Е.В. Барковский, О.В. Ачинович, С. Г. Барабаш, А. В. Бутвиловский

О ВЕРОЯТНОСТЯХ ТРАНСВЕРСИЙ И ТРАНЗИЦИЙ В МРНК МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ VII ТИПА

Рассмотрение 369 спонтанных точечных мутаций в мРНК аденилатциклазы VII мыши и человека и анализ генетического кода позволяют оценить относительную вероятность трансверсий, оказывающуюся равной 0,20. Рассмотрение 89 несинонимичных мутаций и анализ генетического кода позволяют оценить относительную вероятность трансверсий, оказывающуюся равной 0,21. Рассмотрение 280 синонимичных мутаций и анализ генетического кода позволяют оценить относительную вероятность трансверсий, оказывающуюся равной 0,29.

Ключевые слова:аденилатциклаза, транзиции, трансверсии, синонимичные мутации, несинонимичные мутации.

The investigation of 369 spontaneus point mutations of the mouse and human mRNA of type VII membrane-bounded adenylylcyclase and the analysis of the genetic code make it possible to estimate the relative probability of transversions, wich happens to be 0,20. The investigations of 89 missense mutations and the analysis of the genetic code make it possible to estimate the relative probability of transversions, wich happens to be 0,21. The investigation of 280 silent mutations and the analysis of the genetic code make it possible to estimate the relative probability of transversions, wich happens to be 0,29. Key words: adenylylcyclase, transitions, transversions, silent mutations, missense mutations

Мутации происходят либо спонтанно, либо под влиянием внешних факторов – химических или радиационных воздействий на хромосомы и гены. Следует различать хромосомные мутации – перестройки хромосом и точечные, или генные, мутации. Первые представляют собой изменения надмолекулярных структур, вторые – изменения последовательности нуклеотидов в ДНК и, соответственно, в мРНК [3].

Существует четыре типа точечных мутаций:

1) несинонимичные мутации, состоящие в заменах нуклеотидов в кодонах, меняющие смысл кодона, то есть кодируемый аминокислотный остаток в белке (missense mutations);

2) синонимичные мутации, состоящие в заменах нуклеотидов в кодонах, не меняющие смысл кодона, то есть не меняющие аминокислотный остаток в белке (silent mutations);

3) терминальные мутации, превращающие осмысленный кодон в терминальный УАА, УАГ, УГА (nonsense mutations). Эти мутации, приводящие к обрыву полипептидной цепи, особенно опасны;

4) мутации сдвига рамки (frame shift mutations), то есть делеции нуклеотидов или их включения.

Спонтанные точечные мутации, определяемые заменой одного нуклеотида в кодоне, разделяются на трансверсии и транзиции. Трансверсии – замены пурина на пиримидин и наоборот (А, ГЦ,У), транзиции – замены пурина на пурин и пиримидина на пиримидин (АГ, Ц У).

Настоящая работа посвящена анализу спонтанных точечных мутаций, выявленных при сравнении нуклеотидных последовательностей кодирующих

Репозиторий БГМУ

участков мРНК мембраносвязанной аденилатциклазы VII типа (АЦ VII) мыши и человека.

Материалы и методы

Проанализированы нуклеотидные последовательности кодирующих участков мРНК мембраносвязанной аденилатциклазы VII типа мыши [9] и человека [5].

Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводилось с помощью программы CLUSTAL W [8].

Эволюционное расстояние (К) – среднее число нуклеотидных замен, приходящихся на пару гомологичных сайтов двух сравниваемых последовательностей мРНК, рассчитывали по формуле:

$$K = -\frac{1}{2}\lambda n\,[\,(1-2P-Q)\sqrt{1-2Q}\,], \qquad (1)$$

где Р — частота транзиций, Q — частота трансверсий.

Стандартную ошибку К (sК) рассчитывали по формуле:

$$\sigma_K = \frac{1}{\sqrt{n}}\sqrt{[(a^2P+в^2Q)-(aP+вQ)^2]}, \qquad (2)$$

где а = 1/(1 – 2Р – Q), в = (1/2) Ч [1/(1 – 2Р – Q) + 1/(1 – 2Q)], n – число нуклеотидных сайтов, по которым сравниваются две последовательности.

