

В.Э. Бутвиловский, Е.А Черноус, К.В. Синюк, А.В. Бутвиловский

Механизмы направленного мутационного давления в ДНК, кодирующих ряд белков дыхательной цепи человека, трихинеллы и цианорабдитис. Сообщение 1. Модель механизмов мутационного давления в мтДНК человека и трихинеллы

Белорусский государственный медицинский университет

На основании анализа динуклеотидного состава и мутаций в генах, кодирующих 11 белков дыхательной цепи человека и трихинеллы, нами разработана модель механизмов действующего в них направленного мутационного давления.

Дистанция динуклеотидного состава для изученных генов человека и трихинеллы достоверно меньше таковой для генов человека и цианорабдитис. Установлено, что основным субстратом для действия мутационного давления в мтДНК трихинеллы являются аденин-содержащие динуклеотиды (АА, АЦ, ЦА, АТ, ТА), а основным типом мутаций – происходящие в них трансверсии А→Ц и А→Т.

Ключевые слова: мутационное давление, механизмы мутационного давления, белки дыхательной цепи, трихинелла.

Секвенирование большого количества последовательностей нуклеиновых кислот предоставило исследователям широкие возможности для изучения содержащейся в них информации. При ее анализе были выявлены некоторые особенности нуклеотидного состава ДНК, которые сложно было объяснить в рамках теории нейтральной эволюции М. Кимуры [3]. Такими особенностями являются: 1) колебания ГЦ-содержания ДНК различных видов бактерий от 25 до 75% [on the genetic basis]; 2) влияние филогенетических отношений на значение ГЦ-содержания: близкородственные виды имеют схожий состав азотистых оснований ДНК; 3) гетерогенность ГЦ-содержания внутри генома одного вида. Для объяснений этих закономерностей Н. Суеоккой была разработана теория направленного мутационного давления, постулирующая существование преобладающего направления мутаций, которое приводит к повышению или снижению ГЦ-содержания в молекулах ДНК (и соответственно мРНК) в ряду поколений [11, 12]. Установлено, что мутационное давление – это фактор молекулярной эволюции, обусловленный повышенной частотой возникновения и фиксации замен аденина и тимина на гуанин и цитозин относительно частоты возникновения и фиксации замен гуанина и цитозина на аденин и тимин (ГЦ-давление), или наоборот (АТ-давление) [2]. Определенной силе мутационного давления соответствует определенный нуклеотидный состав, достигнув которого прекратится фиксация мутаций в данном направлении.

Направленное мутационное давление реализуется благодаря определенным молекулярным механизмам. Так, например, основным молекулярным механизмом изменения направления мутационного давления в ДНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы класса 3 хордовых животных, являются ЦГ→ТГ мутации, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина [1]. К настоящему времени накоплена информация о механизмах мутационного давления в ряде ДНК (в

основном бактерий и вирусов), однако отсутствуют данные о механизмах мутационного давления в ДНК, кодирующих белки человека и трихинеллы как компонентов системы «паразит-хозяин», формирующейся при трихинеллезе. Цель работы: определить механизмы мутационного давления в генах, кодирующих белки дыхательной цепи человека и трихинеллы.

Задачи исследования:

1. Сопоставить динуклеотидный состав генов, кодирующих ряд белков дыхательной цепи человека и трихинеллы.
2. Установить основные субстраты мутационного давления в генах, кодирующих ряд митохондриальных белков человека и трихинеллы.
3. Определить основные виды мутаций, лежащих в основе направленного мутационного давления в мтДНК человека и трихинеллы.

Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования с сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) взяты последовательности ДНК, кодирующих субъединицы НАДН-дегидрогеназы (1-6 и 4L), субъединицы 1-3 цитохром-с-оксидазы, цитохром b человека (*H. sapiens* [10]), трихинеллы (*T. spiralis*, опыт [9]) и свободноживущей нематоды цианорабдитис (*C. elegans*, контроль [13]). Разбивка ДНК на динуклеотиды, подсчет количества отдельных типов динуклеотидов и их разницы в ДНК человека и трихинеллы, ДНК человека и цианорабдитис произведены в программе Microsoft Excel 2007. Сходство динуклеотидного состава изучаемых ДНК оценено по дистанции динуклеотидного состава [4]. Выравнивание последовательностей выполнено с помощью программы ClustalW (на матрице Gonnet при стандартных условиях) в пакете MEGA 4 [7, 8]. Полученные результаты обработаны методами описательной статистики в программе Microsoft Excel, корреляционный анализ выполнен с помощью коэффициента Пирсона, достоверность различий определена по критериям χ^2 и Стьюдента [5, 6].

