

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ
КАФЕДРА БИОЛОГИИ

А. В. БУТВИЛОВСКИЙ, Е. В. БАРКОВСКИЙ, В. Э. БУТВИЛОВСКИЙ

АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ХОРДОВЫХ ЖИВОТНЫХ

Монография

Под общей редакцией Е. В. Барковского



Минск 2007

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. – ISBN 978–985–462–695–6.

Представлены основные сведения о среднепочечных алкогольдегидрогеназах хордовых животных и человека. Издание состоит из 6 глав, в которых приведена информация о структуре, регуляции и функции фермента, обоснована структурно-функциональная классификация среднепочечных алкогольдегидрогеназ человека, проанализированы основные параметры эволюционных изменений алкогольдегидрогеназ, кодирующих их мРНК и соответствующих генов. Особое внимание уделено изучению характера аминокислотных замен, выявлению и анализу гипервариабельных участков, оценке влияния мутационного давления на стратегию кодирования и аминокислотный состав белков, а также количественной взаимосвязи темпов эволюционных изменений мРНК с нейтральностью замен нуклеотидов в них.

Предназначено для биохимиков, врачей и биологов, интересующихся алкогольдегидрогеназами и проблемами эволюционных изменений генетических макромолекул.

Табл. 44. Ил. 52. Библиогр. 194

Утверждено Советом Бел. гос. мед. универ.

Рецензенты:

засл. деятель науки Республики Беларусь, д-р мед. наук, проф. каф. биохимии Белорусского государственного медицинского университета В. К. Кухта; засл. деятель науки Республики Беларусь, д-р мед. наук, проф.-консульт. Минского городского консультационно-диагностического центра В. Г. Колб

ВВЕДЕНИЕ

Пристальное внимание исследователей, которое уделялось алкогольдегидрогеназной системе на протяжении многих лет, было связано исключительно с тем, что она является главным метаболическим путем этанола.

За последние двадцать лет данные о функциях алкогольдегидрогеназ (АДГ) существенно расширились. Стало очевидным их значение как защитников организма от ряда эндо- и экзогенных токсических агентов (в частности формальдегида) и канцерогенов (дериватов 1,3-бутадиена, бензохинонов, аминоазокрасителей и ряда гликолей). Одновременно выяснилось, что в определенных процессах алкогольдегидрогеназы, напротив, продуцируют повреждающие соединения (например, окисляя метанол). Затем было установлено участие алкогольдегидрогеназ в синтезе и катаболизме ряда ретинолов, ω -гидроксигирных кислот, нейромедиаторов (норадреналина, серотонина, дофамина), стероидных гормонов и других соединений.

Столь разнообразные функции, выполняемые алкогольдегидрогеназами, послужили причиной проведения большого количества фундаментальных исследований. Основное направление этих исследований связано с таким важным в медицинском и социальном плане заболеванием, как алкоголизм. Остальные направления исследований алкогольдегидрогеназ преимущественно сфокусированы на таких процессах, как канцерогенез, восприятие света сетчаткой глаза, регуляция эмбрионального развития и дифференцировки клеток, передача импульсов в нервной системе, обезвреживание ксенобиотиков и др.

По нашему мнению, весь сложный комплекс функций АДГ не может быть полностью понят без глубоких эволюционно-филогенетических исследований. Актуальность данных исследований алкогольдегидрогеназ следует рассматривать, исходя из следующих соображений. Во-первых, они позволяют установить эволюционные взаимосвязи как между АДГ человека, так и в филогенетическом ряду хордовых. Во-вторых, филогенетические исследования нуклеиновых кислот и белков, а также построение на их основе филограмм имеет огромное значение для таксономии. В-третьих, выявление ранее неизвестных закономерностей эволюционных изменений генетических макромолекул будет способствовать развитию новых представлений об общей стратегии их эволюции. В-четвертых, широкомасштабные исследования в области молекулярной эволюции в Беларуси проводятся еще недостаточно широко, что обусловлено малой осведомленностью биологов, биохимиков, генетиков и медиков с проблемами и методами этой науки.

В этой связи важно отметить, что по нашей инициативе вопросы по молекулярной эволюции и эволюционной биохимии впервые включены в типовую учебную программу по биологии и медицинской генетике для студентов медицинских вузов Республики Беларусь. Проведенное нами в 2005 году анкетирование студен-

тов Белорусского государственного медицинского университета (БГМУ) выявило их недостаточные знания по молекулярной эволюции и эволюционной биохимии, а также стремление познакомиться с основами этих наук [55].

