



УДК 51-76:612.751.2  
ББК 58

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ КОСТНЫХ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ КАК ПОИСК ИХ ЭФФЕКТИВНЫХ ГОМОЛОГОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ХРЯЩА

**Крылов Павел Андреевич**

Аспирант кафедры биоинженерии и биоинформатики,  
Волгоградский государственный университет  
pavelcarboxyfluorescein@yandex.ru  
просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация

**Липницкая Софья Алексеевна**

Студент кафедры биоинженерии и биоинформатики,  
Волгоградский государственный университет  
Lipnitskaya.sofya@gmail.com  
просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация

**Аннотация.** В настоящей статье представлены результаты изучения структурных особенностей представителей семейства костных морфогенетических белков (ВМР), обладающих хондроиндуктивным эффектом. В ходе работы создана база данных костных морфогенетических белков, рассмотрены возможные пути эволюции ВМР и основные эволюционные модули в рамках семейства. На основании полученных данных осуществлен поиск эффективных аналогов, способных к взаимодействию с рецепторами хрящевой ткани.

**Ключевые слова:** костные морфогенетические белки, рецепторы ВМР, суставной хрящ, филогенетическая реконструкция, тканевая инженерия.

На сегодняшний день в молекулярной биологии создаются базы данных, что позволяет упростить и систематизировать различные виды информации. Одним из современных подходов в молекулярной биологии является создание филогенетических деревьев. Использование филогенетических деревьев позволяет отразить эволюционные взаимосвязи между различными молекулами, имеющими общую молекулу-предшественника. Построение филогенетического дерева дает возможность проследить эволюционное развитие конкретных молекул, участвующих в развитии суставного хряща.

В данной работе особое внимание было уделено функциональным особенностям пред-

ставителей семейства костных морфогенетических белков (ВМР) [2; 1], участвующих в процессах остеогенеза и хондрогенеза в суставном хряще. ВМР – это мультифункциональные факторы роста, входящие в состав суперсемейства, трансформирующего фактора роста [3]. Молекулы ВМР состоят из 110–140 аминокислотных остатков. На сегодняшний момент идентифицировано более 20 видов ВМР, принимающих участие в регуляции различных процессов в тканях организма. В суставном хряще преобладают небольшое количество представителей семейства ВМР: ВМР-1, ВМР-2, ВМР-4, ВМР-5, ВМР-6, ВМР-7, ВМР-8а, ВМР-12, ВМР-14. Все вышеприведенные

молекулы BMP связываются с рецепторами костных морфогенетических белков (BMPR), расположенных на мембране хондроцитов, запуская процесс передачи сигнала в клетке. Молекулы BMP-2, BMP-4, BMP-7 являются факторами роста, так как отвечают за дифференцировку и пролиферацию хондроцитов, синтез внеклеточного матрикса [3; 4; 9]. Другие молекулы BMP обладают менее широким диапазоном функциональных свойств.

Специфическими мембранными рецепторами для семейства молекул BMP являются BMPR1A, BMPR1B и BMPR2. BMPR1 присутствует на мембране остеобластов, но в настоящее время есть данные о том, что рецепторы BMPR1A, BMPR1B участвуют в запуске дифференцировки хондроцитов на ранних стадиях хондрогенеза, хотя также есть противоречивые данные участия в замедлении хондрогенной дифференциации, который имитирует эффект фактора роста фибробластов 2 [10]. BMPR2 – специфические рецепторы хондроцитов, участвующие в регуляции процессов дифференцировки, пролиферации хондроцитов, синтеза внеклеточного матрикса и запуска апоптоза [2; 7; 11].

**Цель работы** – поиск эффективных гомологов молекул семейства BMP участвующих в процессах дифференцировки, пролиферации, синтеза внеклеточного матрикса и remodelирование тканеинженерных конструкций в суставном хряще.

#### **Материал и методы исследования.**

Для достижения цели исследования нами были намечены следующие этапы. На первом этапе была разработана база данных структурных и функциональных свойств молекул семейства BMP, участвующих в процессе хондрогенеза в суставном хряще. Для внесения данных был осуществлен поиск из ресурсов свободного доступа: PubMed, PubMedCentral, PDB и NCBI Proteins. Поиск осуществлялся с учетом синонимических словосочетаний «chondrocyte receptor and cartilage remodeling» и их синонимических конструкций. Для проектирования базы данных использовался программный пакет Microsoft Office Excel с учетом следующих критериев: адекватность, полнота, устойчивость. В итоге был сформирован следующий список столбцов базы данных: «представители семейства BMP», «функциональные свойства», «стадия хондрогенеза».

