

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Фосфолипазы A2 человека: функциональный и эволюционный анализ

И.И. Турнаев^{1,3}✉, М.Е. Бочарникова^{2,3}, Д.А. Афонников^{1,2,3}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ turn@bionet.nsc.ru

Аннотация. Фосфолипазы A2 (PLA2) способны гидролизовать *sn*-2 положение глицерофосфолипидов для высвобождения жирных кислот и лизофосфолипидов. Ферменты семейства фосфолипазы A2 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 A2 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 A2 типа G6 (фосфолипазы A2 G6B, G6F, G6C, G6A). Мы проанализировали также связи между фосфолипазами A2 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 A2. Показано, что белки фосфолипаз A2 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 A2 у человека (типы G4, G2 и G7) вовлечены в наибольшее количество групп заболеваний.

Ключевые слова: фосфолипаза A2; глицерофосфолипиды; заболевания человека.

Для цитирования: Турнаев И.И., Бочарникова М.Е., Афонников Д.А. Фосфолипазы A2 человека: функциональный и эволюционный анализ. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(8):787-797. DOI 10.18699/VJGB-22-95

Human phospholipases A2: a functional and evolutionary analysis

I.I. Turnaev^{1,3}✉, M.E. Bocharnikova^{2,3}, D.A. Afonnikov^{1,2,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ turn@bionet.nsc.ru

Abstract. Phospholipases A2 (PLA2) are capable of hydrolyzing the *sn*-2 position of glycerophospholipids to release fatty acids and lysophospholipids. The PLA2 superfamily enzymes are widespread and present in most mammalian cells and tissues, regulating metabolism, remodeling the membrane and maintaining its homeostasis, producing lipid mediators and activating inflammatory reactions, so disruption of PLA2-regulated lipid metabolism often leads to various diseases. In this study, 29 PLA2 genes in the human genome were systematically collected and described based on literature and sequence analyses. Localization of the PLA2 genes in human genome showed they are placed on 12 human chromosomes, some of them forming clusters. Their RVI scores estimating gene tolerance to the mutations that accumulate in the human population demonstrated that the G4-type PLA2 genes belonging to one of the two largest clusters (4 genes) were most tolerant. On the contrary, the genes encoding G6-type PLA2s (G6B, G6F, G6C, G6A) localized outside the clusters had a reduced tolerance to mutations. Analysis of the association between PLA2 genes and human diseases found in the literature showed 24 such genes were associated with 119 diseases belonging to 18 groups, so in total 229 disease/PLA2 gene relationships were described to reveal that G4, G2 and G7-type PLA2 pro-

teins were involved in the largest number of diseases if compared to other PLA2 types. Three groups of diseases turned out to be associated with the greatest number of PLA2 types: neoplasms, circulatory and endocrine system diseases. Phylogenetic analysis showed that a common origin can be established only for secretory PLA2s (G1, G2, G3, G5, G10 and G12). The remaining PLA2 types (G4, G6, G7, G8, G15 and G16) could be considered evolutionarily independent. Our study has found that the genes most tolerant to PLA2 mutations in humans (G4, G2, and G7 types) belong to the largest number of disease groups.

Key words: phospholipase A2; glycerophospholipids; human diseases.

For citation: Turnaev I.I., Bocharnikova M.E., Afonnikov D.A. Human phospholipases A2: a functional and evolutionary analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(8):787-797. DOI 10.18699/VJGB-22-95

Введение

Фосфолипазы (КФ 3.1) – это гидролазы, ферменты, которые используют молекулу воды для расщепления фосфолипидов (Burke, Dennis, 2009; Aloulou et al., 2018), основного компонента биологических мембран всех живых организмов (De Maria et al., 2007). Существует четыре класса фосфолипаз: А, В, С, D. Каждый из них способен гидролизовать определенную связь в фосфолипиде. Так, фосфолипазы А1 (PLA1) (КФ 3.1.1.32) и А2 (PLA2) (КФ 3.1.1.4) являются ацил-эстеразами и гидролизуют *sn*-1 и *sn*-2 позиции глицерофосфолипидов соответственно; фосфолипаза В (PLB) (КФ 3.1.1.5) гидролизует и *sn*-1, и *sn*-2 позиции глицерофосфолипидов; фосфолипазы С (PLC) (КФ 3.1.4.3) и D (PLD) (КФ 3.1.4.4) относятся к фосфат-эстеразам и определяются на основе гидролиза глицерина или дистальной стороны фосфатной группы (рис. 1) (Aloulou et al., 2018; Shayman, Tesmer, 2019).

Наиболее интенсивно изучают семейство фосфолипаз А2, что отражает их биологическую значимость. PLA2 гидролизуют эфирную связь мембранных фосфолипидов в позиции *sn*-2. В естественных условиях в *sn*-2 положении фосфолипидов часто содержится полиненасыщенные жирные кислоты, которые при высвобождении могут метаболизироваться с образованием различных эйкозаноидов и связанных с ними биологически активных липидных медиаторов (Aloulou et al., 2018).

Существует по меньшей мере шестнадцать типов фосфолипаз А2. Е.А. Dennis с коллегами разделили их на шесть групп, основываясь на свойствах: секреторируемые фосфолипазы А2 (sPLA2, типы G1, G2, G3, G5, G9, G10, G11, G12, G13 и G14); цитозольные фосфолипазы А2 (cPLA2, тип G4); кальций-независимые фосфолипазы А2

(iPLA2, тип G6); ацетилгидролазы PAF (platelet-activating factor – фактор активации тромбоцитов) (PAF-АН PLA2s, типы G7 и G8); лизосомальная фосфолипаза А2 (LPLA2, тип G15); фосфолипаза адипоцитов А2 (AdPLA, тип G16) (Dennis et al., 2011).

Отнесение PLA2 к определенной группе (типу) основано на экспериментальном определении их каталитических механизмов, клеточной локализации, эволюционных и структурных особенностях. Отметим, что большинство этих липолитических ферментов не имеют структурного сходства и обладают различными регуляторными и каталитическими механизмами (Aloulou et al., 2018).

Каждый из шестнадцати типов фосфолипаз А2 вовлечен в различные виды липидного метаболизма и развития заболеваний, поэтому предполагается, что PLA2 могут служить терапевтическими мишенями для лечения ряда заболеваний (Aloulou et al., 2018). В связи с этим в фармацевтической промышленности наблюдается огромный интерес к разработке селективных и эффективных ингибиторов каждого из перечисленных типов PLA2 (Aloulou et al., 2018).

Известно, что описание функций белков включает, с одной стороны, молекулярную функцию, а с другой – функцию на уровне жизнедеятельности клетки или всего организма (Karp, 2000). Фосфолипазы А2 достаточно хорошо исследованы с точки зрения молекулярных функций и их механизмов. Однако их роль в процессах жизнедеятельности клетки и всего организма остается пока слабо изученной.

Настоящая работа посвящена анализу характеристик различных типов фосфолипаз А2 человека в контексте имеющихся данных о связях фосфолипаз А2 с разными заболеваниями. Были проанализированы: доменная организация белковых последовательностей, распределение генов фосфолипаз А2 в геноме, характеристики мутабельности генов фосфолипаз, а также их филогенетические отношения с фосфолипазами других организмов.

Материалы и методы

Формирование выборки фосфолипаз человека и животных. Последовательности белков PLA2 человека были взяты из статьи (Huang Q. et al., 2015). Поскольку в этой работе описаны не все известные PLA2 человека (Dennis et al., 2011), то недостающие последовательности были идентифицированы в базе NCBI по их названиям и идентификаторам согласно (Dennis et al., 2011). Для этого использовали версию и аннотацию генома человека GRCh38.p14.