Результаты и обсуждение. Определение разницы количества отдельных типов динуклеотидов (табл. 1) позволило установить достоверное ($p < 0,001$) снижение содержания АА-динуклеотидов в изучаемых генах человека по сравнению с таковыми трихинеллы на 38,25%, а также ряда аденин-содержащих динуклеотидов: ГА – на 23,24%, АТ – на 14,41%, АЦ – на 12,21% и ЦА – на 10,98%. При этом наблюдается достоверный ($p < 0,001$) рост количества цитозин-содержащих динуклеотидов: ГЦ – на 131,98%, ЦЦ – на 73,06%, ЦТ – на 71,98% и ТЦ – на 51,47%.

Таблица 1

Содержание отдельных типов динуклеотидов в исследуемых ДНК человека, трихинеллы, цианорабдитис, % (абсолютное количество)

Динуклеотид / организм	<i>H. sapiens</i>	<i>T. spiralis</i>	<i>C. elegans</i>
АТ	7,92 (831)	9,95 (971)	12,30 (1177)
АЦ	9,17 (963)	11,24 (1097)	3,14 (300)
АГ	4,09 (429)	4,59 (448)	5,68 (543)
АА	8,36 (878)	14,57 (1422)	8,36 (800)
ТА	8,34 (875)	9,62 (939)	13,24 (1267)
ТТ	5,89 (618)	5,92 (578)	24,05 (2301)
ТЦ	8,35 (877)	5,93 (579)	3,23 (309)
ТГ	2,81 (295)	2,07 (202)	5,42 (519)
ЦА	9,50 (997)	11,47 (1120)	3,44 (329)
ЦТ	9,65 (1013)	6,03 (589)	3,65 (349)
ЦЦ	11,26 (1182)	7,00 (683)	1,36 (130)
ЦГ	2,73 (287)	1,68 (164)	0,78 (75)
ГА	3,33 (350)	4,67 (456)	4,41 (422)
ГТ	1,94 (204)	1,64 (160)	5,95 (569)
ГЦ	4,35 (457)	2,02 (197)	1,51 (144)
ГГ	2,30 (241)	1,60 (156)	3,48 (333)
всего	100,0 (10497)	100,0 (9761)	100,0 (9567)

В контроле, как и в опыте, замечено достоверное ($p < 0,001$) снижение числа динуклеотидов АТ – на 29,40% и рост числа ЦЦ, ГЦ, ЦТ и ТЦ-динуклеотидов соответственно в 9,1; 3,2; 2,9 и 2,8 раза. Полученные данные позволяют предположить наличие направленного ГЦ-давления в изучаемых ДНК контроля и опыта, проявляющегося в повышении содержания цитозин-содержащих динуклеотидов.

Вместе с тем в изучаемых генах человека по сравнению с таковыми цианорабдитис наблюдается значимое ($p < 0,001$) снижение количества динуклеотидов ТТ – на 73,14%, ГТ – на 64,15%, ТГ – на 43,16%, ТА – на 30,94%, АГ – на 20,99% и увеличение количества АЦ, ГЦ и ЦА фрагментов соответственно в 3,2; 3,2 и 3,0 раза.

Полученные данные наводят на мысль о том, что в изучаемых ДНК человека и трихинеллы мутационное давление реализуется путем перехода адениновых динуклеотидов в содержащие цитозин и тимин динуклеотиды, в отличие от ДНК человека и цианорабдитис, где более вероятным механизмом направленного давления представляется транзиция Т→Ц.

Дистанция динуклеотидного состава для изучаемых ДНК человека и трихинеллы составляет $0,121 \pm 0,0263$, что в 2,45 раза меньше таковой для изучаемых ДНК человека и цианорабдитис ($0,296 \pm 0,0706$, $p < 0,05$).

