

Филогенетический анализ белка лубрицина и сурфактант-ассоциированных белков В и С

Третьякова А.В.¹, Герасимова Е.О.¹, Крылов П.А.^{1,2}, Новочадов В.В.¹

¹Волгоградский государственный университет

²ФНЦ агроэкологии РАН

krylov.pavel@volsu.ru

В данной работе проанализированы и построены филогенетические деревья белка поверхностной зоны – лубрицина (PRG4) с сурфактант-ассоциированными белками В и С. Научная новизна заключается в восполнении данных об эволюционных взаимоотношениях между гидрофобными SP-B, SP-C и белками зон суставного хряща. В ходе исследования были построены 4 филогенетических дерева методом максимального правдоподобия с помощью программы MEGA11. Достоверными считали ветки деревьев, в которых значение бутстрапа было выше 70. В работе были проанализированы 10 аминокислотных последовательностей млекопитающих следующих организмов: человека, серой крысы, коровы, овцы, свиньи, сирийского хомяка, павиана анубиса, синего кита, мыши и тихоокеанского моржа. Филогенетический анализ белка PRG4 показал, что ближе всего к общему предку данного белка является белок мыши, относительно небольшое число мутации произошло у белка человека и павиана анубиса, а максимальные – у PRG4 моржа, кита и хомяка. При анализе белка SP-C меньше всего зафиксировано изменений у быка и овцы. Белок SP-B имеет большее сродство с PRG4 и формировал с ним одну кладу. Несмотря на то, что аминокислотные последовательности этих белков отличны, особенно по длине, есть вероятность существования гомологии между этими белками.

Ключевые слова: филогенетические деревья, множественное выравнивание, лубрицин, SP-B, SP-C.

Phylogenetic analysis of the lubricin protein and surfactant-associated proteins B and C

Tretyakova A.V.¹, Gerasimova E.O.¹, Krylov P.A.^{1,2}, Novochadov V.V.¹

¹Volgograd State University

²Federal Research Center for Agroecology, Complex Amelioration, and Protective Afforestation, Russian Academy of Sciences

In this paper, phylogenetic trees of the surface zone protein – lubricin (PRG4) with surfactant-associated proteins B and C are analyzed and constructed. The scientific novelty lies in the completion of data on the evolutionary relationship between hydrophobic SP-B, SP-C and proteins of articular cartilage zones. During the study, 4 phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood method using the MEGA11 program. The branches of trees in which the bootstrap value was over 70 were considered reliable. The work analyzed 10 amino acid sequences of mammals of the following organisms: human, gray rat, cow, sheep, pig, Syrian hamster, baboon anubis, blue whale, mouse and Pacific walrus. Phylogenetic analysis of the PRG4 protein showed that the closest to the common ancestor of this protein is the mouse protein, a relatively small number of mutations occurred in the human protein and the baboon anubis, and the maximum – in the PRG4 walrus, whale and hamster. When analyzing the SP-C protein, the least changes were recorded in the bull and sheep. The SP-B protein has a greater affinity with PRG4 and formed one clade with it. Despite the fact that the amino acid sequences of these proteins are different, especially in length, there is a possibility of homology between these proteins.

Key words: phylogenetic trees, multiple alignment, lubricin, SP-B, SP-C.

1. Введение

В настоящее время активно развивается структурная и эволюционная биоинформатика,

направленная на выявление гомологии различных белков, связывая их с функциональными особенностями. Особый интерес вызывают белки,

которые имеют различную структуру, синтезируются клетками в различных тканях и органах, но при всем этом выполняют сходные функции. В связи с этим возникает вопрос имеют ли столь разные белки общие или предковые структурные участки, которые могут влиять на их функционирование в различных клеточных и тканевых процессах.

Одним из самых распространенных в мире заболеваний является остеоартроз, вызванный травмами или старением. Суставной хрящ содержит множество протеогликанов, которые необходимы для его нормального функционирования [1–2]. Избыточная нагрузка на сустав приводит к понижению лубрикативных свойств синовиальной жидкости и суставных поверхностей. Вследствие этого начинается разрушение поверхностной зоны и гибель клеток, синтезирующие такой белок как PRG4, обеспечивающий смазку суставных поверхностей путем снижения коэффициента трения скольжения и поверхностного натяжения [3] и содержащий два муциновых домена [4–7]. У лиц с генетическим дефицитом PRG4 развивается преждевременная недостаточность суставов [8–9].

