

## **Тема отчета: Фосфолипазы А2 человека: функциональный и эволюционный анализ.**

### **Состав коллектива**

- Турнаев Игорь Иванович, младший научный сотрудник, Институт Цитологии и Генетики СО РАН, исполнитель
- Бочарникова Мария Евгеньевна, студентка, НГУ, ФЕН, исполнитель
- Афонников Дмитрий Аркадьевич, к.б.н., ведущий научный сотрудник, Цитологии и Генетики СО РАН, руководитель

### **Аннотация**

Фосфолипазы А2 (PLA2) способны гидролизовать sn-2 положение глицерофосфолипидов для высвобождения жирных кислот и лизофосфолипидов. Ферменты семейства фосфолипазы А2 широко распространены и присутствуют в большинстве клеток и тканей млекопитающих, выполняя функции регулятора метаболизма, поддержания мембранного гомеостаза, производства липидных медиаторов, ремоделирования мембран, активации воспалительных реакций. Соответственно, нарушение PLA2-регулируемого липидного метаболизма часто приводит к различным заболеваниям. В настоящем исследовании были систематически собраны и описаны 29 генов PLA2 в геноме человека на основе анализа литературных данных и изучения последовательностей. Анализ локализации генов PLA2 в геноме человека показал, что они расположены на 12 хромосомах человека и некоторые из них образуют кластеры. Оценка значений величины RVIS (оценка толерантности генов к мутациям, которые накапливаются в популяции человека) демонстрирует, что гены фосфолипаз А2 типа G4, входящие в один из двух наиболее крупных кластеров (четыре гена), наиболее толерантны к мутациям. Напротив, пониженную толерантность к мутациям имеют локализованные вне кластеров гены, кодирующие фосфолипазы А2 типа G6 (фосфолипазы А2 G6B, G6F, G6C, G6A). Мы проанализировали также связи между фосфолипазами А2 и заболеваниями человека по литературным данным, в результате чего выявлены связи 24 генов PLA2 со 119 заболеваниями, относящимися к 18 группам. Описано 229 связей «болезнь–ген» фосфолипазы А2. Показано, что белки фосфолипаз А2 типов G4, G2 и G7 вовлечены в наибольшее число заболеваний по сравнению с другими типами PLA2. С наибольшим числом типов PLA2 были связаны три группы заболеваний: новообразования, болезни системы кровообращения и болезни эндокринной системы. Филогенетический анализ показал, что общее происхождение устанавливается только для секреторных PLA2 (G1, G2, G3, G5, G10 и G12). Остальные типы PLA2 (G4, G6, G7, G8, G15 и G16) можно считать эволюционно независимыми. В результате проведенного анализа установлено, что наиболее толерантные к мутациям фосфолипазы А2 у человека (типы G4, G2 и G7) вовлечены в наибольшее количество групп заболеваний.

### **Грантовая поддержка**

Работа поддержана бюджетным проектом № FWNR-2022-0020. Обработка данных проводилась с использованием вычислительных ресурсов ЦКП «Биоинформатика» ИЦиГ СО РАН и Суперкомпьютерного центра Новосибирского государственного университета.

### **Научное содержание работы:**

1. Постановка задачи.

Фосфолипазы А2 – это группа ферментов, которые гидролизуют эфирную связь мембранных фосфолипидов с позиции sn-2. При действии фосфолипазы А2 на фосфолипид образуется 2-лизофосфолипид и жирная кислота. В sn-2 положении фосфолипида могут находиться различные жирные кислоты, включая арахидоновую и эйкозапентаеновую кислоты. Фосфолипазы А2 (PLA2) человека и млекопитающих делятся на группы: конвенциональные секреторные PLA2 (группы 1, 2, 5 и 10), атипичные секреторные PLA2 (3, 12), цитозольные PLA2 (4), не зависящие от кальция PLA2 (6), ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов (7 и 8), лизосомальные PLA2 (15), адипозоспецифические PLA2 (16). Каждый член семейства ферментов фосфолипазы А2 играет свою роль в образовании активных липидных метаболитов, которые способствуют развитию воспалительных метаболических заболеваний, включая атеросклероз, гиперлипидемию, ожирение, диабет, сердечнососудистые заболевания, ряд психиатрических заболеваний (например, болезни Альцгеймера или Паркинсона) и др. В связи с чем мы провели исследование эволюции ряда групп фосфолипаз. Нами была исследована филогения I, II, III, IV, V, VI и X групп фосфолипаз А2.