Скорость эволюционных замен оснований на сайт в год вычисляли по формуле:

k нукл. = К/2Т,

где Т – число лет, прошедших после эволюционной дивергенции двух цепей от общей для них предковой цепи: множитель 2 в знаменателе соответствует двум ветвям подразумеваемого филогенетического древа.

Синонимичную компоненту скорости замен нуклеотидов по третьему положению кодонов (Ksў) оценивали по формуле:

$$K_{ў} = -\frac{1}{2}\lambda n\,(1-2P-Q).$$

Стандартную ошибку Ksў (sKsў) рассчитывали по формуле:

$$\sigma_{ў}' = \frac{\sqrt{[4P+Q-(2P+Q)^2]}}{2(1-2P-Q)\cdot\sqrt{n}}.$$

Средние относительные вероятности трансверсий (w) и транзиций (1 – w) рассчитывали по формуле:

$$\frac{w}{1-w}\cdot p = q,$$

где р – соотношение трансверсии / транзиции согласно таблице генетического кода;

q – соотношение трансверсии / транзиции в сравниваемых нуклеотидных последовательностях.

Среднее число аминокислотных замен, приходящихся на пару гомологичных сайтов двух сравниваемых белков (Каа), рассчитывали по формуле:

Репозиторий БГМУ

$$K_{aa} = -\ln(1 - Pd - 1/5Pd^2),$$

где Pd = daa/naa – доля 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 Каа () 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 = Kaa/2T.

Для оценки степени сходства взаимозаменяемых аминокислотных остатков использовали коэффициент химического сходства Снита (f) [7], показатель функционально близости (ФБА) [1] и значения разности гидрофобностей аминокислот (DH) [2].

Результаты и обсуждение

1. Несинонимичные и синонимичные мутации

Последовательности мРНК АЦ VII мыши и человека сравнивались по 3237 нуклеотидным сайтам, соответствующим 1079 кодонам (аминокислотным сайтам). В 243 сайтах этих двух последовательностей обнаруживаются различия по типу транзиции, а в 126 – по типу трансверсии. Таким образом, P = 0,0751, Q = 0,0389, и мы получаем K = 0,121 ± 0,006. Поскольку грызуны и приматы дивергировали около 80 млн. лет назад (T = 8Ч107), то скорость эволюции этих последовательностей в расчете на сайт будет равна kнукл.= K/2T = 0,76Ч10–9 в год. Эта величина представляет собой общую скорость замен в расчете на сайт, однако гораздо интереснее оценить скорость эволюции для каждого из трех положений кодонов. Для первого положения, по которому, как и по двум другим, сравнивалось 1079 сайтов, P1=0,0306, Q1 = 0,0204, что дает K1 = 0,053±0,006 (индекс 1 указывает, что значение K относится к первому положению кодонов). Аналогичным образом для второго положения имеем P2=0,0222, Q2 = 0,0093, так что K2 = 0,032±0,005. И, наконец, для третьего поло

жения P3=0,1724, Q3 = 0,0871, теперь K3 = 0,325±0,0020, что намного больше, чем в первых двух случаях. Таким образом, получаем соотношение K3 > K1 > K2, из которого следует, что наибольшая скорость мутационных замен характерна для третьего положения кодонов, меньшая для первого и самая маленькая – для второго. Эта закономерность может быть объяснена только после анализа скоростей несинонимичных и синонимичных мутационных замен.

Теперь оценим синонимическую компоненту эволюционного расстояния по третьему положению. Вычисление ее с помощью формулы (4) дает Ksў= 0,275±0,020. Скорость эволюции за год по трем положениям кодона и для синонимичной компоненты составляет k1= 0,33Ч10–9, k2= 0,20Ч10–9 и k3= 2,03Ч10–9, а k sў= 1,72Ч10–9 на нуклеотидный сайт в год.