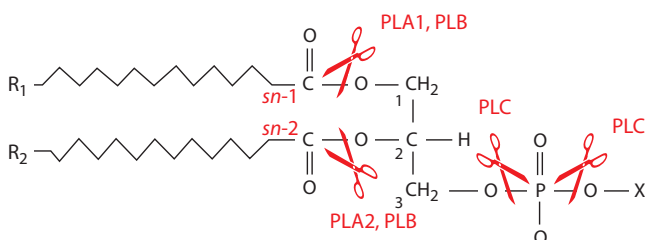


Рис. 1. Структурная схема фосфолипида и положения эфирных связей, гидролизующихся разными классами фосфолипаз.

R1 и R2 – $((\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3)$; X – различные полярные головные группы глицерофосфолипидов, например серин, холин, этаноламин, глицерол или инозитол; *sn*-1 и *sn*-2 – позиции в глицерофосфолипидах. Адаптировано из (Giresha, 2021).

Геном человека содержит 29 генов фосфолипаз А2, кодирующих белки двенадцати типов (PLA2G1–8, 10, 12, 15, 16) (последовательности см. в Прил. 2)¹. Типы фосфолипаз А2 G1, G3, G5, G10, G15, G16 представлены одним геном, типы G7 (*G7A*, *G7B*), G8 (*G8A*, *G8B*) и G12 (*G12A*, *G12B*) – двумя генами, тип G2 – пятью генами (*G2A*, *G2C–F*), тип G6 – шестью генами (*G6A–F*).

Первичные структуры фосфолипаз А2 человека были охарактеризованы по наличию доменов, активных центров, сигнальных пептидов на основе литературных данных. Поиск гомологов фосфолипаз А2 человека у животных проводили в программе BLASTP с E-value ≤ 1. В качестве запроса использовали последовательности белков PLA2 человека. Гомологи искали среди белковых последовательностей организмов, представляющих различные таксоны, список которых приведен в Прил. 1.

Функциональный анализ фосфолипаз. Для того чтобы оценить консервативность генов фосфолипаз А2 человека, мы использовали метод RVIS (Petrovski et al., 2013). Индекс RVIS (residual variance index score) позволяет оценить толерантность генов к мутациям, которые накапливаются в популяции человека. Рассчитывается на основе информации о частоте аллелей, представленной в последовательности всего экзона человека (набор данных NHLBI-ESP6500 с сервера вариантов экзомов – EVS v.0.0.14: <https://evs.gs.washington.edu/EVS/>). RVIS позволяет ранжировать гены по количеству наблюдаемых нуклеотидных вариаций; при этом учитывается относительная доля нейтральных замен, которые наблюдаются для исследуемого гена. Отрицательные значения индекса RVIS свидетельствуют о низкой вариации гена (его последовательность является менее толерантной к накоплению мутаций, что обнаруживается у генов с более важной функцией), а положительные – о более высокой вариабельности гена (он более толерантен к заменам нуклеотидов).

Для выявления биологических процессов, в которые вовлечены фосфолипазы А2, мы использовали сервис DAVID (Huang D.W. et al., 2009). Он позволяет выявить термины из баз Gene Ontology, INTERPRO и KEGG Pathway, которые перепредставлены в аннотации генов из анализируемой выборки в сравнении с аннотациями всех генов организма. В нашем случае такой выборкой была выборка генов фосфолипаз А2 человека.

Поиск ассоциации фосфолипаз А2 человека с заболеваниями. Поиск статей, в которых описана связь между заболеваниями человека и активностью белков PLA2, проводился по базам PubMed и Google Scholar. Использовались запросы «disease/patients/pathology/название конкретного заболевания (например, lung cancer или schizophrenia) + PLA2/phospholipase A2/название конкретной PLA2 (например, pla2g1b, pla2g2a)». Также информация была взята из обзоров, посвященных участию фосфолипаз А2 в различных группах заболеваний.

В статьях, полученных в результате поиска, отслеживали информацию о связи заболевания человека и активности/экспрессии определенного PLA2. К такой информации, например, относились сообщения о том, что у больных значительно понижена/повышена экспрессия

или активность данного PLA2 по сравнению со здоровыми людьми; сведения о том, что мутация гена PLA2 усиливает/ослабляет выраженность заболевания, и о том, что установлен механизм, посредством которого PLA2 влияет на ход заболевания. Для классификации болезней в настоящем исследовании использовали Международную классификацию болезней МКБ-10 (<https://mkb-10.com>) (Hirsch et al., 2016).

На основании информации о взаимосвязи между заболеванием и вовлечением в него фосфолипаз различного типа была сформирована таблица данных, по строкам которой расположены типы заболеваний человека, а по столбцам – типы фосфолипаз А2. Если в ячейке таблицы стояло значение 1, это означало, что данный тип фосфолипазы вовлечен/имеет связь с заболеванием. Для построения таблицы был написан скрипт на языке Python, который осуществлял в процессе работы привязку названия заболевания к коду МКБ.

Далее мы проводили иерархическую кластеризацию типов фосфолипаз А2 человека по степени их ассоциации с различными заболеваниями: для разных типов фосфолипаз сравнивали значения их участия в заболевании из вышеописанной таблицы. В качестве меры сходства использовали евклидово расстояние. Для кластеризации применяли метод UPGMA. Аналогично кластеризовали и заболевания, по степени их связи с различными типами фосфолипаз А2.

Множественное выравнивание и реконструкция филогении белков. Множественное выравнивание гомологичных последовательностей фосфолипаз осуществляли с помощью программ PROMALS (Pei, Grishin, 2007) и MAFFT (Katoh, Toh, 2010). Поиск белков для выравнивания и, соответственно, само выравнивание белковых последовательностей проводились только по фосфолипазному домену. Реконструкцию филогенетического дерева выполняли методом максимального правдоподобия (программа IQ-TREE v.8.2.4) (Nguyen, 2015). Для реконструкции дерева была выбрана оптимальная модель WAG + R6.

Результаты

Структурная и функциональная характеристика фосфолипаз человека

Особенности структурной организации фосфолипаз человека различных типов отражены на рис. 2. Характеристика белков (субстраты, активность, масса, каталитические остатки и т. д.) приведена в Прил. 3.

Секреторные фосфолипазы А2 (sPLA2) включают шесть типов PLA2: G1, G2 (pla2g2(a, c–f)), G3, G5, G10, G12 (pla2g12(a, b)). Длина белков типов G1, G2, G5, G10 составляет 138–165 а. о., типа G12 – 189–195 а. о., тогда как белок типа G3 значительно крупнее – 509 а. о. (см. рис. 2). Его размер значительно увеличен по сравнению с остальными sPLA2 белками за счет протяженных С- и N-концевых расширений.

