

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 2. Модель механизмов мутационного
давления**

Белорусский государственный медицинский университет

При анализе динуклеотидного состава и мутаций в генах, кодирующих 11 белков дыхательной цепи человека и цианорабдитис, нами разработана модель механизмов действующего в них направленного мутационного давления.

Установлено, что основным субстратом для действия мутационного давления в мтДНК цианорабдитис являются тимин-содержащие динуклеотиды (ТТ, ТЦ, ЦТ, АТ, ТА), а основным типом мутаций – происходящие в них транзиции Т→Ц и трансверсии Т→А. Предложенные модели молекулярных механизмов направленного мутационного давления в изученных ДНК опыта и контроля достоверно отличаются.

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

Рандомизированные контролируемые исследования, когортные исследования и исследования типа опыт-контроль с позиции доказательной медицины являются основными инструментами аналитического исследования. В данной работе, посвященной изучению механизмов мутационного давления в мтДНК человека, трихинеллы и цианорабдитис, применялся метод опыт-контроль. В качестве контроля использовались нуклеотидные последовательности митохондриальной ДНК круглого червя *Caenorhabditis elegans*.

Исследования генома данного организма начаты в 1974 году С. Бреннером. В настоящий момент цианорабдитис широко используется как модель в исследованиях по генетике и биологии развития. Геном *C.elegans* секвенирован и опубликован в банке генов в 1998 году, а в 2002 г. был дополнен и выверен. Следует отметить, что секвенирование проводилось с использованием «медленного» метода «Clone-by-Clone» для обеспечения высокой точности полученных последовательностей. Геном *C. elegans* состоит из приблизительно 100 миллионов пар нуклеотидов и содержит около 20 000 генов. Большинство из этих генов кодируют белки, а часть (примерно 1 000 генов) - кодирует РНК. С момента публикации нуклеотидных последовательностей *C.elegans* появилась возможность использовать его в качестве контроля и проводить сравнительный генетический анализ различных нематод, используя алгоритмы и методики молекулярной эволюции.

В отличие от трихинеллы (полигостальный паразит), *Caenorhabditis elegans* - свободноживущая нематода, в жизненном цикле которой (личинки и взрослая особь) нет ни облигатных, ни факультативных паразитических форм, что обуславливает возможность использования цианорабдитис в качестве контроля в данном исследовании.

Цель работы: определить молекулярные механизмы мутационного давления в последовательностях ДНК, кодирующих ферменты дыхательной цепи человека и цианорабдитис.

Задачи исследования:

1. Установить основные субстраты мутационного давления в генах, кодирующих ряд митохондриальных белков человека и цианорабдитис.
2. Определить основные виды мутаций, лежащих в основе направленного мутационного давления в мтДНК человека и цианорабдитис.
3. Сравнить полученные модели механизмов направленного мутационного давления, действующих в мтДНК трихинеллы и цианорабдитис.

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*), трихинеллы (*T. spiralis*, опыт) и свободноживущей нематоды цианорабдитис (*C. elegans*, контроль).

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. Выравнивание последовательностей выполнено с помощью программы ClustalW (на матрице Gonnet при стандартных условиях) в пакете MEGA 4. 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.

Результаты и обсуждение. При статистической обработке данных разницы содержания динуклеотидов в ДНК человека и цианорабдитис (табл. 1) выявлена зависимость между уменьшением числа ТТ динуклеотидов и возрастанием числа динуклеотидов ТЦ, ЦТ и ЦЦ. Данная связь характеризуется как сильная обратная ($r=-0,98\pm 0,06$) и достоверно ($p<0,001$) отличается от аналогичной в паре человек-трихинелла ($r=0,71\pm 0,24$). Полученный график линейной регрессии (рис. 1), характеризующийся высоким $R^2=0,96$, является доказательством перехода $T\rightarrow C$, как одного из механизмов мутационного давления в изучаемых ДНК человека и цианорабдитис.

