеми анализируемыми представителями семейств.

Выявлены специфические идентичности по нуклеотидной последовательности, которые формируются у *Vicugna pacos* (семейство *Camelidae*) с *Bovidae*, *Delphinapterus leucas* и *Cervidae*. Тогда как самая высокая идентичность по аминокислотной последовательности в области каталитического центра отмечена у *Camelidae* (*C. Dromedaries*, *Camelus ferus*) с *T.chinensis* (семейство *Tupaiidae*), *Delphinapterus leucas*. В свою очередь у семейства *T.chinensis* (семейство *Tupaiidae*) идентичны нуклеотидные последовательности с *Delphinapterus leucas*. У *Vicugna pacos* (семейство *Camelidae*) с *Delphinapterus leucas*. Наименьшая идентичность нуклеотидной последовательности отмечается у *Vicugna pacos* (семейство *Camelidae*) с *Cervidae*, *Bovidae* и *T.chinensis* (семейство *Tupaiidae*). Нижний предел идентичности нуклеотидной последовательности в области каталитического центра для анализируемых представителей семейств составляет 74%, а аминокислотной – 71%. Верхний предел идентичности нуклеотидной последовательности в области каталитического центра для анализируемых представителей семейств составляет 95%, а аминокислотной – 94%.

Представленность аминокислотного состава Chn носит выраженно видоспецифичный характер - достаточно редко встречаются Trp (1,1-1,3%), Cys (1,5-1,9%), His (1,1-2,6%) и Met (1,8-2,9%), часто – Ser (8,2-11,0%), Gly (7,9-9,2%), Val (7,1-9,0%) и Leu (8,0-9,5%). Общий показатель консервативности по аминокислотному составу каталитического участка в положении 25 - 220 составляет 67% (118 идентичности из 175).

В ходе филогенетического анализа на дендрограмме, построенной для нуклеотидной последовательности гена химозина, можно выделить клады шести клад:

- клада I состоит из трёх видов семейства *Camelidae* (*C. Dromedaries*, *Camelus ferus*, *Vicugna pacos*);
- клада II включает три вида семейства *Cervidae* (*A. Alce*, *C. Canadensis*, *C. pygargus*);
- клада III – входят 5 видов семейства *Bovidae*, образующие две подгруппы.

В целом топология дерева трех групп соответствует топологии деревьев, построенных для других участков генома видов отряда *Cetartiodactyla*.

Отдельно стоят группы:

- клада IV – семейство *Delphinapterus leucas*;
- клада V – *Muridae* (семейства *R.norvegicus*)
- клада VI – *T.chinensis* (семейство *Tupaiidae*).

Таким образом, выявлен широкий спектр как различий, так и сходства анализируемых параметров гена и белка Chp у исследуемых представителей семейств, которое по всей видимости определяется средой обитания, рационом питания, терморегуляцией организма и участием Chp в пассивном переносе материнского IgG, согласно «иммунной гипотезе». Выявленные замены, спектр и представленность аминокислот как в целом в белке, так и в области каталитического центра, могут влиять на связывание фермента с кCS и, следовательно, на каталитическую активность.

Финансирование

Работа написана в рамках выполнения государственного задания «Разработка способа очистки ферментов, как продукта генетически сконструированной экспрессионной системы». Дополнительное соглашение №073-03-2024-060/1 от 13.02.2024 к Соглашению о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнения работ) № 073-03-2024-060 от 18.01.2024, заключенным между ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» и Министерством просвещения Российской Федерации. Регистрационный номер 124102300757-8.

Благодарности

Авторы выражаем благодарность Цыганову А.В. за помощь, оказанную по биоинформативной обработке данных.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

The work was written within the framework of the state task "Development of a method for purification of enzymes as a product of a genetically engineered expression system". Supplementary Agreement No.073-03-2024-060/1 dated 02/13/2024 to the Agreement on the Provision of Subsidies from the Federal Budget for Financial Support of the State Task for the Provision of Public Services (performance of Works) No. 073-03-2024-060 dated 01/18/2024, concluded between the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education named after I.N. Ulyanov and the Ministry of Education of the Russian Federation. Registration number 124102300757-8.

