

*Барковский Евгений Викторович, Ачинович Ольга Владимировна*

## **Филогенетические взаимоотношения мембраносвязанных аденилатциклаз человека и многоклеточных беспозвоночных животных**

В статье представлены результаты сравнительного исследования аминокислотных последовательностей мембраносвязанных аденилатциклаз человека, нематоды и дрозофилы. Ключевые слова: аденилатциклаза, нематода, дрозофила, человек.

Метод статистического сравнения первичных структур белков и нуклеиновых кислот, при помощи которого пытаются установить и количественно выразить филогенетические взаимосвязи между гомологичными биополимерами, исходит из нескольких предпосылок. Естественным является предположение, что степень родства между организмами тем больше, чем меньше отличий имеется между их биополимерами. Далее, предполагают, что скорость накопления нуклеотидных (аминокислотных) замен на нуклеотидный (аминокислотный) сайт, на год в ходе эволюции остается постоянной. Считают также, что мутации происходят случайно по всей длине биополимера [1].

Рассматривая путь эволюции аденилатциклаз, нужно учитывать следующие обстоятельства. Ввиду наибольшей изученности в указанном плане позвоночных животных, наши эволюционные представления базируются в основном на данных, полученных при исследовании этих животных. Между тем, позвоночные проделали свой эволюционный дебют только на последнем – 20%-ном участке жизни нашей планеты [12]. Кроме того, они составляют лишь несколько процентов от всех многоклеточных животных и еще меньшую часть от всех животных форм на Земле.

Принимая это во внимание, можно полагать, что сравнительный анализ аденилатциклаз человека и многоклеточных беспозвоночных животных (нематоды *Caenorhabditis elegans* и плодовой мушки *Drosophila melanogaster*) поможет приблизить нас к пониманию эволюции этого фермента.

Традиционная, основанная на морфологии, филогения размещает нематод на древе жизни в основе линии многоклеточных псевдоцеломических животных, в то время как дрозофила и другие артроподы размещаются в более молодой эволюционной линии первичноротых эуцеломических животных с более короткой филогенетической дистанцией от позвоночных и других вторичноротых животных [15]. По современным молекулярно-биологическим оценкам нематоды произошли ~ 1050 млн. лет назад [8], а членистоногие, к которым относится дрозофила, произошли ~ 830 млн. лет назад [20]. Учитывая значительную эволюционную дистанцию между этими многоклеточными беспозвоночными и человеком, нам представлялось важным выявить характер эволюционных взаимоотношений между их аденилатциклазами. С этой целью нами проведен анализ сходства первичной структуры мембраносвязанных аденилатциклаз человека, *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы исследования

В качестве материалов исследования изучены аминокислотные последовательности 9 типов мембраносвязанных аденилатциклаз человека [5-7,10,16-19]. У нематоды *C.elegans* охарактеризованы четыре различные мембраносвязанные аденилатциклазы: АСУ 1, АСУ 2, АСУ 3 и АСУ 4, аминокислотные последовательности которых взяты из базы данных Wormbase (CDS: F 17C8.1, C10 F3.3, C44 F1.5 и TO1C2.1, соответственно). У дрозофилы идентифицированы десять различных типов мембраносвязанных аденилатциклаз: АСХА - АСХЕ, DAC9, DAC 76E, DAC 78C-L, DAC 39E и Rutabaga [2-4,13,21].

Количественную оценку степени гомологии сравниваемых белков проводили на основании значений индексов сходства, числа идентичных аминокислотных остатков (%) выравненных с помощью программы CLUSTAL W [22] аминокислотных последовательностей, а также значений показателя E (E value), полученных в результате использования алгоритмов BLASTP 2.2.5 [9] и WU-BLAST 2 [11].

