



DOI: <https://doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2020.1.1>

UDC 575.89

LBC 28.02

PHILOGENETIC ANALYSIS OF ADAMTS-4 AND ADAMTS-5 STRUCTURES

Anastasia A. Korchagina

Volgograd State University, Volgograd, Russian Federation

Pavel A. Krylov

Volgograd State University, Volgograd, Russian Federation

Abstract. ADAMTS-4 and -5 are aggrecanases that are involved in the development of osteoarthritis by breaking aggrecan at various binding sites, of which cleavage in the Glu373-Ala374 bond plays the most important role in pathogenesis. Therefore, studying them is an urgent task to this day. Now, the structural features of these enzymes have already been studied, however, the influence of evolutionary development on their functions and enzymatic activity is not quite clear. In the framework of this research *in silico* studies have been conducted. They consist in the construction of phylogenetic trees by the maximum likelihood method in MEGA X program, the establishment of changes in the structures that occurred during evolution, and their possible effect on enzymatic activity. In addition, the organism most suitable for experimental studies has been determined. In this research, to analyze evolutionary changes, we have studied the sequences of organisms from different families: Salmon, Guinea fowl, Frog, Python, Rabbit, Leopard, Gorilla, Man. The lengths of these sequences are approximately equal; when aligning, the structures do not differ much. When studying the trees constructed from these sequences, it has been found that their structure is quite different only at the beginning, in the area of the signal surface and prodomain, while the rest of the changes are insignificant. The authors have also carried out the analysis of phylogenetic trees to determine an organism that is most like the human structure and therefore most suitable for *in vivo* studies. The following structures have been investigated: Bull, Camel, Pig, Donkey, Rabbit, Rat, Mouse, and Man. The rabbit has the most similar structure and therefore is more suitable for experimental studies.

Key words: ADAMTS-4, ADAMTS-5, phylogenetic trees, structure, domains, osteoarthritis.

Citation. Korchagina A.A., Krylov P.A. Philogenetic Analysis of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 Structures. *Natural Systems and Resources*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 5-11. (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2020.1.1>

УДК 575.89

ББК 28.02

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУР ADAMTS-4 И ADAMTS-5

Анастасия Александровна Корчагина

Волгоградский государственный университет, г. Волгоград, Российская Федерация

Павел Андреевич Крылов

Волгоградский государственный университет, г. Волгоград, Российская Федерация

Аннотация. ADAMTS-4 и -5 являются агреканизаторами, которые участвуют в развитии остеоартроза путем разрушения агрекана в различных сайтах связывания, из которых наиболее важную роль в патогенезе играет расщепление в связи Glu373-Ala374. Поэтому их изучение является актуальной задачей и по сей день. В настоящий момент уже изучены структурные особенности данных ферментов, однако не достаточно понятно влияние эволюционного развития на их функции и ферментативную активность. В данной работе были проведены исследования *in silico*. Они заключаются в построении филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия в программе MEGA X, установлении изменений в структурах, произошедших в процессе эволюции, и их возможное влияние на ферментативную активность. Помимо этого, был определен организм, наиболее подходящий для экспериментальных исследований. В ходе данного исследования для анализа эволюционных изменений были изучены последовательности организмов из различных семей: Лосось, Цесарка, Лягушка, Питон, Кролик, Леопард, Горилла, Человек. Длины данных последовательностей приблизительно равны, при выравнивании структуры не сильно отличаются. При исследовании построенных по данным последовательностям деревьев было обнаружено, что их структура сильно отличается только в начале, в районе сигнальной поверхности и продомена, в остальной же части изменения незначительны. Также был проведен анализ филогенетических деревьев для определения организма, обладающего наиболее схожей с человеческой структурой и следовательно наиболее подходящего для исследований *in vivo*. Были исследованы структуры: Бык, Верблюд, Свинья, Осел, Кролик, Крыса, Мышь, а также Человек. Наиболее схожей структурой обладает кролик и следовательно он является более подходящим для экспериментальных исследований.