Анализ различий в содержании динуклеотидов в каждой паре изучаемых ДНК человека и трихинеллы (табл. 2) показал наличие достоверных связей ($p < 0,05$) между уменьшением количества динуклеотидов АЦ, ЦА, АА и увеличением числа ТТ, ТЦ, ТГ, ЦТ, ГТ, ГЦ и ГГ динуклеотидов (табл. 3). Связь между разницей числа данных групп динуклеотидов в изучаемых ДНК человека и трихинеллы является обратной и сильной ($r = -0,98 \pm 0,063$) и достоверно ($p < 0,001$) отличается от таковой в изучаемых ДНК человека и цианорабдитис ($r = -$

0,31±0,32). Уравнение регрессионного анализа для данных показателей в ДНК человека и трихинеллы имеет вид: $y = -1,39x + 10,1$, где $x = \Delta AЦ + \Delta ЦА + \Delta AA$ и $y = \Delta TT + \Delta TЦ + \Delta TG + \Delta ЦT + \Delta GT + \Delta GC + \Delta GG$ (рис. 1).

Таблица 2

Разница числа динуклеотидов в исследуемых ДНК человека и трихинеллы

Динуклеотид/ ДНК	НАДН-ДГ1	НАДН-ДГ2	НАДН-ДГ3	НАДН-ДГ4	НАДН-ДГ4L	НАДН-ДГ5	НАДН-ДГ6	Цитb	ЦО1	ЦО2	ЦО3	Общее
АТ	-15	11	-12	11	11	3	-23	-36	-50	-18	-22	-140
АЦ	2	-37	5	-24	-14	-45	19	3	-10	-5	-27	-133
АГ	-15	5	1	-11	8	22	7	-20	1	-13	-4	-19
АА	-38	-85	2	-140	-38	-137	17	-18	-32	-25	-50	-544
ТА	-23	30	-6	28	20	29	-20	-39	-46	-9	-31	-67
ТТ	-26	38	-19	50	6	57	-32	-20	-30	-4	20	40
ТЦ	27	46	-8	77	11	86	0	19	16	11	15	300
ТГ	8	12	-3	21	9	21	-4	-1	16	3	11	93
ЦА	11	-37	2	-39	-17	-46	23	6	-3	-15	-8	-123
ЦТ	28	72	1	106	24	115	1	23	25	20	9	424
ЦЦ	72	56	28	8	0	63	57	76	60	30	49	499
ЦГ	13	8	3	16	4	15	3	20	15	16	10	123
ГА	-16	-15	-3	-14	2	-3	0	-20	-10	-13	-14	-106
ГТ	-1	5	-5	9	4	17	-1	-7	11	3	9	44
ГЦ	23	35	9	31	15	44	7	27	31	15	23	260
ГГ	6	10	0	13	6	14	0	6	3	10	17	85

Таблица 3

Коэффициенты корреляции между разницей содержания ряда динуклеотидов в исследуемых ДНК человека и трихинеллы ($p < 0,05$)

Динуклеотиды	ΔTT	$\Delta TЦ$	ΔTG	$\Delta ЦT$	ΔGT	ΔGC	ΔGG
$\Delta AЦ$	-0,90±0,14	-0,76±0,22	-0,83±0,19	-0,77±0,21	-0,80±0,20	-0,80±0,20	-0,80±0,20
$\Delta ЦА$	-0,93±0,12	-0,81±0,19	-0,78±0,21	-0,86±0,17	-0,71±0,24	-0,70±0,24	-0,70±0,24
ΔAA	-0,91±0,14	-0,97±0,09	-0,89±0,15	-0,96±0,09	-0,74±0,23	-0,82±0,19	-0,75±0,22