Таблица 1

Разница числа динуклеотидов в исследуемых ДНК человека и цианорабдитис

Динуклеотид/ ДНК	НАДН-ДГ1	НАДН-ДГ2	НАДН-ДГ3	НАДН-ДГ4	НАДН-ДГ4L	НАДН-ДГ5	НАДН-ДГ6	Цит b	Ц01	Ц02	Ц03	Общее
АТ	-33	-23	-16	-67	-4	-42	4	-35	-55	-38	-34	-343
АЦ	69	69	25	116	22	120	49	62	51	41	38	662
АА	-9	5	-10	-19	3	-19	-3	-27	-12	-18	-5	-114
АА	-4	9	0	22	-3	28	45	-5	-6	-6	0	80
ТА	-28	-14	-5	-62	5	-66	-15	-64	-75	-36	-36	-396
ТТ	-177	-183	-54	-222	-58	-287	-98	-183	-213	-99	-109	-1683
ТЦ	46	63	12	73	16	117	24	82	74	31	30	568
ТГ	-19	-20	-9	-20	-4	-17	-12	-37	-44	-21	-21	-224
ЦА	59	76	10	98	20	138	59	70	64	29	45	668
ЦТ	63	81	30	102	31	129	19	71	68	36	34	664
ЦЦ	110	113	40	131	27	191	73	114	114	62	77	1052
ЦГ	21	15	6	26	5	32	7	26	37	25	12	212
ГА	-4	-13	-7	-8	-3	-12	6	-7	-5	-9	-11	-73
ГТ	-31	-27	-15	-41	-10	-54	-25	-54	-58	-24	-26	-365
ГЦ	28	40	9	37	18	62	11	23	44	18	23	313
ГГ	-11	2	-6	-8	-2	-26	-3	-12	-19	-3	-4	-92