Acknowledgement

Authors express their gratitude to Tsyganov A.V. for assistance in bioinformatic data processing.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Szecsi P.B. The aspartic proteases / P.B. Szecsi // Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation. — 1992. — 52. — p. 5–22.
2. Palmer D.S. Bovine chymosin: a computational study of recognition and binding of bovine κ -Casein / D.S. Palmer, A.U. Christensen, J. Sørensen [et al.] // Biochemistry. — 2010. — 49. — p. 2563–2573.
3. Lopes-Marques M. Unusual loss of chymosin in mammalian lineages parallels neo-natal immune transfer strategies / M. Lopes-Marques, R. Ruivo, E. Fonseca [et al.] // Molecular Phylogenetics and Evolution. — 2017. — 116. — p. 78–86.
4. Антонова Е.И. Генетические конструкции как источник получения рекомбинантного химозина / Е.И. Антонова, А.Н. Аббязова, Н.В. Фирсова [и др.] // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии. Материалы VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием. — Ульяновск: Среда, 2024. — с. 49–55.
5. Amjad H. Comprehensive bioinformatics annotation and functional characterization of bovine chymosin protein reveals new biological insights / H. Amjad, F. Salim, M. Ahmad [et al.] // Food Chemistry (Oxf). — 2024. — 30(8). — p. 190–195.
6. Gilliland G.L. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution / G.L. Gilliland, E.L. Winborne, J. Nachman [et al.] // Proteins. — 1990. — 8. — p. 82–101.
7. Мурашкин Д.Е. Анализ некоторых биохимических свойств рекомбинантного химозина сибирской козули (*Capreolus pygargus*), полученного в культуре клеток млекопитающих (СНО-К1) / Д.Е. Мурашкин, С.В. Бельнская, А.А. Бондарь [и др.] // Биохимия. — 2023. — Т. 88. — Вып. 9. — с. 10–20.
8. Pearl L. The active site of aspartic proteinases / L. Pearl, T. Blundell // FEBS Letters. — 1984. — 174. — p. 96–101.
9. Rawlings N.D. Pepsin homologues in bacteria / N.D. Rawlings, A. Bateman // BMC Genomics. — 2009. — 10(1). — p. 437–441.
10. Revuelta M.V. Extensive expansion of A1 family aspartic proteinases in fungi revealed by evolutionary analyses of 107 complete eukaryotic proteomes / M.V. Revuelta, J.A.L. van Kan, J. Kay [et al.] // Genome Biology and Evolution. — 2014. — 6 (6). — p. 1480–1494.
11. Grahame D.S.A. Comparative bioinformatic and structural analyses of pepsin and renin / D.S.A. Grahame, J.H. Dupuis, B.C. Bryksa [et al.] // Enzyme and Microbial Technology. — 2020. — 141. — p. 120–135.
12. Rawlings N.D. Evolutionary families of peptidases / N.D. Rawlings, A.J. Barrett // Biochemical Journal. — 1993. — 290 (1). — p. 205–218.
13. Rawlings N.D. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors / N.D. Rawlings, A.J. Barrett, A. Bateman // Nucleic Acids Research. — 2012. — 40. — p. 343–350.
14. Davies D.R. The structure and function of the aspartic proteinases / D.R. Davies // Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry. — 1990. — 19. — p. 189–215.

15. Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development / T. Kageyama // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2002. — 59. — p. 288–306.
16. Wu T. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*) / T. Wu, L.C. Sun, C.H. Du [et al.] // *Food Chemistry*. — 2009. — 115. — p. 137–142.
17. Uniacke-Lowe T. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties / T. Uniacke-Lowe, P.F. Fox // *Cheese: Chemistry. Physics and Microbiology: Fourth Edition*. — 2017. — 1. — p. 69–113.
18. He J. «Phylogenetic methods» in *Encyclopedia of Microbiology* / J. He — Cambridge, MA: Academic Press, 2019. — 550 p.
19. Heger A. Towards a covering set of protein family profiles / A. Heger, L. Holm // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. — 2000. — 73 (5) . — p. 321–337.
20. Malik U. Unveiling the physical and functional niches of fam26f by analyzing its subcellular localization and novel interacting partners / U. Malik, S. Zafar, N. Younas [et al.] // *ACS Omega*. — 2020. — 5(35). — p. 22008–22020.
21. Narang P.K. Functional annotation and sequence-structure characterization of a hypothetical protein putatively involved in carotenoid biosynthesis in microalgae / P.K. Narang, J. Dey, S.R. Mahapatra [et al.] // *South African Journal of Botany*. — 2021. — 141. — p. 219–226.
22. Lagunas-Rangel F.A. Bioinformatic analysis of SIRT7 sequence and structure / F.A. Lagunas-Rangel // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. — 2023. — 41(16). — p. 8081–8091.
23. Yuan Y. Comparative genomics provides insights into the aquatic adaptations of mammals / Y. Yuan, Y. Zhang, P. Zhang [et al.] // *Biological Sciences*. — 2021. — 118(37). — p. 110–118.
24. Albalat R. Evolution by gene loss / R. Albalat, C. Canestro // *Nature Reviews Genetics*. — 2016. — 17. — p. 379–391.
25. Opazo J.C. Evolution of gremlin 2 in cetartiodactyl mammals: gene loss coincides with lack of upper jaw incisors in ruminants / J.C. Opazo, K. Zavala, P. Krall [et al.] // *PeerJ*. — 2017. — 5. — p. 2901–2906.
26. Castro L.F.C. The evolution of pepsinogen C genes in vertebrates: duplication, loss and functional diversification / L.F.C. Castro, M. Lopes-Marques, O. Gonçalves [et al.] // *PLoS One*. — 2012. — 7. — p. e32852.
27. Wang X. Quantitative Analysis of Protein Evolution: The Phylogeny of Osteopontin / X. Wang, F. Weber Georg // *Frontiers in Genetics | Evolutionary and Population Genetics*. — 2021. — 12. — p. e700789.
28. Kawasaki K. Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster / K. Kawasaki, K.M. Weiss // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. — 2003. — 100. — p. 4060–4065.
29. Caroli A.M. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition / A.M. Caroli, S. Chessa, G.J. Erhardt // *Journal Of Dairy Science*. — 2009. — 92. — p. 5335–5352.
30. Jensen J.L. Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties / J.L. Jensen, A. Mølgaard, J.C.N. Poulsen [et al.] // *Acta Crystallographica Section D*. — 2013. — 69. — p. 901–913.
31. El-Sohaimy S.A. Cloning and In Vitro-Transcription of Chymosin Gene in *E. coli* / S.A. El-Sohaimy, E.E. Hafez, M.A. El-Saadani // *The Open Nutraceuticals Journal*. — 2010. — 3. — p. 63–68.
32. Belenkaya S.V. Characterization of the Altai Maral Chymosin Gene, Production of a Chymosin Recombinant Analog in the Prokaryotic Expression System, and Analysis of Its Several Biochemical Properties / S.V. Belenkaya, A.A. Bondar, T.A. Kurgina [et al.] // *BIOCHEMISTRY*. — 2020. — 85 (7). — p. 201–210.
33. Rogelj I. Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production / I. Rogelj, B. Perko, A. Francky [et al.] // *Journal Of Dairy Science*. — 2001. — 84. — p. 85–93.
34. Vega-Hernández M.C. Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin / M.C. Vega-Hernández, A. Gomez-Coello, J. Villar [et al.] // *Journal of Biotechnology*. — 2004. — 114. — p. 110–123.
35. Vallejo J.A. Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris* / J.A. Vallejo, J.M. Ageitos, M. Poza [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2008. — 56. — p. 36–42.
36. Kappeler S.R. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk / S.R. Kappeler, H. Rahbek-Nielsen, Z. Farah [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2006. — 342(2). — p. 647–654.
37. Balabova D.V. Can recombinant tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) chymosin coagulate cow (*Bos taurus*) milk? / D.V. Balabova, S.V. Belenkaya, E.A. Volosnikova [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2022. — 58. — p. 220–229.
38. Belenkaya S.V. Biochemical properties of recombinant chymosin in alpaca (*Vicugna pacos* L.) / S.V. Belenkaya, A.P. Rudometov, D.N. Shcherbakov [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2018. — 54(6). — p. 240–249.
39. Elchaninov V.V. Development of a producer of recombinant maral chymosin based on the yeast *Kluyveromyces lactis* / V.V. Elchaninov, D.N. Shcherbakov // *Biotechnology*. — 2021. — 37. — p. 108–116.
40. Castro L.F.C. Recurrent gene loss correlates with the evolution of stomach phenotypes in gnathostome history / L.F.C. Castro, O. Gonçalves, S. Mazan [et al.] // *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*. — 2014. — 281 (1775). — p. 200–210.
41. Narita Y. Lineage-specific duplication and loss of pepsinogen genes in hominoid evolution / Y. Narita, S.I. Oda, O. Takenaka [et al.] // *Journal of Molecular Evolution*. — 2010. — 70. — p. 313–324.
42. Ordoñez G.R. Loss of genes implicated in gastric function during platypus evolution / G.R. Ordoñez, L.W. Hillier, W.C. Warren [et al.] // *Genome Biology*. — 2008. — 9. — p. R81.
43. Örd T. Structure of the human genomic region homologous to the bovine prochymosin-encoding gene / T. Örd, M. Kolmer, R. Villems [et al.] // *Gene*. — 1990. — 91. — p. 241–246.