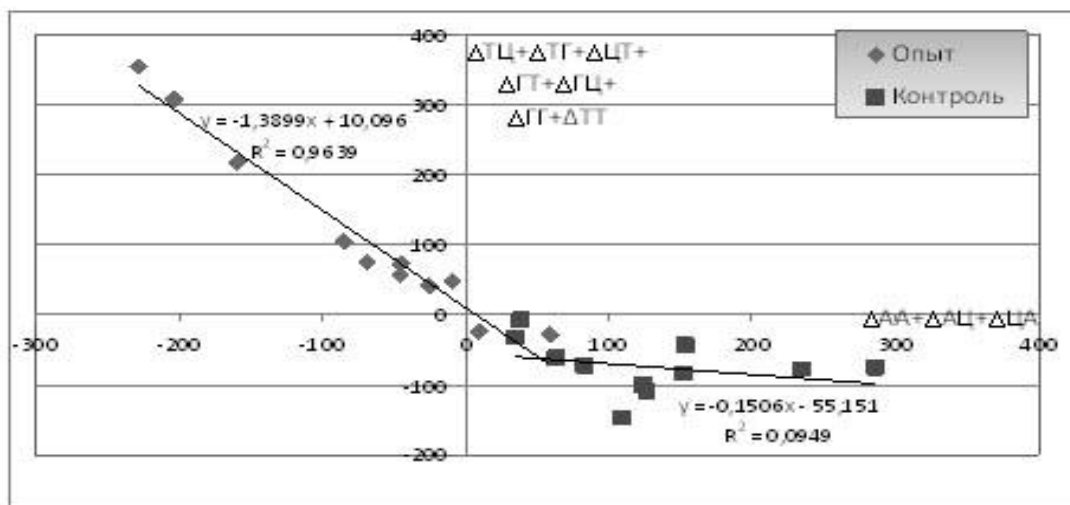


Рисунок 1. Зависимость разницы содержания ТЦ+ТГ+ЦТ+ТГ+ГЦ+ГГ динуклеотидов от $\Delta AA + \Delta AЦ + \Delta ЦА$ динуклеотидов в сравниваемых ДНК человека и трихинеллы (опыт), человека и цианорабдитис (контроль)

Таким образом, на основании изменений динуклеотидного состава изучаемых ДНК человека и трихинеллы можно предположить, что основным механизмом мутационного давления в них является переход аденина динуклеотидов АА, ЦА, АЦ в цитозин, гуанин и меньшей мере тимин соответствующих динуклеотидов (табл. 4).

Полученные корреляционные зависимости, однако, не отражают количество переходов динуклеотидов одного типа в другой и позволяют предполагать лишь о наличии определенного направления мутационного давления в исследуемых ДНК. Для проверки выдвинутой гипотезы изучены мутации динуклеотидов в попарно выровненных ДНК человека и трихинеллы, а также человека и цианорабдитис.

Изучение выровненных ДНК человека и трихинеллы (табл. 4) позволило подтвердить и уточнить выдвинутую гипотезу о переходе А→Ц, Т в некоторых аденин-содержащих динуклеотидах (рис. 2).

Таблица 4

Мутации в динуклеотидах исследуемых ДНК, произошедшие в процессе эволюции от трихинеллы к человеку

Tr.sp./Hs.	АТ	АЦ	АГ	АА	ТА	ТТ	ТЦ	ТГ	ЦА	ЦТ	ЦЦ	ЦГ	ГА	ГТ	ГЦ	ГГ
АТ	193	116	28	57	48	84	41	22	39	152	66	13	17	34	41	10
АЦ	93	261	33	69	55	48	80	12	85	73	143	21	24	16	54	6
АГ	25	26	78	43	20	10	33	25	28	27	31	31	9	4	24	20
АА	107	117	77	273	103	44	100	20	152	88	140	35	44	19	52	28
ТА	47	45	37	67	215	73	127	38	84	56	74	13	15	8	14	11
ТТ	40	30	10	17	85	114	71	16	22	86	36	7	15	9	8	4
ТЦ	20	53	15	35	75	42	144	8	37	18	64	10	9	5	22	14
ТГ	13	10	13	6	14	6	10	47	7	18	14	24	4	2	8	5
ЦА	62	82	40	99	73	49	61	32	222	122	146	29	27	15	32	13
ЦТ	73	21	11	38	32	45	19	11	55	158	59	11	7	16	22	3
ЦЦ	21	58	22	41	38	18	42	11	74	64	212	20	12	5	21	6
ЦГ	4	7	18	8	3	3	6	15	15	16	10	42	5	0	5	4
ГА	12	37	9	36	28	9	25	5	44	20	49	4	113	13	32	11
ГТ	23	8	2	4	8	7	8	1	11	16	7	0	5	36	20	3
ГЦ	9	8	4	10	5	4	25	1	24	10	17	0	11	9	51	7
ГГ	5	8	5	6	4	3	9	1	7	4	8	1	5	1	13	73

Примечание. Светло-серым цветом выделены значения, показывающие количество динуклеотидов, в которых не наблюдаются мутации, темно-серым – часто встречающиеся (≥ 100) переходы одного типа динуклеотидов в другой.