Аналогичными функциями обладает гидрофобная SP-B и SP-C, которые синтезируются клетками легких, выстилающих альвеолы [10]. В целом функциональные особенности PRG4 и сурфактант-ассоциированных белков и имеют схожие черты – сообщение с внешним пространством (альвеолярное пространство и суставные поверхности), наружное покрытие, образование защитных конструкций и смазка, а также противостояние воздействию давления [11]. В проведенных ранее исследованиях было показано, что внутрисуставное введение в сустав сурфактант-ассоциированных белков позволяет уменьшить повреждения суставного хряща, путем повышения лубрикативных свойств синовиальной жидкости [12–13].

Исходя из вышесказанного, целью данного исследования является выявление эволюционных связей между PRG4 и SP-B и SP-C с помощью инструментов структурной биоинформатики.

2. Материалы и методы

Филогенетические деревья были построены в программе MEGA11 [14]. Перед этим было произведено множественное выравнивание алгоритмом MUSCLE 10 аминокислотных последовательностей следующих организмов: человека (*Homo sapiens*), серой крысы (*Rattus norvegicus*), коровы (*Bos taurus*), свиньи (*Sus scrofa*), сирийского хомяка (*Mesocricetus auratus*), овцы (*Ovis aries*), павиана анубиса (*Papio anubis*), синего кита (*Balaenoptera musculus*), домашней мыши (*Mus musculus*) и тихоокеанского моржа (*Odobenus rosmarus divergens*). Далее с помощью данной программы были найдены наилучшие модели для построения филограмм. Устойчивость топологии

определялась с помощью бутстрап-поддержки. Деревья с бутстрап-поддержкой меньше 70 считались недостоверными. Шкала соответствует 50 заменам на 1000 аминокислотных остатков для PRG4, SP-B и SP-C. Для общего дерева шкала соответствует 200 заменам на 1000 аминокислотных остатков.

3. Результаты

В результате были построены 3 дерева белков PRG4, SP-B, SP-C (рис. 1, 2, 3) и общее дерево у человека и крысы для данных белков (рис. 4) с использованием следующих моделей: для белков SP-B и SP-C с моделью JTT (Jones-Taylor-Thornton) [15] с дискретным гамма-распределением (G) и PRG4 с моделью JTT с дискретным гамма-распределением и фактическими частотами аминокислот (F). Филогенетическое дерево между белками PRG4, SP-B, SP-C человека и крысы было построено с помощью модели JTT.

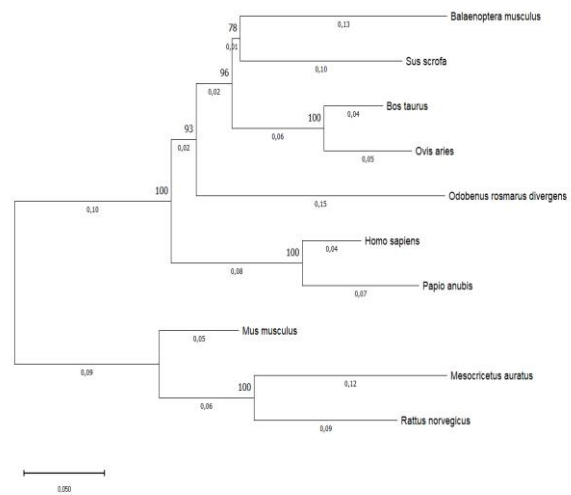


Рис. 1. Филогенетическое дерево белка PRG4.

На рисунке 1 представлена филограмма PRG4. Это филогенетическое дерево демонстрирует ярко-выраженную эволюцию белка у различных видов. Наименьшее количество мутаций произошло у мыши, таким образом этот организм является более близким к общему предку. Наибольшее количество мутаций отмечено у PRG4 синего кита, моржа и сирийского хомяка. Видно, что грызуны образуют отдельную кладу от других клад млекопитающих и данный белок у них эволюционно отличается сильнее от других организмов в этом дереве. Все узлы имеют высокую бутстрап-поддержку.