Ключевые слова: ADAMTS-4, ADAMTS-5, филогенетические деревья, структура, домены, остеоартроз.

Цитирование. Корчагина А. А., Крылов П. А. Филогенетический анализ структур ADAMTS-4 и ADAMTS-5 // Природные системы и ресурсы. – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 5–11. – DOI: <https://doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2020.1.1>

Введение. ADAMTS-4 и -5 являются внеклеточными протеолитическими ферментами-агреканизаторами, которые действуют на агреканизаторы, разрушая их и тем самым давая начало развитию остеоартроза. Структурные особенности и ферментативная активность данных ферментов на данный момент достаточно хорошо изучена [7; 10]. Известно, что ADAMTS-4 содержит 7 доменных участков: сигнальная область, продомен, каталитический домен, дезинтегринподобный домен, мотив тромбосподина, богатый цистеином домен и спейсерный участок [3; 4]. ADAMTS-5 содержит все те же домены, плюс у него есть еще один дополнительный мотив тромбосподина в конце [2; 11]. Однако изменения структур в ходе эволюции в настоящее время остается нерешенным вопросом. Изучение в данном направлении позволит определить зависимость структурных изменений и их функциональных и ферментативных характеристик в процессе эволюционного развития.

Для изучения данных агреканизаторов проводятся исследования *in vivo* на различных организмах. В частности на мышах, кроликах и крысах. Однако их структуры отличаются от человеческих. В работе Н.Д. Kosasih и соавторов были описаны исследования по ингиби-

рованию ADAMTS-4 и -5, которые проводились на мышах. Оказалось, что они более подвержены к действиям ADAMTS-4, а ингибирование последнего приводило практически к полной остановке разрушения агрекана, не смотря на то, что фермент ADAMTS-5 продолжал работать [1]. У человека же в большей степени играет роль либо ADAMTS-5, либо оба эти фермента [1; 6; 8]. В таком случае, проводить эксперименты на мышах является не таким уж эффективным способом изучения данных ферментов и перенос результатов на человеческую модель может оказаться не достоверным. Цель исследования – провести филогенетический анализ ADAMTS-4 и -5 у различных организмов и выявить структурно-функциональные различия.

Материал и методы. Для построения эволюционных деревьев была использованная программа MEGA X (Pennsylvania State University, USA). Для определения эволюционных различий в структуре были взяты последовательности разных семейств, критерием отбора была относительно равная длина последовательностей и схожесть структур. Исходные данные для построения филогенетических деревьев были представлены в фор-

мате .fasta из открытой базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA). Для подбора последовательностей было проведено множественное выравнивание с помощью программного пакета ClustlO (University College Dublin, Irish). Организмы подбирались из разных семейств таким образом, чтобы можно было проследить изменение структур в ходе эволюций. Изначально были выбраны организмы из ряда семейств: Насекомые, Рыбы, Амфибии, Пресмыкающиеся, Птицы и Млекопитающие.

При проведении множественного выравнивания было определено, что структуры насекомых сильно отличаются и поэтому было принято решение не использовать последовательности организмов данного семейства. В итоге были выбраны данные структуры: Лосось (*Salmosalar*), Цесарка (*Numidameleagris*), Лягушка (*Xenopus tropicalis*), Питон (*Pythonbivittatus*), Кролик (*Oryctolagus cuniculus*), Леопард (*Acinonyx-jubatus*), Горилла (*Gorillagorilla*), Человек (*Homosapiens*).

Филогенетические деревья белков ADAMTS-4 и -5 были созданы методом максимального правдоподобия на основе матричной модели JTT. Начальное дерево консенсуса, выведенное из 1 000 повторностей, было взято для представления эволюционной истории анализируемых таксонов. Эволюционный анализ был проведен в программе MEGA X. Начальное дерево для эвристического поиска было получено автоматически путем при-

менения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененных с использованием модели JTT, и затем выбора топологии с более высоким значением логарифмической вероятности. Дерево построено в масштабе с длиной ветвей, измеренной числом замен на сайт.

