

## **Эволюционные расстояния и скорости эволюции креатинкиназ хордовых животных**

*Белорусский государственный медицинский университет*

Изучены аминокислотные последовательности М- и В-изоферментов креатинкиназ (СК) хордовых животных. Определены эволюционные дистанции и скорости эволюции креатинкиназ в филогенетическом ряду. Показано, что эволюция изоферментов СК позвоночных животных происходила с приблизительно постоянной скоростью, равной 0,17-0,18 По, а их эволюционными предшественниками являются СК циюны и ланцетника. Установлено, что образование цитоплазматических изоферментов произошло примерно 532,3 млн. лет назад.

**Ключевые слова:** креатинкиназа, изоферменты, время дивергенции, молекулярная эволюция

V.E. Butvilovsky, V.V. Davydov, A.V. Butvilovsky, V.I. Semak, V.F. Muraveyko  
Evolutional Distance and evolution rate of creatinekinase of the chordates  
Aminoacide sequences M- and B- isoenzymes of creatinekinase (CK) of the chordates were studied. Evolutional distance and evolution's rate of CK in the filogenetic row were determined. It was showed that evolution-isoenzymes of CK of vertebrates animal were happend with approximately constant rate, equal to 0,17-0,18 Po. CK Ciona intestinalis and Branchiostoma floridae are evolutional predecessors of the M- and B-isoenzymes CK. This cytoplasmik isoenzymes of CK arose approximately 532,3 mil. years ago.

Key words: creatinekinase, isoenzymes, divergence time, molecular evolution

Креатинкиназа (ЕС 2.7.3.2) - фермент, играющий важную роль в энергетическом обмене хордовых животных. Креатинкиназа катализирует обратимый перенос остатка фосфорной кислоты с АТФ на креатин, что приводит к образованию креатинфосфата и АДФ.

АТФ + креатин ?? АДФ + креатинфосфат

Существуют, по крайней мере, четыре различных, хотя и сходных изофермента креатинкиназы. Два из них являются цитоплазматическими, а два других – митохондриальными. К цитоплазматическим изоферментам относятся мышечный изофермент (М (muscle)-изофермент) и мозговой изофермент (В (brain)-изофермент). Креатинкиназа является димером, состоящим из двух одинаковых или различных изоферментов. ММ-димер преимущественно локализуется в миокарде и скелетных мышцах, МВ-димер – в миокарде, ВВ-димер – во многих тканях, особенно в головном мозге [10]. В свою очередь, каждый изофермент креатинкиназ состоит из двух структурно-функциональных участков (доменов): N-терминального и каталитического.

Цель исследования: установить степень филогенетического родства креатинкиназ различных систематических групп хордовых животных по их аминокислотным последовательностям, оценить эволюционные расстояния между ними и скорость их эволюции.

## Материалы и методы

Проанализированы аминокислотные последовательности креатинкиназ различных хордовых: оболочника (*Ciona intestinalis* – C.i., [6]), ланцетника (*Branchiostoma floridae* – B.f. [6]), М-изофермента рыб (*Ictalurus punctatus* – I.p. [7]), М-изофермента пресмыкающихся (*Zoocys dhumnades* – Z.d. [19]), М и В изоферментов птиц (*Gallus gallus* – G.g. [11, 18]), М и В изоферментов грызунов (*Rattus norvegicus* – R.n. [3, 4], *Mus musculus* – M.m. [14, 15]), М и В изоферментов зайцеобразных (*Oryctolagus cuniculus* – O.c. [12]), М-изофермента парнокопытных (*Bos taurus* – B.t., NCBI:AAD30974.1), М и В изоферментов хищных (*Canis familiaris* – C.f. [13]) и М и В изоферментов приматов (*Homo sapiens* – H.s. [9, 17]). Аминокислотные последовательности изоформ креатинкиназ оболочника и ланцетника не выявлены.

Эволюционная дистанция (среднее число аминокислотных замен, приходящихся на пару гомологичных сайтов двух сравниваемых белков (Kaa)), рассчитывалась по формуле М. Кимуры [1]:  $K_{aa} = -\ln(1 - Pd - 1/5Pd^2)$ , где  $Pd = daa/naa$  – доля различных аминокислотных сайтов, по которым сравниваются две гомологичные белковые последовательности,  $daa$  – число отличающихся друг от друга сайтов,  $naa$  – число аминокислотных сайтов, по которым сравниваются две последовательности. При подсчете числа различий участки, не имеющие соответствия с одной из сопоставляемых последовательностей (“пробелы”) и возникшие в результате вставок и делеций, не рассматривались.

