

**(ознакомительный фрагмент)**

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ»**

УДК 577.322.5:543.422.25

**Ачинович Ольга Владимировна**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАНОСВЯ-  
ЗАННЫХ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, АНАЛИЗ ИХ  
МАТРИЧНЫХ РНК И АМИНОКИСЛОТНЫХ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

03.00.04 – биохимия

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Гродно 2003

Работа выполнена на кафедре общей химии  
Белорусского государственного медицинского университета

Научный руководитель – доктор биологических наук,  
профессор, лауреат Государственной  
премии Республики Беларусь  
Барковский Е.В.  
Белорусский государственный  
медицинский университет, кафедра общей химии

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,  
профессор, Заслуженный деятель  
науки Республики Беларусь  
Кухта В.К.  
Белорусский государственный  
медицинский университет, кафедра биохимии

доктор биологических наук,  
профессор Мажуль В.М.  
Институт фотобиологии НАН Беларуси.

Оппонирующ:

Защита состои \_\_\_\_\_  
вета по защите диссертации Д 01.30.01 при Институте биохимии Национальной  
академии наук Беларуси, г. Гродно, бульвар Ленинского Комсомола, 50, тел.  
33-32-11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт биохимии  
НАН Беларуси»

Автореферат разослан 24 декабре 2003 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций,  
кандидат биологических наук

 П.С.Пронько

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы диссертации

К числу наиболее крупных достижений биохимии последних пятнадцати лет относится не только выяснение первичной структуры мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих и кодирующих их генов, но и установление пространственного строения их цитоплазматических доменов на основе кристаллографических данных [Tesmer et al., 1997, Zhang et al., 1997]. Это позволило вплотную подойти к осмыслению каталитического механизма образования цАМФ и предопределило новый контекст понимания регуляции активности аденилатциклаз ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , G-белками,  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулиновым комплексом, протеинкиназами, протеинфосфатазами, форсколином и Р-сайт ингибиторами.

Интерес, проявляемый различными специалистами к изучению аденилатциклаз, обусловлен тем, что они играют критическую роль не только в механизмах обучения, памяти, обоняния, деятельности сердечно-сосудистой, выделительной и репродуктивной систем [Defer et al., 2000], но и в развитии патологических состояний, связанных с нарушением регуляции активности аденилатциклаз (алкоголизм, лекарственная зависимость), а также заболеваний, обусловленных мутациями их генов [Hanoune et al., 2001, Patel et al., 2001].

Актуальность филогенетических исследований мембраносвязанных аденилатциклаз следует рассматривать, исходя из следующих соображений. Во-первых, эти исследования позволяют установить эволюционные связи между аденилатциклазами организмов, находящихся на разных этапах эволюционного развития, что имеет огромное значение для таксономии. Во-вторых, определение скоростей молекулярной эволюции мембраносвязанных аденилатциклаз и их разных в функциональном отношении участков, а также установление консервативной природы мутационных замен аминокислотных остатков в процессе эволюции может подтвердить или опровергнуть основные эмпирические принципы теории нейтральной молекулярной эволюции, сформулированные почти исключительно на основе анализа водорастворимых белков. И, наконец, в-третьих, выяснение закономерностей эволюционных изменений нуклеотидных последовательностей мРНК мембраносвязанных аденилатциклаз будет способствовать формулировке общей стратегии молекулярной эволюции.

### Связь работы с крупными научными программами

Диссертационная работа выполнена по плановой теме БГМУ «Структурно-функциональные свойства аденилатциклаз различного происхождения и теоретический анализ их аминокислотных последовательностей» (№ гос.регистрации 2001680, сроки выполнения 2001-2005 г.г.).

### Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования – установить основные закономерности изменения нуклеотидных последовательностей мРНК и первичной структуры мембраносвязанных аденилатциклаз в процессе эволюции, характер эволюционных взаимоотношений между ними в широком филогенетическом ряду животных от многоклеточных беспозвоночных до человека, а также принци-

альную возможность формирования канальных структур трансмембранными сегментами аденилатциклаза.