#### Результаты и обсуждение

Из данных, представленных в табл. 1 – 4, следует, что разные изоформы аденилатциклазы *C.elegans* имеют различные филогенетические взаимоотношения с мембраносвязанными аденилатциклазами человека. Так, АСУ 1 *C.elegans* имеет наибольшее структурное сходство с АЦ IX человека, по-видимому, являясь ее эволюционным ортологом. Следует обратить внимание на тот факт, что, судя по результатам WU-BLAST 2 и BLASTP 2.2.5 анализов (табл. 3,4), АСУ 2 *Caenorhabditis elegans* проявляет гораздо более высокую степень сходства с АЦ II, АЦ IV и АЦ VII, чем с остальными изоформами аденилатциклазы человека.

#### Таблица

1

Значения индексов сходства аминокислотных последовательностей аденилатциклаз человека и нематоды *C.elegans*

Тип АЦ	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
АСУ1	28	28	25	26	29	25	23	22	32
АСУ 2	30	33	26	28	31	27	28	25	24
АСУ 3	19	21	20	21	21	19	22	22	16
АСУ 4	35	36	35	36	40	40	36	38	31

#### Таблица 2

Гомология аминокислотных последовательностей (%) аденилатциклаз человека и нематоды *C.elegans*

Тип АЦ	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
АСУ1	32,6	30,7	29,5	28,9	31,6	28,8	24,0	30,0	35,5
АСУ2	33,9	37,5	26,5	32,8	33,3	29,4	31,8	27,2	26,4
АСУ3	22,7	23,1	23,0	22,6	23,2	22,1	22,8	23,5	19,7
АСУ4	39,3	40,4	37,5	39,5	42,9	43,5	38,5	40,2	30,6

Таблица 3

Значения показателей сходства аминокислотных последовательностей аденилатциклаз человека и нематоды *C.elegans* на основе WU-BLAST 2 анализа

Тип АЦ	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
АСУ1	3,7e-82	2,5e-82	1,1e-75	2,5e-84	3,4e-86	4,5e-90	1,3e-78	4,9e-90	9,1e-164
АСУ2	3,6e-100	2,2e-135	3,3e-93	5,9e-128	3,2e-83	2,7e-105	7,7e-121	5,3e-102	1,4e-80
АСУ3	1,1e-33	3,9e-28	4,5e-28	1,7e-27	8,5e-40	4,9e-36	8,6e-23	4,3e-46	3,8e-14
АСУ4	3,2e-125	2,9e-137	6,0e-126	1,4e-128	3,7e-152	2,9e-153	6,6e-133	4,8e-141	4,9e-84

Таблица 4

Значения показателей сходства аминокислотных последовательностей аденилатциклаз человека и нематоды *C.elegans* на основе BLASTP 2.2.5 анализа

Тип АЦ	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
АСУ1	4e - 45	5e - 48	4e - 49	3e - 48	8e - 49	1e - 47	2e - 43	9e - 52	e - 100
АСУ2	8e - 58	3e - 68	6e - 49	1e - 71	1e - 61	2e - 60	7e - 65	3e - 58	6e - 44
АСУ3	1e - 19	9e - 18	2e - 18	8e - 17	2e - 33	3e - 20	3e - 16	5e - 19	1e - 07
АСУ4	8e - 63	1e - 71	5e - 73	1e - 70	4e - 90	8e - 91	7e - 72	e - 142	1e - 45

Таблица 5

Гомология аминокислотных последовательностей (%) мембраносвязанных аденилатциклаз человека и дрозофилы

Тип АЦ	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
АСХА	24,9	27,2	25,4	26,3	26,5	24,3	27,2	26,9	20,0
АСХВ	25,1	27,2	26,8	25,4	26,2	24,1	28,6	28,0	19,6
АСХС	26,4	27,0	24,8	26,6	26,9	25,7	26,9	26,7	24,7
АСХD	24,0	28,5	28,0	27,6	24,5	27,4	27,6	26,2	20,6
АСХЕ	24,8	27,4	25,8	27,2	27,4	26,0	28,0	27,4	24,0
DAC 9	27,7	27,8	28,8	29,1	29,0	29,3	29,4	27,8	36,8
Rutabaga	46,9	39,7	34,1	35,9	45,4	45,1	38,7	40,2	27,0
DAC 39E	30,2	30,8	38,8	31,9	32,5	33,7	30,8	33,3	28,6
DAC 76E	34,4	39,6	31,6	38,5	33,8	34,3	41,9	34,7	26,1
DAC 78CL	33,9	34,4	33,0	35,3	34,3	33,3	32,8	39,5	27,9