Репозиторий БГМУ

Отношение числа трансверсий к числу транзиций, выявленных при сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей мРНК АЦ VII мыши и человека составляет q = 126/243 = 0,52. Для нахождения относительных вероятностей трансверсий и транзиций необходимо найти их возможные числа согласно таблице генетического кода. Всего возможно 64Ч9 = 576 однократных замещений в кодонах. Из них в 50 замещениях фигурируют терминальные кодоны, 134 замены являются синонимичными и 392 замены – несинонимичными [3]. Нами были рассмотрены 526 мутаций, включающих синонимичные и несинонимичные замены. Из них 350 трансверсий и 176 транзиций. Их соотношение равно p = 350/176 = 1,99. Находим средние относительные вероятности трансверсий w и транзиций 1– w из формулы (5). Получаем w = 0,20, 1– w = 0,80. Транзиции в среднем в четыре раза более вероятны, чем трансверсии.

Перейдем к оценке относительных вероятностей отдельных несинонимичных и синонимичных замещений в кодонах мРНК. Данные о мутациях nM, полученные при сравнительном анализе выравненных нуклеотидных последовательностей мРНК АЦ VII мыши и человека приведены в табл. 1. В этой таблице приведены также данные кодовой таблицы (nК). Сравнивая значения nM и nК, находим относительные вероятности отдельных замещений wi:

$$w_i \cdot \frac{n_к}{526} = \frac{n_м}{369}.$$

Нормированные к единице значения wi также приведены в табл. 1.

Таблица 1

Числа наблюдаемых мутаций $n_м$, числа мутаций $n_к$, следующие из кодового словаря, и относительные вероятности замещений нуклеотидов w_i при сравнительном анализе мРНК аденилатциклазы VII мыши и человека

Заменяемый нуклеотид	Замещающий нуклеотид											
	А			Г			Ц			У		
	$n_м$	$n_к$	w_i	$n_м$	$n_к$	w_i	$n_м$	$n_к$	w_i	$n_м$	$n_к$	w_i
А	–	–	–	71	43	0,20	**23**	**44**	**0,06**	**7**	**41**	**0,02**
Г	**25**	**43**	**0,07**	–	–	–	23	46	0,06	10	44	0,03
Ц	13	44	0,04	25	46	0,07	–	–	–	**38**	**45**	**0,10**
У	6	41	0,02	19	44	0,05	**109**	**45**	**0,29**	–	–	–

Транзиции выделены жирным шрифтом.

Из этой таблицы следует, что вероятности транзиций ЦУ (0,29 + 0,10 = 0,39) значительно превосходят не только вероятности трансверсий АЦ, АУ, ГЦ, ГУ, но и транзиций АГ (0,20+0,07=0,27). Очевидно, что найденные таким образом вероятности wi характеризуют именно сравниваемые мРНК, а не кодируемые ими белки.

2. Несинонимичные мутации

Для характеристики аминокислотных последовательностей АЦ VII мыши и человека были проанализированы только несинонимичные однократные замещения нуклеотидов в кодирующих их мРНК. Всего выявлено 89 таких замен. Из них 35 трансверсий и 54 транзиции, отношение этих чисел q= 0,65. Согласно таблице генетического кода, из 392 несинонимичных замен 116 являются трансверсиями, а 276 транзициями [3]. Откуда p = 2,38. Подставляя приведенные значения q и p в формулу (6), имеем w = 0,21, а 1– w = 0,79.

Таким образом, как и для всей совокупности несинонимичных и синонимичных однократных замен нуклеотидов в мРНК, так и только для несинонимичных однократных замен транзиции почти в четыре раза более вероятны, чем трансверсии.

Поскольку общее число несинонимичных замен нуклеотидов в кодонах мРНК АЦ VII мыши и человека равно наблюдаемому числу замен аминокислот в кодируемых ими аминокислотных последовательностях, то, воспользовавшись формулами (7 – 9), получаем Каа = 0,087 ± 0,009 и kaa = 0,54Ч10–9 на сайт в год.