Для белков sPLA2 (типы G1, G2, G3, G5, G10, G12) показана только PLA2 каталитическая активность. Каталитические домены расположены в центральной части последовательностей и содержат консервативную ката-

¹ Приложения 1–11 см. по адресу: <https://sites.icgbio.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx13.pdf>

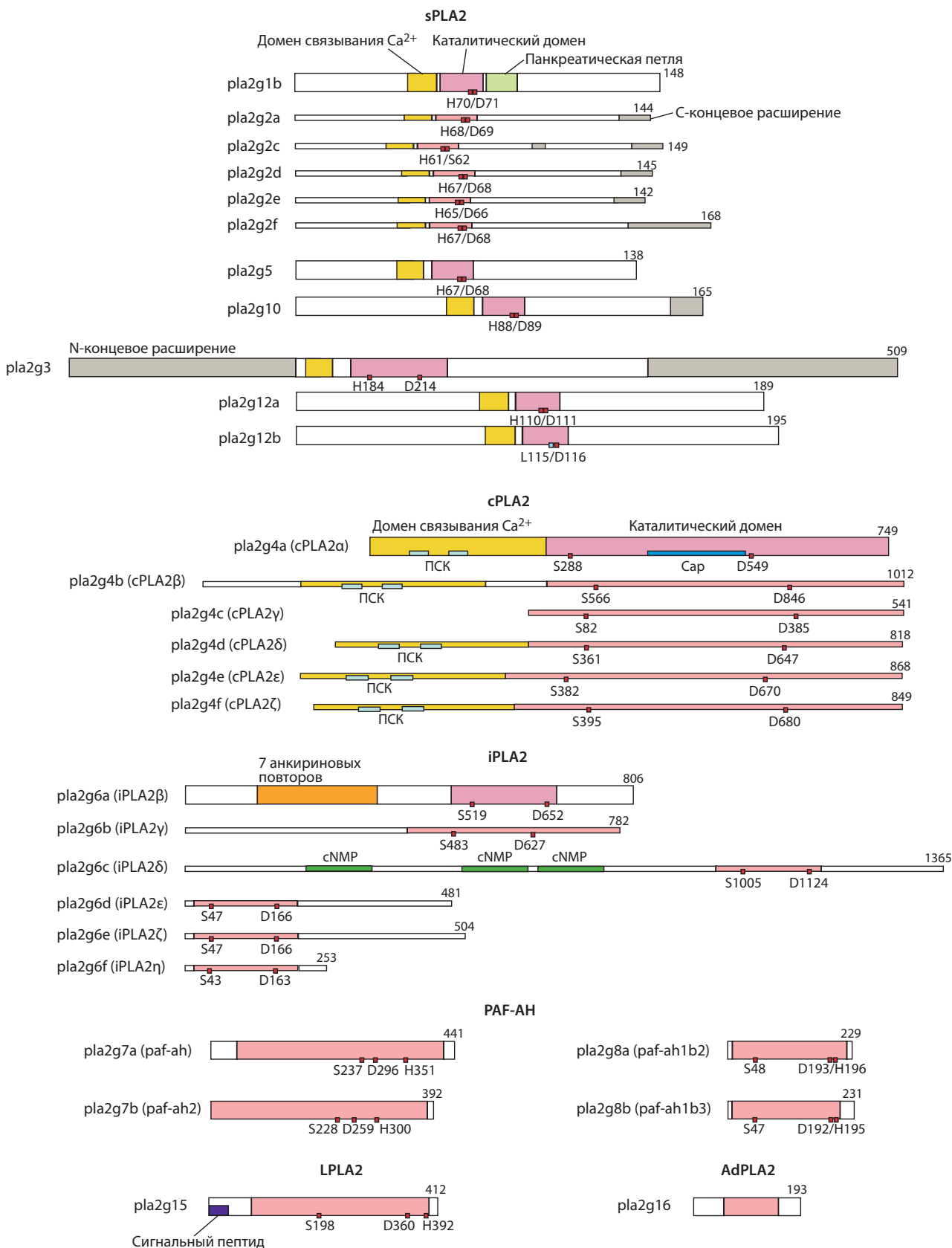


Рис. 2. Структура белков PLA2 человека.

Красным квадратиком обозначены активные сайты. Голубой квадратик в последовательности pla2g12b обозначает замену Н (гистидина) на L (лейцин) в 115-й позиции белка, что приводит к отсутствию каталитической активности белка pla2g12b (Guan et al., 2011). ПСК – петля, связывающая Ca²⁺; cNMP – домен, связывающий циклические нуклеотиды (цАМФ или цГМФ); панкреатическая петля – уникальное пятиаминокислотное расширение, имеющееся у sPLA2G1B; Cap – область крышки, обнаруженная в PLA2G4A, которая закрывает/открывает активный сайт для моделирования фосфолипидного субстрата. Рисунок адаптирован из статей (Kudo, Murakami, 2002; Dennis et al., 2011).

литическую диаду His/Asp (см. рис. 2, Прил. 3). sPLA2 являются Ca^{2+} -зависимыми фосфолипазами, и, соответственно, у них ближе к N-концу есть домен связывания кальция, включающий в себя петлю связывания кальция (Dennis et al., 2011) (см. рис. 2).

Субстратами для ферментов sPLA2 служат фосфолипиды. Во всех случаях это фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидэтаноламин (ФЕ), за исключением pla2g12a, который использует фосфатидилглицерол (ФГ), но не ФХ или ФЕ. Некоторые sPLA2 используют в качестве субстратов ФГ и фосфатидилсерин (ФС). Белок pla2g12b человека каталитически неактивен (см. Прил. 3 и подпись к рис. 2).

Цитозольные фосфолипазы А2 (cPLA2) представлены типом G4. К этому типу относятся шесть белков человека: pla2g4(a–f). Масса белков cPLA2 варьирует от 541 а.о. (pla2g4c) до 1012 а.о. (pla2g4b) (см. рис. 2). У белков cPLA2 каталитические домены расположены в С-концевой части последовательностей и содержат консервативную каталитическую диаду Ser/Asp (см. Прил. 3, рис. 2). cPLA2, так же как и sPLA2, являются кальций-зависимыми фосфолипазами А2, и, соответственно, у них ближе к N-концу тоже есть домен связывания кальция (Dennis et al., 2011).

Для белков G4 типа (cPLA2/PLA2G4), как и для белков sPLA2, отмечена активность PLA2, в качестве субстратов для которой используются ФХ и ФЕ. Белок pla2g4a дополнительно задействует как субстрат фосфатидилинозитол (ФИ), а белок pla2g4c – ФХ, но его специфичность для ФЕ не показана (см. Прил. 3).

Кальций-независимые фосфолипазы А2 (iPLA2) включают только фосфолипазы А2 типа G6. Длина белков PLA2G6 человека сильно варьирует – от 253 до 1365 а.о. В белках iPLA2 каталитические домены расположены у pla2g(a, c) ближе к С-концу, а у pla2g(d–f) ближе к N-концу (см. рис. 2). Каталитический домен содержит, как и у белков cPLA2, консервативную каталитическую диаду Ser/Asp (см. Прил. 3, рис. 2). Каталитическая активность iPLA2 не зависит от присутствия Ca^{2+} , что отражено в их названии «кальций-независимые фосфолипазы». В отличие от sPLA2 и cPLA2, они не имеют Ca^{2+} -связывающего домена. У белка pla2g6a ближе к N-концу находится область, содержащая семь анкириновых повторов. Данный мотив участвует в белок-белковых взаимодействиях, позволяя интенсивно связываться с мембранными белками (Филькин и др., 2020). В белке pla2g6c ближе к С-концу находятся три cNMP сайта (сайт, связывающий циклические нуклеотиды) (см. рис. 2).

Белки типа g6(a–f) используют в качестве субстратов для PLA2 реакций ФХ. Белок pla2g6b, кроме ФХ, может задействовать ФЕ. Также эти ферменты, помимо PLA2, могут проявлять и другие активности: триглицерид гидролазную, лизофосфолипазную, PLA1 (для pla2g6b) и др. (см. Прил. 3).

Ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов (PAF-АН или Lp-PLA2). PAF-АН включают фосфолипазы А2 типов G7 и G8. Они моделируют активность фактора активации тромбоцитов. Фактор активации тромбоцитов (platelet-activating factor, PAF) – сильный фосфолипидный медиатор воспаления. PAF участвует в вос-

палении, агрегации тромбоцитов, играет роль в патогенезе анафилактического шока (Shimizu, 2009). Длина PAF-АН белков составляет 441 и 392 а.о. для белков g7a и g7b соответственно и 229 и 231 а.о. для белков g8a и g8b (см. рис. 2). Каталитический домен занимает почти всю последовательность и содержит консервативную каталитическую триаду Ser/His/Asp (см. Прил. 3, рис. 2). Белки PAF-АН являются фосфолипазами А2, не зависящими от Ca^{2+} . Соответственно, у них отсутствует домен связывания Ca^{2+} (см. рис. 2).

Белки pla2g7(a, b) и pla2g8(a, b) способны гидролизовать PAF (фосфолипидный фактор активации тромбоцитов) до lysoPAF. При этом белок pla2g7a обладает как PLA2, так и PLA1 активностями и может использовать в качестве субстрата ФХ и оксФХ. Белок pla2g7b показывает PLA2 активность (см. Прил. 3).

Лизосомальные фосфолипазы А2 (LPLA2). LPLA2 (PLA2 тип G15) представлен у человека одним белком pla2g15 длиной 412 а.о. (см. рис. 2). У pla2g15 каталитический домен находится в центральном районе последовательности и содержит консервативную каталитическую триаду Ser/His/Asp (см. Прил. 3, рис. 2). Каталитическая активность PLA2 белка lpla2 не зависит от присутствия Ca^{2+} , поэтому последовательность lpla2 не имеет домена для связывания с Ca^{2+} .

Белок pla2g15/lpla2 типа G15 обладает PLA2 и PLA1 активностями, субстратами для которых служат ФХ, ФЕ и ФС. Также pla2g15 способен к ацилцерамид синтазной активности, субстратом для которой служит С1 церамид (см. Прил. 3).

Фосфолипазы адипоцитов А2 (AdPLA2). AdPLA2 (PLA2 тип G16) представлен у человека одним белком pla2g16 длиной 193 а.о. (см. рис. 2). Каталитический домен находится в центральном районе последовательности и содержит, как и у белков LPLA2, консервативную каталитическую триаду Ser/His/Asp (см. Прил. 3, рис. 2). adpla2 является Ca^{2+} -независимой фосфолипазой А2, и, соответственно, у него, как и у iPLA2, PAF-АН, LPLA2, отсутствует домен для связывания Ca^{2+} (см. рис. 2).

Белок G16 типа pla2g16/adpla обладает PLA2 и PLA1 активностями, используя в качестве субстратов ФХ и ФЕ. Также он имеет N-ацил ФЕ ацилтрансферазную активность, задействуя как субстрат диацил-ФЕ (см. Прил. 3).

Локализация генов фосфолипаз А2 в геноме человека

Расположение генов фосфолипаз А2 в геноме человека (версия GRCh38.p14) представлено на рис. 3. Гены PLA2 отсутствуют на хромосомах 2, 3, 5, 8, 9, 13, 14, 17, 18, 20, 21 и Y хромосоме. На хромосомах 4, 6, 7, 10, 12 и X локализовано по одному гену PLA2, на хромосомах 11, 16 – по два гена, а на хромосомах 19, 22 – по три. На хромосоме 15 четыре гена (G4B, G4E, G4D, G4F) образуют кластер размером 0.3 Мб в положении 43 Мб. На хромосоме 1, кроме одиночного гена G4A (на 188 Мб), в положении 20 Мб находится кластер из шести генов (G2E, G2A, G5, G2D, G2F, G2C) размером 0.11 Мб. Надо отметить, что все остальные гены, за исключением генов названных двух кластеров, находятся друг от друга на хромосомах изолированно, на расстоянии не менее 6 Мб друг от друга. При этом если

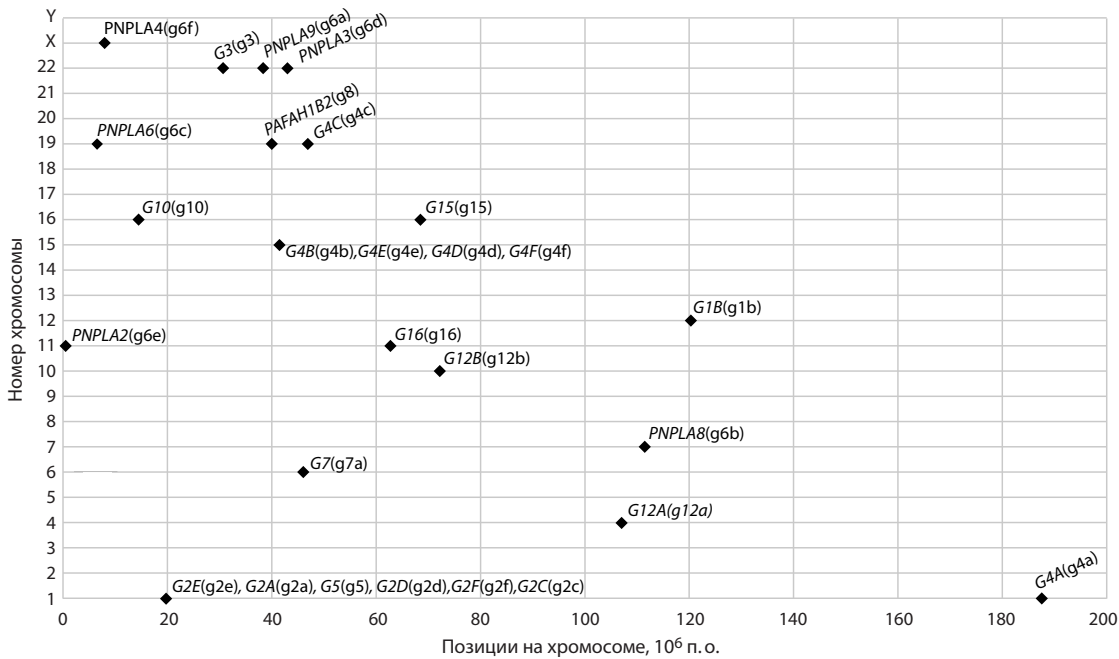


Рис. 3. Локализация генов фосфолипаз A2 на хромосомах человека.

Гены обозначены ромбами. Их позиции по оси X соответствуют координатам начала генов на хромосоме, по оси Y – номеру хромосомы.

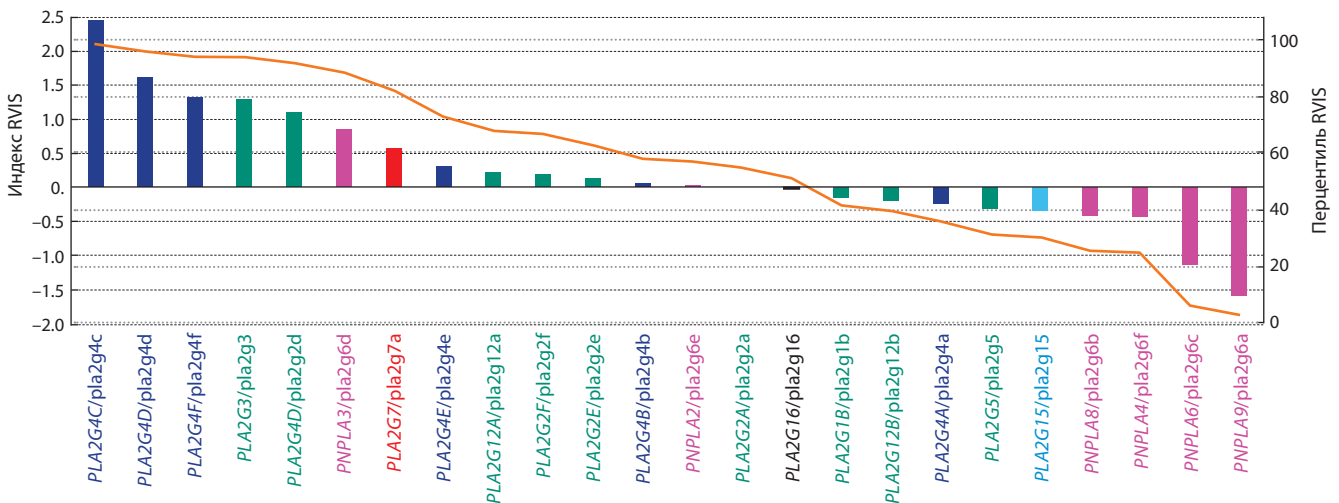


Рис. 4. Распределение значений индекса RVIS (Residual Variation Intolerance Score) для генов фосфолипаз A2 в геноме человека.