Представленные в монографии данные являются частью многолетних исследований по молекулярной эволюции и филогенетике, проводимых на кафедре общей химии Белорусского государственного медицинского университета в рамках НИР «Структурно-функциональные свойства аденилатциклаз различного происхождения и теоретический анализ их аминокислотных последовательностей» (№ ГР 2001680, сроки выполнения 01.01.2001 г. – 31.12.2005 г.), НИР «Молекулярная эволюция генетических макромолекул» (№ ГР 2006234, сроки выполнения 01.01.2006 г. – 31.12.2010 г.), а также в рамках гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований для молодых ученых по теме «Молекулярная эволюция генетических макромолекул» (№ Б06М-060 от 01.04.06 г.).

В первой главе монографии приведен обзор имеющихся в литературе данных по номенклатуре, строению, регуляции и функциям, выполняемым алкогольдегидрогеназами. Наличие такого обзора, по нашему мнению, облегчит чтение основного материала читателями.

В монографии также подробно рассмотрены вопросы, связанные с классификациями алкогольдегидрогеназ человека, временами и последовательностью их возникновения в ходе эволюции, а также особенностями нуклеотидного состава экзонов и интронов генов АДГ, выявлением и анализом гипервариабельных участков в соответствующих последовательностях мРНК. Пристальное внимание уделено мутационному давлению в экзонах генов, кодирующих алкогольдегидрогеназы, его влиянию на стратегию кодирования и аминокислотный состав соответствующих белков. Отдельно рассмотрены вопросы о темпах эволюционных изменений алкогольдегидрогеназ и их взаимосвязи с нейтральностью замен нуклеотидов по первому и второму положениям кодона мРНК, а также о характере аминокислотных замен в алкогольдегидрогеназах хордовых животных.

Авторы выражают свою благодарность отдельным ученым, чьи открытия и теории формировали их собственную мысль. В нашем случае это, прежде всего, М. Кимура (теория нейтральной молекулярной эволюции), Н. Суеока (теория направленного мутационного давления), Э. Цукеркэндл и Л. Полинг (концепция «молекулярных часов»). Фундаментальность сделанных ими научных открытий позволила нам применить их для решения конкретных общеприкладных и прикладных задач.

Вместе с тем авторы признают, что отдельные части данной книги могут быть далеки от совершенства, поэтому все замечания и пожелания читателей будут приняты с искренней благодарностью.

Г Л А В А 1

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КЛАССИФИКАЦИИ, НОМЕНКЛАТУРЕ, МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ, РЕГУЛЯЦИИ И ФУНКЦИЯХ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ ХОРДОВЫХ

1.1 Классификация и номенклатура алкогольдегидрогеназ

В соответствии с международной классификацией ферментов, алкогольдегидрогеназа (АДГ) относится к классу оксидоредуктаз, подклассу оксидоредуктаз, действующих на СНОН-группы доноров, подподклассу оксидоредуктаз, использующих в качестве акцептора НАД⁺ или НАДФ⁺ и, таким образом, имеет шифр 1.1.1.1 [134, 167].

Следует отметить, что в настоящее время известны три различных структурно-функциональных типа алкогольдегидрогеназ: длинноцепочечные (среднецепочечные, цинксодержащие), короткоцепочечные (обнаружены у насекомых) и железосодержащие [113, 134]. При этом к числу других цинкзависимых дегидрогеназ, близкородственных АДГ, относят ксилитолдегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.9), сорбитолдегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.14), арил-алкогольдегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.90), L-треонин-3-дегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.103), циннамил-алкогольдегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.195; обнаружены у растений), галактитол-1-фосфат-5-дегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.251) и L-йодонат-5-дегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.264; обнаружены у *E.coli*). Семейство АДГ также включает и НАДФ⁺-зависимые хинооксидоредуктазы, обнаруженные у бактерий, дрожжей и млекопитающих.

В основу одной из первых попыток классификации алкогольдегидрогеназ было положено их разделение по функциональному принципу, а именно наличию или отсутствию у них способности ингибироваться производными пиразола [130, 155]. Таким образом, по этому признаку все алкогольдегидрогеназы подразделялись на пиразол-чувствительные и пиразол-нечувствительные.

Однако постепенно накапливались данные о новых представителях семейства алкогольдегидрогеназ. При этом каждый из исследователей, секвенировавший новую аминокислотную последовательность АДГ или кодирующую ее нуклеотидную последовательность мРНК, обозначал ее по своему усмотрению. Это привело к возникновению весьма сложной номенклатуры алкогольдегидрогеназ.

В 1995 г. Х. Джорнвалл и Ж. Хогг предложили обобщенную номенклатуру алкогольдегидрогеназ млекопитающих [148], а в 1999 г. Г. Дуэстер и соавт. предложили ее модификацию, разработанную в соответствии с рекомендациями Рабочей группы по международным номенклатурам [156].