Стандартную ошибку Kaa рассчитывали по формуле:

$$\sigma_{K_{aa}} = \sqrt{\frac{Pd}{(1 - Pd) \cdot n_{aa}}}$$

Скорость эволюционных замен аминокислот (kaa) на сайт в год вычисляли по формуле:  $kaa = K_{aa}/2T$ , где T – число лет, прошедших после эволюционной дивергенции двух цепей от общей для них предковой цепи: множитель 2 в знаменателе соответствует двум ветвям подразумеваемого филогенетического дерева [1].

### Результаты и обсуждение

Аминокислотные последовательности В- и М-изоферментов креатинкиназ хордовых были проанализированы и выровнены с помощью программы Clustal W [16] (рис. 1, 2).

	190	200	210	220	230	240	250
H. s.	EAEQQQLIDDHFLFDK PVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKT FLVWVNEEDHLRVI SM						
C. f.	EAEQQQLIDDHFLFDK PVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKT FLVWVNEEDHLRVI SM						
O. c.	EAEQQQLIDDHFLFDK PVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKT FLVWVNEEDHLRVI SM						
M. n.	EAEQQQLIDDHFLFDK PVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKT FLVWVNEEDHLRVI SM						
R. n.	EAEQQQLIDDHFLFDK PVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKT FLVWVNEEDHLRVI SM						
G. g.	DAEQQQLIDDHFLFDK PVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKT FLVWVNEEDHLRVI SM						
B. f.	DAEQQLIADHFLFDK PVS PLLTCAGMARDW PDARGIWHNNEKS FLIWINNEEDHLRVI SM						
C. i.	EEHQDQLINDHFLFDK PVS PLLLASNMARDW PDARGIWHNDKKNFLVWVNEEDHLRVI SM						
	: . : : *** ***** . : . ***** : * . ** : * : *****						

Рис. 1. Выровненные аминокислотные последовательности участков каталитических доменов В-изоферментов креатинкиназ позвоночных и соответствующих участков креатинкиназ ланцетника и оболочника.

Примечание. Нумерация аминокислотных остатков произведена по креатинкиназе человека. Знаком \* отмечены инвариантные аминокислоты.

	190	200	210	220	230	240	250
H.s.	EKEQQQLIDDHFLFDK FVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLRVI SM						
C.f.	EQEQQQLIDDHFLFDK FVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKTFLVWVNEEDHLRVI SM						
B.t.	EQEQQQLIDDHFLFDK FVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLRVI SM						
O.c.	EQEQQQLIDDHFLFDK FVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLRVI SM						
M.m.	EQEQQQLIDDHFLFDK FVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLRVI SM						
R.n.	EQEQQQLIDDHFLFDK FVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLRVI SM						
G.g.	EQEQQQLIDDHFLFDK FVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKTFLVWVNEEDHLRVI SM						
Z.d.	DAEQQQQLIDDHFLFDK FVS PLLLASGMARDW PDARGIWHNDNKTFLVWVNEEDHLRVI SM						
I.p.	DAEQEQQLIADHFLFDK FVS PLLLAAGMARDW PDARGIWHNDEKTFVWVNEEDHLRVI SM						
B.f.	DAEQEQQLIADHFLFDK FVS PLLTCAGMARDW PDARGIWHNNEKSFVWVNEEDHLRVI SM						
C.i.	EEHQDQLINDHFLFDK FVS PLLLASNMARDW PDARGIWHNDKKNFLVWVNEEDHLRVI SM						
	: .*:*** *****:**** .:*****:*. **:*:*****						

Рис. 2. Выровненные аминокислотные последовательности участков каталитических доменов М-изоферментов креатинкиназ позвоночных и соответствующих участков креатинкиназ ланцетника и оболочника.

Примечание. Нумерация аминокислотных остатков произведена по креатинкиназе человека.

В табл. 1 и 2 показаны эволюционные дистанции для аминокислотных последовательностей В- и М-изоферментов креатинкиназ хордовых животных.