Ось Y справа соответствует доле генов в геноме человека (в %), имеющих меньшее значение RVIS, чем для конкретного гена (столбца). Этим значениям перцентилей соответствует оранжевая линия на графике. Цвет столбцов отражает принадлежность фосфолипаз A2 к разным типам, где синий – цитозольные PLA2, зеленый – секретрируемые, розовый – кальций-независимые, красный – ацетилтрансферазы фактора активации тромбоцитов (PAF-AH), черный (pla2g16) – адипотические PLA2, голубой (pla2g15) – лизосомальные PLA2.

гены PLA2 типа G4 (*G4B*, *G4E*, *G4D*, *G4F*) локализованы в вышеописанном кластере на хромосоме 15, то два других гена этого типа (*G4A* и *G4C*) расположены изолированно на хромосомах 1 и 19 соответственно. При этом все гены PLA2 типа G2 (*G2A*, *G2C*, *G2D*, *G2E*, *G2F*) находятся в кластере на хромосоме 1, но вместе с ними в этот кластер входит ген *G5*. Гены фосфолипаз A2 типа G6 расположены: *G6B* – на хромосоме 7, *G6E* – на хромосоме 11, *G6C* – на хромосоме 19, *G6A* и *G6D* – на хромосоме 22, *G6F* – на X хромосоме.

Анализ толерантности генов фосфолипаз A2 к мутациям на основе величины RVIS

На рис. 4 представлено распределение индексов RVIS для PLA2 человека. Слева на графике располагаются PLA2 с индексом выше нуля; это гены, которые содержат относительно большое число мутаций и толерантные к ним. Справа – фосфолипазы с индексом ниже нуля (гены, которые менее толерантны к мутациям). Негативное значение RVIS имеют гены фосфолипазы A2 типов G16, G1, G12 (*PLA2G12B*), G4 (*PLA2G4A*), G5, G15, G6 (см. рис. 4). Из

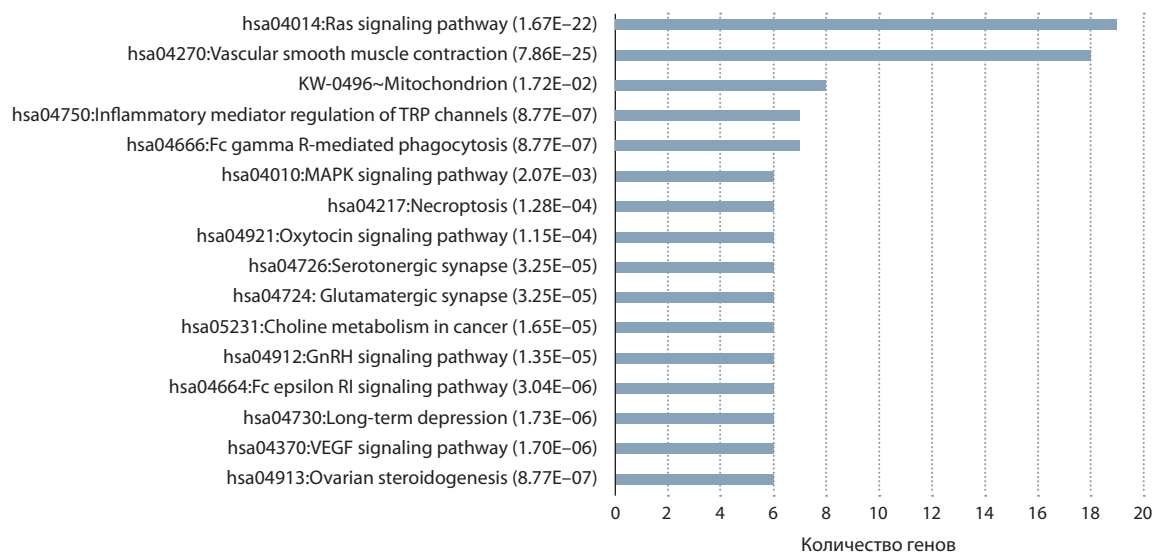


Рис. 5. Сигнальные пути и биологические процессы из базы KEGG Pathway, значимо ассоциированные со списком генов фосфолипаз А2 по данным анализа, проведенного с использованием системы DAVID.

По оси Y расположены термины, описывающие сигнальные пути и биологические процессы. В скобках после каждого термина приведено значение FDR (false discovery rate – ожидаемая доля ложных отклонений). По оси X отложено количество генов фосфолипаз А2, ассоциированных с каждым термином, описывающим сигнальные пути и биологические процессы.

этих генов три относятся к секретируемым PLA2 типов G1, G12, G5, а остальные относятся к кальций-независимым (тип G6), цитозольным (G4), лизосомальным (G15) и адипотическим (G16) фосфолипазам А2. Интересно, что четыре из шести генов PLA2 типа G6 (кальций-независимые PLA2), *PNPLA8*, *PNPLA4*, *PNPLA6*, *PLA2G6* (кодирующие белки *pla2g6b*, *pla2g6f*, *pla2g6c*, *pla2g6a*), имеют самые низкие величины показателя RVIS, т. е. наименее толерантны к мутациям. Остальные гены фосфолипаз этого типа (*PNPLA2* и *PNPLA3*, кодирующие белки *pla2g6e* и *pla2g6d*) имеют RVIS, свидетельствующий об умеренной или немного повышенной толерантности.

Наиболее толерантными к мутациям оказались гены фосфолипаз А2 цитозольного типа G4. Пять из шести генов этого типа имеют положительное значение RVIS, и только у гена *PLA2G4A* значение RVIS меньше 0 ($RVIS = -0.25$). Привлекает внимание, что более толерантные к мутациям гены PLA2 типа G4 *PLA2G4(B, D-F)* локализованы в кластере на хромосоме 15, в отличие от гена *PLA2G4A* с низкой толерантностью к мутациям, который располагается отдельно от них, на хромосоме 1. Для пяти PLA2 человека (*PLA2G2C*, *PLA2G7B*, *PLA2G8A*, *PLA2G8B*, *PLA2G10*) на сервере EVS отсутствуют данные по вариабельности генов, по которым рассчитывался RVIS (см. Материалы и методы), в связи с чем этих PLA2 нет на графике (см. рис. 4).

