

К.Г. Прокопчик, О.Н. Ринейская

**Изучение нуклеотидного состава мРНК, кодирующих интерстициальную  
коллагеназу**

Белорусский государственный медицинский университет,

кафедра биоорганической химии

Матриксные металлопротеиназы (MMPs) представляют мультигенное семейство цинк-зависимых эндопептидаз (содержат  $Zn^{2+}$  в активном центре), способных расщеплять один или несколько компонентов межклеточного матрикса, - коллаген, ламинин, фибронектин, эластин, протеогликаны и др. Так, MMP-1 гидролизует коллагены I, II, III типов в нейтральной среде по связи Gly-Leu(Ile) [6]. MMPs играют важную роль в нормальных физиологических процессах - эмбриональное развитие, морфогенез и метаморфоз тканей, процессах ангиогенеза и в ряде патологических состояний (ревматоидный артрит, системная склеродермия, пародонтит, сердечно-сосудистые заболевания), а также ключевую роль в процессах инвазии и метастазирования [5]. Ранее были изучены особенности доменной 3D-структуры MMPs методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии [9], а также субстратная специфичность и процессы активации про-MMPs [10, 11]. Однако исследования по изучению эволюционных изменений MMP1 и кодирующих их генов единичны [7] и требуют дальнейшего тщательного изучения.

**Целью нашей работы** явился анализ нуклеотидного состава мРНК, кодирующих металлопротеиназу I типа. Для этого последовательно ставились задачи: изучить изменения общего содержания гуанина и цитозина (GC-насыщенности) в мРНК, кодирующих MMP-1, в процессе эволюции; определить зависимости GC-насыщенности отдельных положений кодона и частоты использования претерминальных кодонов (ПТК) от общей GC-насыщенности.

**Материалы и методы исследования.** Объектами исследования явились взятые с сервера Национального центра биотехнологической информации [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) нуклеотидные последовательности мРНК, кодирующие MMP-1 человека (*Homo sapiens* – H.s., /AY769434 /), лошади (*Equus caballus* – E.c., /AF148882/), быка (*Bos taurus* – B.t., /NM\_174112/, prov.), свиньи (*Sus scrofa* – S.s., /EU722906/), кролика (*Oryctolagus cuniculus* – O.c., /NM\_001171139/, prov.), шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* – X.l. /NM\_001087049/, prov.), лягушки (*Xenopus tropicalis*, X.t., /BC161475/). Общая GC-насыщенность, GC-насыщенность отдельных положений кодона, содержание претерминальных кодонов (ПТК) в мРНК изучено с помощью пакета программ MEGA 4.1 (Beta 3) [8]. Полученные результаты были обработаны методами описательной статистики с помощью программы Microsoft Excel 2003. Корреляционный анализ был проведен с использованием коэффициента Пирсона (r), достоверность различий определена по критерию Стьюдента. Данные представлены как значения  $\pm$  стандартная ошибка относительных показателей.

**Результаты и их обсуждение.** Данные по общей GC-насыщенности, содержанию гуанина и цитозина по отдельным положениям кодонов (GC1, GC2, GC3), частоте использования ПТК представлены в таблице 1.