Это позволяет рассматривать АСУ 2 нематоды в качестве эволюционного предшественника подсемейства мембраносвязанных аденилатциклаз II/IV/VII человека. С другой стороны, АЦ III и подсемейство аденилатциклаз I/V/VI/VIII человека имеет четкие ортологические взаимоотношения с АСУ 4 нематоды. АСУ 3 *C.elegans* не имеет прямого ортологического отношения ни к одному из типов аденилатциклаз человека, иллюстрируя факт отдельной эволюции некоторых изоформ фермента в различных филогенетических линиях.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей аденилатциклаз дрозофилы и человека (табл. 5) позволяет прийти к следующему заключению. Аденилатциклазы АСХА-Е представляют собой подсемейство аденилатциклаз дрозофилы, все члены которого имеют очень низкую гомологию с аденилатциклазами человека (20% – 28% сходства). Аденилатциклазы DAC 9, DAC 76E, DAC 39E и Rutabaga имеют четкие ортологические взаимоотношения с аденилатциклазами человека. Так, Rutabaga является ортологичной аденилатциклазным изоформам человека АЦ I (46,9% сходства), АЦ V (45,5% сходства), АЦ VI (45,1% сходства) и АЦ VIII (40,2% сходства); DAC 76E является ортологичной с АЦ II (39,6% сходства), АЦ IV (38,5% сходства) и АЦ VII (41,9% сходства); DAC 39E является ортологом АЦ III (38,8% сходства) и, наконец, DAC 9 – ортологом АЦ IX (36,8% сходства). Наоборот, аденилатциклаза DAC 78C-L не имеет четких ортологических взаимоотношений ни с одной изоформой аденилатциклазы человека, что согласуется с данными Cann и соавт. [3]. Это заключение полностью подтверждается результатами WU-BLAST 2 и BLASTP 2.2.5 анализов (табл. 6,7).

Таким образом, у каждого из четырех подсемейств мембраносвязанных аденилатциклаз человека имеется соответствующий ортолог у дрозофилы, а именно: у подсемейства I/V/VI/VIII – Rutabaga, у подсемейства II/IV/VII – DAC 76E, у АЦ III – DAC 39E и у АЦ IX – DAC 9.

Таблица

6

Значения показателей сходства аминокислотных последовательностей аденилатциклаз человека и дрозофилы на основе WU-BLAST 2 анализа

Тип АЦ	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
DAC76 E	2,0e-139	1,0e-192	2,6e-128	2,8e-186	7,5e-155	2,4e-148	6,4e-184	2,3e-140	2,5e-91
Rutabaga	3,6e-184	1,2e-165	9,2e-147	1,4e-161	1,4e-198	2,2e-204	1,2-153	1,7e-195	4,0e-92
DAC39 E	1,7e-124	3,9e-129	4,1e-156	1,1e-129	4,4e-142	8,0e-144	9,7e-127	6,3e-152	2,2e-94
DAC9	7,7e-85	7,3e-87	1,9e-82	7,9e-85	4,3e-89	2,5e-85	1,2e-78	4,7e-87	7,5e-188
DAC78 CL	4,6e-123	1,5e-132	4,5e-140	1,4e-134	1,0e-150	4,5e-141	1,3e-128	7,9e-195	1,6e-94

Таблица 7

Значения показателей сходства аминокислотных последовательностей аденилатциклаз человека и дрозофилы на основе BLASTP 2.2.5 анализа