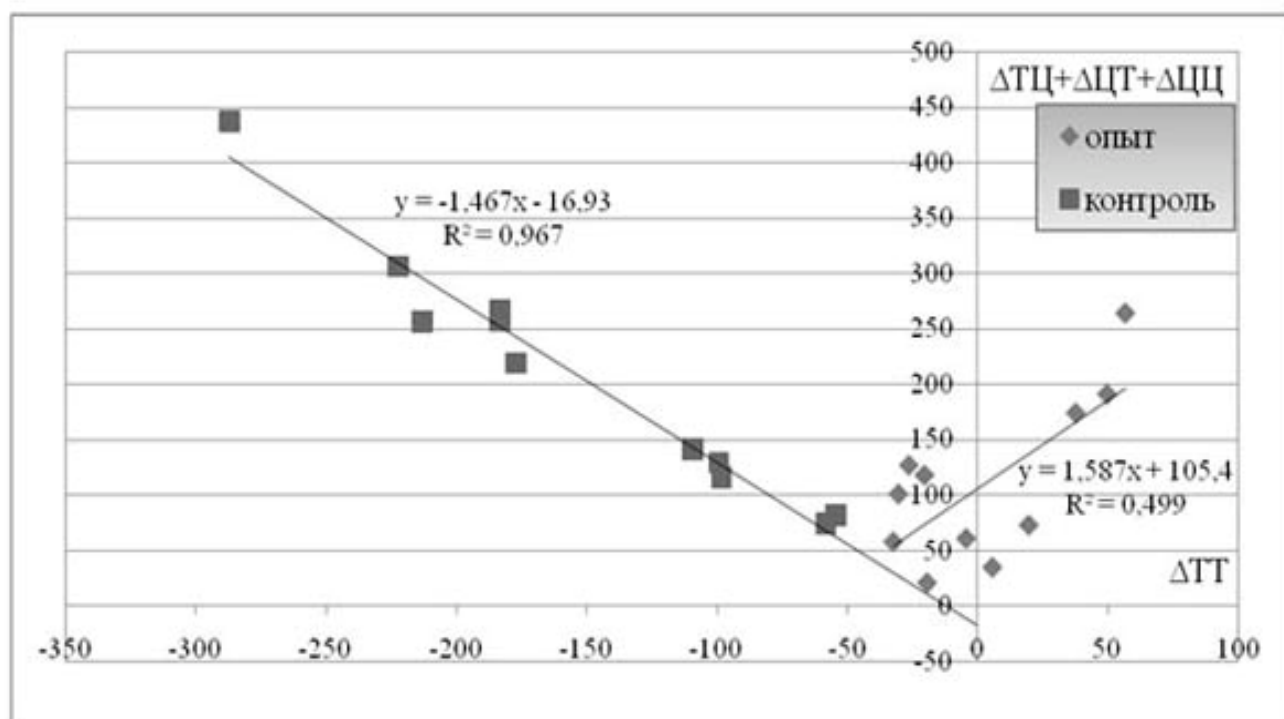


Рисунок 1. Зависимость разницы содержания динуклеотидов ТЦ+ЦТ+ЦЦ от разницы содержания динуклеотидов ТТ в сравниваемых ДНК человека и трихинеллы (опыт), человека и цианорабдитис (контроль).

Подтверждением выдвинутого предположения является существование зависимости содержания динуклеотидов ЦТ и ТЦ от количества ТТ

динуклеотидов ($r=-0,97\pm 0,083$; $p<0,001$), а также рост количества ЦЦ динуклеотидов при уменьшении числа ТТ ($r=-0,97\pm 0,068$; $p<0,001$). Полученные зависимости достоверно отличаются от таковых в ДНК человека и трихинеллы ($p<0,001$ для зависимости $\Delta ЦТ+\Delta ТЦ$ от $\Delta ТТ$ и $p<0,1$ для зависимости $\Delta ЦЦ$ от $\Delta ТТ$). В обратной зависимости от содержания ТТ динуклеотидов также находятся ЦА ($r=-0,93\pm 0,12$), АЦ ($r=-0,89\pm 0,15$), ЦГ ($r=-0,82\pm 0,19$) и ГЦ ($r=-0,92\pm 0,13$) динуклеотиды. Связи, аналогичные полученным для ТТ, установлены также для АТ и ТА динуклеотидов (табл. 2). Следует отметить, что данные связи менее сильны и достоверны, чем для ТТ и вышеописанных динуклеотидов.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции между разницей содержания некоторых динуклеотидов в исследуемых ДНК человека и цианорабдитис

Динуклеотиды	$\Delta АЦ$	$\Delta ТЦ$	$\Delta ЦА$	$\Delta ЦТ$	$\Delta ЦЦ$	$\Delta ЦГ$	$\Delta ГЦ$
$\Delta АТ$	$-0,61\pm 0,26$	$-0,64\pm 0,26$	$-0,51\pm 0,29$	$-0,67\pm 0,25$	$-0,62\pm 0,26$	$-0,84\pm 0,18$	$-0,61\pm 0,26$
$\Delta ТА$	$-0,62\pm 0,26$	$-0,81\pm 0,20$	$-0,67\pm 0,25$	$-0,67\pm 0,25$	$-0,75\pm 0,22$	$-0,92\pm 0,13$	$-0,65\pm 0,25$

Примечание. Серым цветом выделена недостоверная связь ($p>0,1$), для других связей $p<0,05$.

Выявленные корреляционные связи в ДНК цианорабдитис и человека, а также резкое уменьшение числа динуклеотидов ТТ, ТА и АТ при увеличении количества цитозин-содержащих, позволяют предположить наличие направленных мутаций $T\rightarrow A$ и $T, A\rightarrow C$ в данных динуклеотидах. Возможность существования данного механизма подтверждает также сильная корреляционная связь ($r=-0,94\pm 0,12$) между разницей динуклеотидов ТТ, АТ, ТА и разницей динуклеотидов АЦ, ТЦ, ЦА, ЦТ, ЦЦ, ЦГ, ГЦ (рис. 2). При сравнении ДНК человека и трихинеллы аналогичной связи ($r=0,20\pm 0,33$) не наблюдается ($p>0,05$).