44. Cruywagen C.W. Effect of curd forming of colostrum on absorption of immunoglobulin g in newborn calves / C.W. Cruywagen // *Journal Of Dairy Science*. — 1990. — 73. — p. 3287–3290.
45. Szecsi B. Chymosin. Handbook of Proteolytic Enzymes / B. Szecsi, M. Harboe — New York: Academic Press, 2013. — 37 p.
46. Mokhber-Dezfooli M.R. Effect of abomasal emptying rate on the apparent efficiency of colostrum immunoglobulin G absorption in neonatal Holstein-Friesian calves / M.R. Mokhber-Dezfooli, M. Nouri, M. Rasekh [et al.] // *Journal Of Dairy Science*. — 2012. — 95. — p. 6740–6749.
47. Coe C.L. Vital and vulnerable functions of the primate placenta critical for infant health and brain development / C.L. Coe, G.R. Lubach // *Frontiers in Neuroendocrinology*. — 2014. — 35. — p. 439–446.
48. Borghesi J. Immunoglobulin transport during gestation in domestic animals and humans — a review / J. Borghesi, L. Mario, M. Rodrigues [et al.] // *Open Journal of Animal Sciences*. — 2014. — 1. — p. 323–336.
49. Furukawa S. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals / S. Furukawa, Y. Kuroda, A. Sugiyama // *Journal of Toxicologic Pathology*. — 2014. — 27. — p. 11–18.
50. Beltrán-Espinoza J.A. The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk / J.A. Beltrán-Espinoza, B. Domínguez-Lujan, N. Gutiérrez-Méndez [et al.] // *International Journal of Dairy Technology*. — 2021. — 74 (2). — p. 297–306.
51. Mbye M. Physicochemical properties, sensory quality, and coagulation behavior of camel versus bovine milk soft unripened cheeses / M. Mbye, B. Sobti, M.K. Al Nuami [et al.] // *NFS Journal*. — 2020. — 20. — p. 28–36.
52. Consortium U. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge / U. Consortium // *Nucleic Acids Research*. — 2019. — 47(D1). — p. D506–D515.
53. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution*. — 1993. — 10. — p. 512–526.
54. Tamura K. Evolutionary Distance Estimation Under Heterogeneous Substitution Pattern Among Lineages / K. Tamura, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. — 2002. — 19 (10). — p. 1727–1736.
55. Kaplan M.F. Evaluation of raw milk samples and vendor-derived *Staphylococcus aureus* and *Coxiella burnetii* prevalence in dairy delicatessens in eastern Turkey / M.F. Kaplan, E. Kaplan, A. Raza [et al.] // *International Journal of Food Science and Nutrition*. — 2024. — 12. — p. 5942–5950.
56. Hong Y. ENJ algorithm can construct triple phylogenetic trees / Y. Hong, M. Guo, J. Wang // *Molecular Therapy: Nucleic Acids*. — 2021. — 23. — p. 286–293.
57. Akishev Z. Obtaining of Recombinant Camel Chymosin and Testing Its Milk-Clotting Activity on Cow's, Goat's, Ewes' Camel's and Mare's Milk / Z. Akishev, S. Aktayeva, A. Kiribayeva [et al.] // *Biology*. — 2022. — 11 (11). — p. e1545.
58. Holt C. Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods / C. Holt, J.A. Carver, H. Ecroyd [et al.] // *Journal Of Dairy Science*. — 2013. — 96. — p. 300–307.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Szecsi P.B. The aspartic proteases / P.B. Szecsi // *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*. — 1992. — 52. — p. 5–22.