В качестве объекта исследования были выбраны 9 представителей семейства BMP (1, 2, 4–8а, 12, 14), обладающих хондроиндуктивным потенциалом и экспрессирующихся клетками хрящевой ткани. В таблицу была включена информация о функциональных свойствах BMP и стадии хондрогенеза: формирование мезенхимальных уплотнений, пролиферация и дифференцировка прехондробластов, пролиферация и дифференцировка хондробластов, синтез внеклеточного матрикса, трансформация хондробластов в хондроциты и продолжение жизненного цикла [10].

Биоинформационный поиск и анализ структуры представителей семейства BMP дает возможность создания филогенетического дерева семейства BMP. При создании филогенетического дерева нами был использован метод PHYLIP Neighbor Joining (программный пакет UGENE). На основании множественного выравнивания (ClustalW) близкородственных белков выделили консенсус, части которого отражают наиболее часто встречающиеся аминокислоты в конкретных последовательностях представителей семейства BMP. Полученные данные множественного выравнивания использовались нами для построения филогенетического дерева методом Jones – Taylor – Thornton.

Поиск гомологов молекул семейства BMP осуществлялся с помощью скрининга глобальной базы данных белковой классификации молекул семейства BMP у других видов животных. Скрининг последовательностей в базе данных осуществлялся с использованием следующих критериев: сырьевой доступности, наибольшей степени структурного подобию с BMP человека.

**Результаты и обсуждения.** В результате анализа источников была спроектирована следующая база данных функциональных свойств представителей семейства BMP в процессе хондрогенеза (см. табл. 1).

Созданная нами база данных, выбранная для исследования представителей семейства BMP, показывает степень участия каждой молекулы BMP в процессе хондрогенеза суставного хряща. Также молекулы BMP непосредственно влияют на процесс remodelирования хряща, определяя его структурную целостность [5].

Таблица 1

**Характеристика белков-представителей семейства BMP, индуцирующие формирование хрящевой ткани**

Представители семейства BMP	Функциональные свойства	Стадии хондрогенеза
BMP1	Деградация внеклеточного матрикса	2
BMP2	Пролиферация и дифференцировка хондроцитов, синтез внеклеточного матрикса	1–3
BMP4	Синтез внеклеточного матрикса	1–2
BMP5	Пролиферация и дифференцировка хондроцитов, синтез внеклеточного матрикса	2
BMP6	Дифференцировка хондроцитов	1
BMP7	Дифференцировка и пролиферация хондроцитов	1–3
BMP8a	Дифференцировка	1
BMP12	Синтез внеклеточного матрикса	2
BMP14	Синтез внеклеточного матрикса и дифференцировка хондроцитов	2

Для построения филогенетического дерева мы составили таблицу, сформированную из 21 уникальной аминокислотной последовательности, анализируемых последовательно представителем семейства BMP (1, 3, 4–8a, 12, 14) (табл. 2).

При помощи базы данных CDD NCBI были соотнесены искомые консервативные

участки с названием домена и выявлены 4 эволюционно закрепившихся домена, определяющие основные функции белков семейства BMP: TGF-b-N, TGF-b-rel, TGF-b-C и TGF-b-CS. Таким образом, способность белков BMP к хондрогенезу в суставном хряще поддерживается, прежде всего, наличием структурных и функциональных доменов, благодаря кото-

Таблица 2

**Уникальные аминокислотные последовательности ряда представителей семейства BMP, задействованные в процесс репарации хрящевой ткани в организме *Ното сариенс* и пригодные для анализа гомологов**

Представители	NCBI RefSeq/UniProtKB
BMP-1	AAA51833
	AAA93462
	CAA69974
	CAA69975
BMP-2	AAA51834
	AAA51835
	ACV32588
	ACV32589
	ACV32591
	ACV32593
	ACV32596
BMP-4	AAH20546
	ACB21039
BMP-5	AAH27958
BMP-6	EAW55219
BMP-7	AAH08584
BMP-8a	AAP74559
BMP-12	AAP97720
	BAD07014
BMP-14	P43026