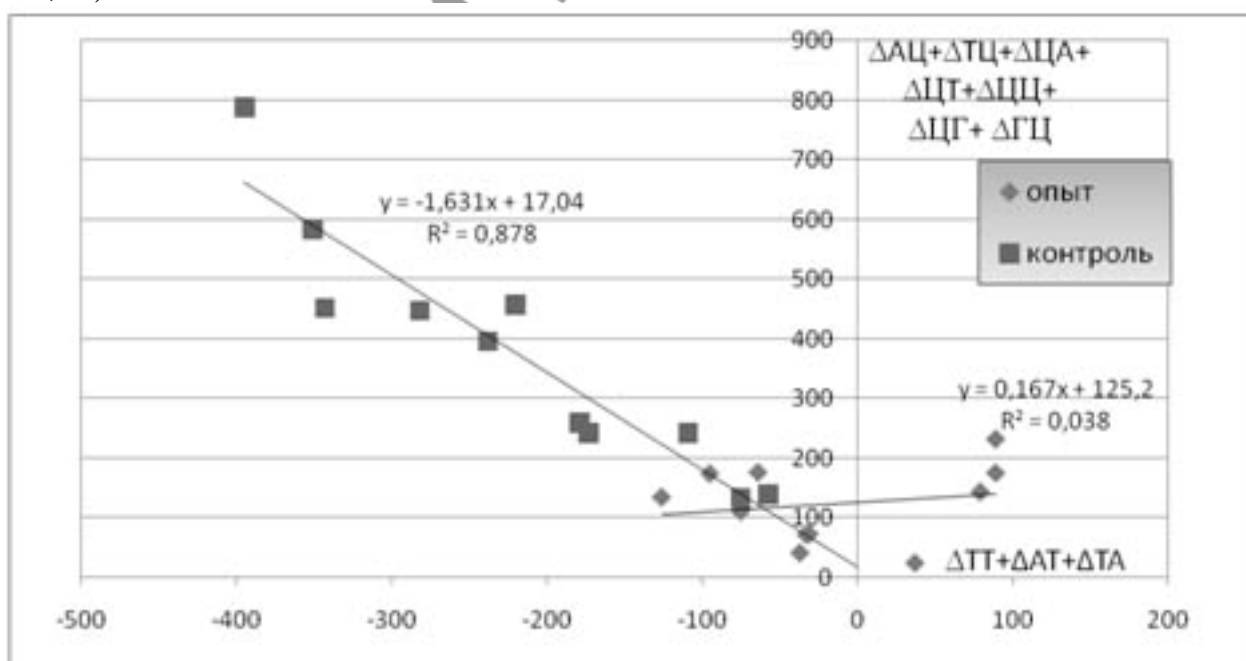


Рисунок 2. Зависимость разницы содержания динуклеотидов АЦ+ТЦ+ЦА+ЦТ+ЦЦ+ЦГ+ГЦ от разницы содержания динуклеотидов ТТ+АТ+ТА в

изучаемых ДНК человека и трихинеллы (опыт), человека и цианорабдитис (контроль).

При анализе выровненных последовательностей изучаемых ДНК человека и цианорабдитис установлено, что в соответствии с выдвинутой нами гипотезе динуклеотиды ТТ являются основным субстратом мутаций в них (табл. 3).