Поставленная цель включала решение следующих задач:

- Выявить родственные отношения между различными типами мембраносвязанных аденилатциклаза млекопитающих и на этой основе предложить их структурную классификацию, а также установить филогенетические связи между мембраносвязанными аденилатциклазами млекопитающих, нематоды и дрозофилы.
- Определить скорость молекулярной эволюции мембраносвязанных аденилатциклаза и их различных в функциональном отношении участков в широком филогенетическом ряду животных от нематоды до человека.
- Провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мРНК и первичных структур мембраносвязанных аденилатциклаза мыши и человека с целью выяснения взаимосвязи между степенью консервативности аминокислотных замен в процессе эволюции и местоположением нуклеотидных замен в кодонах мРНК, а также типом несинонимичных транзиций и трансверсий.
- Охарактеризовать направленность изменений частоты использования претерминальных кодонов и нуклеотидного состава мРНК мембраносвязанных аденилатциклаза в процессе эволюции.
- Оценить принципиальную возможность формирования канальных структур трансмембранными сегментами мембраносвязанных аденилатциклаза млекопитающих.

#### **Объекты и предмет исследования**

Объектом настоящего исследования служили известные из данных литературы аминокислотные последовательности мембраносвязанных аденилатциклаза, выделенных из различных источников животного происхождения, а также нуклеотидные последовательности соответствующих им мРНК.

Предметом исследования было изучение закономерностей изменения нуклеотидных последовательностей мРНК и аминокислотных последовательностей мембраносвязанных аденилатциклаза в процессе эволюции.

#### **Методология и методы проведенного исследования**

Общим методическим подходом к решению поставленных задач являлось выяснение направленности и степени изменения нуклеотидных последовательностей мРНК и аминокислотных последовательностей мембраносвязанных аденилатциклаза в широком филогенетическом ряду от многоклеточных беспозвоночных до человека.

В работе использовался комплекс методов теоретического конформационного анализа, филогенетических и статистических методов.

#### **Научная новизна и значимость полученных результатов**

Впервые на основе комплексного анализа подобия аминокислотных (ди- и трипептидный анализ, анализ полной первичной структуры) и нуклеотидных последовательностей мРНК проведена количественная классификация семейства мембраносвязанных аденилатциклаза млекопитающих, согласно которой

выделены четыре подсемейства: I/V/VI/VIII, II/IV/VII, IX/X и III. Показано, что такое деление на подсемейства по признакам сходства аминокислотных и нуклеотидных последовательностей полностью совпадает с предложенным нами делением мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих по их функциональным (биохимическим) свойствам.

Впервые установлены филогенетические взаимоотношения между мембраносвязанными аденилатциклазами человека, дрозофилы и нематоды. Так, АСУ 1 нематоды является эволюционным предшественником АЦ IX человека и ДАС 9 дрозофилы, АСУ 2 нематоды — предшественником аденилатциклаз II/IV/VII человека и ДАС 76 Е дрозофилы и, наконец, АСУ 4 нематоды — предшественником аденилатциклаз I/III/V/VI/VIII человека, а также ДАС 39 Е и Rutabaga дрозофилы.

Новыми являются данные о том, что эволюция мембраносвязанных аденилатциклаз АСУ 1 и АСУ 4 нематоды, а также соответствующих эволюционных ортологов, то есть АЦ IX и АЦ VI, у позвоночных животных проходила примерно с постоянной, хотя и разной скоростью ( $0,60 \cdot 10^{-9}$  на аминокислотный сайт в год для АЦ IX и  $0,44 \cdot 10^{-9}$  на аминокислотный сайт в год для АЦ VI).

Обнаружено, что максимальная скорость эволюции наблюдается для экстраклеточных петель, а минимальная — для цитоплазматических доменов мембраносвязанных аденилатциклаз позвоночных животных. Наиболее медленно в процессе эволюции изменяются участки цитоплазматических доменов, формирующие активный центр фермента.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мРНК АЦ VI – IX мыши и человека показал, что для несинонимичных замен имеем соотношение  $K_1 > K_2 > K_3$ . Среди взаимозаменяемых аминокислот в молекулах АЦ VI – IX мыши и человека, обусловленных заменами нуклеотида в первом положении кодона, консервативные замены составляют 70,5%, во втором положении кодона – 65,1% и в третьем положении – 43,8%.

Выявлено, что в процессе эволюции мРНК мембраносвязанных аденилатциклаз наблюдается уменьшение частоты использования претерминальных кодонов, а также значительное изменение нуклеотидного состава, выражающееся в увеличении содержания Г + Ц и уменьшении А + У.