Новая номенклатура основывается на системе классов, в первую очередь, по гомологии аминокислотных последовательностей и, во вторую очередь, по каталитическим свойствам и содержанию мРНК, кодирующей АДГ, в различ-

ных органах и тканях. Благодаря удалению римских чисел и греческих символов предложенный Г. Дуэстером вариант обеспечивает одинаковые названия для сходных белков и генов у различных видов, тем самым позволяя легко идентифицировать ортологи, узнавать классы и изоферменты АДГ, а также предусматривает расширение семейства в будущем.

В фундаментальных работах Х. Эденберга и Г. Дуэстера все существующие алкогольдегидрогеназы различных видов позвоночных разделены на 7 классов, основываясь на гомологии нуклеотидных последовательностей мРНК и аминокислотных последовательностей, электрофоретических и ферментативных свойствах [98, 156]. Основным принципом выделения самостоятельного класса является наличие менее 70 % сходства аминокислотных последовательностей с АДГ других классов того же организма при условии наличия специфической каталитической активности. Если при том же условии сходство аминокислотных последовательностей составляет более 80 %, АДГ относятся к одному классу. В настоящее время неизвестно ни одного вида, у которого есть гены, кодирующие все семь классов АДГ. Например, у человека описаны только АДГ 1, 2, 3, 4 и 5-го классов, у мыши — 1, 2, 3 и 4-го классов. АДГ 6-го встречается только у крыс и диких мышей, а класс 7 АДГ обнаружен только у птиц [156]. Ранняя идентификация множественных АДГ у лошади, человека, мыши и крысы привела к возникновению видоспецифических номенклатур, которые были полезными на протяжении некоторого времени.

В соответствии с номенклатурой Г. Дуэстера и соавт., алкогольдегидрогеназа обозначается символом АДГ (ADH), а ее класс арабским числом (например, алкогольдегидрогеназа 1-го класса обозначается как АДГ1 (ADH1)). Для изоферментов, относящихся к одному и тому же классу, Г. Дуэстер и соавт. рекомендуют добавлять заглавную букву после арабского числа, а не греческий символ. Таким образом, три изофермента АДГ 1-го класса человека ранее обозначаемые $ADH1\alpha$, $ADH1\beta$ и $ADH1\gamma$ обозначаются как ADH1A, ADH1B и ADH1C соответственно. Для обозначения генов рекомендовано использование курсива (*ADH* для человека и *Adh* для грызунов), а затем указание с помощью арабского числа класса и, если необходимо, заглавной буквы для обозначения изоферментов внутри класса. Таким образом, три гена АДГ 1-го класса человека обозначаются как *ADH1A*, *ADH1B*, *ADH1C*, а единичные гены АДГ 1-го класса мыши, крысы и дикой мыши обозначаются как *Adh1*. Новые названия соответствуют ключевым линиям, предложенным Комитетом по номенклатуре Организации по исследованию человеческого генома (Human Genome Organization Nomenclature Committee), Международным комитетом по стандартизации генетических номенклатур для мыши (International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice) и Базой данных по геному крысы (Rat Genome Database). Следует отметить, что существенным недостатком номенклатуры алкогольдегидрогеназ, предложенной Г. Дуэстером и соавт., явля-

ется то, что она не учитывает номенклатур генов для других позвоночных животных.

К АДГ 1-го класса относятся 3 изофермента человека, кодируемых разными генами [140, 156], и по одному ферменту грызунов (мышь, крысы и дикой мышь). Представители остальных классов АДГ кодируются только одним геном у всех видов млекопитающих, у которых они были обнаружены, за исключением кролика, у которого есть 2 изофермента АДГ2. Примечательно, что алкогольдегидрогеназа 7-го класса все еще не обнаружена у млекопитающих.

О последовательностях ДНК псевдогенов было сообщено для АДГ3 мышь и человека, а также для АДГ1 мышь. По рекомендации Г. Дуэстера и соавт., псевдоген АДГ3 человека, ранее именуемый в Базе данных генома человека *ADH5P1*, обозначен как *ADH3P1*, а псевдоген АДГ3 мышь, ранее именуемый в Базе данных генома мышь *Adh5-ps1*, обозначен как *Adh3-ps1*. Существующее в Базе данных обозначение псевдогена АДГ1 мышь *Adh1-ps1* правильно отражает класс АДГ и должно быть сохранено. Эти обозначения следуют ключевым линиям, установленным для номенклатуры псевдогенов мышь и человека.