## 2. Современное состояние проблемы.

В настоящее время есть ряд работы по анализу эволюции семейств белков Фосфолипаз А2. Но они ограничиваются в основном анализом филогении белков позвоночных. О фосфолипазах А2 беспозвоночных, эволюционной связи между этими белками позвоночных и беспозвоночных, как и о происхождение Фосфолипаз А2 существуют лишь отрывочные данные. Также, если функции белков Фосфолипаз А2 человека и некоторых модельных для него организмов (мышь, крыса) в связи с важностью ролью этих белков в широком круге заболеваний, то функции остальных PLA2 позвоночных и в особенности беспозвоночных мало исследованы. В связи с чем мы провели филогенетический анализ ряда групп PLA2 с целью выявить эволюционное происхождение этих групп.

1. Dennis E.A., Cao J., Hsu Y.-H., Magrioti V., Kokotos G. Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem. Rev.* 2011;111:6130–6185. DOI 10.1021/cr200085w.

2. Huang Q., Wu Y., Qin C., He W. Wei X. Phylogenetic and structural analysis of the phospholipase A2 gene family in vertebrates. *International journal of molecular medicine.* 2015;35:587–596. DOI 10.3892/ijmm.2014.2047.

3. Kudo I., Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68–69:3–58. DOI 10.1016/s0090-6980(02)00020-5.

## 3. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы.

Для создания выборок белков PLA2 мы провели поиск гомологов белков PLA2 человека взятых из статьи Huang et al., 2015. Поиск гомологов проводился с помощью программы BlastP (e-value  $\leq 1 \times 10^{-5}$ , остальные параметры поиска были взяты по умолчанию). Далее проводилось множественное выравнивание полученных последовательностей с помощью программы Promals. Полученные выравнивания проверялись на отсутствие в последовательностях крупных делеций и вставок, состояние ключевых активных сайтов. После выбраковки

несоответствующих последовательностей выборки снова перевыравнивались, в результате чего мы получили итоговые выровненные выборки белковых последовательностей PLA2. Далее мы реконструировали филогенетические деревья для групп PLA2 с помощью программы IQ-TREE версии 1.6.12.

#### 4. Полученные результаты.

С помощью поиска по гомологии были идентифицированы последовательности фосфолипаз A2 для 33 видов организмов (таблица 1) из них 13 позвоночных и 20 беспозвоночных.

Таблица 1. Список организмов последовательности белков которых были использованы для поиска гомологов PLA2.

№	Полное название вида	Аббревиатура названия вида	Таксон
1	<i>Pongo abelii</i>	pon	Млекопитающие
2	<i>Mus musculus</i>	mus	Млекопитающие
3	<i>Sus scrofa</i>	sus	Млекопитающие
4	<i>Canis lupus familiaris</i>	can	Млекопитающие
5	<i>Bos taurus</i>	bos	Млекопитающие
6	<i>Gallus gallus</i>	gal	Птицы
7	<i>Chelonia midas</i>	che	Рептилии
8	<i>Anolis carolinensis</i>	ano	Рептилии
9	<i>Ophiophagus hannah</i>	ophi	Рептилии
10	<i>Vipera berus</i>	vip	Рептилии
11	<i>Xenopus laevis</i>	xen	Амфибии
12	<i>Danio rerio</i>	dan	Рыбы
13	<i>Ciona intestinalis</i>	cio	Личиночнохордовые
14	<i>Drosophila melanogaster</i>	dro	Насекомые
15	<i>Apis mellifera</i>	api	Насекомые
16	<i>Bombyx mori</i>	bomb	Насекомые
17	<i>Argiope bruennichi</i>	argi	Пауки
18	<i>Centruroides sculpturatus</i>	cen	Пауки
19	<i>Ixodes scapularis</i>	ixo	Клещи
20	<i>Daphnia pulex</i>	dap	Плеченогие
21	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	str	Иглокожие
22	<i>Mytilus coruscus</i>	myt	Моллюски
23	<i>Octopus bimaculoides</i>	oct	Моллюски
24	<i>Trichinella pseudospiralis</i>	trichi	Круглоротые
25	<i>Caenorhabditis elegans</i>	cae	Круглоротые
26	<i>Macrostomum lignano</i>	mac	Плоские черви
27	<i>Capitella teleta</i>	cap	Кольчатые черви
28	<i>Dimorphilus gyrotilatus</i>	dim	Кольчатые черви
29	<i>Hydra vulgaris</i>	hid	Стрекающие
30	<i>Nematostella vectensis</i>	nem	Стрекающие
31	<i>Amphimedon queenslandica</i>	amp	Губки
32	<i>Trichoplax adhaerens</i>	tricho	Пластинчатые

Для иллюстрации сходства функциональных районов PLA2 мы провели анализ гомологии между каталитическими доменами фосфолипаз A2 у человека. Сходство между доменами PLA2 разных типов выявлено только среди секреторных PLA2 (Таблица 2). А именно между каталитическими доменами PLA2 типов G1, G2, G5, G10 есть сходство (e-value) от 2e-03 до 2e-38; и между белками типа G12 (g12a и g12b) e-value = 4e-48. Нет сходства (e-value  $\geq 1$ ) между PLA2 типа G3 (plag3) и всеми остальными белками sPLA2.