Для определения наиболее подходящего для проведения экспериментов организма были выбраны животные с наименьшими изменениями в последовательности и возможностью использования для экспериментов. Построение деревьев по данным последовательностям также происходило по методу максимального правдоподобия. Для проверки были выбраны данные организмы: Бык (*Bostaurus*), Верблюд (*Camelusferus*), Свинья (*Susscrofa*), Осел (*Equuscaballus*), Кролик (*Oryctolagus cuniculus*), Крыса (*Rattusnorvegicus*), Мышь (*Musmusculus*), а также Человек (*Homosapiens*). Параллельно с построением филогенетических деревьев проводилось множественное в программе ClustlO (University College Dublin, Irish) выравнивание последовательностей, для обнаружения связей между структурными элементами и эволюционными изменениями.

Результаты и обсуждение. Ниже представлено эволюционное дерево по ADAMTS-4 (рис. 1). Наиболее близкими к человеческой как по структуре, так и эволюционно, являются белки гориллы и кролика (черные круги). Леопард является менее схожим по структуре белком

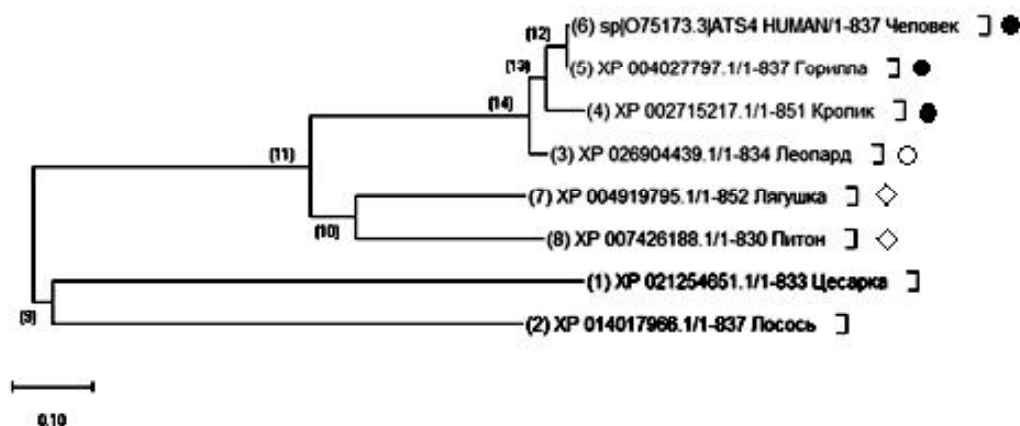


Рис. 1. Эволюционное дерево ADAMTS-4:

черный круг – организмы с наибольшим сходством; белый круг – сходство меньше по отношению к человеку; ромб – значительные отличия по отношению к человеку

(белый круг). У лягушки и питона есть заметные отличия (белый ромб). Структуры цесарки и лосося сильно разнятся с человеческой.

При проведении множественного выравнивания было также заметно, что наибольшая разница в структурах различных последовательностей находится в самом начале в районе сигнальной области и продомена [5; 9]. Если не брать во внимание большие отличия в структурах лосося и цесарки в сравнении с остальными, то срединные участки, так же, как и концевые в ходе эволюции не сильно изменились. Это означает, что наиболее важные для работы данного фермента доменные участки, следующие за продоменом, сохранились почти не тронутыми. Продомен необходим для перехода фермента в активное состояние и именно его структура отличается во всех последовательностях [12].

Далее исследуем ADAMTS-5. Ниже представлены результаты по построению филогенетических деревьев (рис. 2).