Предложена гипотетическая модель ионного канала, сформированного шестью трансмембранными сегментами домена M1 аденилатциклазы VIII типа.

### **Практическая значимость полученных результатов**

Практическая значимость полученных результатов заключается в выяснении основных закономерностей эволюционной стратегии, направленной на уменьшение частоты мутаций с сильно выраженными эффектами и увеличение конформационной стабильности генов. Полученные результаты могут быть использованы в качестве практических рекомендаций для целенаправленного химического синтеза «эволюционно совершенных» мРНК или генов, используемых в генно-инженерных исследованиях.

Результаты исследования используются при чтении лекций на кафедрах биологической химии (акт внедрения от 23.05.2003) и биологии (акт внедрения от 23.05.2003) БГМУ.

### Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Семейство мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих состоит из четырех подсемейств: 1) АЦ I/АЦ V/АЦ VI/АЦ VIII, 2) АЦ II/ АЦ IV/АЦ VII, 3) АЦ IX/АЦ X и 4) АЦ III. Эволюционными предшественниками АЦ IX, АЦ II/АЦ IV/АЦ VII и АЦ I/АЦ V/АЦ VI/АЦ VIII/АЦ III человека являются, соответственно, аденилатциклазы АСУ 1, АСУ 2 и АСУ 4 нематоды *Caenorhabditis elegans*.
2. Эволюция мембраносвязанных аденилатциклаз VI и IX типов позвоночных животных, а также соответствующих эволюционных предшественников АСУ 4 и АСУ 1 нематоды *Caenorhabditis elegans* происходила с постоянной, хотя и разной скоростью. Максимальная скорость эволюции наблюдается для экстраклеточных петель, а минимальная — для участков цитоплазматических доменов, формирующих активный центр мембраносвязанных аденилатциклаз.
3. В процессе эволюции мРНК мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих максимальная скорость несинонимичных замен нуклеотидов наблюдается в первом положении, а минимальная — в третьем положении кодонов. Между скоростью нуклеотидных замен в разных положениях кодонов и частотой консервативных замен аминокислотных остатков существует прямая зависимость. При замещениях нуклеотидов в первом и втором положениях кодонов наиболее консервативными являются аминокислотные замены, обусловленные транзигциями  $A \rightleftharpoons G$  и трансверсиями  $G \rightleftharpoons C$ .
4. Стратегия эволюционных изменений мРНК мембраносвязанных аденилатциклаз, проявляющаяся в уменьшении частоты использования претерминальных кодонов и увеличении содержания  $G + C$ , направлена на минимизацию мутаций с сильно выраженными эффектами и увеличение конформационной стабильности соответствующих генов.
5. Среди всех изоформ мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих наибольшим сходством по аминокислотному составу с транспортными белками обладает домен M1 аденилатциклазы VIII типа. Формирование гипотетического ионного канала осуществляется шестью амфифильными  $\alpha$ -спиральными трансмембранными сегментами домена M1 аденилатциклазы VIII типа, гидрофобные поверхности которых обращены к липидной фазе, а полярные поверхности выстилают внутреннюю поверхность водного канала, пронизывающего бислоем.

### Личный вклад соискателя

Приведенные в работе результаты были получены соискателем лично. Проведена статистическая обработка данных, их анализ, подготовка к публикации печатных работ по теме диссертации. Научный руководитель, помимо постановки целей и задач исследования, оказывал консультативную помощь в обсуждении и трактовке полученных результатов.

### Апробация результатов диссертации

Результаты исследования обсуждены на Республиканской научной конференции «Органическая химия Беларуси на рубеже XXI века» (Минск, 1999),

Международном симпозиуме “Intracellular signaling in plant and animal systems”(Minsk, 2000), IV съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2000), Международной научно-практической конференции, посвященной 10-летию образования Гомельского государственного медицинского института (Гомель, 2000), юбилейной конференции, посвященной 80-летию БГМУ «Актуальные вопросы современной медицины» (Минск, 2002), научной конференции «Теория и практика медицины» (Минск, 2002), научной конференции, посвященной 75-летию НИИ санитарии и гигиены «Здоровье и окружающая среда» (Минск, 2002), Международной научной конференции; Пятом съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2002).