Из сопоставления значений kнукл.(0,76Ч10–9) и kaa (0,54Ч10–9) следует, что скорость эволюции нуклеотидных последовательностей мРНК АЦ VII мыши и человека в 1,4 раза больше скорости эволюции соответствующих аминокислотных последовательностей, что связано с вкладом в величину kнукл. синонимичных замен нуклеотидов в кодонах мРНК (см. раздел 3).

Для несинонимичных замен имеем P = 0,0167 и Q = 0,0108. Тогда К = 0,028 ±0,002, а kнукл.= 0,18Ч10–9 на сайт в год. Последняя величина представляет собой общую скорость несинонимичных замен во всех трех положениях кодонов. Для первого положения (30 транзиций и 15 трансверсий) P1 = 0,0278, Q1 = 0,0139, К1 = 0,043±0,005, k1 = 0,27Ч10–9 на сайт в год; для второго положения (24 транзиции и 10 трансверсий) P2 = 0,0222, Q2 = 0,0093, К2 = 0,032±0,005, k2 = 0,20Ч10–9 на сайт в год; для третьего положения (транзиции отсутствуют, 10 трансверсий) P3 = 0, Q3 = 0,0093, К3 = 0,0094±0,0007, k3 = 0,06Ч10–9 на сайт в год.

Таким образом, имеем соотношение К1 > К2 > К3, из которого следует, что наибольшая скорость несинонимичных замен характерна для первого положения кодонов, меньшая для второго и самая маленькая – для третьего. В рамках теории нейтральности [4] легко объяснить соотношение К1 > К2, так как замены нуклеотидов во втором положении сопровождаются заменой на такие аминокислоты, физико-химические и функциональные свойства которых отличаются от свойств замещаемых аминокислот значительно сильнее, чем в случае замен по первому положению (табл.2, последняя строка). Что же касается соотношения К2 > К3, то, по-видимому, очень низкая скорость несинонимичных замен нуклеотидов в третьем положении кодонов обусловлена селективными ограничениями не физико-химического и функционального характера, а какого-то другого типа.

Таблица 2

Показатели химического сходства (f), функциональной близости (ФБА) и изменения гидрофобностей (ДН, ккал/моль) взаимозамещаемых аминокислотных остатков в первичной структуре аденилатциклазы VII мыши и человека

Тип замены	I положение			II положение			III положение			I+II+III		
	f	ФБА	DH	f	ФБА	DH	f	ФБА	DH	f	ФБА	DH
Ал Г	0,521	23,5	0,61	0,362	12,8	0,93	–	–	–	0,465	19,8	0,72
Ал Ц	0,525	16,0	1,21	0,296	9,2	1,74	**0,406**	**12,0**	**1,30**	0,395	12,1	1,49
Ал У	**0,515**	**15,0**	**1,12**	0,501	10,0	2,32	–	–	–	0,506	11,7	1,92
Гл Ц	0,723	22,0	0,83	**0,659**	**29,0**	**0,63**	0,510	15,0	1,07	0,636	19,7	0,90
Гл У	0,460	14,0	0,66	0,417	5,7	1,36	0,512	19,2	1,07	0,467	9,4	1,00
Цр У	0,429	12,2	1,70	0,497	9,3	1,09	–	–	–	0,470	10,5	1,34
средние величины	0,532	17,5	1,00	0,403	9,4	1,49	0,511	17,1	1,07	0,490	13,9	1,23

Жирным шрифтом указаны замещения, встречающиеся только один раз и не учитывающиеся при расчете средних величин.