Таблица 1

Эволюционные дистанции и их стандартная ошибка для аминокислотных последовательностей В-изофермента креатинкиназ позвоночных и креатинкиназ ланцетника и оболочника

	H.s.	C.f.	O.c.	M.m.	R.n.	G.g.	B.f.	C.i.
H.s.		0,0081	0,0094	0,0098	0,0106	0,0169	0,0351	0,0336
C.f.	<b>0,0245</b>		0,0081	0,0094	0,0102	0,0171	0,0345	0,0345
O.c.	<b>0,0328</b>	<b>0,0245</b>		0,0113	0,0120	0,0176	0,0349	0,0342
M.m.	<b>0,0357</b>	<b>0,0328</b>	<b>0,0470</b>		0,0054	0,0181	0,0355	0,0342
R.n.	<b>0,0413</b>	<b>0,0384</b>	<b>0,0527</b>	<b>0,0108</b>		0,0184	0,0358	0,0345
G.g.	<b>0,1033</b>	<b>0,1063</b>	<b>0,1126</b>	<b>0,1188</b>	<b>0,1220</b>		0,0338	0,3332
B.f.	<b>0,4086</b>	<b>0,3951</b>	<b>0,4040</b>	<b>0,4178</b>	<b>0,4223</b>	<b>0,3819</b>		0,0364
C.i.	<b>0,3775</b>	<b>0,3951</b>	<b>0,3906</b>	<b>0,3906</b>	<b>0,3951</b>	<b>0,3687</b>	<b>0,4363</b>	

Примечание. Жирным шрифтом выделены эволюционные дистанции.

Таблица 2

Эволюционные дистанции и их стандартная ошибка для аминокислотных последовательностей М-изофермента креатинкиназ позвоночных и креатинкиназ ланцетника и оболочника

	H.s.	C.f.	B.t.	O.c.	M.m.	R.n.	G.g.	Z.d.	I.p.	B.f.	C.i.
H.s.		0,0102	0,0102	0,0098	0,0098	0,0106	0,0166	0,0181	0,0198	0,0323	0,0336
C.f.	0,0384		0,0098	0,0094	0,0094	0,0102	0,0161	0,0161	0,0194	0,0323	0,0336
B.t.	0,0384	0,0357		0,0090	0,0106	0,0102	0,0158	0,0174	0,0201	0,0323	0,0332
O.c.	0,0357	0,0328	0,0300		0,0076	0,0066	0,0155	0,0169	0,0206	0,0327	0,0336
M.m.	0,0357	0,0328	0,0413	0,0217		0,0038	0,0155	0,0174	0,0198	0,0325	0,0334
R.n.	0,0413	0,0384	0,0384	0,0162	0,0053		0,0158	0,0174	0,0201	0,0327	0,0336
G.g.	0,1002	0,0940	0,0911	0,0880	0,0880	0,0911		0,0196	0,0203	0,0334	0,0345
Z.d.	0,1188	0,0940	0,1094	0,1033	0,1094	0,1094	0,1380		0,0215	0,0338	0,0358
I.p.	0,1411	0,1347	0,1444	0,1510	0,1411	0,1444	0,1477	0,1642		0,0321	0,0330
B.f.	0,3516	0,3516	0,3516	0,3602	0,3559	0,3602	0,3775	0,3819	0,3475		0,0364
C.i.	0,3775	0,3775	0,3687	0,3775	0,3731	0,3775	0,3951	0,4223	0,3645	0,4363	

Примечание. Жирным шрифтом выделены эволюционные дистанции.

Для получения средних значений  $K_{aa}$  для каждого из организмов учитывались только эволюционные расстояния, полученные при сравнении аминокислотной последовательности кретинкиназы этого организма с последовательностями кретинкиназ таксономически вышестоящих организмов. Так, при расчете средней  $K_{aa}$  для оболочника мы учитывали эволюционные расстояния, полученные при сравнении аминокислотной последовательности его кретинкиназы с последовательностями кретинкиназ ланцетника, птиц, грызунов, зайцеобразных, хищных и приматов. Средние эволюционные дистанции для В- и М-изоферментов кретинкиназ представлены в табл. 3.