#### **Опубликованность результатов**

По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ, в том числе глава в коллективной монографии, 6 статей в научных журналах и 10 в сборниках, 11 тезисов докладов.

Общее количество опубликованных страниц – 102.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 157 страницах печатного текста. Состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, заключения и библиографического указателя (содержит список из 249 использованных источников). Диссертация содержит 50 таблиц и 29 рисунков.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Объекты и методы исследования**

Изучены аминокислотные последовательности мембраносвязанных аденлатциклаз дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae*, ACY1 – ACY4 нематоды *Caenorhabditis elegans*, ACXA – ACXE, DAC9, DAC 76E, DAC 78C-L, DAC39 E и *Rutabaga* плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, АЦ VI костистой рыбы *Takifugu rubripes*, АЦ IX шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, АЦ IX фазана *Gallus gallus*, АЦ I быка *Bos taurus*, АЦ VI – IX мыши *Mus musculus*, АЦ II – IV крысы *Rattus norvegicus*, АЦ V, VI собаки *Canis familiaris*, АЦ I – IX человека, а также нуклеотидные последовательности мРНК ACY1 и ACY4 нематоды *Caenorhabditis elegans*, АЦ VI костистой рыбы *Takifugu rubripes*, АЦ IX шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, АЦ IX фазана *Gallus gallus*, АЦ VI – IX мыши *Mus musculus*, АЦ I быка *Bos taurus* и АЦ II – IX человека.

Выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы CLUSTALW [Tompson et a., 1994].

Предсказание трансмембранных сегментов мембраносвязанных белков по их аминокислотной последовательности проводили, используя оригинальный алгоритм [Ачинович, 2000].

мента, который около 80 млн. лет назад приобрел оптимальную структуру, необходимую для выполнения своей функции [9-11, 15].

4. Сопоставление нуклеотидных последовательностей мРНК мембраносвязанных аденилатциклаз мыши и человека показало, что для всей совокупности синонимичных и несинонимичных замен нуклеотидов наибольшая скорость мутационных замен характерна для третьего положения кодонов, меньшая — для первого и самая маленькая — для второго. Для несинонимичных замен наибольшая скорость замен характерна для первого положения кодонов, меньшая — для второго и самая маленькая — для третьего. Установлено, что среди взаимозаменяемых аминокислот в молекулах мембраносвязанных аденилатциклаз, обусловленных заменой нуклеотида в первом положении кодонов, консервативные замены составляют 70,5%, во втором положении — 65,1% и, наконец, в третьем — 43,8%. Наибольшая консервативность взаимозаменяемых аминокислот обусловлена транзициями А=Г, трансверсиями Г=Ц, Г=У, А=У в первом положении кодонов и транзициями А=Г, Ц=У, а также трансверсиями Г=Ц, А=У — во втором положении [14,16,26-28].

5. Анализ 1420 спонтанных точечных мутаций, выявленных при сравнении нуклеотидных последовательностей кодирующих участков мРНК мембраносвязанных аденилатциклаз мыши и человека показал следующее: 1) вероятность транзиций выше, чем трансверсий; 2) для несинонимичных замещений транзиций А=Г заметно преобладают над транзициями Ц=У, наоборот, для синонимичных замещений транзиции Ц=У преобладают над транзициями А=Г; 3) частоты разных трансверсий как для всей совокупности синонимичных и несинонимичных замещений, так и раздельно для синонимичных и несинонимичных замещений различны и могут быть расположены в ряд Г=Ц > А=Ц > У=Г > А=У. По степени опасности терминальной мутации претерминальные кодоны располагаются в следующий ряд: УГГ > УЦА, УАЦ>ЦАА, ЦГА, ЦАГ>УУА, УАУ>УЦГ, УГЦ>ГАА, ГАГ, ГГА > УУГ, УГУ > ААА, ААГ, АГА. В процессе эволюции мРНК мембраносвязанных аденилатциклаз наблюдается значительное уменьшение частоты использования претерминальных кодонов, а также увеличение содержания Г + Ц (%) [14,16,26-28].