Используя новую номенклатуру алкогольдегидрогеназ, Г. Дуэстер предложил обозначения различных АДГ позвоночных, для которых существующие данные по последовательностям позволили определить их в определенный класс. Ортологи АДГ1, АДГ2, АДГ3, АДГ4 и АДГ6 были обнаружены, в то время как АДГ5 встречается только у человека, а АДГ7 — только у петуха. Изоферменты, обнаруженные для АДГ1 (у человека, лошади, бабуина, обезьяны и ящерицы), АДГ2 (кролика) и АДГ3 (трески и акулы) обозначаются заглавными буквами после арабского числа. Обозначения для этих изоферментов основываются на превращении ранее существовавших греческих символов в заглавные буквы (например, изоферменты α , β и γ человека, β и γ бабуина и α обезьяны), использовании ранее существовавших обозначений заглавными буквами (например, изоферменты E и S лошади), превращении ранее существовавших числовых обозначений в заглавные буквы (например, изоферменты II-1 и II-2 кролика) или строчных букв в заглавные (например, изоферменты a и b ящерицы, h и l трески, a и b акулы). Так как существование множественных изоферментов в определенных классах АДГ является видоспецифичным и, следовательно, они могут выполнять видоспецифичные функции, обозначение этих форм с использованием заглавных букв также является видоспецифичным. Буквенное обозначение не предназначено для идентификации ортологов изоферментов у разных видов. Ортологи идентифицируются только по числу, следующему за символом АДГ.

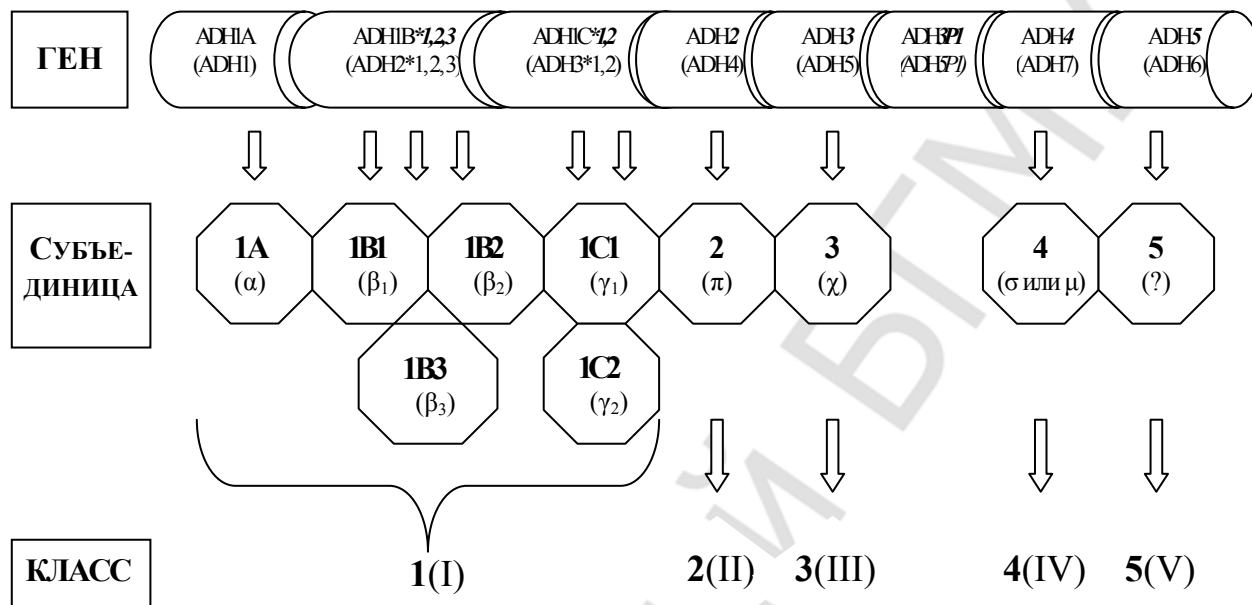
По исследованиям ферментативной активности для многих организмов стало известно о существовании дополнительных АДГ, но недостаточное количество информации об их последовательностях не позволяет отнести их к какому-либо классу. В соответствии с новой номенклатурой, рекомендуется обо-

значать изоферменты с каталитическими свойствами и профилями тканевой локализации, характерными для определенного класса как АДГ1-подобный (ADH1-like), АДГ2-подобный (ADH2-like) и т. д. до тех пор, пока данные по последовательностям не позволят отнести их к определенному классу. В качестве примера может служить дикая мышь, у которой обнаружены ферменты, сходные по активности с АДГ3 и АДГ4, но не известны их аминокислотные последовательности. Г. Дуэстер и соавт. обращают особое внимание на то, что выделение дополнительных классов (например, АДГ8, АДГ9 и др.) должно проводиться с большой осторожностью и лишь в том случае, когда полные данные по аминокислотным последовательностям и свойствам позволяют установить существенные различия с таковыми существующих классов.