Таблица 3

Мутации в динуклеотидах исследуемых ДНК цианорабдитис и человека

C.e.l./H.s.	АТ	АЦ	АГ	АА	ТА	ТТ	ТЦ	ТГ	ЦА	ЦТ	ЦЦ	ЦГ	ГА	ГТ	ГЦ	ГГ
АТ	213	181	33	65	49	53	52	14	49	117	77	16	14	34	41	5
АЦ	21	90	7	17	4	1	17	1	13	10	42	3	9	3	11	6
АГ	18	50	83	50	9	4	43	19	22	22	47	23	12	4	20	15
АА	46	52	39	216	34	7	29	9	70	42	48	22	16	5	14	9
ТА	38	59	38	90	255	56	124	36	148	57	95	24	21	5	20	11
ТТ	174	116	37	76	209	275	224	47	128	334	185	24	32	32	44	14
ТЦ	10	39	7	17	8	6	59	7	9	13	47	6	5	2	25	6
ТГ	28	26	39	15	49	26	43	84	35	19	30	50	4	3	8	11
ЦА	7	14	2	10	11	10	12	2	100	20	65	6	3	1	12	2
ЦТ	17	20	7	11	15	17	13	2	44	48	72	9	3	3	19	1
ЦЦ	0	8	0	2	0	0	2	0	10	4	75	0	0	0	7	2
ЦГ	2	1	5	2	0	0	0	4	8	5	11	29	1	0	0	0
ГА	13	19	4	26	23	10	11	3	41	24	32	6	117	5	20	9
ГТ	48	32	11	29	17	22	24	9	35	55	46	5	36	60	60	9
ГЦ	4	14	1	2	4	0	15	0	7	10	15	1	1	2	41	7
ГГ	7	14	20	8	3	5	15	6	24	14	19	15	9	5	23	94

Доля динуклеотидов ТТ, в которых наблюдаются мутации в соответствии с описанными механизмами, равна $81,74 \pm 0,94\%$, что достоверно больше мутаций протекающих в других направлениях ($p < 0,001$). При этом $44,33 \pm 1,21\%$ мутировавших ТТ динуклеотидов изменялись в ЦТ, ЦЦ и ТЦ (первое направление), и $37,41 \pm 1,18\%$ ТТ динуклеотидов мутировали в АТ, АЦ, ЦА и ТА (второе направление, рис. 3). Подтверждением предложенных моделей механизмов мутационного давления являются сильные отрицательные достоверные корреляционные связи между $\Delta ТТ$ и $\Delta ЦТ + \Delta ТЦ + \Delta ЦЦ$ ($r = -0,98 \pm 0,16$; $p < 0,01$) для первой схемы и между $\Delta ТТ + \Delta АТ + \Delta ТА$ и $\Delta АЦ + \Delta ЦА$ ($r = -0,86 \pm 0,17$; $p < 0,01$) для второй схемы.

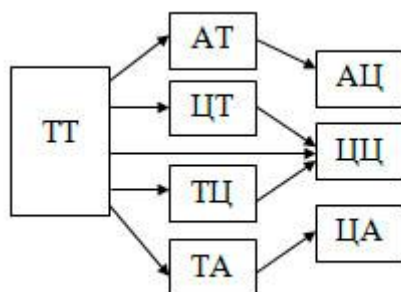


Рисунок 3. Модель молекулярных механизмов мутационного давления в ДНК, кодирующих ферменты дыхательной цепи человека и цианорабдитис.

Следует отметить большую вероятность транзиции $T \rightarrow C$ по сравнению с трансверсией $T \rightarrow A$. Так, TT динуклеотиды переходят в CT и TC в $19,93 \pm 0,98\%$ и $13,37 \pm 0,83\%$ наблюдаемых мутаций. К образованию CC фрагментов приводят $22,70 \pm 2,91\%$ мутаций динуклеотидов TC и $28,46 \pm 2,83\%$ динуклеотидов CT . Доля перехода динуклеотидных фрагментов TT в аденин-содержащие AT и TA , достоверно ($p < 0,1$). Корректность предложенной нами модели подтверждают и результаты анализа типов мутаций, наблюдаемых при выравнивании изучаемых ДНК (рис. 4).