Таблица 2. Сходство каталитических доменов sPLA2 (A2 G1, G2, G3, G5, G10, G12 типов)

	1b	2a	2c	2d	2e	2f	3	5	10	12a	12b
1b	0.0										
2a	2e-05	0.0									
2c	>1	2e-13	0.0								
2d	2e-08	2e-38	2e-14	0.0							
2e	3e-08	3e-30	1e-15	3e-24	0.0						
2f	1e-05	2e-10	>1	2e-20	5e-16	0.0					
3	>1	>1	>1	>1	>1	>1	0.0				
5	2e-03	1e-31	>1	6e-33	1e-29	1e-14	>1	0.0			
10	4e-08	1e-18	>1	2e-23	2e-25	2e-14	>1	9e-13	0.0		
12a	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	0.0	
12b	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	4e-48	0.0

Первый ряд и первая строка таблицы показывают белки sPLA2. Остальные клетки демонстрируют e-value сходства между каталитическими доменами этих белков.

Во всех остальных типах PLA2, кроме принадлежащих к sPLA, не отмечено сходства доменов между PLA2 разных типов. Внутри типов, в частности, сходство между цитозольными PLA2 (тип G4) составило (p-value) от 4e-27 до 1e-177 (Таблица 3).

Таблица 3. Сходство каталитических доменов cPLA2 (тип G4)

	4a	4b	4c	4d	4e	4f
4a	0.0					
4b	2e-65	0.0				
4c	2e-43	8e-36	0.0			
4d	5e-72	1e-177	2e-44	0.0		
4e	5e-81	2e-144	4e-27	4e-80	0.0	
4f	1e-89	2e-139	8e-36	1e-71	5e-126	0.0

Тогда как кальций-независимые PLA2 (тип G6), по сходству доменов, распадаются на три подгруппы: (1) pla2g6d, 6e, 6f со сходством доменов от 2e-42 до 4e-91; (2) pla2g6a, 6b со сходством между их каталитическими доменами (e-value) 4e-12 (3) каталитический домен pla2g6c не имеет гомологии с каким-либо другим белком б типа (Таблица 4).

Таблица 4. Сходство каталитических доменов iPLA2 (тип G6)

	6a (pn9)	6b (pn8)	6c (pn6)	6d (pn3)	6e (pn2)	6f (pn4)
6a (pn9)	0.0					

6b (pn8)	4e-12	0.0				
6c (pn6)	>1	>1	0.0			
6d (pn3)	>1	>1	>1	0.0		
6e (pn2)	>1	>1	>1	4e-91	0.0	
6f (pn4)	>1	>1	>1	2e-47	2e-42	0.0

Соответственно, между доменами человеческих PLA2 этих трех подтипов типа G6 сходство отсутствовало. Типы PLA2 G7 (два белка g7a и g7b) и G8 (два белка g8a и g8b) имеют гомологию внутри типов 7e-103 (тип G7) (Таблица 5) и 3e-102 (тип G9) (Таблица 6).

Таблица 5. Сходство каталитических доменов PAF PLA2 (тип G7)

	7b
7a	7e-103

Таблица 6. Сходство каталитических доменов PAF PLA2 (тип G8)

	8b
8a	3e-102

Для оставшихся двух типов (G15, G16) сравнения не проводилось, так как они включают только по одному белку у человека.

Чтобы реконструировать филогению белков PLA2 мы, предварительно, провели анализ гомологии и множественного выравнивания между белками различных типов PLA2. В результате было определено, что белки, объединённые в группу секретируемые sPLA2 (типы G1-3, G5, G10, G12) обладают высокой или умеренной гомологией ( $e\text{-value} \leq 1$ ) и качественным выравниванием между белками этих групп. В противоположность этому белки других типов PLA2 (G4, G6, G7, G8, G15, G16) обладают очень низкой гомологией ( $e\text{-value} > 1$ ) и плохо выравниваются между группами и по отношению к белкам sPLA2. В связи с чем мы реконструировали филогению sPLA2 методом максимального правдоподобия (рисунок 7). Для остальных типов белков (G4, G6, G7, G8, G15, G16) филогенетический анализ не проводился, так как реконструкция филогении по некачественному выравниванию с высокой вероятностью приведёт к артефактной филогении.