Анализ связи генов фосфолипаз А2 человека с биологическими процессами и сигнальными путями из базы KEGG Pathway

Результаты функционального анализа списка генов фосфолипаз А2 человека, выполненного при помощи сервера DAVID, приведены на рис. 5. Оказалось, что наиболее значимым (по количеству ассоциированных с ним генов фосфолипаз А2) является «сигнальный путь Ras». Ин-

тересно, что этот путь вовлечен в канцерогенез. Другой термин – путь VEGF, связанный с васкулярным эндотелиальным фактором роста. Заболевания, ассоциированные с данным путем, тоже, как правило, связаны с развитием опухолей (рак молочной железы, глиома, меланома и др.) (Takahashi, Shibuya, 2005). Таким образом, эти данные показывают значительную связь фосфолипаз А2 с процессами канцерогенеза.

Болезни, связанные с фосфолипазами А2

По информации из научных статей мы провели анализ связи между активностью различных фосфолипаз А2 и заболеваниями у человека (Прил. 4). Заболевания обозначены согласно Международной классификации болезней (МКБ-10, <https://mkb-10.com>). Отражена связь заболевания и PLA2 в случаях, если в статьях есть информация: 1) об ассоциации экспрессии определенного PLA2 с ходом заболевания; 2) о связи мутаций PLA2 с течением заболевания; 3) описаны механизмы воздействия PLA2 на ход заболевания. Описаны 229 связей «болезнь–ген», показаны связи 24 генов PLA2, входящих в 12 типов PLA2, со 119 заболеваниями (см. Прил. 4).

Результаты кластеризации фосфолипаз различного типа по их связи с заболеваниями человека приведены на рис. 6. По строкам диаграммы представлены 18 групп заболеваний, их названия и коды МКБ-10 (в скобках). Столбцы диаграммы соответствуют 12 типам PLA2 человека. Больше всего групп PLA2 связано с новообразованиями (код МКБ-10: C00–D48) – 9 групп из 12-ти; болезнями системы кровообращения (I00–I99) – 8; болезнями эндокринной системы (E00–E90) – 7; болезнями глаза и его придаточного аппарата (H00–H59) – 6 групп. Наименьшее количество групп PLA2 связано с врожденными аномалиями (Q00–Q99) – только одна PLA2 типа G7; с группой болезней «симптомы, признаки и отклонения от нормы»

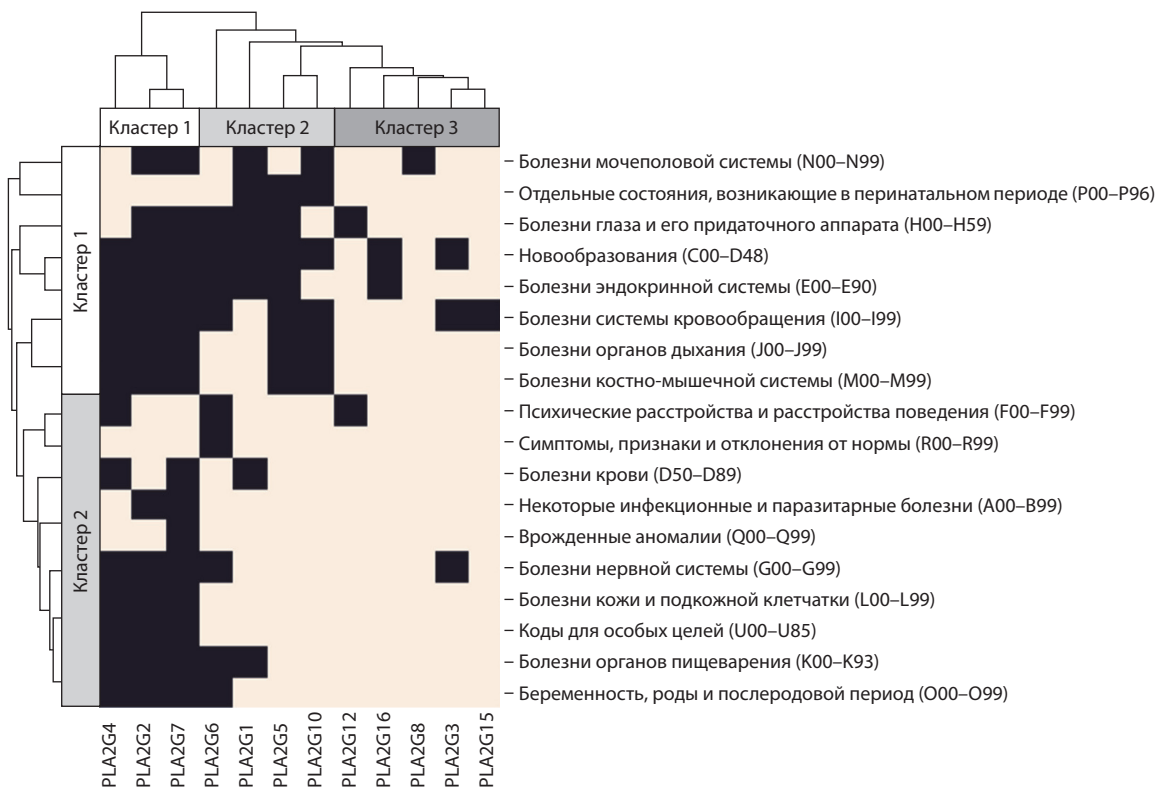


Рис. 6. Связь фосфолипаз A2 с различными группами заболеваний.

Черные ячейки – выявлена связь между генами группы фосфолипаз A2 и заболеваниями из представленных групп заболеваний; светлые – связей «ген–заболевание» не выявлено.

(R00–R99) – только PLA2 типа G6; с группой болезней «некоторые инфекционные и паразитарные болезни» (A00–B99) – только PLA2 типов G2 и G7.

Интересно отметить, что из PLA2 больше всего связей с заболеваниями имеют следующие: тип G7 связан с 15 группами заболеваний из 18 представленных на рис. 6; G2 – с 13 группами; G4 – с 12 группами. Меньше всего представлены в группах заболеваний: PLA2 типа G8, связанные только с болезнями мочеполовой системы (N00–N99); типа G15 – только с болезнями системы кровообращения (I00–I99); типа G12 – только с психическими расстройствами и расстройствами поведения (F00–F99) и с болезнями глаза и его придаточного аппарата (H00–H59); типа G16 – только с новообразованиями (C00–D48) и с болезнями эндокринной системы (E00–E90).

При кластеризации фосфолипазы A2 (по горизонтали) разделились на три кластера (см. рис. 6). Первый кластер содержит фосфолипазы A2 типов G4, G2, G7 и характеризуется тем, что гены этих типов PLA2 участвуют в наибольшем числе проанализированных нами заболеваний человека. Второй кластер включает PLA2 типов G6, G5, G10, которые относятся к секретируемым фосфолипазам A2. Они участвуют примерно в половине из проанализированных нами заболеваний (болезни различных систем: мочеполовой (N00–N99), кровообращения (I00–I99), дыхания (J00–J99); новообразования (C00–D48) и т. д.). PLA2 третьего кластера (типы G12, G16, G8, G3, G15) можно считать специфическими по отношению к отдельным заболеваниям.

Заболевания также разделились на две большие группы: первый кластер – болезни, в которых участвуют фосфолипазы A2 большинства типов; второй кластер – заболевания, в которые вовлечены фосфолипазы A2 в основном из кластера 1 (кластер фосфолипаз A2) (см. рис. 6).