Результаты данного филогенетического древа являются схожими с результатами ADAMTS-4. Наиболее близкие горилла и кролик (черные круги) и наименее схожие по структуре и самые далекие эволюционно это лосось и цесарка.

Изучение структур после множественного выравнивания так же показало различие в самом начале в районе сигнальной области и продомена. Структуры, идущие за ними, имеют незначительные отличия.

Филогенетические деревья, построенные по последовательностям возможных экспериментальных животных (см. рис. 3, 4). По данным деревьям видно, что ближайшими к человеку организмами являются кролик, крыса и мышь – три самых распространенных экспериментальных животных. По наиболее схожим структурным характеристикам и ближайшему расположению на филогенетическом древе можно понять, что наиболее подходящим организмом будет являться кролик. Однако во многих исследованиях ADAMTS-4 и -5 основными подопытными были мыши.

Как уже говорилось ранее, ферментативная активность ADAMTS-4 и -5 различается у организмов. У мышей ADAMTS-4 в большей степени участвует в развитии остеоартоза. По результатам филогенетического анализа это может быть связано с продоменом, а точнее с пропротеин-конвертазой, которая активирует фермент, связываясь с участком продомена. У мышей возможно больше пропротеин-конвертаз, которые распознают и активируют именно ADAMTS-4, у человека возможно наоборот, или же у него пропротеин-конвертазы в одинаковой степени распознают обе формы ADAMTS [4]. В таком случае в будущем имеет смысл провести исследования в области активации ADAMTS-4 и -5 для подтверждения или опровержения данной теории. Полученные результаты характерны для обоих видов агреканиз.

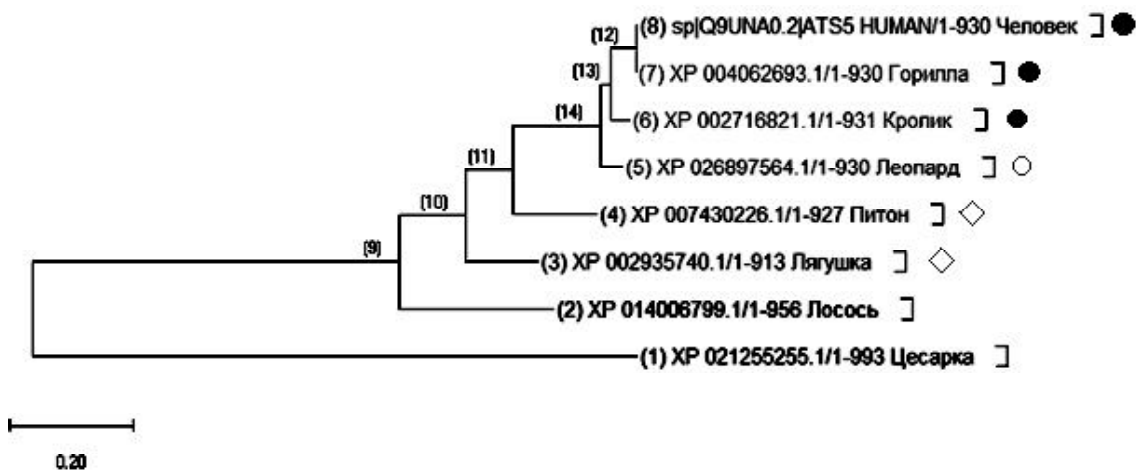


Рис. 2. Эволюционное древо ADAMTS-5:

черный круг – организмы с наибольшим сходством; белый круг – сходство меньше по отношению к человеку; ромб – значительные отличия по отношению к человеку