В связи с этим следует сказать, что в 1992 г. были секвенированы 2 последовательности АДГ трески *G. callarius*, которые отнесли к 1-му классу. А в 2004 г. были секвенированы еще 2 последовательности АДГ *D. rerio*, сходные почти на 80 % с таковыми трески и на основании этого также отнесенные к 1-му классу. Однако, т. к. свойства данных АДГ значительно отличаются от таковых АДГ 1-го класса, М. Реймерс выделил их в отдельный (восьмой) класс при согласии Комитета по номенклатуре генов для семейств генов (HUGO Gene Nomenclature Committee for Gene Family Nomenclature) и консультации Комитета по номенклатуре *D. rerio*. Одновременно с этим в литературе имеются данные, что к 8-му классу АДГ в 1999 г. был отнесен фермент *R. perezii*, обладающий уникальными свойствами.

Классификация, старая и новая, номенклатуры алкогольдегидрогеназ человека показаны на рисунке 1.1. Как было сказано выше, к настоящему времени 7 различных генов (*ADH1A*, *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH2-ADH5*), кодирующих алкогольдегидрогеназы человека, идентифицированы и объединены в 5 классов. Следует подчеркнуть, что белок, кодируемый геном *ADH5*, не выделен *in vivo*.

Получены данные о существовании сплайс-вариантов представителей 1-го класса АДГ. Так, известно [188, 192, 193] о наличии 3 вариантов АДГ1В, обозначаемых АДГ1В1 (ADH1B1), АДГ1В2 (ADH1B2) и АДГ1В3 (ADH1B3), и 2 вариантов АДГ1С, обозначаемых АДГ1С1 (ADH1C1) и АДГ1С2 (ADH1C2). Обозначения генов соответствуют обозначениям белков, но производятся с по-



мощью курсива и со звездочкой перед номером аллеля (например, *ADH1B*1*, *ADH1B*2* и др.), согласно рекомендациям Комитета по номенклатуре Организации по исследованию человеческого генома [156]. Три близкородственные субъединицы (включая полиморфные варианты) АДГ1 человека способны гибридизироваться с образованием всех возможных гомо- и гетеродимеров. Для их обозначения рекомендуется использовать наклонную черту между названиями субъединиц (например, АДГВ1/В1 (ADH1B1/B1), АДГВ1/В2 (ADH1B1/B2) и кратко В1/В1, В1/В2 соответственно, что заменяет прежние обозначения β₁β₁ и β₁β₂).

Рис. 1.1. Классификация и номенклатура алкогольдегидрогеназ человека

Примечание. Жирным шрифтом выделены обозначения в соответствии с номенклатурой Г. Дуэстера, в скобках указаны обозначения по старой номенклатуре

Безусловно, номенклатура Г. Дуэстера значительно упрощает обозначение алкогольдегидрогеназ, но возникшие сложности с переименованием нуклеотидных и аминокислотных последовательностей АДГ в мировых базах данных привели к тому, что старая номенклатура была частично сохранена. В заключение хочется отметить, что исследователи, занимающиеся изучением алкогольдегидрогеназ, зачастую используют обе номенклатуры АДГ, а вопрос о предпочтении какой-либо из них до сих пор остается нерешенным. В данной работе мы пользовались более удобной, с нашей точки зрения, номенклатурой Г. Дуэстера.

1.2. Структура, механизм действия и тканевая специфичность алкогольдегидрогеназ

Алкогольдегидрогеназа (алкоголь: НАД⁺-оксидоредуктаза) является цитозольным цинксодержащим НАД⁺-зависимым ферментом. Наиболее часто катализируемую АДГ обратимую реакцию схематически представляют как:



Однако эта схема отражает лишь одну из многочисленных функций алкогольдегидрогеназ, которые подробно рассмотрены нами ниже.

1.2.1. Структура алкогольдегидрогеназ

Алкогольдегидрогеназа является димером, состоящим из двух субъединиц с молекулярной массой 40 кДа (рис. 1.2). Известно, что АДГ 1-го класса обладают способностью образовывать гомо- и гетеродимеры, в то время как АДГ всех остальных классов существуют лишь в виде гомодимеров [140, 192].