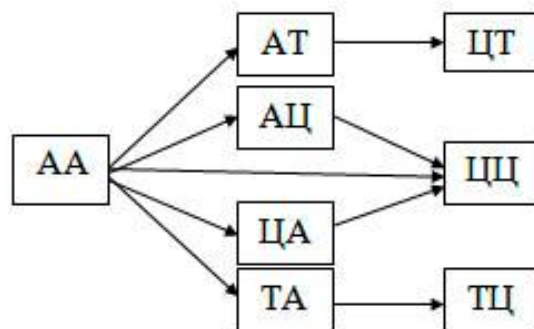


Рисунок 2. Модель механизмов мутационного давления в мтДНК человека и трихинеллы.

Доля мутировавших динуклеотидов АА, в которых наблюдаются замены в соответствии с описываемой моделью, равна $54,97 \pm 1,48\%$ и достоверно больше мутаций в них, происходящих по другим механизмам ($p < 0,001$). Так, $9,50 \pm 0,87\%$ и $9,15 \pm 0,86\%$ от общего количества мутировавших АА фрагментов переходят соответственно в АТ и ТА посредством мутации А→Т, большее число динуклеотидов АА переходят в цитозин содержащие ЦЦ ($12,43 \pm 0,98\%$), ЦА ($13,50 \pm 1,02\%$), АЦ ($10,39 \pm 0,91\%$). Переход динуклеотидов АЦ→ЦЦ и ЦА→ЦЦ в результате трансверсии А→Ц составляет $17,63 \pm 1,34\%$ и $16,55 \pm 1,25\%$, соответственно. Аденин в динуклеотидах АТ и ТА в $19,79 \pm 1,43\%$ и $17,91 \pm 1,44\%$ мутаций соответственно заменяется на цитозин, что приводит к возникновению динуклеотидов ЦТ и ТЦ. Необходимо отметить дополнительную возможность перехода динуклеотидных фрагментов ЦА в ЦТ ($13,83 \pm 1,16\%$ мутаций). Подтверждением действия предложенного механизма мутационного давления является сильная отрицательная достоверная связь ($r = -0,79 \pm 0,20$, $p < 0,01$) между разностью количества динуклеотидов $\Delta AA + \Delta AC + \Delta CA + \Delta TA + \Delta AT$ и $\Delta TT + \Delta TC + \Delta CT$ в изучаемых ДНК человека и трихинеллы. Еще одним доказательством предложенной нами модели являются результаты анализа типов мутаций, наблюдаемых при выравнивании изучаемых ДНК (рис. 3).

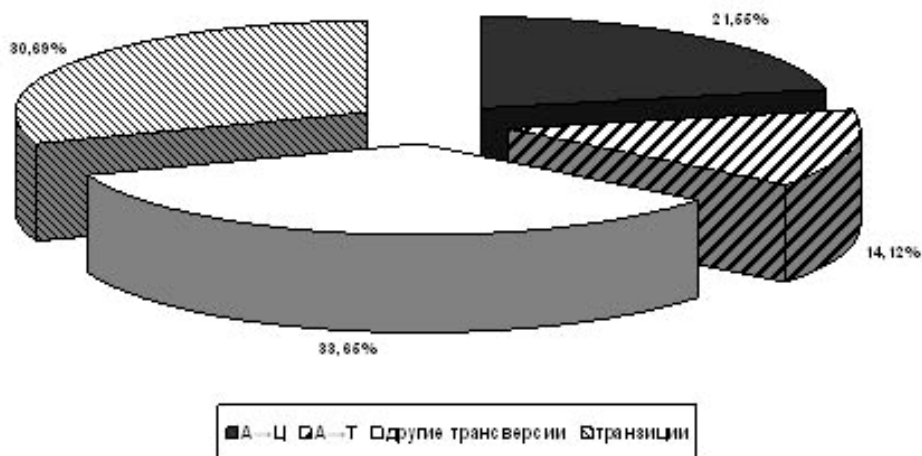


Рисунок 3. Мутации, лежащие в основе направленного мутационного давления в генах, кодирующих ферменты дыхательной цепи трихинеллы.