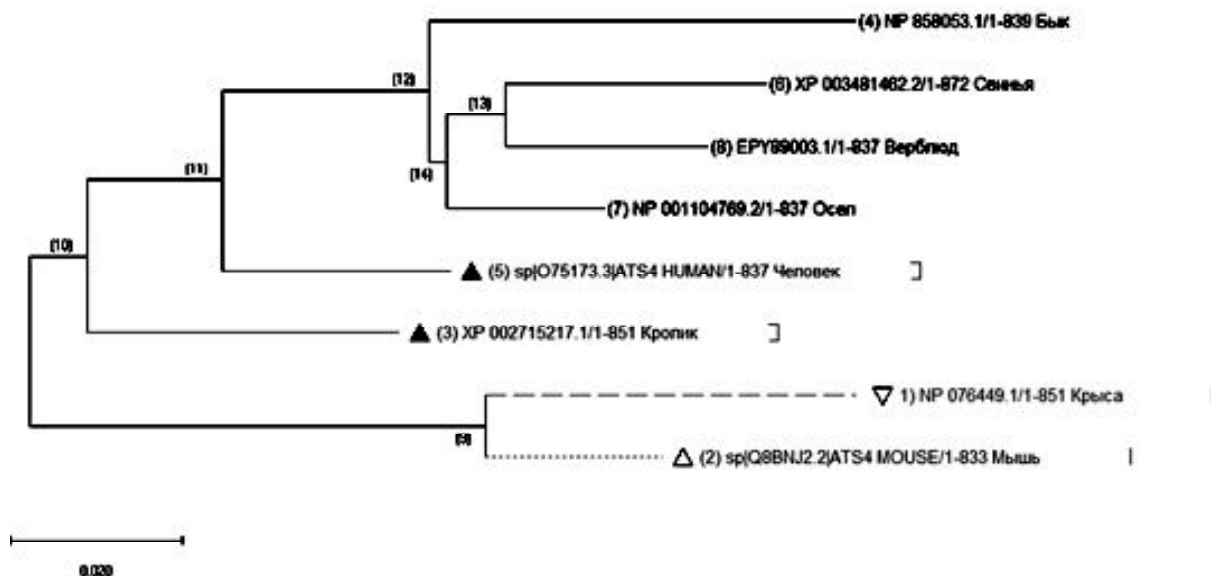


Рис. 3. Филогенетическое дерево ADAMTS-4:

черный треугольник – организмы с наибольшим сходством;
 белый треугольник с вершиной вверх – второй по сходству к последовательности человеческого белка;
 белый треугольник с вершиной вниз – третий по сходству к последовательности человеческого белка

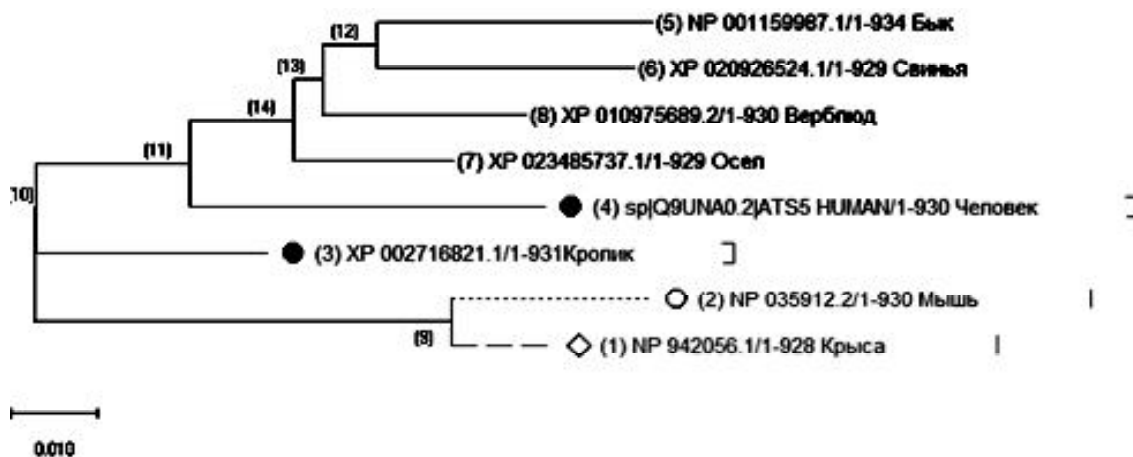


Рис. 4. Филогенетическое дерево ADAMTS-5:

черные кружки – организмы с наибольшим сходством;
 белый ромб – второй по сходству к последовательности человеческого белка;
 белый круг – третий по сходству к последовательности человеческого белка

Заключение. В данном исследовании было обнаружено, что наиболее подходящим опытным организмом является кролик, а не мыши, которые более часто используются в экспериментах. Также стало понятно, что структурные различия, образовавшиеся в ходе эволюции, небольшие и находятся преимущественно в самом начале последовательностей в районе сигнальной области и продомена. На этом основании можно пред-

полагать, что пропротеин-конвертазы, активирующая в разной степени ADAMTS-4 и -5, также играют роль в развитии остеоартроза у человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs-5 (ADAMTS-5) Forms Catalytically Active Oligomers / H. J. Kosasih [et al.]

// J Biol Chem. – 2016. – Vol. 291, № 7. – P. 3197–3208. – DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704817>.

2. ADAMTS4 Cleaves at the Aggrecanase Site (Glu373-Ala374) and Secondarily at the Matrix Metalloproteinase Site (Asn341-Phe342) in the Aggrecan Interglobular domain / J. Westling [et al.] // J Biol Chem. – 2002. – Vol. 277, № 18. – P. 16059–16066. – DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M108607200>.

3. Aggrecanolytic in Human Osteoarthritis: Confocal localization and Biochemical Characterization of ADAMTS5-hyaluronan Complexes in Articular Cartilages / A. Plaas [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 2007. – Vol. 15, № 7. – P. 719–734. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.12.008>.

4. Autocatalytic Cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) Reveals Multiple Glycosaminoglycan-binding Sites. / C.R. Flannery [et al.] // J Biol Chem. – 2002. – Vol. 277, № 45. – P. 42775–42780. – DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M205309200>.

5. Gomis-Rüth, F. X. Catalytic Domain Architecture of Metzincin Metalloproteases / F. X. Gomis-Rüth // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284, № 23. – P. 15353–15357. – DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.R800069200>.

6. Relative Messenger RNA Expression Profiling of Collagenases and Aggrecanases in Human Articular Chondrocytes in vivo and in vitro / B. Bau [et al.] // Arthritis Rheum. – 2002. – Vol. 46, № 10. – P. 2648–2657. – DOI: <https://doi.org/10.1002/art.10531>.

7. Roughley, P. J. The Role of Aggrecan in Normal and Osteoarthritic Cartilage. / P. J. Roughley, J. S. Mort // Journal of Experimental Orthopaedics. – 2014. – Vol. 1, № 8. – P. 1–11. – DOI: <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs40634-014-0008-7>.

8. Structural and Inhibition Analysis Reveals the Mechanism of Selectivity of a Series of Aggrecanase Inhibitors / M. D. Tortorella [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284, № 36. – P. 24185–24191. – DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.029116>.

9. Tang, B.L. ADAMTS: a Novel Family of Extracellular Matrix Proteases. / B.L. Tang // Int J Biochem Cell Biol. – 2019. – Vol. 33, № 1. – P. 33–44. – DOI: [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(00\)00061-3](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(00)00061-3).

10. The ADAMTS metalloproteinases. / S. Porter [et al.] // Biochem J. – 2005. – Vol. 386, № 1. – P. 15–27. – DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20040424>.

11. The Role of ADAM-TS4 (Aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (Aggrecanase-2) in a Model of Cartilage Degradation. / M.D. Tortorella [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 2001. – Vol. 9, № 6. – P. 539–552. – DOI: <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0427>.

12. Transgenic Mice with Inactive Alleles for Procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) Develop Fragile Skin and Male Sterility. / S.W. Li [et al.] // Biochem J. – 2001. – Vol. 355. – P. 271–278. – DOI: <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3550271>.