В табл. 3 приведены данные о несинонимичных мутациях (nM), полученные при анализе сравниваемых мРНК АЦ VII мыши и человека (точно такие же данные могут быть получены при сравнении соответствующих аминокислотных

последовательностей), данные кодовой таблицы (nК) и относительные вероятности отдельных замещений (wi), найденные из соотношения:

$$wi \cdot \frac{n_K}{392} = \frac{n_w}{89}$$

Имеется существенное различие в вероятностях замещений, найденных из первичных структур белков (табл.3) и непосредственно из первичных структур мРНК (табл.1). В первом случае вероятности транзиций АГ (0,32 + 0,08 = 0,40) существенно превосходят вероятности трансверсий и транзиций ЦУ (0,10 + 0,14 = 0,24), во втором случае, как указывалось выше, имеет место прямо противоположная ситуация.

По-видимому, замещения АГ дает меньшую долю опасных мутаций в белках, чем другие замещения. М.В. Волькенштейн считает, что аминокислотные остатки, связанные переходами АГ, существенно ближе друг к другу, чем связанные другими переходами [2,3]. В самом деле, переходам АГ отвечают наименьшие изменения гидрофобностей и наибольшие значения показателя функциональной близости аминокислотных остатков. Напротив, переходам ЦУ отвечают почти вдвое бульшие изменения гидрофобностей и вдвое более низкие значения показателя функциональной близости аминокислот (табл. 2).

3. Синонимичные мутации

Согласно кодовому словарю, из 134 синонимичных мутаций 74 являются трансверсиями и 60 транзициями – отношение числа трансверсий к числу транзиций p = 1,23.

При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей мРНК АЦ VII мыши и человека найдено 280 синонимичных замен нуклеотидов, среди которых 91 трансверсия и 189 транзиций (q=0,50). Исходя из формулы (1), w= 0,29, а 1– w = 0,71. Таким образом, трансверсии среди синонимичных замен почти в 1,5 раза более вероятны, чем среди несинонимичных замен.

Используя формулы (1 – 3), получаем К = 0,147±0,008, kнукл.= 0,92Ч10–9 на сайт в год. Таким образом, скорость синонимичных замен (0,92Ч10–9) в 5 раз выше таковой для несинонимичных замен (0,18Ч10–9). Именно этим обстоятельством и объясняется более высокая общая скорость эволюции сравниваемых последовательностей мРНК (0,76Ч10–9 на нуклеотидный сайт в год) по сравнению с соответствующими аминокислотными последовательностями (0,54Ч10–9 на аминокислотный сайт в год).

Для первого положения (3 транзиции и 7 трансверсий) P1 = 0,0028, Q1 = 0,0065, К1 = 0,0066±0,0007, k1 = 0,04Ч 10–9 на сайт в год. Для второго положения замены не являются синонимичными. Для третьего положения P3 = 0,1724, Q3 = 0,0778,

К3 = 0,3164±0,0196, k3 = 1,98Ч10–9 на сайт в год. Скорость синонимичных замен по третьему положению кодонов в 50 раз выше скорости синонимичных замен по первому положению.

Легко рассчитать, что скорость синонимичных замен по первому положению (0,04Ч10–9) ~ в 7 раз ниже таковой для несинонимичных замен (0,27Ч10–9), а по третьему положению (1,98Ч10–9), наоборот, более чем в 30 раз выше таковой для несинонимичных замен (0,06Ч10–9).

Тот факт, что средняя скорость синонимичных замен выше, чем несинонимичных для разных генов, был установлен рядом исследователей [4,6]. Полученная нами расчетная оценка для синонимичной компоненты скорости замен в третьем

Репозиторий БГМУ

положении кодонов составляет ksў= 1,72Ч10–9 на сайт в год, а истинная скорость синонимичных замен для третьего положения составляет 1,98Ч10–9 на сайт в год. Как видим, эти величины не очень отличаются одна от другой.

Таблица 3

Числа наблюдаемых несинонимичных мутаций $n_н$, числа несинонимичных мутаций $n_к$, следующие из кодового словаря, и относительные вероятности замещений нуклеотидов при сравнительном анализе мРНК аденилатциклазы VII мыши и человека

Заменяемый нуклеотид	Замещающий нуклеотид											
	А			Г			Ц			У		
	$n_н$	$n_к$	wi	$n_н$	$n_к$	wi	$n_н$	$n_к$	wi	$n_н$	$n_к$	wi
А	–	–	–	**27**	**31**	**0,32**	3	33	0,03	1	32	0,01
Г	**7**	**31**	**0,08**	–	–	–	4	38	0,04	6	35	0,06
Ц	5	33	0,06	9	38	0,09	–	–	–	**7**	**27**	**0,10**
У	2	32	0,02	5	35	0,05	**13**	**27**	**0,14**	–	–	–

Транзиции выделены жирным шрифтом.