Установлено, что в изученных мтДНК трихинеллы и человека, достоверно преобладают трансверсии А→Ц ($21,55 \pm 0,56\%$), благодаря которым и происходят большая часть ($77,78\%$) трансформаций динуклеотидов согласно разработанной нами модели (АА→АЦ→ЦЦ, АА→ЦА→ЦЦ, АА→ЦЦ, ТА→ТЦ и АТ→ЦТ). Несколько реже наблюдается трансверсия А→Т ($14,12 \pm 0,48\%$), которая определяет переходы динуклеотидов АА в ТА и АТ (рис. 2). Обнаружено, что доля других трансверсий и транзиций составляет соответственно $33,65 \pm 0,65\%$ и $30,69 \pm 0,63\%$, при этом вклад их отдельных типов колеблется в пределах от $2,70\%$ (трансверсия Г→Т) до $11,53\%$ (трансверсия Ц→А).

Выводы:

1. Дистанция динуклеотидного состава для изученных генов человека и трихинеллы достоверно меньше таковой для генов человека и цианорабдитис.
2. Основными субстратами для действия мутационного давления в мтДНК трихинеллы являются аденин-содержащие динуклеотиды (АА, АЦ, ЦА, АТ, ТА).
3. В основе механизма мутационного давления лежат трансверсии А→Ц и А→Т, приводящие к преимущественному образованию динуклеотидов ЦЦ, ЦТ и ТЦ.

Литература

1. Бутвиловский, А. В. Алкогольдегидрогеназы хордовых животных : монография / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский, В. Э. Бутвиловский; под общ. ред. Е. В. Барковского. Минск: БГМУ, 2007. 144 с.
2. Бутвиловский, А. В. Основные методы молекулярной эволюции: монография / А. В. Бутвиловский [и др.] ; под общ. ред. Е. В. Барковского. Минск: Белпринт, 2009. 216 с.
3. Кимура, М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности / М. Кимура. М., 1985. 398 с.
4. Новый метод определения эволюционных дистанций между последовательностями нуклеиновых кислот / А. В. Бутвиловский [и др.] // Современные информационные и телемедицинские технологии для здравоохранения (АИТН`2008): материалы II Международной конференции (1–3 октября, 2008, Минск, Беларусь). Минск: Объединенный институт проблем информатики Национальной академии Наук Беларуси, 2008. С. 140–144.
5. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика: учеб. пособие / П. Ф. Рокицкий. Минск: «Вышэйш. школа», 1973. 320 с.
6. Статистика в Excel: учеб. пособие / Н. В. Макарова, В. Я. Трофимец. М.: «Финансы и статистика», 2002. 368 с.
7. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions – specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Tompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // Nucl. Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
8. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. / S. Kumar, K. Tamura, J. Dudley, M. Nei // Mol. Biol. Evol. 2007. Vol. 24 P. 1596–1599.
9. Lavrov, D. V. *Trichinella spiralis* mtDNA. A nematode mitochondrial genome that encodes a putative ATP8 and normally structured tRNAs and has a gene arrangement relatable to those of coelomate metazoans / D. V. Lavrov, W. M. Brown // Genetics. 2001. Vol. 157 (2). P. 621–637.
10. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans / M. Ingman [et. al] // Nature. 2000. Vol. 408. P. 708–713.
11. Sueoka, N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution / N. Sueoka // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. P. 2653–2657.
12. Sueoka, N. On the genetic basis of variation and heterogeneity of DNA base composition / N. Sueoka // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1962. Vol. 48. P. 582–592.
13. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum* / R. Okimoto [et. al] // Genetics. 1992. Vol. 130 (3). P. 471–498.