2. Palmer D.S. Bovine chymosin: a computational study of recognition and binding of bovine κ -Casein / D.S. Palmer, A.U. Christensen, J. Sørensen [et al.] // *Biochemistry*. — 2010. — 49. — p. 2563–2573.
3. Lopes-Marques M. Unusual loss of chymosin in mammalian lineages parallels neo-natal immune transfer strategies / M. Lopes-Marques, R. Ruivo, E. Fonseca [et al.] // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. — 2017. — 116. — p. 78–86.
4. Antonova E.I. Geneticheskie konstruksii kak istochnik poluchenija rekombinantnogo himozina [Genetic constructs as a source of recombinant chymosin production] / E.I. Antonova, A.N. Abbjazova, N.V. Firsova [et al.] // *Fundamental and applied research in priority areas of bioecology and biotechnology. Materials of the VII All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation*. — Ul'janovsk: Sreda, 2024. — p. 49–55. [in Russian]
5. Amjad H. Comprehensive bioinformatics annotation and functional characterization of bovine chymosin protein reveals new biological insights / H. Amjad, F. Salim, M. Ahmad [et al.] // *Food Chemistry (Oxf)*. — 2024. — 30(8). — p. 190–195.
6. Gilliland G.L. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution / G.L. Gilliland, E.L. Winborne, J. Nachman [et al.] // *Proteins*. — 1990. — 8. — p. 82–101.
7. Murashkin D.E. Analiz nekotoryh biohimicheskikh svojstv rekombinantnogo himozina sibirskoj kosuli (*Capreolus pygargus*), poluchennogo v kul'ture kletok mlekopitajuschih (CHO-K1) [Analysis of some biochemical properties of recombinant chymosin of Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) obtained in mammalian cell culture (CHO-K1)] / D.E. Murashkin, S.V. Belen'kaja, A.A. Bondar' [et al.] // *Biochemistry*. — 2023. — Vol. 88. — Iss. 9. — p. 10–20. [in Russian]
8. Pearl L. The active site of aspartic proteinases / L. Pearl, T. Blundell // *FEBS Letters*. — 1984. — 174. — p. 96–101.
9. Rawlings N.D. Pepsin homologues in bacteria / N.D. Rawlings, A. Bateman // *BMC Genomics*. — 2009. — 10(1). — p. 437–441.
10. Revuelta M.V. Extensive expansion of A1 family aspartic proteinases in fungi revealed by evolutionary analyses of 107 complete eukaryotic proteomes / M.V. Revuelta, J.A.L. van Kan, J. Kay [et al.] // *Genome Biology and Evolution*. — 2014. — 6 (6). — p. 1480–1494.
11. Grahame D.S.A. Comparative bioinformatic and structural analyses of pepsin and renin / D.S.A. Grahame, J.H. Dupuis, B.C. Bryksa [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. — 2020. — 141. — p. 120–135.
12. Rawlings N.D. Evolutionary families of peptidases / N.D. Rawlings, A.J. Barrett // *Biochemical Journal*. — 1993. — 290 (1). — p. 205–218.
13. Rawlings N.D. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors / N.D. Rawlings, A.J. Barrett, A. Bateman // *Nucleic Acids Research*. — 2012. — 40. — p. 343–350.