6. Сравнительный анализ трансмембранных сегментов аденилатциклаз млекопитающих, транспортных и нетранспортных интегральных белков показал, что наибольшим сходством по аминокислотному составу с транспортными белками обладает домен М1 аденилатциклазы VIII типа. По-видимому, шесть амфифильных трансмембранных сегментов домена М1 аденилатциклазы VIII типа образуют катионный канал, полость которого формируют карбонильные группы пептидного остова, карбоксамидные группы глутамина и аспарагина, феноксиароматические кольца тирозина, карбоксильные группы глутаминовой и аспарагиновой кислот, аминогруппы лизина и аргинина, имидазольная группа гистидина [2,8,13,21].



### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ачинович О.В. Трансмембранная модель и вторичная структура аденилатциклазы мозга // Труды молодых ученых: Сб. науч. работ / Под общ. ред. С.Л. Кабака.– Мн.: МГМИ, 2000.– С.11-16.
2. Ачинович О.В., Барковский Е.В., Бутвиловский А.В. Анализ аминокислотного состава мембранных доменов аденилатциклазы млекопитающих, транспортных и нетранспортных интегральных белков//Актуальные вопросы медицины и новые технологии медицинского образования: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 10-летию образования Гомельского государственного медицинского института (22-23 ноября 2000 г., Гомель): В 2 т.Т.1.– Мозырь: Издательский Дом «Белый ветер», 2000.– С.18 - 22.
3. Ачинович О.В., Барковский Е.В., Цыганков В.Г. Вторичная структура аденилатциклазы мозга и профили гидрофобного момента ее структурированных участков // Предпатология: проблемы и решения: Сб.науч.тр./Под ред. С.М.Соколова и др.–Мн.: Бел.наука,2000.–С145– 154.
4. Ачинович О.В., Королев В.А., Барковский Е.В., Бутвиловский А.В. Распределение трипептидных перекрывающихся фрагментов в первичной структуре мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих//Актуальные вопросы медицины и новые технологии медицинского образования: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 10-летию образования Гомельского государственного медицинского института (22-23 ноября 2000 г., Г.Гомель): В 2 т.Т.1.– Мозырь: «Белый Ветер», 2000.–С.22-24.
5. Ачинович О.В. Новый метод классификации белков. Подсемейства мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих//Труды молодых ученых: Сб. науч. работ / Под общ. ред. С.Л. Кабака.– Мн.: МГМИ, 2001.–С.18-23.
6. Ачинович О.В. Функциональная и структурная классификация мембранных аденилатциклаз млекопитающих//Труды молодых ученых. Юбилейное издание: Сб.науч.работ /Под общ. ред. С.Л. Кабака.–Мн.:БГМУ, 2001.–С.6-9.
7. Ачинович О.В., Бутвиловский А.В., Королев В.А. Предсказание вторичной структуры доменов VC<sub>1a</sub> и PC<sub>2a</sub> аденилатциклаз млекопитающих //Актуальные вопросы современной медицины: Материалы юбилейной науч. конф., посв. 80-летию БГМУ, в двух частях. Часть I /Под ред. С.Л.Кабака.–Мн.: БГМУ, 2001.– С.22-23.
8. Барковский Е.В., Ачинович О.В., Бутвиловский А.В., Королев В.А. Домен M1 мембраносвязанной аденилатциклазы млекопитающих VIII типа как потенциальная каналобразующая структура //Актуальные вопросы современной медицины: Материалы юбилейной науч. конф., посв. 80-летию БГМУ, в двух частях. Часть I /Под ред. С.Л.Кабака.– Мн.: БГМУ, 2001.– С.26 -28.
9. Барковский Е.В., Ачинович О.В., Бутвиловский А.В. Скорость эволюции мембраносвязанной аденилатциклазы IX типа//Здравоохранение.–2002.–№ 6.–С.12-14.
10. Барковский Е.В., Ачинович О.В., Бутвиловский А.В. Темпы эволюционных изменений различных участков мембраносвязанных аденилатциклаз IX типа //Здравоохранение.–2002.– № 7.–С.16-19.