Следует отметить, что одиннадцать из двенадцати исследованных генов PLA2 типов G4, G2, G7 имеют высокий уровень толерантности к мутациям (RVIS), и только ген *PLA2G4A* – умеренно низкий уровень толерантности к мутациям (RVIS = -0.25) (см. рис. 4). При этом PLA2 этих типов (G4, G2, G7) участвуют в наибольшем числе заболеваний (см. рис. 6). В то же время из семи исследованных генов PLA2 типов G6 и G15 пять имеют самый низкий уровень толерантности к мутациям (RVIS), и только один, *PLA6G6D*, отличается относительно высоким уровнем толерантности к мутациям (RVIS = 0.85) (см. рис. 4). PLA2 этих типов (G6 и G15) относятся к кластеру фосфолипаз, связанных с наименьшим числом заболеваний (см. рис. 6). Это позволяет предполагать возможную положительную зависимость между количеством заболеваний, в которые вовлечена фосфолипаза A2, и толерантностью гена к мутациям (индекс RVIS). Однако расчет коэффициента корреляции методом χ^2 не выявил значимой корреляции между этими величинами. В данном случае можно говорить только о недостоверной тенденции.

В работе (Petrovski et al., 2013) в ходе исследования выборки генов, связанных с менделевскими (моногенными) заболеваниями, было достоверно показано, что они имеют низкую толерантность (индекс RVIS) по сравнению с

остальными генами человека. S. Petrovski с коллегами предполагают, что отрицательный RVIS свидетельствует о наличии очищающего (purifying) отбора, а положительный RVIS – либо об отсутствии очищающего отбора, либо даже о наличии некоторых форм балансирующего (balanced) или движущего (positive) отбора.

Тенденция к повышенному уровню индекса RVIS у генов фосфолипаз А2, вовлеченных в большее количество заболеваний, возможно, обусловлена тем, что при рассмотрении экспрессионных данных набор выявленных дифференциально экспрессирующихся генов был существенно зашумлен случайными генами. Появление таких случайных генов может быть связано как с особенностями методики (Hatfield et al., 2003), так и с тем, что любое возмущение в клетке и организме (например, заболевание) индуцирует неспецифические эффекты на экспрессию генов (например, активирует гены стрессового ответа, апоптоза, некроз и т.д.) (Leuner et al., 2007; Turkmen, 2017). Поэтому при оценке числа связей между фосфолипазами А2 и заболеваниями большое или малое количество связей необходимо интерпретировать с некоторой осторожностью.

Эволюция фосфолипаз А2

С помощью поиска по гомологии были идентифицированы последовательности фосфолипаз А2 для 32 видов организмов (см. Прил. 1), включая 13 позвоночных и 19 беспозвоночных (см. Материалы и методы). Их идентификаторы и последовательности приведены в выборке Прил. 5.

Для иллюстрации сходства функциональных районов PLA2 мы провели анализ гомологии между каталитическими доменами фосфолипаз А2 у человека. Сходство между доменами PLA2 разных типов выявлено только среди секреторных PLA2 (Прил. 6), а именно: между каталитическими доменами PLA2 типов G1, G2, G5, G10 есть сходство (E-value) от $2e-03$ до $2e-38$; между белками типа G12 (g12a и g12b) E-value = $4e-48$. Нет сходства (E-value ≥ 1) между PLA2 типа G3 (plag3) и всеми остальными белками sPLA2.

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) варьировало (E-value) от $4e-27$ до $1e-177$ (Прил. 7).

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 имеющий гомологии с каким-либо другим белком 6-го типа (Прил. 8). 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) (Прил. 9) и 3e–102 (тип G8) (Прил. 10). Для оставшихся двух типов сравнение не проводилось, так как они включают только по одному белку у человека.

Чтобы реконструировать филогению белков PLA2, мы предварительно провели анализ гомологии и множест-

венного выравнивания между белками различных типов PLA2. В результате определено, что белки, объединенные в группу «секретируемые sPLA2» (типы G1–3, G5, G10, G12), обладают высокой или умеренной гомологией (E-value ≤ 1) и качественно выравниваются между белками этих групп. Белки других типов PLA2 (G4, G6, G7, G8, G15, G16), напротив, обладают очень низкой гомологией (E-value > 1) и плохо выравниваются между группами и по отношению к белкам sPLA2. Исходя из этого мы реконструировали филогению sPLA2 методом максимального правдоподобия (рис. 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 приведет 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 потом 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 группой, поскольку включает в себя и кластер PLA2 типа G5. Все остальные группы sPLA2 являются монофилитическими.

Заключение

В нашей статье проведен анализ семейства фосфолипаз А2 человека. Мы описали структуру и функции 29 PLA2 человека, которые относятся к 12 типам: G1–8, G10, G12, G15, G16. Анализ локализации генов PLA2 в геноме человека показал, что гены фосфолипаз А2 локализованы на 12 хромосомах человека и некоторые из них образуют кластеры. Два самых крупных из них включают: первый – все гены PLA2 типа G2 (G2A, G2C–F) и ген G5, а второй – гены PLA2 типа G4 (G4B, G4D–F).

Мы также провели анализ связи между фосфолипазами А2 и заболеваниями человека по литературным данным. Было описано 229 связей «болезнь–ген» фосфолипазы А2, в результате чего выявлены связи 24 генов PLA2 со 119 заболеваниями. Оказалось, что белки фосфолипаз А2 типов G4, G2 и G7 были вовлечены в наибольшее число заболеваний по сравнению с другими типами PLA2. Тогда как с наибольшим числом типов PLA2 были связаны три группы заболеваний: новообразования, болезни системы кровообращения и болезни эндокринной системы.

При оценке толерантности/нетолерантности к мутациям генов PLA2 методом RVIS обнаружено, что большинство генов типов G4 (G4B, G4C, G4D, G4E, G4F),