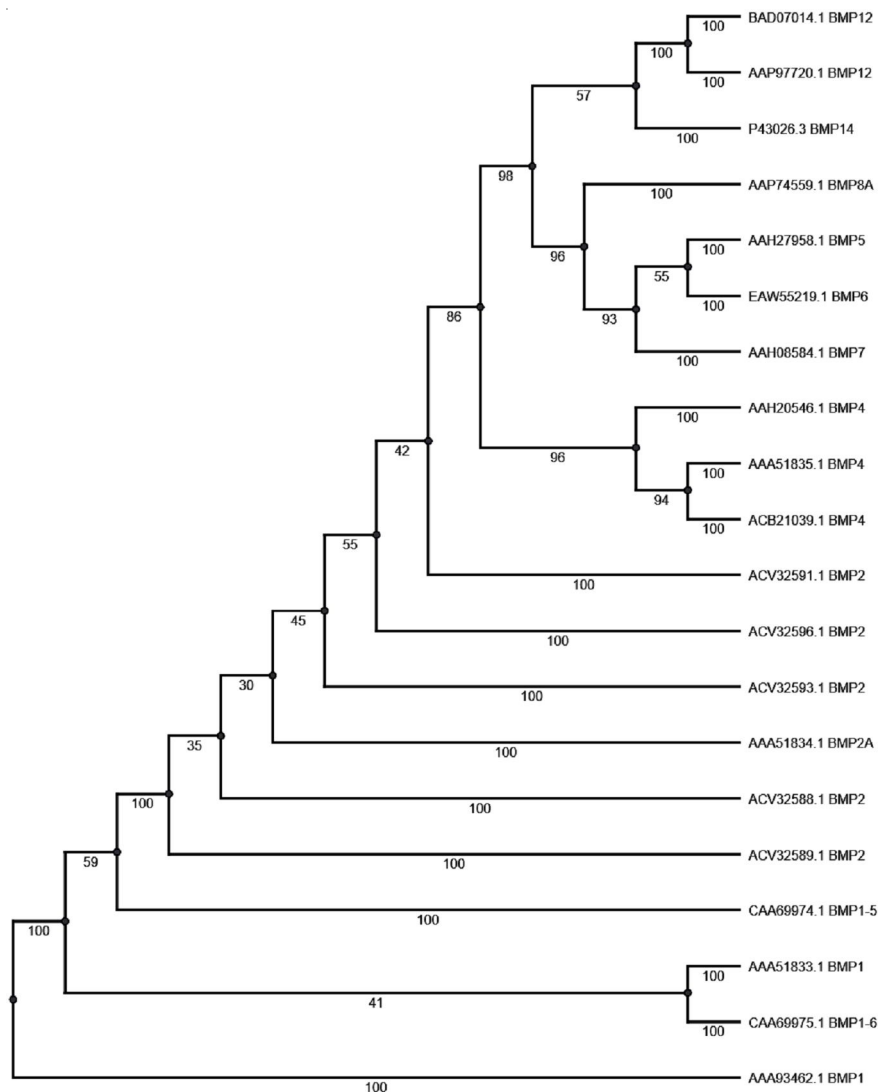
рым представители семейства BMP выполняют свои функции в процессе хондрогенеза. Повреждение структурных доменов ведет к нестабильности молекулы, а повреждение функционального домена – к утрате молекулами BMP способности к связыванию со специфическими рецепторами, приводящее к нарушению передачи сигналов в клетке.

На основании множественного выравнивания (ClustalW) близкородственных белков мы вывели консенсусную последовательность, отражающую наиболее часто встречающиеся аминокислоты в данных положениях в конкретных последовательностях. Результаты множественного выравнивания были использованы для создания филогене-

тического дерева представителей семейства BMP (см. рисунок).

Полученное филогенетическое дерево показывает связь между углами, отражающую количество пермутаций в ходе эволюции представителей семейства BMP. Сходство структурной организации подтверждает эволюционное родство анализируемых последовательностей и позволяет выявить домены монофилетической группы, определяющие основные функции белков.

В результате скрининга глобальной базы данных белковой классификации была создана выборка последовательностей BMP, состоящая из 30 белков, в организмах крупного рогатого скота и домашней птицы. Провели по-



Кладограмма филогенетических связей семейства белков BMP, участвующих в процессе хондрогенеза

парное выравнивание представителей семейства BMP человека с ортологами *Bos taurus* (коровы), *Gallus gallus* (курица). Критерий качества выравнивания аминокислотных последовательностей: более 70 % идентичности при длине более 100 а.о. и E-value превосходящем 0,001. Нами были определены кандидаты, проявляющие наибольшую степень идентичности (98 %): AA105345.1, XP\_005211849.1, XP\_005211850.1, XP\_005211851.1, XP\_005211852.1, XP\_005211853.1 и DAA23024.1. Найденные с помощью биоинформационного поиска ортологи представителей семейства BMP позволяют нам использовать их в тканевой инженерии суставного хряща [8; 12].