Тип АЦ	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
DAC76 E	2e - 74	e - 108	4e - 69	e - 100	7e - 78	4e - 76	4e - 94	2e - 76	9e - 51
Rutabaga	e - 100	4e - 88	1e - 84	3e - 82	e - 104	e - 112	4e - 86	e - 104	1e - 55
DAC39 E	8e - 75	5e - 71	6e - 98	2e - 74	9e - 75	1e - 75	2e - 70	e - 101	3e - 53
DAC9	4e - 48	2e - 47	8e - 53	1e - 47	3e - 49	1e - 47	2e - 44	2e - 53	e - 100
DAC78 CL	2e - 63	9e - 68	8e - 82	3e - 70	2e - 77	3e - 78	3e - 72	e - 102	1e - 54

Таблица 8

Значения показателей сходства аминокислотных последовательностей аденилатциклаз нематоды и дрозофилы на основе BLASTP 2.2.5 анализа

Тип АЦ	Rutabaga	DAC 76E	DAC 39E	DAC 9
ACY1	1e - 57	4e - 44	6e - 47	8e - 94
ACY2	1e - 63	2e - 71	3e - 51	3e - 43
ACY3	1e - 21	9e - 15	2e - 17	9e - 09
ACY4	8e - 78	3e - 66	8e - 66	7e - 47

При оценке эволюционных взаимоотношений мембраносвязанных аденилатциклаз нематоды и дрозофилы у последней рассматривались только те аденилатциклазы, которые имеют четкие ортологические связи с аденилатциклазами человека, т.е. Rutabaga, DAC 76E, DAC 39E и DAC 9 (табл. 8). Как и следовало ожидать ACY 1 *C.elegans* проявляет наибольшее сходство с DAC 9 *D.melanogaster*, ACY 2 с DAC 76 E, а ACY 4 с аденилатциклазами Rutabaga и DAC 39E. ACY 3 не проявляет ортологических взаимоотношений ни с одной из рассматриваемых аденилатциклаз дрозофилы.

В качестве внешнего гомолога для обозначения корня дендрограммы использовали более удаленную в филогенетическом плане аденилатциклазу дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae*, относящегося к низшим одноклеточным эукариотам [14]. Анализ родственных отношений между

мембраносвязанными аденилатциклазы человека, нематоды и дрозофилы свидетельствует о том, что по степени сходства аминокислотных последовательностей аденилатциклазы АЦ IX, АСУ 1 и DAC 9 составляют четко обособленную группу, в которой наиболее тесно связанными между собой являются АСУ1 и DAC 9. Ко второй группе, включающей аденилатциклазы DAC 76E, АЦ VII, АЦ IV и АЦ II, непосредственно примыкает линия АСУ 2, что позволяет рассматривать последнюю в качестве эволюционного предшественника аденилатциклаз этой группы. И, наконец, третью группу аденилатциклаз формируют АЦ I, АЦ III, АЦ V, АЦ VI, АЦ VIII, Rutabaga, DAC 39E и АСУ4. В этой группе наиболее тесные ортологические взаимоотношения наблюдаются между аденилатциклазами АЦ I/Rutabaga и АЦ III/DAC 39E. Положение на дендрограмме линии АСУ4 свидетельствует в пользу того, что ее аминокислотная последовательность характеризуется более выраженным сходством с аденилатциклазами подсемейства АЦ I/АЦ V/АЦ VI/АЦ VIII и Rutabaga, чем с аденилатциклазами АЦ III и DAC 39E. АСУ 3 формирует отдельную независимую ветвь от общего эволюционного предшественника мембраносвязанных аденилатциклаз и не имеет четких ортологических взаимоотношений с рассматриваемыми аденилатциклазами человека и дрозофилы.