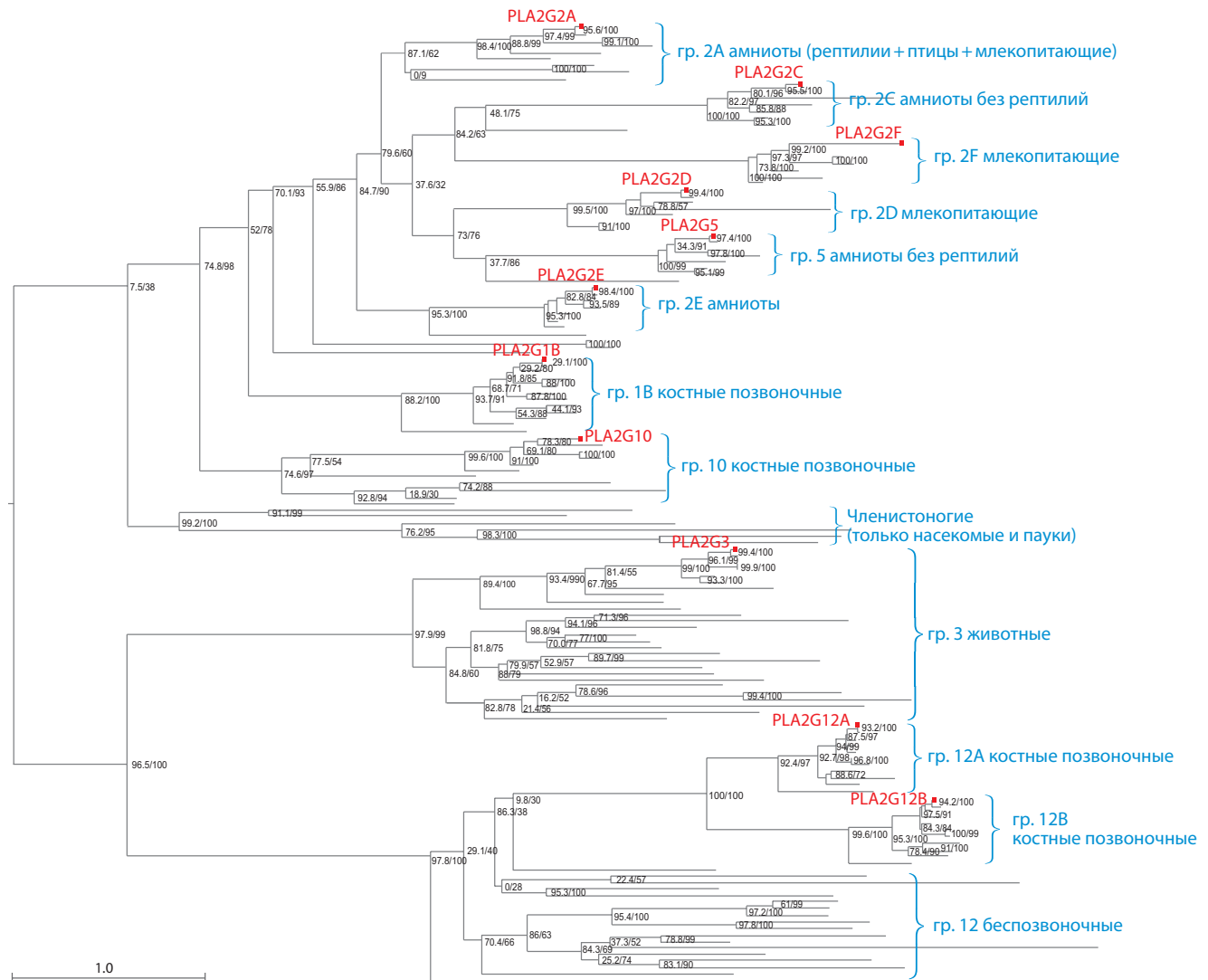


Рис. 7. Филогенетическое дерево фосфолипаз A₂: типы G1, G2, G3, G5, G10, G12.

Синим цветом даны названия типов (кластеров на дереве) фосфолипаз A₂ и описано, какие таксоны представлены в каждом кластере. Красным цветом 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. Текстовое описание филогенетического дерева см. в Прил. 11.

G2 (G4D, G4E, G4F), как и гены типов G3 и G7, представленными одним геном, толерантны к мутациям. Большинство генов типа G6 (G6A–C, G6F), как и типов G5 и G15, представленными одним геном, напротив, нетолерантны к мутациям. Здесь стоит особо отметить, что все типы PLA2 с преобладанием генов, толерантных к мутациям, за исключением G3, тоже связаны с наибольшим количеством заболеваний: G4 – 12 групп заболеваний, G2 – 13, G7 – 15. А все не толерантные к мутациям типы PLA2 ассоциированы с меньшим числом групп заболеваний: G6 – 9 групп заболеваний, G6 – 7, G6 – 1 группа. Это позволяет предполагать, что более высокая толерантность к мутациям определенного гена PLA2 у человека обусловлена вовлечением данного гена в большее количество заболеваний (групп заболеваний). Филогенетический анализ показал, что общее происхождение можно установить только для секреторных фосфолипаз A₂ (G1, G2, G3, G5, G10, G12). Остальные типы фосфолипаз A₂ (G4, G6, G7, G8, G15, G16) можно считать эволюционно независимыми.

Список литературы / References

- Филькин С.Ю., Липкин А.В., Федоров А.Н. Суперсемейство фосфолипаз: структура, функции и применение в биотехнологии. *Успехи биол. химии*. 2020;60:369-410.
- [Filkin S.Yu., Lipkin A.V., Fedorov A.N. Phospholipase superfamily: structure, functions, and biotechnological applications. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii = Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(Suppl.1): S177-S195. DOI 10.1134/S0006297920140096.]
- Aloulou A., Rahier R., Arhab Y., Noiriel A., Abousalham A. Phospholipases: an overview. *Methods Mol. Biol.* 2018;1835:69-105. DOI 10.1007/978-1-4939-8672-9_3.
- Burke J.E., Dennis D.A. Phospholipase A₂ biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2009;23(1):49-59. DOI 10.1007/s10557-008-6132-9.
- De Maria L., Vind J., Oxenbøll K.M., Svendsen A., Patkar S. Phospholipases and their industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;74(2):290-300. DOI 10.1007/s00253-006-0775-x.
- Dennis E.A., Cao J., Hsu Y.-H., Magriotti V., Kokotos G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 2011;111(10):6130-6185. DOI 10.1021/cr200085w.
- Giresha A.S. Secretory phospholipase A₂ group IIA: a potential therapeutic target in inflammation. In: Kumar D. (Ed.) Current Research

- and Trends in Medical Science and Technology. Lucknow (Uttar Pradesh, India): Department of Ortho KGMU, 2021;1:34-85.
- Guan M., Qu L., Tan W., Chen L., Wong C.-W. Hepatocyte nuclear factor-4 alpha regulates liver triglyceride metabolism in part through secreted phospholipase A₂ GXIIB. *Hepatology*. 2011;53(2):458-466. DOI 10.1002/hep.24066.
- Hatfield G.W., Hung S.-P., Baldi P. Differential analysis of DNA microarray gene expression data. *Mol. Microbiol.* 2003;47(4):871-877. DOI 10.1046/j.1365-2958.2003.03298.x.
- Hirsch J.A., Nicola G., McGinty G., Liu R.W., Barr R.M., Chittle M.D., Manchikanti L. ICD-10: history and context. *Am. J. Neuroradiol.* 2016;37(4):596-599. DOI 10.3174/ajnr.A4696.
- Huang D.W., Sherman B.T., Zheng X., Yang J., Imamichi T., Stephens R., Lempicki R.A. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2009;27:13.11.1-13.11.13. DOI 10.1002/0471250953.bi1311s27.
- Huang Q., Wu Y., Qin C., He W., Wei X. Phylogenetic and structural analysis of the phospholipase A₂ gene family in vertebrates. *Int. J. Mol. Med.* 2015;35(3):587-596. DOI 10.3892/ijmm.2014.2047.
- Karp P.D. An ontology for biological function based on molecular interactions. *Bioinformatics*. 2000;16(3):269-285. DOI 10.1093/bioinformatics/16.3.269.
- Katoh K., Toh H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*. 2010;26(15):1899-1900. DOI 10.1093/bioinformatics/btq224.
- Kudo I., Murakami M. Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:3-58. DOI 10.1016/s0090-6980(02)00020-5.
- Leuner K., Pantel J., Frey C., Schindowski K., Schulz K., Wegat T., Maurer K., Eckert A., Müller W.E. Enhanced apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphocytes as potential biomarkers for Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 2007;72:207-215. DOI 10.1007/978-3-211-73574-9_27.
- Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015;32(1):268-274. DOI 10.1093/molbev/msu300.
- Pei J., Grishin N.V. PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. *Bioinformatics*. 2007;23(7):802-808. DOI 10.1093/bioinformatics/btm017.
- Petrovski S., Wang Q., Heinzen E.L., Allen A.S., Goldstein D.B. Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003709. DOI 10.1371/journal.pgen.1003709.
- Shayman J.A., Tesmer J.J.G. Lysosomal phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2019;1864(6):932-940. DOI 10.1016/j.bbalip.2018.07.012.
- Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2009;49:123-150. DOI 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145616.
- Takahashi H., Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* 2005;109(3):227-241. DOI 10.1042/CS20040370.
- Turkmen K. Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse. *Int. Urol. Nephrol.* 2017;49(5):837-844. DOI 10.1007/s11255-016-1488-4.

ORCID ID

I.I. Turnaev orcid.org/0000-0002-0448-1468
D.A. Afonnikov orcid.org/0000-0001-9738-1409

Благодарности. 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.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.09.2022. После доработки 24.11.2022. Принята к публикации 25.11.2022.