11. Барковский Е.В., Ачинович О.В., Бутвиловский А.В. Эволюция аминокислотных замен в мембраносвязанных аденилатциклазах VI и IX типов // Белорусский медицинский журнал. – 2002. – №1 – С.41–43
12. Барковский Е.В., Кубарко А.И., Ачинович О.В. Альтернативно-сплайсированные субтипы аденилатциклаз млекопитающих: норма или патология // Теория и практика медицины: сб. научн. тр. Вып.3 / Под ред. В.А. Остапенко, Г.Г. Шанько. – Минск: Белорусский центр науч. метод. информации, 2002. – С.183–185.
13. Барковский Е.В., Ачинович О.В., Бутвиловский А.В., Королев В.А. Мембраносвязанные аденилатциклазы млекопитающих: классификация, состав, строение, функция // Биофизика живых систем: от молекулы к организму / Под ред. И.Д. Вологовского. – Мн.: БелСЭНС, 2002. – С.73–86.
14. Барковский Е.В., Ачинович О.В., Барабаш С.Г., Бутвиловский А.В. О вероятностях трансверсий и транзиций в мРНК мембраносвязанной аденилатциклазы VII типа // Белорусский медицинский журнал. – 2002. – №2. – С.49–52.
15. Барковский Е.В., Цыганков В.Г., Ачинович О.В., Бутвиловский А.В. Сравнительный анализ скоростей молекулярной эволюции мембраносвязанных аденилатциклаз VI и IX типов // Здоровье и окружающая среда. Сб. науч. трудов к 75-летию НИИ санитарии и гигиены. В 2 т. Т.1. – Барановичи. – 2002. – С. 74–80.
16. Ачинович О.В. Транзиции, трансверсии и скорость эволюции нуклеотидных последовательностей мРНК мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих // Труды молодых ученых: Сб. науч. работ / Под общ. ред. С.Л. Кабака. – Мн.: БГМУ, 2003. С.3–6
17. Барковский Е.В., Ачинович О.В. Филогенетические взаимоотношения мембраносвязанных аденилатциклаз человека и многоклеточных беспозвоночных животных // Белорусский медицинский журнал. – 2003, №3. – С.35–38
18. Барковский Е.В. Ачинович О.В. Регуляция мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих. // Белорусский медицинский журнал. – 2003. – №4. – С.6–10.
19. Ачинович О.В., Барковский Е.В. Трансмембранная модель N-концевого фрагмента аденилатциклазы мозга // Органическая химия Беларуси на рубеже XXI века: Программа и тезисы докладов первой респ. науч. конф. 25,26 мая 1999 г., Минск / Отв. Ред. О.Г. Кулинкович. – Мн.: БГУ. 1999. – С.31.
20. Ачинович О.В., Барковский Е.В., Барабаш С.Г. О двух моделях аденилатциклазы I типа // Тез. докл. IV Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем (28–30 июня 2000 г., Минск). – Мн.: БГУ, 2000. – С.92.
21. Ачинович О.В., Бутвиловский А.В. Сравнительный анализ аминокислотного состава мембранных и немембранных участков аденилатциклазы I типа, транспортных и нетранспортных интегральных мембранных белков // Тез. докл. IV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем (28–30 июня 2000 г., Минск). – Мн.: БГУ, 2000. – С.93.
22. Барковский Е.В., Ачинович О.В. Модель вторичной структуры фрагментов C<sub>1a</sub> и C<sub>2a</sub> цитоплазматических доменов аденилатциклазы // Тезисы докладов Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: Молекулярно-

- клеточные основы функционирования биосистем (28-30 июня 2000 г., Минск).— Мн.: БГУ, 2000.— С.95.
23. Achinovich O.V., Barkowsky Y.V., Butvilowsky A.V. Amino acid composition of the membrane and aqueous domains of mammalian adenylyl cyclases //International symposium: Intracellular signaling in plant and animal systems. Minsk (Belarus), September 24-26, 2000.— P.38.
  24. Achinovich O.V., Barkowsky Y.V., Butvilowsky A.V. Mammalian adenylyl cyclase subfamilies //International symposium: Intracellular signaling in plant and animal systems. Minsk (Belarus), September 24-26, 2000.— P.39.
  25. Butvilowsky A.V., Achinovich O.V., Barkowsky Y.V. Quantitative dipeptide analysis of mammalian adenylyl cyclases //International symposium: Intracellular signaling in plant and animal systems. Minsk (Belarus), September 24-26, 2000.— P.42.
  26. Барковский Е.В., Ачинович О.В., Барабаш С.Г. Сравнительный анализ матричных РНК мембраносвязанной аденилатциклазы VII типа мыши и человека // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Международная научная конференция; Пятый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 22-24 октября 2002 г.: Материалы докл./Ред. кол.: И.Д. Волотовский и др.—Мн.: Тонпик, 2002. —С.57
  27. Барковский Е.В., Ачинович О.В., Бутвиловский А.В. Консервативная природа мутационных замен аминокислот мембраносвязанной аденилатциклазы IX типа в процессе эволюции // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Международная научная конференция; Пятый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 22-24 октября 2002 г.: Материалы докл./Ред. кол.: И.Д. Волотовский и др.—Мн.: Тонпик, 2002. —С.58
  28. Ачинович О.В., Барковский Е.В., Бутвиловский А.В., Королев В.А. Частота и консервативный характер аминокислотных замен в различных участках аденилатциклазы IX типа в процессе эволюции // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Международная научная конференция; Пятый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 22-24 октября 2002 г.: Материалы докл./Ред. кол.: И.Д. Волотовский и др.—Мн.: Тонпик, 2002. —С.57