Таблица 4

Числа наблюдаемых синонимичных мутаций $n_н$, числа синонимичных мутаций $n_к$, следующие из кодового словаря, и относительные вероятности замещений нуклеотидов при сравнительном анализе мРНК аденилатциклазы VII мыши и человека

Заменяемый нуклеотид	Замещающий нуклеотид											
	А			Г			Ц			У		
	$n_н$	$n_к$	W_i	$n_н$	$n_к$	W_i	$n_н$	$n_к$	W_i	$n_н$	$n_к$	W_i
А	–	–	–	**44**	**12**	**0,16**	20	11	0,09	6	9	0,03
Г	**17**	**12**	**0,06**	–	–	–	20	8	0,11	4	9	0,02
Ц	8	11	0,03	15	8	0,09	–	–	–	**31**	**18**	**0,08**
У	4	9	0,02	14	9	0,07	**97**	**18**	**0,24**	–	–	–

Транзиции выделены жирным шрифтом.

Рассмотрим относительные вероятности отдельных синонимичных замещений wi в кодонах мРНК (табл. 4), рассчитанные по формуле:

$$w_i = \frac{n_к}{134} = \frac{n_н}{280}.$$

Сопоставление данных, представленных в табл. 3 и 4, позволяет объяснить более высокое значение относительной вероятности синонимичных трансверсий по сравнению

с несинонимичными. Во-первых, это обусловлено почти двухкратным уменьшением относительной вероятности синонимичных транзиций АГ, а во вторых, трехкратным увеличением относительных вероятностей синонимичных трансверсий АЦ и АУ по сравнению с несинонимичными.

Анализ приведенных данных по частотам спонтанных мутаций в кодирующих участках мРНК позволяет сделать следующие выводы: 1) могут происходить всевозможные замены пар оснований; 2) вероятность транзиций выше, чем трансверсий; 3) частота разных трансверсий как для всей совокупности синонимичных и несинонимичных замен, так и по отдельности для синонимичных и несинонимичных замен различны и могут быть расположены в ряд ГЦУА > ГЦЦГ> АУУА; 4) замены в разных направлениях могут происходить с разной частотой.

Литература

1. Бачинский А.Г. Структура и помехоустойчивость генетического кода.//Ж. общей биол.–1976.–Т.37.–С.163 – 173.

2. Волькенштейн М.В. Вероятности трансверсий транзиции//Мол.биол.– 1976.– Т.10, №4.–С.737 – 741.
3. Волькенштейн М.В. Биофизика. М., 1981.
4. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. – М., 1985.
5. Hellevuo K., Berry R., Sikela J.M. et al. Localization of the gene for a novel human adenylyl cyclase (ADCY7) to chromosome 16//Hum. Genet.–1995.–Vol.95, N2.–P.197 – 200.
6. Miyata T., Yasunaga T., Nishida T. Nucleotide sequence divergence and functional constraint in mRNA evolution//Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1980.– Vol.77.–P.7328 – 7332.
7. Sneath P.H.A. Relations between chemical structure and biological activity in peptides//J.Theoret. Biol.–1966.–Vol. 12, N2.–P.157 – 195.
8. Tompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions - specific gap penalties and weight matrix choice//Nucl. Acids Res.–1994.–Vol.22.–P.4673–4680.
9. Watson P.A., Krupinski J., Kempinski A.M. et al. Molecular cloning and characterization of the type VII isophorm of mammalian adenylyl cyclase//J.Biol.Chem.–1994.–Vol.269.–P.28893–28898.

Репозиторий БГМУ