Таблица 3

Средние эволюционные дистанции и их стандартная ошибка для аминокислотных последовательностей В- и М-изоферментов кретинкиназ хордовых животных

	$K_{aa} \pm \sigma_{K_{aa}}$	
	В-изофермент	М-изофермент
<i>Canis familiaris</i>	0,0245±0,0081	0,0384±0,0102
<i>Bos taurus</i>	последовательность не выделена	0,0371±0,0019
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0,0287±0,0059	0,0328±0,0020
<i>Mus musculus</i>	0,0385±0,0053	0,0329±0,0048
<i>Rattus norvegicus</i>	0,0441±0,0053	0,0336±0,0067
<i>Gallus gallus</i>	0,1126±0,0040	0,0921±0,0020
<i>Zaocys dhumnades</i>	последовательность не выделена	0,1118±0,0056
<i>Ictalurus punctatus</i>	последовательность не выделена	0,1461±0,0033
<i>Branchiostoma floridae</i>	0,4050±0,0067	0,3598±0,0043
<i>Ciona intestinalis</i>	0,3934±0,0087	0,3870±0,0080

Однако гораздо интереснее сопоставить средние значения эволюционных расстояний с предполагаемыми временами дивергенции различных организмов (рис. 3, 4).

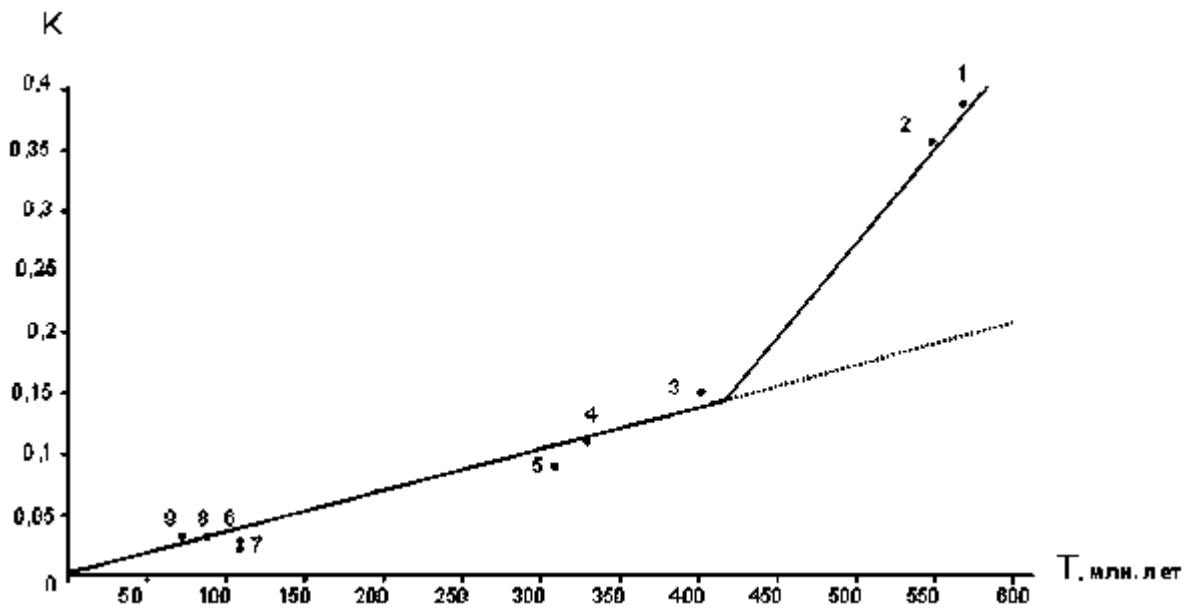


Рис. 3. Зависимость между значениями эволюционных дистанций и временем дивергенции М-изофермента креатинкиназ хордовых животных

Так, точка под номером 1 соответствует среднему значению Каа для оболочника и предполагаемому времени дивергенции (500-600 млн. лет). Точка под номером 2 – это средняя Каа для ланцетника (время дивергенции - 550 млн. лет [2]), точка под номером 3 – средняя Каа для рыбы (405 млн. лет), точка 4 - средняя Каа для пресмыкающихся (330 млн. лет), точка 5 – средняя Каа для птиц (310 млн. лет), точка 6 – средняя Каа для грызунов (110 млн. лет), точка 7 – средняя Каа для зайцеобразных (110 млн. лет), точка 8 – средняя Каа для парнокопытных (90 млн. лет) и, наконец, точка 9 – средняя Каа для хищных (74 млн. лет) [5].