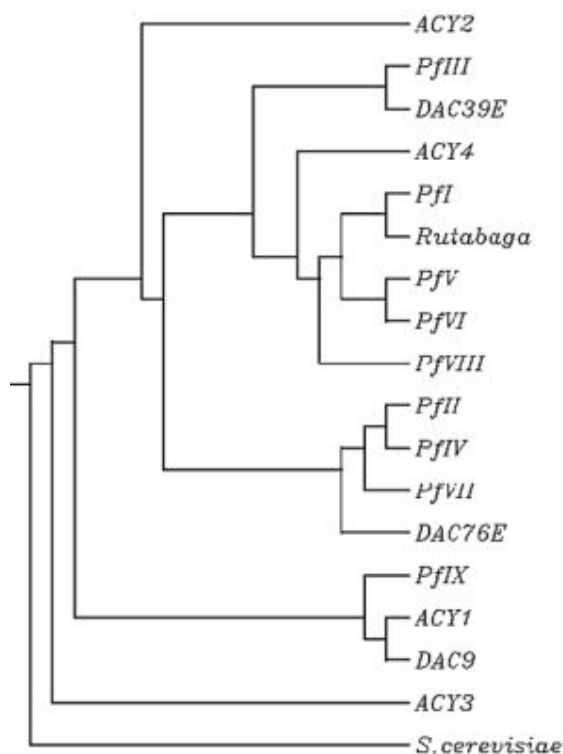


Рис. Родственные отношения между мембраносвязанными аденилатциклазами человека, нематоды и дрозофилы. На рисунке представлена обобщенная картина, отражающая характер эволюционных взаимоотношений между мембраносвязанными аденилатциклазами нематоды, дрозофилы и человека.

Таким образом, мы рассмотрели мембраносвязанные аденилатциклазы как элемент, характеризующий эволюционные связи живых организмов за длительный исторический период их развития – от нематоды *Caenorhabditis elegans* до человека. Учитывая огромную эволюционную дистанцию (около 1 млрд. лет) между столь отдаленными в эволюционном отношении организмами, априорно нельзя было ожидать большого (буквального) сходства их аденилатциклаз. Поэтому нами был проведен детальный анализ их аминокислотных последовательностей на предмет отыскания «зерен» сходства между ними. При этом во главу угла были поставлены данные о структурной гомологии аденилатциклаз, поскольку только они позволяют судить о степени эволюционного родства этих белков. Сравнительный анализ полных аминокислотных последовательностей и наиболее консервативных участков мембраносвязанных аденилатциклаз человека, нематоды и дрозофилы позволил выявить между ними четкие эволюционные взаимоотношения, суть которых сводится к следующему. Все рассматриваемые нами показатели сходства аминокислотных последовательностей убедительно доказывают, что аденилатциклаза ACY 1 *Caenorhabditis elegans* является эволюционным предшественником АЦ IX человека и DAC 9 дрозофилы. Результаты WU-BLAST 2 и BLAST 2.2.5 анализов позволяют рассматривать аденилатциклазу ACY 2 *Caenorhabditis elegans* в качестве эволюционного предшественника аденилатциклаз II/IV/VII человека и DAC 76E дрозофилы. Судя по значениям всех показателей сходства, аденилатциклаза IV наиболее тесно в эволюционном плане связана с аденилатциклазами I/III/V/VI/VIII человека, а также DAC 39 E и Rutabaga дрозофилы. На основании приведенных данных, можно констатировать, что эволюционные предшественники всех четырех подсемейств мембраносвязанных аденилатциклаз человека и соответствующих ортологов у дрозофилы существовали уже на ранних этапах формирования биохимических систем многоклеточных беспозвоночных, то есть около 1 млрд. лет назад. Существование четких ортологических взаимоотношений трех типов аденилатциклаз человека (II/IV/VII) с одним типом ACY 2 нематоды, а тем более – пяти типов аденилатциклаз человека (I/III/V/VI/VIII) с ACY 4 нематоды иллюстрирует в известной мере положение о том, что аденилатциклазный путь сигнализации у существующих в настоящее время животных в процессе эволюции все более совершенствуется и становится все более прецизионным.

#### Литература

1. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. - М., 1985.
2. Cann M.J., Levin L.R. Restricted expression of a truncated adenylyl cyclase in the Cephalic furrow of *Drosophila melanogaster* // *Dev. Genes Evol.* - 2000. - Vol.210- P.34-40.
3. Cann M.J., Chung E., Levin L.R. A new family of adenylyl cyclase genes in the male germline of *Drosophila melanogaster* // *Dev. Genes Evol.* - 2000. - Vol. 210. - P.200-206.
4. Cloning and characterization of a *Drosophila* adenylyl cyclase homologous to mammalian type IX. Iourgenko V., Kliot B., Cann M.J., Levin L.R. // *FEBS Lett.*-1997.-Vol.413, № 1.- P.101-108.