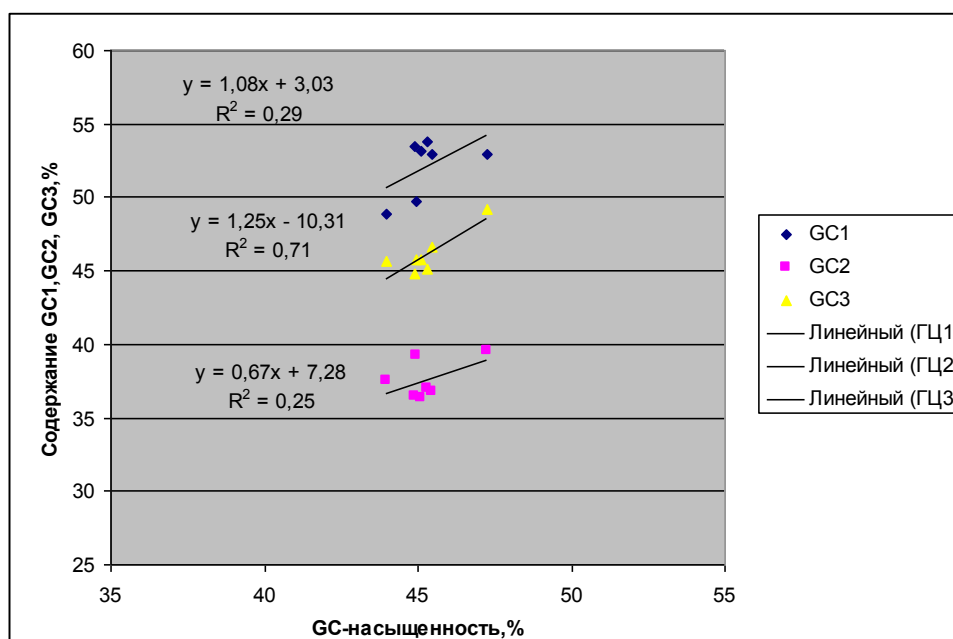
**Таблица 1 – Содержание гуанина и цитозина, претерминальных кодонов в мРНК, соответствующих MMP-1 хордовых**

Организм	Общее GC, %	GC1, %	GC2, %	GC3, %	ПТК, %
H.s.	45,32 $\pm$ 1,33	53,83 $\pm$ 2,30	37,02 $\pm$ 2,23	45,11 $\pm$ 2,30	33,26 $\pm$ 2,17
S.s.	45,11 $\pm$ 1,33	53,19 $\pm$ 2,30	36,38 $\pm$ 2,22	45,74 $\pm$ 2,30	29,64 $\pm$ 2,11
E.c.	45,46 $\pm$ 1,33	52,98 $\pm$ 2,30	36,81 $\pm$ 2,22	46,60 $\pm$ 2,30	29,42 $\pm$ 2,10
B.t.	47,23 $\pm$ 1,33	52,98 $\pm$ 2,30	39,57 $\pm$ 2,26	49,15 $\pm$ 2,31	24,31 $\pm$ 1,98
O.c.	44,92 $\pm$ 1,33	53,52 $\pm$ 2,30	36,46 $\pm$ 2,22	44,78 $\pm$ 2,30	30,70 $\pm$ 2,13
X.l.	43,97 $\pm$ 1,33	48,82 $\pm$ 2,31	37,47 $\pm$ 2,24	45,61 $\pm$ 2,30	33,26 $\pm$ 2,18
X.t.	44,94 $\pm$ 1,47	49,74 $\pm$ 2,56	39,27 $\pm$ 2,26	45,81 $\pm$ 2,55	25,16 $\pm$ 2,22

Установлено, что наибольшее общее GC-содержание характерно для мРНК, кодирующих MMP1 быка (47,23 $\pm$ 1,33%), наименьшее – для мРНК шпорцевой лягушки

(43,97±1,33%). Определено, что различия между наибольшим общим GC-содержанием мРНК (B.t.) и наименьшим общим GC-содержанием мРНК (X.l.) не являются достоверными ( $p>0,05$ ). Это связано с тем, что GC-насыщенность исследуемых мРНК колеблется в малых пределах. Сходно с общей GC-насыщенностью, содержание гуанина и цитозина в отдельных положениях кодона в изучаемом вариационном ряду также статистически не различаются.

Определим зависимость содержания гуанина и цитозина в каждом из положений нуклеотида в кодоне от общей GC-насыщенности мРНК, кодирующих MMP-1 (рис. 1).