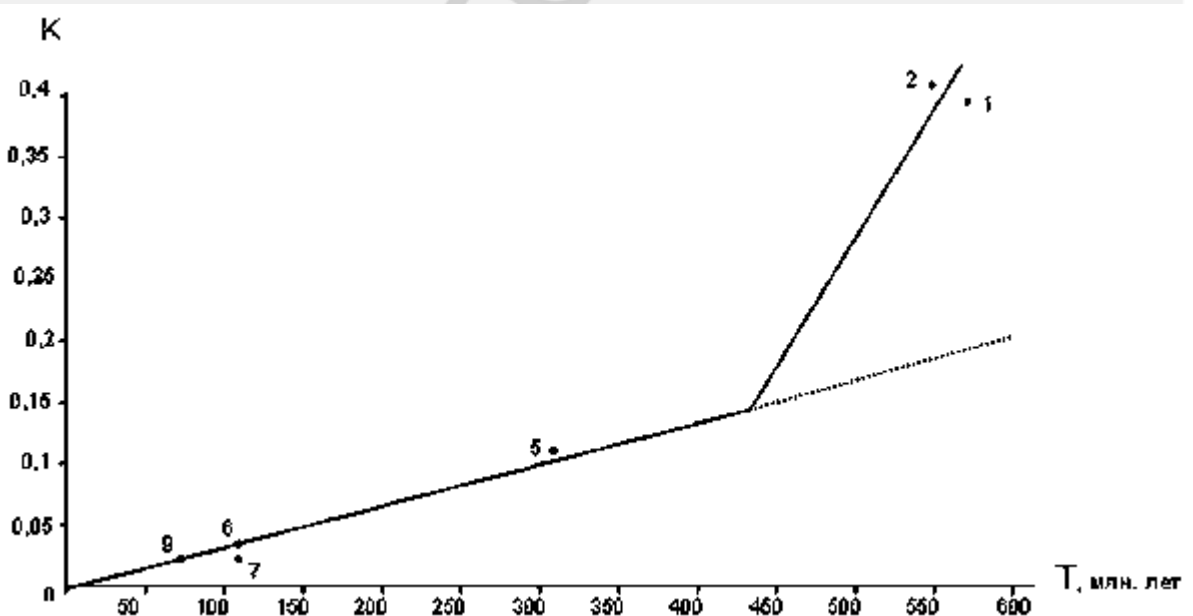


Рис. 4. Зависимость между значениями эволюционных дистанций и временем дивергенции В-изофермента креатинкиназ хордовых животных

Из рис. 3 видно, что точки 3-9 хорошо ложатся на прямую, наклон которой равен 0,0036, что дает  $каа = Каа/2T = 0,0036/2 \cdot 100 \text{ млн. лет} = 0,18 \cdot 10^{-9}$  замен на аминокислотный сайт в год (0,18 По). На рис. 4 точки 5-7 и 9 также хорошо ложатся на прямую, наклон которой равен 0,0034, что дает  $каа = 0,17$  По. Это свидетельствует

о приблизительно постоянной скорости эволюции аминокислотных последовательностей М- и В-изоферментов креатинкиназ позвоночных. Однако при экстраполяции данных прямых до значений средних эволюционных дистанций для ланцетника и ционы установлено, что дивергенция этих организмов произошла более 1 млрд. лет назад, а это, в свою очередь, не согласуется с данными общепринятыми в палеонтологии и молекулярной эволюции.

Нами рассчитаны скорости эволюции аминокислотных последовательностей креатинкиназ для каждого из организмов по отдельности (табл. 3). Из приведенных данных видно, что скорость эволюции креатинкиназ ланцетника и оболочника примерно в 2 раза выше таковой для позвоночных животных. Этот факт можно рассматривать с двух позиций. Во-первых, известно, что скорость эволюции резко увеличивается после дупликации гена. Тогда можно предположить, что такая дупликация произошла до дивергенции оболочника и ланцетника, у которых существуют пока еще не обнаруженные изоферменты. Во-вторых, можно выдвинуть гипотезу о том, что дупликация гена, кодирующего этот фермент, произошла после дивергенции ционы и ланцетника. И после дупликации скорость эволюции не увеличилась, так как уже на уровне низших хордовых креатинкиназа была структурно-функционально сформирована и играла важную роль в энергетическом обмене.