5. Cloning and expression of human adenylyl cyclase type VI in thyroid tissues. Wicker R., Catalan A.G., Cailleux A. et al. // *Biochim. Biophys. Acta* -2000. Vol.-1493, № 1-3. -P.279-283.
6. Cloning, chromosomal mapping, and expression of human fetal brain type I adenylyl cyclase. Villacres E.C., Xia Z., Bookbinder L.H. et al. // *Genomics* -1993. - Vol.- 16. № 2. - P.437-478.
7. Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY 9). Hacker B. M., Tomlinson J.E., Wayman G.A. et al. // *Genomics*.-1998.-Vol.-50, № 1.- P.97-104.
8. Feng D-F., Cho G., Doolittle R.F. Determining divergence times with a protein clock: Update and reevaluation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.-1997.-Vol.94.-P.13028-13033.
9. Gapped BLAST and PSY-BLAST: a new generation of protein of protein database search programs. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A. et al. // *Nucleic Acids Res.*-1997.-Vol.25.-P.3389-3402.
10. Gaudin C., Homcy C.J., Ishikawa Y. Mammalian adenylyl cyclase family members are randomly located on different chromosomes // *Hum. Genet.* -1994. -Vol. 94, № 5. - P.527-529.
11. Gish W. (1996 – 2003). <http://blast.wustl.edu>.
12. Intracellular communication: An attempt at a unifying hypothesis. Roth J., Le Roith D., Shiloach J., Rubinovitz C. // *Clin.Res.* -1983. -Vol.31. -P.354-363.
13. Iourgenko V., Levin L.R. A calcium-inhibited *Drosophila* adenylyl cyclase // *Biochim. Biophys. Acta*-2000.- Vol. 1495, № 2.- P.125-139.
14. Kataoka T., Broek D., Wigler M. DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase // *Cell*. -1985. -Vol.43. -P.493 – 505.
15. Large-scale taxonomic profiling of eucaryotic model organisms: a comparison of orthologous proteins encoded by the human, fly, nematode, and yeast genomes. Mushegian A.R., Carey J.R., Martin J., Lin L.X. // *Gen.Res.*-1998.-Vol.8.-P.590-598.
16. Localization of the gene for a novel human adenylyl cyclase to chromosome 16. Hellevuo K., Berry R., Sikela J.M., Tabakoff B. // *Hum. Genet.*- 1995.- Vol.95, № 2.- P.197-200.
17. Ludwig M.G., Seuwen K. Characterization of the human adenylyl cyclase gene family: cDNA, gene structure, and tissue distribution of the nine isoforms // *J. Recept. Signal Transduct. Res.* -2002. Vol.- 22, № 1-4. - P.79-110.
18. Molecular cloning of a full-length cDNA for human type 3 adenylyl cyclase and its expression in human islets. Yang B. He B., Abdel-Halim S.M. Tibell A., Brendel M.D. et al. // *Biochem. Res. Commun.* - 1999. - Vol. 254, № 3. - P.548-551.
19. Molecular cloning of the human type VIII adenylyl cyclase. Defer N., Marinx O., Stengel D. et al. // *FEBS Lett.* -1994. - Vol.351, № 1.-P.109-113.
20. Nei M., Xu P., Glazko G. Estimation of divergence times from multiprotein sequences for a few mammalian species and several distantly related organisms // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. -2001. -Vol.95. -P.2497 – 2502.
21. The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca<sup>2+</sup>/ Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. Levin L.R. Han P. L. Hwang P.M. et al. // *Cell*. -1992. - Vol.68, № 3. - P. 479-489.



22. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position – specific gap penalties and weight matrix choice. // Nucleic. Acids. Res.– 1994.–Vol.22, № 22.– P.4673 – 4680.