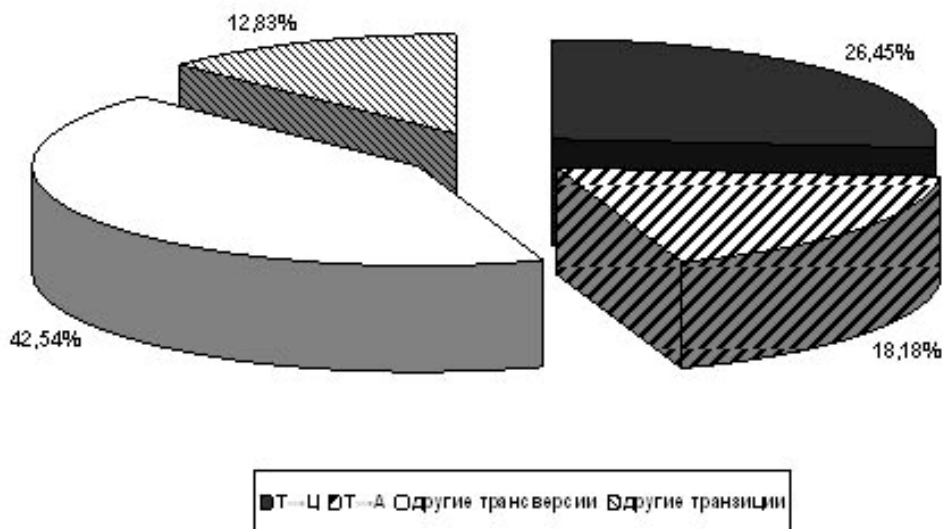


Рисунок 4. Мутации, лежащие в основе направленного мутационного давления в генах, кодирующих ферменты дыхательной цепи цианорабдитис.

Установлено, что в изученных мтДНК трихинеллы и человека, достоверно преобладают транзиции $T \rightarrow C$ ($26,45 \pm 0,61\%$, $p < 0,001$), благодаря которым и происходят большая часть ($77,78\%$) трансформаций динуклеотидов согласно разработанной нами модели ($TT \rightarrow TC \rightarrow CC$, $TT \rightarrow CT \rightarrow CC$, $TT \rightarrow CC$, $TA \rightarrow CA$ и $AT \rightarrow AC$). Несколько реже наблюдается трансверсия $T \rightarrow A$ ($18,18 \pm 0,53\%$), которая определяет переходы динуклеотидов TT в TA и AT (рис. 3).

Обнаружено, что доля других трансверсий и транзиций составляет соответственно $42,54 \pm 0,68\%$ и $12,83 \pm 0,46\%$, при этом вклад их отдельных типов колеблется в пределах от $1,24\%$ (трансверсия $C \rightarrow G$) до $14,36\%$ (трансверсия $A \rightarrow C$).

При сравнения предложенных моделей молекулярных механизмов мутационного давления в ДНК опыта и контроля обнаружено, что они отличаются по преимущественно используемым субстратам (соответственно AA и TT) и преобладающему виду мутаций (соответственно трансверсии $A \rightarrow C$, T ; транзиция $T \rightarrow C$ + трансверсия $T \rightarrow A$). Наиболее вероятной причиной этих

отличий, с нашей точки зрения, является коэволюция человека и трихинеллы как компонентов системы “паразит-хозяин”, формирующейся при трихинеллезе.

Выводы:

1. Основными субстратами для действия мутационного давления в мтДНК цианорабдитис являются тимин-содержащие динуклеотиды (ТТ, ТЦ, ЦТ, АТ, ТА).
2. В основе механизма мутационного давления лежат транзиция Т→Ц и трансверсия Т→А, приводящие к преимущественному образованию динуклеотидов ЦЦ, ЦА и АЦ.
3. Предложенные модели молекулярных механизмов направленного мутационного давления в изученных ДНК опыта и контроля достоверно отличаются.

Литература

1. Бутвиловский, А. В. Основные методы молекулярной эволюции: монография / А. В. Бутвиловский [и др.]; под общ. ред. Е. В. Барковского. Минск: Белпринт, 2009. 216 с.
2. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика: учеб. пособие / П. Ф. Рокицкий. Минск: «Вышэйш. школа», 1973. 320 с.
3. Статистика в Excel: учеб. пособие / Н. В. Макарова, В. Я. Трофимец. М.: «Финансы и статистика», 2002. 368 с.
4. 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.
5. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. / S. Kumar [et al.] // Mol. Biol. Evol. 2007. Vol. 24. P. 1596–1599.
6. 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.
7. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans / Ingman M. [et. al] // Nature. 2000. Vol. 408. P. 708–713.
8. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum* / R. Okimoto [et. al] // Genetics. 1992. Vol. 130 (3). P. 471–498.