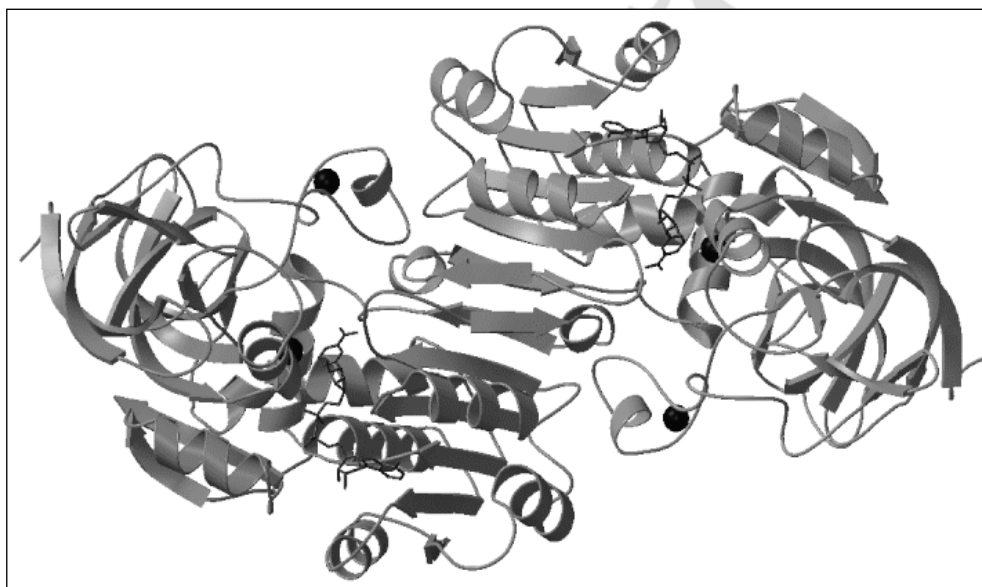


Рис. 1.2. Структура гомодимера АДГ1В1

Субъединицы имеют глобулярную форму и контактируют между собой гидрофобными поверхностями размером приблизительно $20 \times 30 \text{ \AA}$. Димерный фермент имеет оптимальную активность при более низких концентрациях субстрата (для АДГ1В1 — 2,5 mM этанола и 50 μM НАД⁺), чем мономер (1,5 M этанола, 2,5 mM НАД⁺) [142]. Отсюда ясно, что целью димеризации являются структурно-конформационные изменения субъединиц, направленные на модификацию каталитических свойств в сторону снижения значений K_M для субстратов.

Каждая из субъединиц связывает два атома цинка (каталитический и некаталитический) и состоит из двух доменов: каталитического и кофермент (НАД⁺)-связывающего (рис. 1.3) [169].