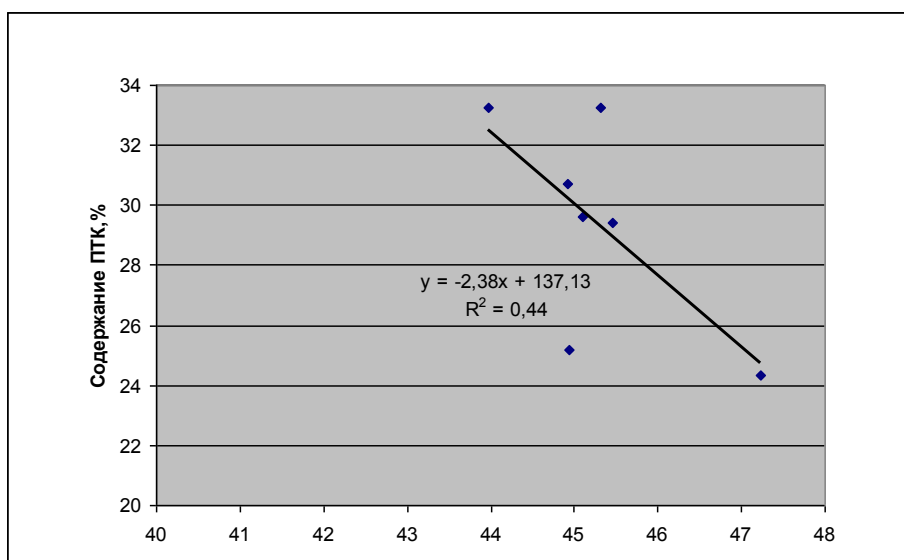
**Рисунок 1 – Зависимость GC-содержания в отдельных положениях кодона от общей GC-насыщенности**

При анализе этой зависимости было выявлено, что с увеличением общей GC-насыщенности наблюдается линейное возрастание содержания гуанина и цитозина во всех положениях нуклеотида в кодоне. Наибольший наклон (1,25) линии тренда характерен для значений GC3, меньший (1,08) – для тренда, построенного по значениям GC1 и наименьшее значение (0,67) соответствует зависимости содержания GC2 от общей GC-насыщенности. Таким образом, в мРНК и, следовательно, в ДНК, кодирующих MMP1, более вероятны замены в третьем положении кодона, в меньшей степени – в первом и наименее вероятны во втором. Это связано с тем, что 72% замен по третьему положению не приводят к изменению

кодируемой аминокислоты, по первому положению 5% замен также синонимичны, а по второму положению все замены несинонимичны [4]. Однако наклон линии тренда по значениям GC2 (1,25) свидетельствует о том, что часть замен является нейтральной, то есть не приводит к изменению функции белка. Согласно подходу, апробированному на алкогольдегидрогеназах (АДГ) класса III хордовых [3], получение графика с таким наклоном линии тренда свидетельствует об эволюционной сформированности кодируемых MMP1.

Известно, что претерминальные кодоны могут стать терминальными в результате замены одного нуклеотида путем точечной мутации и, следовательно, прервать синтез пептидной цепочки. В исследуемых последовательностях мРНК максимальная частота встречаемости ПТК отмечена в MMP1 человека и лягушки и составляет  $33,26 \pm 2,17\%$ , а минимальная – в таковой быка ( $24,31 \pm 1,98\%$ ). Однако частота использования ПТК в изученных мРНК статистически не отличается ( $p > 0,05$ ) от теоретически ожидаемой ( $29,5\%$ ), согласно стандартной таблице генетического кода.

Интерес представляет изменение содержания ПТК в процессе эволюции исследуемого фермента. В ряду от X.t. до H.s. наблюдается достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение содержания ПТК (от  $25,16 \pm 2,22\%$  до  $33,26 \pm 2,17\%$ ). Так, для мембраносвязанных аденилатциклаз животных [1] и бактерий [2] получена противоположная закономерность, заключающаяся в достоверном уменьшении частоты ПТК в соответствующих мРНК в процессе эволюции. На рис. 2 представлена зависимость содержания ПТК от общей GC-насыщенности в мРНК, кодирующих MMP1 хордовых.



**Рисунок 2 – Зависимость между GC-насыщенностью и содержанием претерминальных кодонов в мРНК, кодирующих MMP-1 хордовых**

Установлено, что между частотой использования ПТК и общей GC-насыщенностью изученных мРНК существует достоверная обратная корреляционная связь средней силы ( $r=-0,66\pm 0,25$ ;  $p<0,05$ ); между GC3-содержанием и частотой ПТК - достоверная обратная сильная корреляционная связь ( $r=-0,70\pm 0,23$ ;  $p<0,05$ ). Таким образом, установленные зависимости (рис. 2) согласуются с таковыми для АДГ класса III хордовых [3], и свидетельствует о том, что содержание ПТК, в первую очередь, определяется GC-насыщенностью.