## РЭЗЮМЕ

Ачыновіч Вольга Уладзіміраўна

**Структурна-функцыянальныя ўласцівасці мембраназвязаных адэнілатцыклаз млекакормячых. аналіз іх матрычных РНК і амінакіслотных паслядоўнасцей**

*Ключавыя словы:* адэнілатцыклаза, мутацыі, хуткасць малекулярнай эвалюцыі, транзіцыі, трансверсіі.

*Аб'екты даследавання:* нуклеацыдныя паслядоўнасці мРНК і амінакіслотныя паслядоўнасці мембраназвязаных адэнілатцыклаз.

*Прадметам працы* было вывучэнне заканамернасцей змянення нуклеацыдных паслядоўнасцей мРНК і амінакіслотных паслядоўнасцей мембраназвязаных адэнілатцыклаз у працэсе эвалюцыі.

*Мэта працы:* устанавіць асноўныя заканамернасці змянення нуклеацыдных паслядоўнасцей мРНК і першаснай структуры мембраназвязаных адэнілатцыклаз у працэсе эвалюцыі, характар эвалюцыйных узаемаадносін паміж імі ў шырокім філагенетычным шэрагу жывел ад шматклетачных бесхрыбетных да чалавека, а таксама прыняцёвую магчымасць фарміравання канальных структур трансмембраннымі сегментамі адэнілатцыклаз.

*Метады даследавання:* комплекс метадаў зэрэтычнага канфармацыйнага аналізу, філагенетычных і статыстычных метадаў.

*Атрыманыя вынікі і іх навізна:* упершыню ўстаноўлены філагенетычныя ўзаемаадносіны паміж адэнілатцыклазамі чалавека, дразафілы і нематоды. Устаноўлена хуткасць эвалюцыі мембраназвязаных адэнілатцыклаз розных тыпаў. Паказана, што максімальная хуткасць эвалюцыі назіраецца для экстраклетачных петляў, а мінімальная - для цытаплазматычных даменаў мембраназвязаных адэнілатцыклаз. Паказана, што сярод узаемазамянальных амінакіслот у малекулах АЦ VI-IX мышы і чалавека, абумоўленых заменамі нуклеацыду ў першым становішчы кадона, кансерватыўныя замены складаюць 70,5%, у другім становішчы кадона - 65% і ў трэцім становішчы - 43,8%. Выяўлена, што ў працэсе эвалюцыі мРНК мембраназвязаных адэнілатцыклаз назіраецца памяншэнне частаты выкарыстання прэтэрмінальных кадонаў і павялічэнне ўтрымання Г+Ц. Прапанавана гіпатэтычная мадэль іоннага канала, сфарміраванага трансмембраннымі сегментамі дамена M1 адэнілатцыклазы VIII тыпу.

*Рэкамендацыі па выкарыстанні:* Выяўленыя ў працы заканамернасці могуць быць выкарыстаны для распрацоўкі практычных рэкамендацый па хімічным сінтэзе «эвалюцыйна дасканалых» мРНК ці генаў, якія выкарыстоўваюцца ў гена-інжынерных работах.

*Вобласць прымянення:* эвалюцыйная біяхімія, генная інжынерыя.