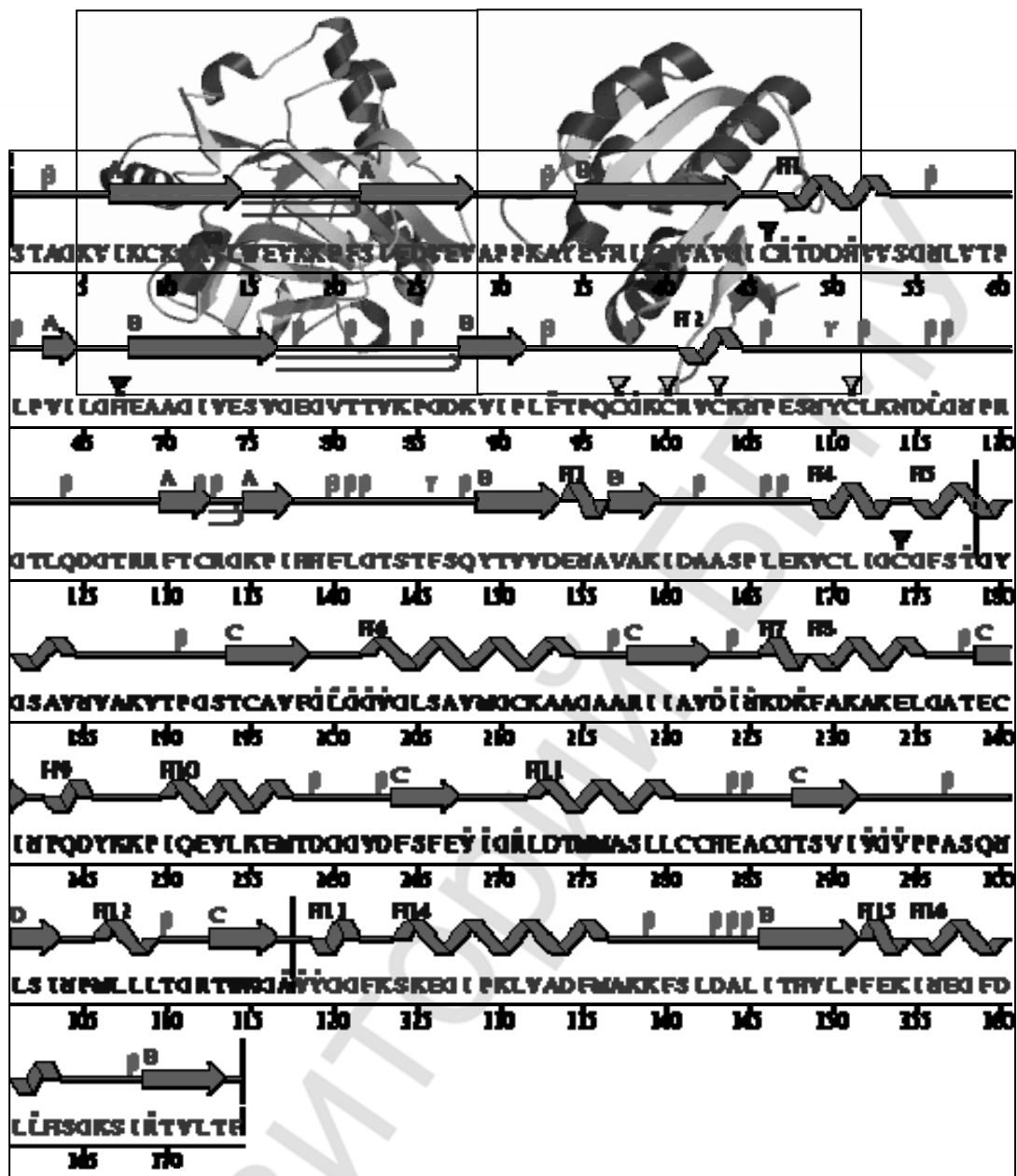


Рис. 1.3. Структура каталитического (слева) и кофермент-связывающего (справа) доменов АДГ1В1

Следует отметить, что каталитический домен состоит из двух частей (N-терминальной и С-терминальной), а кофермент-связывающий домен занимает промежуточное между ними положение (рис. 1.4).

Рис. 1.4. Первичная и вторичная структура АДГ1В1 человека

Примечание. Границы между доменами обозначены пунктиром. Аминокислотные остатки, взаимодействующие с лигандами обозначены знаком « · », с каталитическим ионом цинка — « ▼ », с некаталитическим ионом цинка — « ▽ ».

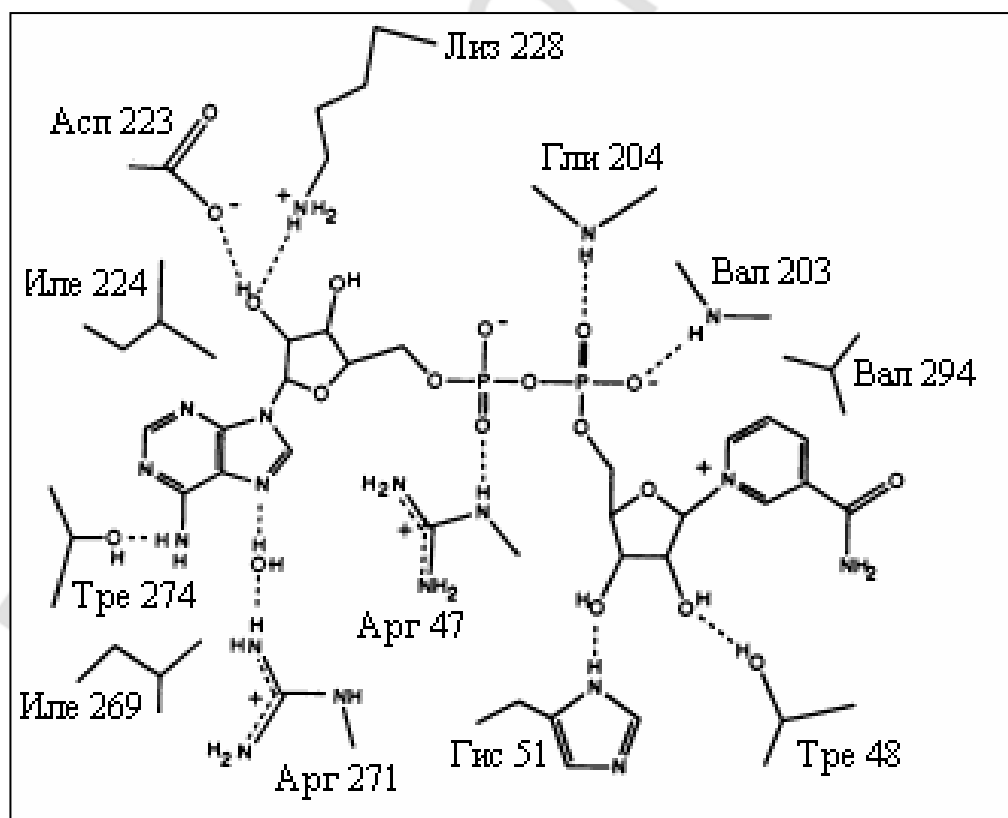
Обе части каталитического домена часто анализируются совместно, потому что имеют сходную структуру, свойства и функции. Границы доменов, установленные разными исследователями, незначительно варьируют, что связано с разными подходами к их определению (структурными, функциональными и др.). В настоящей работе мы воспользовались данными о границах доме-

нов, полученными М. Нидерхат и соавт. с использованием структурного подхода [188]. Помимо этого, в димерах выделяют субстрат- и кофермент-связывающие пакеты (совокупность аминокислотных остатков, непосредственно вовлеченных в катализ), составляющие активный центр фермента [169].