14. Davies D.R. The structure and function of the aspartic proteinases / D.R. Davies // *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. — 1990. — 19. — p. 189–215.
15. Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development / T. Kageyama // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2002. — 59. — p. 288–306.
16. Wu T. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*) / T. Wu, L.C. Sun, C.H. Du [et al.] // *Food Chemistry*. — 2009. — 115. — p. 137–142.
17. Uniacke-Lowe T. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties / T. Uniacke-Lowe, P.F. Fox // *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition*. — 2017. — 1. — p. 69–113.
18. He J. «Phylogenetic methods» in *Encyclopedia of Microbiology* / J. He — Cambridge, MA: Academic Press, 2019. — 550 p.
19. Heger A. Towards a covering set of protein family profiles / A. Heger, L. Holm // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. — 2000. — 73 (5). — p. 321–337.
20. Malik U. Unveiling the physical and functional niches of fam26f by analyzing its subcellular localization and novel interacting partners / U. Malik, S. Zafar, N. Younas [et al.] // *ACS Omega*. — 2020. — 5(35). — p. 22008–22020.
21. Narang P.K. Functional annotation and sequence-structure characterization of a hypothetical protein putatively involved in carotenoid biosynthesis in microalgae / P.K. Narang, J. Dey, S.R. Mahapatra [et al.] // *South African Journal of Botany*. — 2021. — 141. — p. 219–226.
22. Lagunas-Rangel F.A. Bioinformatic analysis of SIRT7 sequence and structure / F.A. Lagunas-Rangel // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. — 2023. — 41(16). — p. 8081–8091.
23. Yuan Y. Comparative genomics provides insights into the aquatic adaptations of mammals / Y. Yuan, Y. Zhang, P. Zhang [et al.] // *Biological Sciences*. — 2021. — 118(37). — p. 110–118.
24. Albalat R. Evolution by gene loss / R. Albalat, C. Canestro // *Nature Reviews Genetics*. — 2016. — 17. — p. 379–391.
25. Opazo J.C. Evolution of gremlin 2 in cetartiodactyl mammals: gene loss coincides with lack of upper jaw incisors in ruminants / J.C. Opazo, K. Zavala, P. Krall [et al.] // *PeerJ*. — 2017. — 5. — p. 2901–2906.
26. Castro L.F.C. The evolution of pepsinogen C genes in vertebrates: duplication, loss and functional diversification / L.F.C. Castro, M. Lopes-Marques, O. Gonçalves [et al.] // *PLoS One*. — 2012. — 7. — p. e32852.
27. Wang X. Quantitative Analysis of Protein Evolution: The Phylogeny of Osteopontin / X. Wang, F. Weber Georg // *Frontiers in Genetics | Evolutionary and Population Genetics*. — 2021. — 12. — p. e700789.
28. Kawasaki K. Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster / K. Kawasaki, K.M. Weiss // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. — 2003. — 100. — p. 4060–4065.
29. Caroli A.M. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition / A.M. Caroli, S. Chessa, G.J. Erhardt // *Journal Of Dairy Science*. — 2009. — 92. — p. 5335–5352.
30. Jensen J.L. Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties / J.L. Jensen, A. Mølgaard, J.C.N. Poulsen [et al.] // *Acta Crystallographica Section D*. — 2013. — 69. — p. 901–913.
31. El-Sohaimy S.A. Cloning and In Vitro-Transcription of Chymosin Gene in *E. coli* / S.A. El-Sohaimy, E.E. Hafez, M.A. El-Saadani // *The Open Nutraceuticals Journal*. — 2010. — 3. — p. 63–68.
32. Belenkaya S.V. Characterization of the Altai Maral Chymosin Gene, Production of a Chymosin Recombinant Analog in the Prokaryotic Expression System, and Analysis of Its Several Biochemical Properties / S.V. Belenkaya, A.A. Bondar, T.A. Kurgina [et al.] // *BIOCHEMISTRY*. — 2020. — 85 (7). — p. 201–210.
33. Rogelj I. Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production / I. Rogelj, B. Perko, A. Francky [et al.] // *Journal Of Dairy Science*. — 2001. — 84. — p. 85–93.
34. Vega-Hernández M.C. Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin / M.C. Vega-Hernández, A. Gomez-Coello, J. Villar [et al.] // *Journal of Biotechnology*. — 2004. — 114. — p. 110–123.
35. Vallejo J.A. Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris* / J.A. Vallejo, J.M. Ageitos, M. Poza [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2008. — 56. — p. 36–42.
36. Kappeler S.R. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk / S.R. Kappeler, H. Rahbek-Nielsen, Z. Farah [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2006. — 342(2). — p. 647–654.
37. Balabova D.V. Can recombinant tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) chymosin coagulate cow (*Bos taurus*) milk? / D.V. Balabova, S.V. Belenkaya, E.A. Volosnikova [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2022. — 58. — p. 220–229.
38. Belenkaya S.V. Biochemical properties of recombinant chymosin in alpaca (*Vicugna pacos* L.) / S.V. Belenkaya, A.P. Rudometov, D.N. Shcherbakov [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2018. — 54(6). — p. 240–249.
39. Elchaninov V.V. Development of a producer of recombinant maral chymosin based on the yeast *Kluyveromyces lactis* / V.V. Elchaninov, D.N. Shcherbakov // *Biotechnology*. — 2021. — 37. — p. 108–116.
40. Castro L.F.C. Recurrent gene loss correlates with the evolution of stomach phenotypes in gnathostome history / L.F.C. Castro, O. Gonçalves, S. Mazan [et al.] // *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*. — 2014. — 281 (1775). — p. 200–210.
41. Narita Y. Lineage-specific duplication and loss of pepsinogen genes in hominoid evolution / Y. Narita, S.I. Oda, O. Takenaka [et al.] // *Journal of Molecular Evolution*. — 2010. — 70. — p. 313–324.
42. Ordoñez G.R. Loss of genes implicated in gastric function during platypus evolution / G.R. Ordoñez, L.W. Hillier, W.C. Warren [et al.] // *Genome Biology*. — 2008. — 9. — p. R81.