## РЕЗЮМЕ

Ачинович Ольга Владимировна

### **Структурно-функциональные свойства мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих, анализ их матричных РНК и аминокислотных последовательностей**

*Ключевые слова:* аденилатциклаза, мутации, скорость молекулярной эволюции, транзиции, трансверсии.

*Объекты исследования:* нуклеотидные последовательности мРНК и аминокислотные последовательности мембраносвязанных аденилатциклаз.

*Предметом работы* было изучение закономерностей изменения нуклеотидных последовательностей мРНК и аминокислотных последовательностей мембраносвязанных аденилатциклаз в процессе эволюции.

*Цель работы:* установить основные закономерности изменения нуклеотидных последовательностей мРНК и первичной структуры мембраносвязанных аденилатциклаз в процессе эволюции, характер эволюционных взаимоотношений между ними в широком филогенетическом ряду животных от многоклеточных беспозвоночных до человека, а также принципиальную возможность формирования канальных структур трансмембранными сегментами аденилатциклаза.

*Методы исследования:* комплекс методов теоретического конформационного анализа, филогенетических и статистических методов.

*Полученные результаты и их новизна:* впервые установлены филогенетические взаимоотношения между аденилатциклазами человека, дрозофилы и нематоды. Установлена скорость эволюции мембраносвязанных аденилатциклаз разных типов. Показано, что максимальная скорость эволюции наблюдается для экстраклеточных петель, а минимальная – для цитоплазматических доменов мембраносвязанных аденилатциклаз. Показано, что среди взаимозаменяемых аминокислот в молекулах АЦ VI–IX мыши и человека, обусловленных заменами нуклеотида в первом положении кодона, консервативные замены составляют 70,5%, во втором положении кодона – 65% и в третьем положении – 43,8%. Выявлено, что в процессе эволюции мРНК мембраносвязанных аденилатциклаз наблюдается уменьшение частоты использования претерминальных кодонов и увеличение содержания Г + Ц. Предложена гипотетическая модель ионного канала, сформированного трансмембранными сегментами домена M1 аденилатциклазы VIII типа.

*Рекомендации по использованию.* Обнаруженные в работе закономерности могут быть использованы для разработки практических рекомендаций по химическому синтезу «эволюционно совершенных» мРНК или генов, используемых в генно-инженерных работах.

*Область применения:* эволюционная биохимия, генная инженерия.

## SUMMARY

**Olga Achinovich**

Structure functional properties of mammal membrane-conjugated adenylate cyclases, their matrix RNA and amino acid sequence analysis

*Key words:* adenylate cyclase, mutations, molecular evolution speed, transitions, transversions.

*Research objects:* mRNA nucleotide sequences and membrane-conjugated adenylate cyclase amino acid sequences.

*Research subject:* study of nucleotide sequences and membrane-conjugated adenylate cyclase amino acid sequences mechanism of development in the process of evolution.

*Objective:* to determine basic nucleotide sequences and membrane-conjugated adenylate cyclase amino acid sequence mechanisms of development in the process of evolution, the character of evolutionary interactions between them in wide phylogenetic row of animals – from multicellular invertebrates to human beings, as well as fundamental possibility of forming channel structures by adenylate cyclase transmembrane domains.

*Research methods:* complex of theoretical conformational analysis methods, phylogenetic and statistical methods.

*Obtained results and their urgency:* phylogenetic interactions between human, fruit fly, and nematode have been established for the first time. Evolution speed of membrane-conjugated adenylate cyclases of different types has been determined. Maximal evolution speed has been demonstrated for extracellular loops, while minimal one has been shown to be typical for membrane-conjugated adenylate cyclase cytoplasmic domains. Conservative replacements among interchangeable amino acids in human and murine VI–IX adenylate cyclase molecules caused by nucleotide replacement in first position of codon have been demonstrated to reach 70.5%, 65% – in second position, and 43.8% – in third position. Decrease of pre-terminal codons usage and increase of G + C content has been discovered to occur in the process of membrane-conjugated adenylate cyclase mRNA evolution. Hypothesize model of ion channel formed by M1 domain transmembrane segments of type VIII adenylate cyclase has been proposed.

*Suggested usage:* relationships discovered in the research can be applied to develop practical recommendations on chemical synthesis of “evolutionary perfect” mRNA or genes being used in genetic engineering.

*Field of application:* evolutionary biochemistry, genetic engineering.