Таблица 4

Скорость эволюции аминокислотных последовательностей креатинкиназ хордовых

	K <sub>aa</sub> , По	
	В-изофермент	М-изофермент
<i>Canis familiaris</i>	0,17	0,27
<i>Bos taurus</i>	последовательность не выделена	0,21
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0,13	0,15
<i>Mus musculus</i>	0,18	0,15
<i>Rattus norvegicus</i>	0,20	0,15
<i>Gallus gallus</i>	0,18	0,15
<i>Zaocys dhumnades</i>	последовательность не выделена	0,17
<i>Ictalurus punctatus</i>	последовательность не выделена	0,18
<i>Branchiostoma floridae</i>	0,37	0,33
<i>Ciona intestinalis</i>	0,34	0,34

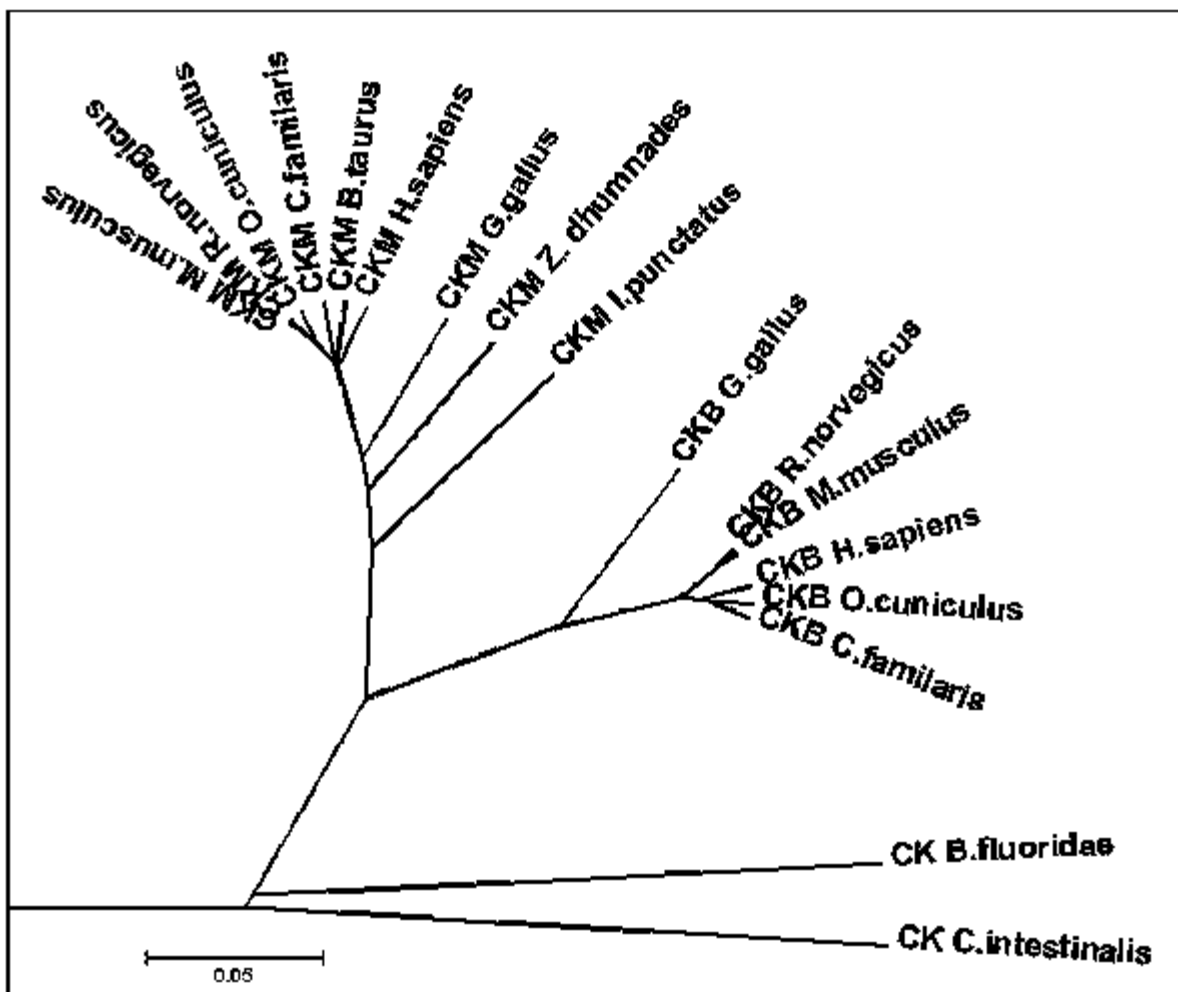


Рис. 5. Дендрограмма креатинкиназ хордовых, полученная методом UPGMA с Equal Input Model