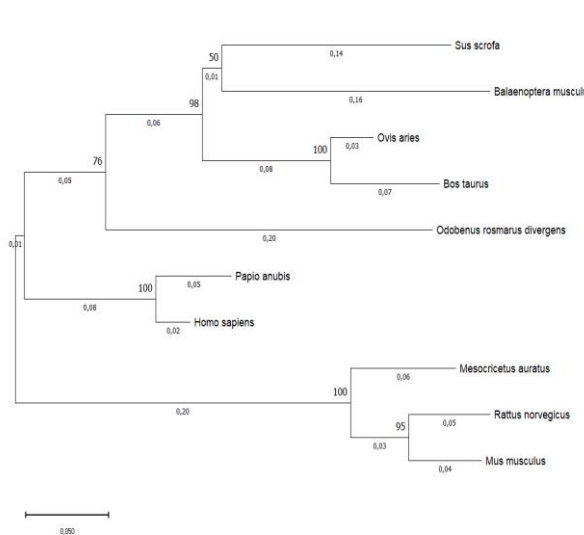


Рис. 2. Филогенетическое дерево белка SP-B.

На рисунке 2 представлено дерево белка SP-B. Оно также демонстрирует ярко-выраженную эволюцию белка. Ближе к общему предку находятся приматы, то есть в аминокислотной последовательности произошло меньше всего изменений. Большому количеству мутаций подвергся белок грызунов и синего кита. Все узлы имеют высокую бутстрап-поддержку, кроме кладов со свиньей и синим китом, что говорит о небольшой устойчивости данного узла.

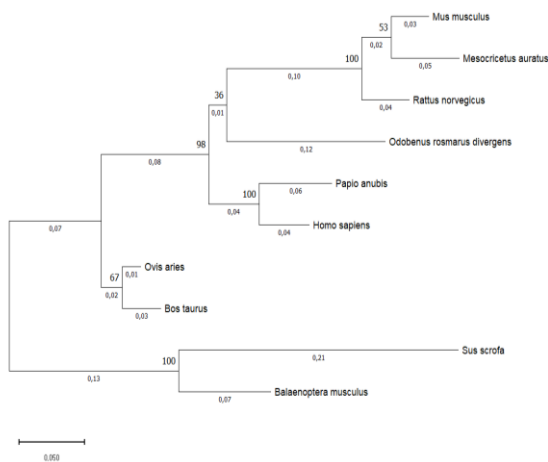


Рис. 3. Филогенетическое дерево белка SP-C.

На рисунке 3 представлена филограмма SP-C. Из рисунка видно, что ближе к общему предку находится клада с коровой и овцой. Свинья и синий кит образуют отдельную кладу от других млекопитающих. Белок SP-C сильнее изменился у грызунов по сравнению белком моржа и свиньи. Почти все узлы обладают высокой бутстрап – поддержкой, кроме клад с овцой и быком (67), мышью и сирийским хомяком (55) и клады грызунов с тихоокеанским моржом (36).

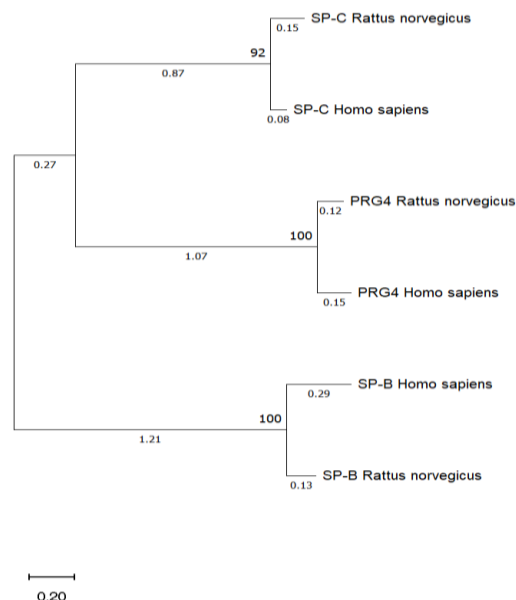


Рис. 4. Филогенетическое дерева белков PRG4, SP-B, SP-C у человека и крысы.

На рисунке 4 изображено дерево PRG4, SP-B и SP-C человека и крысы. Видно, что наиболее близкородственными являются PRG4 и SP-B у человека, а более схожи с общим предком последовательности SP-C у человека и крысы.

4. Выводы

По полученным данным можно сделать вывод, что у каждого белка произошли различные эволюционные изменения среди данных млекопитающих. Также на общем построенном дереве видно, что наиболее близкородственными являются PRG4 и SP-B человека, а более схожи с общим предком последовательности SP-C человека и крысы. Несмотря на то, что данные клады имеют низкую бутстрап поддержку (66 и 29) и много изменений, есть вероятность существования гомологии между этими белками.

5. Благодарности

Работа была выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых-кандидатов наук МК-199.2022.1.4.