**Выводы:**

1. В процессе эволюции наблюдается достоверное увеличение частоты использования ПТК в мРНК, кодирующих MMP1. Частота использования ПТК в изученных мРНК статистически не отличается от теоретически ожидаемой согласно стандартной таблице генетического кода.
2. Найдена обратная корреляционная связь средней силы ( $r=-0,66\pm 0,25$ ;  $p<0,05$ ) между частотой использования ПТК и общей GC-насыщенностью и обратная сильная корреляционная связь ( $r=-0,70\pm 0,23$ ;  $p<0,05$ ) между частотой ПТК и GC3-содержанием в мРНК, кодирующих MMP1.
3. Анализ зависимости содержания гуанина и цитозина в отдельных положениях кодона от общей GC-насыщенности свидетельствует о том, что изучаемые мРНК кодируют эволюционно сформированные белки.

**Литература:**

1. Барковский, Е.В. Мембранносвязанные аденилатциклазы: монография / Е.В. Барковский, О.В. Ачинович; под общ. Ред. Е.В. Барковского. Минск: БГМУ, 2005. 134 с.

2. Барковский, Е.В. Обратная зависимость между уровнем GC-насыщенности геномов бактерий и общей частотой использования в них претерминальных кодонов / Е.В. Барковский, В.В. Хрусталеv // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2009. - №1. – С.16-20.
3. Бутвиловский, А.В. Алкогольдегидрогеназы хордовых животных: монография / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский; под общей ред. Е.В. Барковского. – Минск: БГМУ, 2007. – 144 с.
4. Бутвиловский, А.В. Основные методы молекулярной эволюции: монография / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский, В.В. Давыдов, Е.А. Черноус, В.В. Хрусталеv; под общей ред. проф. Е.В. Барковского. – Мн.: Белпринт, 2009. – 216 с.
5. Клишо, Е.В. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе / Е.В.Клишо, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов // Сибирский онкологический журнал. – 2003. - №2. - С.62-70.
6. Соловьева, Н.И. Основные металлопротеиназы соединительно-тканного матрикса / Н.И. Соловьева // Биоорганическая химия. – 1994. – Т. 20, №2. – С. 143-152.
7. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification / I. Massova [et al.] // FASEB J. – 1998. - № 12. – P. 1075-1095.
8. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura [et al] // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24. - №8. – P. 1596-1599.
9. Murphy, G. Progress in matrix metalloproteinase research / G. Murphy, H. Nagase // Molecular Aspects of Medicine. – 2008. - № 29. – P. 290-308.
10. Structural properties of matrix metalloproteinases / W. Bode [et al.] // Cell. Mol. Life. Sci. – 1999. - № 55. – P. 639-652.
11. Visse, R. Matrix Metalloproteinases and Tissue inhibitors: Structure, Function, and Biochemistry / R. Visse, H. Nagase // Circ. Res. – 2003. - № 92. – P. 827-839.

Summary.

**K. Prakopchyk, O. Ryneiskaya**

Nucleotide sequences analysis of the mRNAs encoding matrix metalloproteinase I

Belarussian State Medical University, bioorganic chemistry department

Total GC-content, GC-contents in the codon positions I, II, III of the investigated mRNAs and the level of preterminal codon usage (PCU) were observed. Maximum GC-content was determined for the mRNAs, encoding MMP1 of bovine B.t. ( $47,23 \pm 1,33\%$ ), minimum was for the mRNAs, encoding MMP1 of frog X.l. ( $43,97 \pm 1,33\%$ ). Reliable inverse medium correlation dependence ( $r = -0,66 \pm 0,25$ ;  $p < 0,05$ ) between the PCU level and the GC-content of the gene and reliable inverse strong correlation dependence ( $r = -0,70 \pm 0,23$ ;  $p < 0,05$ ) between the PCU level and the GC3-content of the gene were determined.