REFERENCES

1. Kosasih H.J., Last K., Rogerson F.M. et al. A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs-5 (ADAMTS-5) Forms Catalytically Active Oligomers. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, vol. 291, no. 7, pp. 3197–3208. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704817>.

2. Westling J., Fosang A.J., Last K. et al. ADAMTS4 Cleaves at the Aggrecanase Site (Glu373-Ala374) and Secondarily at the Matrix Metalloproteinase Site (Asn341-Phe342) in the Aggrecan Interglobular Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 18, pp. 16059–16066. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M108607200>.

3. Plaas A., Osborn B., Yoshihara Y. et al. Aggrecanolytic in Human Osteoarthritis: Confocal Localization and Biochemical Characterization of ADAMTS5-Hyaluronan Complexes in Articular Cartilages. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, vol. 15, no. 7, pp. 719–734. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.12.008>.

4. Flannery C.R., Zeng W., Corcoran C. et al. Autocatalytic Cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) Reveals Multiple Glycosaminoglycan-binding Sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 45, pp. 42775–42780. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M205309200>.

5. Gomis-Rüth F.X. Catalytic Domain Architecture of Metzincin Metalloproteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, vol. 284, no. 23, pp. 15353–15357. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.R800069200>.

6. Bau B., Gebhard P.M., Haag J. et al. Relative Messenger RNA Expression Profiling of Collagenases and Aggrecanases in Human Articular Chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum*, 2002, vol. 46, no. 10, pp. 2648–2657. DOI: <https://doi.org/10.1002/art.10531>.

7. Roughley P.J., Mort J.S. The Role of Aggrecan in Normal and Osteoarthritic Cartilage. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 2014, vol. 1, no. 8, pp. 1–11. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs40634-014-0008-7>.

8. Tortorella M.D., Tomasselli A.G., Mathis K.J. et al. Structural and Inhibition Analysis Reveals the Mechanism of Selectivity of a Series of Aggrecanase Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, vol. 284, no. 36, pp. 24185–24191. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.029116>.

9. Tang B.L. ADAMTS: A Novel Family of Extracellular Matrix Proteases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2019, vol. 33, no. 1, pp. 33–44. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(00\)00061-3](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(00)00061-3).

10. Porter S., Clark I.M., Kevorkian L. et al. The ADAMTS Metalloproteinases. *Biochem J*, 2005, vol. 386, no. 1, pp. 15-27. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20040424>.

11. Tortorella M.D., Malfait A.M., Deccico C. et al. The Role of ADAM-TS4 (Aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (Aggrecanase-2) in a Model of Cartilage Degradation.

Osteoarthritis Cartilage, 2001, vol. 9, no. 6, pp. 539-552. DOI: <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0427>.

12. Li S.W., Arita M., Fertala A. et al. Transgenic Mice with Inactive Alleles for Procollagen N-Proteinase (ADAMTS-2) Develop Fragile Skin and Male Sterility. *Biochem J*, 2001, vol. 355, pp. 271-278. DOI: <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3550271>.

Information About the Authors

Anastasia. A. Korchagina, Student, Department of Bioengineering and Bioinformatics, Volgograd State University, Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation, nastya.korchagina09@gmail.com.

Pavel A. Krylov, Candidate of Sciences (Biology), Associate Professor, Department of Bioengineering and Bioinformatics, Volgograd State University, Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation, krylov.pavel@volsu.ru.

Информация об авторах

Анастасия Александровна Корчагина, студент кафедры биоинженерии и биоинформатики, Волгоградский государственный университет, просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация, nastya.korchagina09@gmail.com.

Павел Андреевич Крылов, кандидат биологических наук, доцент кафедры биоинженерии и биоинформатики, Волгоградский государственный университет, просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация, krylov.pavel@volsu.ru.