Результаты анализа филогении sPLA2 предполагают, что у общих предков многоклеточных беспозвоночных животных произошло две последовательных дивергенции: сначала предковый ген sPLA2 дивергировал на гены G3/G12 и G1/G2/G5/G10, а затем ген G3/G12 дивергировал на предковые гены G3 и G12. У общих предков костных позвоночных предковый ген G12 дивергировал на гены G12A и G12B.

Тогда как предковый ген G1/G2/G5/G10 дивергировал у общих предков костных позвоночных на гены G10 и G1/G2/G5, а затем ген G1/G2/G5 дивергировал на гены G1 и G2/G5. Далее у общих предков амниот произошли дивергенции гена G2/G5 на гены G2E и G2A/G2C/G2D/G2F/G5, затем гена G2A/G2C/G2D/G2F/G5 на гены G2A и G2C/G2D/G2F/G5, далее гена G2C/G2D/G2F/G5 на гены G2C/G2F и G2D/G5 и в итоге ген

G2C/G2F дивергировал на гены G2C и G2F, а ген G2D/G5 на гены G2D и G5. Таким образом PLA2 типа G2, по-видимому, является парафилитической, так как она включает в себя и кластер PLA2 типа G5. Тогда как все остальные группы sPLA2 являются монофилитическими.

## 5. Иллюстрации, визуализация результатов.

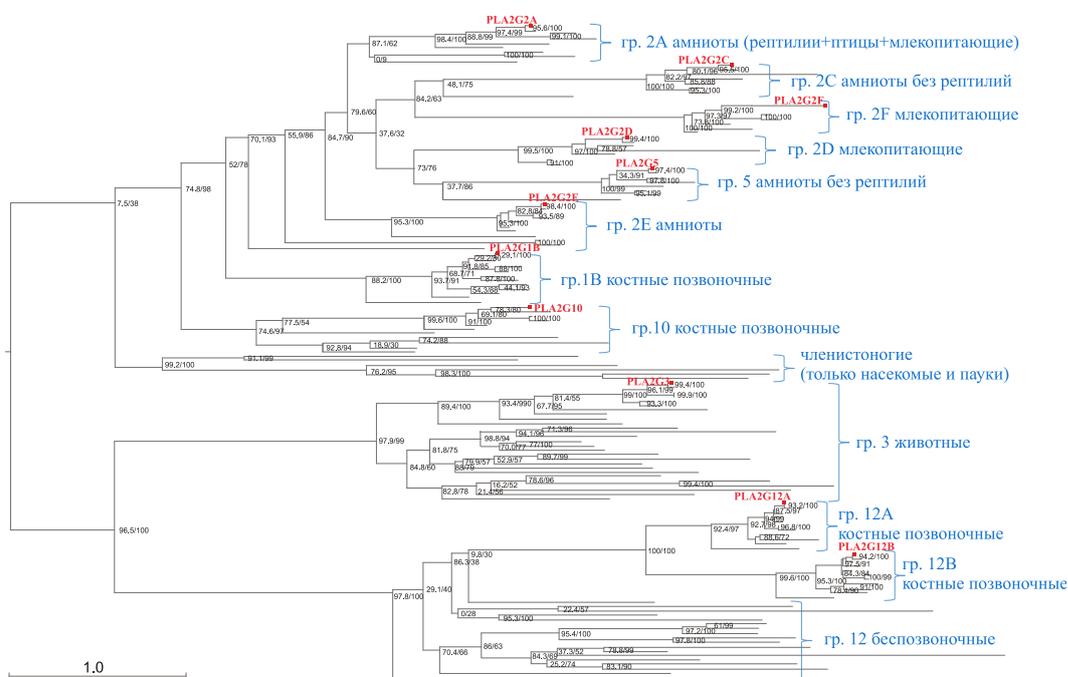


Рис. 1. Филогенетическое дерево Фосфолипаз A2: типы G1, G2, G3, G5, G10, G12. Синим цветом текста приведены названия типов (кластеров на дереве) фосфолипаз A2 и описано, какие таксоны представлены в каждом кластере. Красным цветом текста и красным квадратиком выделены белки фосфолипаз A2 человека. Возле узлов дерева через косую черту приведены два типа бутстреп поддержки для них: ultrafast bootstrap (UFBoot)/bootstrap SH-aLRT.

## Перечень публикаций, содержащих результаты работы

1. Turnaev, I. I., Vocharnikova, M. E., & Afonnikov, D. A. (2022). Фосфолипазы A2 человека: функциональный и эволюционный анализ. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii*, 26(8), 787-797. [8]. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-95>