На рис. 5 показано филогенетическое дерево (дендрограмма) креатинкиназ хордовых, полученная методом UPGMA с Equal Input Model в масштабе 0,05. Приведенная дендрограмма показывает топологию креатинкиназ хордовых животных. На ней четко контурируются две клады (В- и М- изоферментов), а также креатинкиназы ционы и ланцетника, являющиеся эволюционными предшественниками изоферментов креатинкиназ позвоночных животных. При установлении в качестве калибровочных точек времени происхождения ланцетника и оболочника (550 и 575 млн. лет, соответственно) получено, что время образования изоферментов креатинкиназ равно 359,3 и 351,3 млн. лет, соответственно. При установлении в качестве калибровочных точек принятого в молекулярной эволюции времени дивергенции птиц (310 млн. лет) для М- и В-изоферментов получено, что их образование произошло 779,3 и 639,3 млн. лет соответственно. Для получения корректного времени образования изоферментов вычислено среднее по четырем полученным величинам ( $532,3 \pm 122,5$  млн. лет). Такой расчет необходим для непредусмотренной методом UPGMA компенсации различий скоростей эволюции.

#### Выводы

1. Эволюция аминокислотных последовательностей В- и М-изоферментов креатинкиназ позвоночных происходила с приблизительно постоянной скоростью, равной 0,17-0,18 По.
2. Скорость эволюции аминокислотных последовательностей креатинкиназ ланцетника и ционы примерно в два раза выше таковой для позвоночных животных.

3. Эволюционными предшественниками креатинкиназ позвоночных являются креатинкиназы ционы и ланцетника.

4. Образование изоферментов креатинкиназ произошло примерно  $532,3 \pm 122,5$  млн. лет назад.

### Литература

1. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. - 1985. - М.: Мир. - С. 323.
2. Малахов В.В. // Соросовский образовательный журнал. - 1996. - т. 7. - С. 2-9.
3. Benfield P.A., Henderson L., Pearson M.L. // Gene. - 1985. - Vol. 39 (2-3). - P. 263-267.
4. Benfield P.A., Zivin R.A., Miller L.S., Sowder R., Smythers G.W., Henderson L., Oroszlan S., Pearson M.L. // J. Biol. Chem.. - 1984. - Vol. 259 (23). - P. 14979-14984.
5. Feng D.-F., Cho G., Doolittle R.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997. - Vol. 94. - P. 13028-13033.
6. Graber N.A., Ellington W.R. // Mol. Biol. Evol.. - 2001. - Vol. 18 (7). - P. 1305-1314.
7. Kim S., Li P., Zheng X., Dunham R.A., Liu Z. // Fish Physiol. Biochem.. - 2003. - In press.
8. Kimura M. // J. Mol. Evol.. - 1980. - Vol. 16. - P. 111-120.
9. Mariman E.C., Schepens J.T., Wieringa B. // Nucl. Acids Res.. - 1989. - Vol. 17 (15). - P. 6385.
10. Мьhlebach S. M., Wirz T., Вгдндle U. // J. Biol. Chem.. - 1996. - Vol. 271. - P. 11920 - 11929.
11. Orhadl C.P., Evans G.L., Cooper T.A., Kunz G., Perriard J.C. // J. Biol. Chem.. - 1984. - Vol. 259 (24). - P.15224-15227.
12. Pickering L., Pang H., Bieman K., Munro H., Schimmel P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1985. - Vol. 82 (8). - P.2310-2314.
13. Roman D., Billadello J., Gordon J., Grace A., Sobel B., Staruss A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1985. - Vol. 82. - P.8394-8398.
14. Shanti K., Kanungo M.S. // Mol. Biol. Rep.. - 2004. - Vol 31 (1). - P. 43-50.
15. Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2002. - Vol. 99 (26). - P. 16899-16903.
16. Tompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // Nucl. Acids Res.. - 1994. - Vol. 22. - P. 4673-4680.
17. Trask R.V., Strauss A.W., Billadello J.J. // J. Biol. Chem. - 1988. - Vol. 263 (32). - P. 17142-17149.
18. Wirtz T., Brandle U., Soldati T., Hossle J.P., Perriard J.C. // J. Biol. Chem.. - 1990. - Vol. 265 (20). - P. 11656-11666.
19. Zhang F.-W., Zhao F.-K., Xu G.-J. // Sheng Wu Hua Hsueh Yu Sheng Wu Wu Li Hsueh Pao 32. - 2000. - In press.