**Заключение.** В результате проведенного исследования мы определили консервативные мотивы представителей семейства BMP, свидетельствующие о функциональном эффекте этих молекул и их участии в регуляции процессов во время хондрогенеза и репарации ткани, выявили эффективные гомологи представителей семейства BMP в организмах *Bos taurus* (коровы) и *Gallus gallus* (курица). Их можно использовать как аналоги молекул BMP человека в качестве функционального компонента для скаффолда, используемого для восстановления поврежденных и утраченных тканей суставного хряща.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маланин, Д. А. Восстановление поврежденного хряща в коленном суставе / Д. А. Маланин, В. Б. Писарев, В. В. Новочадов. – Волгоград : Волгогр. науч. изд-во, 2010. – 518 с.
2. Новочадов, В. В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща : (обзор литературы) / В. В. Новочадов // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11, Естественные науки. – 2013. – № 1. – С. 19–28.

3. Новочадов, В. В. Ремоделирование суставного хряща в условиях эндогенной интоксикации / В. В. Новочадов, Н. М. Гайфуллин, Д. М. Фролов // Фундаментальные исследования. – 2012. – №10–2. – С. 271–275.

4. Application of Tissue-Engineered Cartilage with BMP-7 Gene to Repair Knee Joint Cartilage Injury in Rabbits / J. H. Che [et al.] // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. – 2010. – Vol. 18, №2. – P. 496–503.

5. Elder, B. D. Systematic Assessment of Growth Factor Treatment on Biochemical and Biomechanical Properties of Engineered Articular Cartilage Constructs / B. D. Elder, K. A. Athanasiou // Osteoarthritis Cartilage. – 2009. – Vol. 17, № 1. – P. 114–123.

6. FGFR3 Induces Degradation of BMP Type I Receptor to Regulate Skeletal Development / H. Qi [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – Vol. 1843, № 7. – P. 1237–1247.

7. Goldring, M. B. Chondrogenesis, Chondrocyte Differentiation, and Articular Cartilage Metabolism in Health and Osteoarthritis / M. B. Goldring // Ther. Adv. Musculoskelet. Dis. – 2012. – Vol. 4, № 4. – P. 269–285.

8. Kock-Corrinus, L. C. Tissue Engineering of Functional Articular Cartilage: the Current Status / L. C. Kock-Corrinus, C. C. van Donkelaar, K. Ito // Cell Tissue Res. – 2012. – Vol. 347. – P. 613–627.

9. Novochadov, V. V. Growth Factor Technologies in Cartilage Tissue Engineering : (Review) / V.V. Novochadov // European Journal of Molecular Biotechnology. – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 5–10.

10. Omelyanenko, N. P. Connective Tissue: Histophysiology, Biochemistry, Molecular Biology / N. P. Omelyanenko, L. I. Slutsky, S. P. Mironov. – [S. l.] : CRC Press Taylor & Francis Group, 2014. – 630 p.

11. Papathanasiou, I. Bone Morphogenetic Protein-2-induced Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway Activation Through Enhanced Low-Density-Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 Catabolic Activity Contributes to Hypertrophy in Osteoarthritic Chondrocytes / I. Papathanasiou, K. N. Malizos, A. Tsezou // Arthritis Res Ther. – 2012. – Vol. 14, № 2. – P. 82.

12. Zhang, L. The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration / L. Zhang, J. Hu, K. A. Athanasiou // Crit. Rev. Biomed. Eng. – 2009. – Vol. 37, № 1–2. – P. 1–57.

**PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION  
OF BONE MORPHOGENETIC PROTEINS  
AS FINDING THEM EFFECTIVE HOMOLOGUES  
FOR TISSUE ENGINEERING OF CARTILAGE**

**Krylov Pavel Andreevich**

Postgraduate Student, Bioengineering and Bioinformatics Department,  
Volgograd State University  
pavelcarboxyfluorescein@yandex.ru  
Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation

**Lipnitskaya Sofya Alekseevna**

Student, Bioengineering and Bioinformatics Department,  
Volgograd State University  
Lipnitskaya.sofya@gmail.com  
Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation

**Abstract.** The conclusions presented in this article present the results studying structural features members bone morphogenetic proteins family (BMP), which effect on chondrogenesis. We will create database by members bone morphogenetic proteins and discussing the possible ways of molecular evolution of BMP was illustrated and evolutionary modes of the family was assessed. As a result, we found five effective analogues members BMP, interacting with specific receptors of the cartilage.

**Key words:** bone morphogenetic pro, receptors, chondrocyte, phylogenetic tree, database, tissue engineering.