43. Örd T. Structure of the human genomic region homologous to the bovine prochymosin-encoding gene / T. Örd, M. Kolmer, R. Villems [et al.] // *Gene*. — 1990. — 91. — p. 241–246.
44. Cruywagen C.W. Effect of curd forming of colostrum on absorption of immunoglobulin g in newborn calves / C.W. Cruywagen // *Journal Of Dairy Science*. — 1990. — 73. — p. 3287–3290.
45. Szecsi B. Chymosin. Handbook of Proteolytic Enzymes / B. Szecsi, M. Harboe — New York: Academic Press, 2013. — 37 p.
46. Mokhber-Dezfooli M.R. Effect of abomasal emptying rate on the apparent efficiency of colostrum immunoglobulin G absorption in neonatal Holstein-Friesian calves / M.R. Mokhber-Dezfooli, M. Nouri, M. Rasekh [et al.] // *Journal Of Dairy Science*. — 2012. — 95. — p. 6740–6749.
47. Coe C.L. Vital and vulnerable functions of the primate placenta critical for infant health and brain development / C.L. Coe, G.R. Lubach // *Frontiers in Neuroendocrinology*. — 2014. — 35. — p. 439–446.
48. Borghesi J. Immunoglobulin transport during gestation in domestic animals and humans — a review / J. Borghesi, L. Mario, M. Rodrigues [et al.] // *Open Journal of Animal Sciences*. — 2014. — 1. — p. 323–336.
49. Furukawa S. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals / S. Furukawa, Y. Kuroda, A. Sugiyama // *Journal of Toxicologic Pathology*. — 2014. — 27. — p. 11–18.
50. Beltrán-Espinoza J.A. The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk / J.A. Beltrán-Espinoza, B. Dom'inguez-Lujan, N. Gutiérrez-Méndez [et al.] // *International Journal of Dairy Technology*. — 2021. — 74 (2). — p. 297–306.
51. Mbye M. Physicochemical properties, sensory quality, and coagulation behavior of camel versus bovine milk soft unripened cheeses / M. Mbye, B. Sobti, M.K. Al Nuami [et al.] // *NFS Journal*. — 2020. — 20. — p. 28–36.
52. Consortium U. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge / U. Consortium // *Nucleic Acids Research*. — 2019. — 47(D1). — p. D506–D515.
53. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution*. — 1993. — 10. — p. 512–526.
54. Tamura K. Evolutionary Distance Estimation Under Heterogeneous Substitution Pattern Among Lineages / K. Tamura, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. — 2002. — 19 (10). — p. 1727–1736.
55. Kaplan M.F. Evaluation of raw milk samples and vendor-derived *Staphylococcus aureus* and *Coxiella burnetii* prevalence in dairy delicatessens in eastern Turkey / M.F. Kaplan, E. Kaplan, A. Raza [et al.] // *International Journal of Food Science and Nutrition*. — 2024. — 12. — p. 5942–5950.
56. Hong Y. ENJ algorithm can construct triple phylogenetic trees / Y. Hong, M. Guo, J. Wang // *Molecular Therapy: Nucleic Acids*. — 2021. — 23. — p. 286–293.
57. Akishev Z. Obtaining of Recombinant Camel Chymosin and Testing Its Milk-Clotting Activity on Cow's, Goat's, Ewes' Camel's and Mare's Milk / Z. Akishev, S. Aktayeva, A. Kiribayeva [et al.] // *Biology*. — 2022. — 11 (11). — p. e1545.
58. Holt C. Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods / C. Holt, J.A. Carver, H. Ecroyd [et al.] // *Journal Of Dairy Science*. — 2013. — 96. — p. 300–307.