4. Список литературы

1. Суховских А.В., Григорьева Э.В. Протеогликаны в нормальной физиологии и канцерогенезе. *Успехи молекулярной онкологии*. 2018. Т. 5. № 1. С. 8–25.
2. Fox A.J.S., Bedi A., Rodeo S.A. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009. V. 1. P. 461–468. doi: [10.1177/1941738109350438](https://doi.org/10.1177/1941738109350438)
3. Knudson W., Ishizuka S., Terabe K., et al. The pericellular hyaluronan of articular chondrocytes.

- Matrix Biology*. 2019. V. 78. P. 32–46. doi: [10.1016/j.matbio.2018.02.005](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.005)
4. Iqbal S.M., Leonard C., Regmi S.C., et al. Lubricin/proteoglycan 4 binds to and regulates the activity of toll-like receptors in vitro. *Scientific Reports*. 2016. V. 6. № 1. P. 1–12. doi: [10.1038/srep18910](https://doi.org/10.1038/srep18910)
 5. Jay G.D., Waller K.A. The biology of lubricin: near frictionless joint motion. *Matrix Biology*. 2014. V. 39. P. 17–24. doi: [10.1016/j.jcej.2018.08.019](https://doi.org/10.1016/j.jcej.2018.08.019)
 6. Ai M., Cui Y., Sy M.-S., et al. Anti-lubricin monoclonal antibodies created using lubricin-knockout mice immunodetect lubricin in several species and in patients with healthy and diseased joints. *PLoS one*. 2015. V. 10. № 2. P. e0116237. doi: [10.1371/journal.pone.0116237](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116237)
 7. Ali L., Flowers S.A., Jin C., Bennet E.P., Ekwall A.-K.H., Karlsson N.G. The O-glycomap of lubricin, a novel mucin responsible for joint lubrication, identified by site-specific glycopeptide analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2014. V. 13. № 12. P. 3396–3409. doi: [10.1074/mcp.M114.040865](https://doi.org/10.1074/mcp.M114.040865)
 8. Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*. 1992. V. 8. № 3. P. 275–282. doi: [10.1093/bioinformatics/8.3.275](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275)
 9. Waller K.A., Zhang L.X., Elsaid K.A., Fleming B.C., Warman M.L., Jay G.D. Role of lubricin and boundary lubrication in the prevention of chondrocyte apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. V. 110. № 15. P. 5852–5857. doi: [10.1073/pnas.1219289110](https://doi.org/10.1073/pnas.1219289110)
 10. Agarwal R., Maskey D., Aggarwal A.N., Saikia B., Garg M., Gupta D., Chakrabarti A. Diagnostic performance of various tests and criteria employed in allergic bronchopulmonary aspergillosis: a latent class analysis. *PLoS one*. 2013. V. 8. № 4. P. e61105. doi: [10.1371/journal.pone.0061105](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061105)
 11. Hartjen N., Bräuer L., Reiß B. et al. Evaluation of surfactant proteins A, B, C, and D in articular cartilage, synovial membrane and synovial fluid of healthy as well as patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *PLoS one*. 2018. V. 13. № 9. P. e0203502. doi: [10.1371/journal.pone.0203502](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203502)
 12. Krylov P.A., Astakhov A.S., Nesmeyanova E.N., Borozdina N.A., Novochadov V.V. Evaluation of the Efficiency of Lubricant Based on Pulmonary Surfactant in Experimental Knee Osteoarthritis in Rats: Analysis of 3D Reconstructions. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020. V. 168. № 3. P. 371–374. doi: [10.1007/s10517-020-04711-1](https://doi.org/10.1007/s10517-020-04711-1)
 13. Novochadov V.V., Krylov P.A. Production technology and physicochemical properties of composition containing surfactant proteins. *Eur. J. Mol. Biotech*. 2016. V. 4. № 2. P. 77. doi: [10.13187/ejmb.2016.12.77](https://doi.org/10.13187/ejmb.2016.12.77)
 14. Tamura K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11/ K. Tamura, G. Stecher G, S. Kumar. *Molecular Biology and Evolution*. 2021. V. 38. № 7. P. 3022–3027. doi: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)
 15. Jin C., Ekwall A.-K.H., Bylund J. et al. Human synovial lubricin expresses sialyl Lewis x determinant and has L-selectin ligand activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. V. 287. № 43. P. 35922–35933. doi: [10.1074/jbc.M112.363119](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.363119)