Многие представители семейства АДГ (1, 3 и 4-й классы) изучены с помощью рентгеноструктурного анализа [80, 121, 128, 170, 192, 193]. Так, вторичная структура АДГ1В1 представлена 16 α -спиралями, 19 β -структурами, 39 β -поворотами, двумя γ -поворотами (рис. 1.4) [169]. Архитектура каталитического домена описывается как сложная, а кофермент-связывающего домена — как трехслойный (*aba*) сэндвич (рис. 1.3).

Названные выше структурные характеристики являются общими для всех классов АДГ [71]. Рассмотрим детально механизм действия АДГ на примере алкогольдегидрогеназы 1-го класса как наиболее изученной, одной из наиболее филогенетически древних и обладающей ярко выраженной субстратной специфичностью. Для упрощения объяснения катализируемую АДГ реакцию можно подразделить на следующие стадии: 1) образование двухкомпонентного фермента (холофермента, апофермент-коферментного комплекса); 2) образование трехкомпонентного комплекса (холофермент-субстратного, апофермент-кофермент-субстратного), удерживаемого ионами цинка; 3) собственно каталитическую реакцию [60].

1.2.2. Образование двухкомпонентного фермента



Целью образования двухкомпонентного фермента, т. е. связывания апоферментом НАД⁺, является резкое усиление способности последнего восста-

навливаться по ядру никотинамида. Рассмотрим важнейшие аминокислотные остатки, участвующие в связывании НАД⁺, на примере АДГ1В1 (рис. 1.5).

Рис. 1.5. Важнейшие взаимодействия аминокислотных остатков коэнзим-связывающего пакета последовательности АДГ1В1 с НАД⁺

Адениловое кольцо НАД⁺ связывается гомодимером В1/В1 между боковыми цепями остатков изолейцина, расположенными в 224-м и 269-м положениях. Аминогруппа аденина НАД⁺ образует водородную связь с ОН-группой остатка треонина в 274-м положении, а N7-атом аденина посредством молекулы воды взаимодействует с NH-группой остатка аргинина в 271-м положении. Остатки Асп-223 и Лиз-228 взаимодействуют с 2'-гидроксильной группой одного из остатков рибозы, в то время как ее 3'-гидроксил может образовывать водородную связь с карбонильной группой 364-го остатка, участвующей в образовании пептидной связи [169].

Второй остаток рибозы взаимодействует с боковыми цепями остатков Тре-48, Гис-51 и азотом 294-го остатка, участвующим в образовании пептидной связи. В образовании водородных связей с 2'- и 3'-гидроксильными группами рибозы никотинамида участвуют гидроксильная группа Тре-48 и иминогруппа Гис-51. Как результат этого процесс передачи протона, описанный ниже, происходит лишь частично, что свидетельствует о том, что вклад остатка гистидина полностью реализуется лишь при связывании субстрата с каталитическим ионом цинка. Функционально важное никотинамидное кольцо, напротив, хорошо координируется и при отсутствии субстрата с помощью Ван-дер-Ваальсовых контактов с боковыми цепями остатков Тре-178, Вал-203 и Вал-294. При этом с Вал-294 наблюдается особо близкое взаимодействие, которым некоторые исследователи объясняют переход между открытой и закрытой конформациями фермента. В дополнение к этому еще одна водородная связь формируется азотом карбоксимида с карбонилем 317-го остатка, участвующим в образовании пептидной связи [169].

Однако, согласно данным, которые получили Т. Харлей и соавт. (1991), наиболее важные изменения структуры кофермент-связывающего пакета ортологов обусловлены заменами аминокислотных остатков, взаимодействующих с пирофосфатным мостиком. В АДГ1В1 этот мостик близок к N-концу α -спирального участка, формируемого остатками 202–212. По данным В. Холл (1985), сходное строение характерно для всех нуклеотид-связывающих доменов, где предполагается участие диполей спиралей в стабилизации отрицательного заряда фосфата (рис. 1.6).

Из аминокислотных остатков, входящих в состав α -спирального участка, наиболее важны Вал-203 и Гли-204, NH-группы которых образуют водородные связи с атомами кислорода остатка фосфорной кислоты молекулы НАД⁺. Расстояние между NH-группами составляет 3,5 Å и сходно с таковым между атомами кислорода (2,6 Å), что обеспечивает хорошую геометрию этих связей. В

этих условиях разница свободной энергии между фосфат-свободным и фосфат-связанным состояниями увеличивается за счет нестабильности, присущей расположенным в начале спирали свободным амидным группам в апоферменте [169].

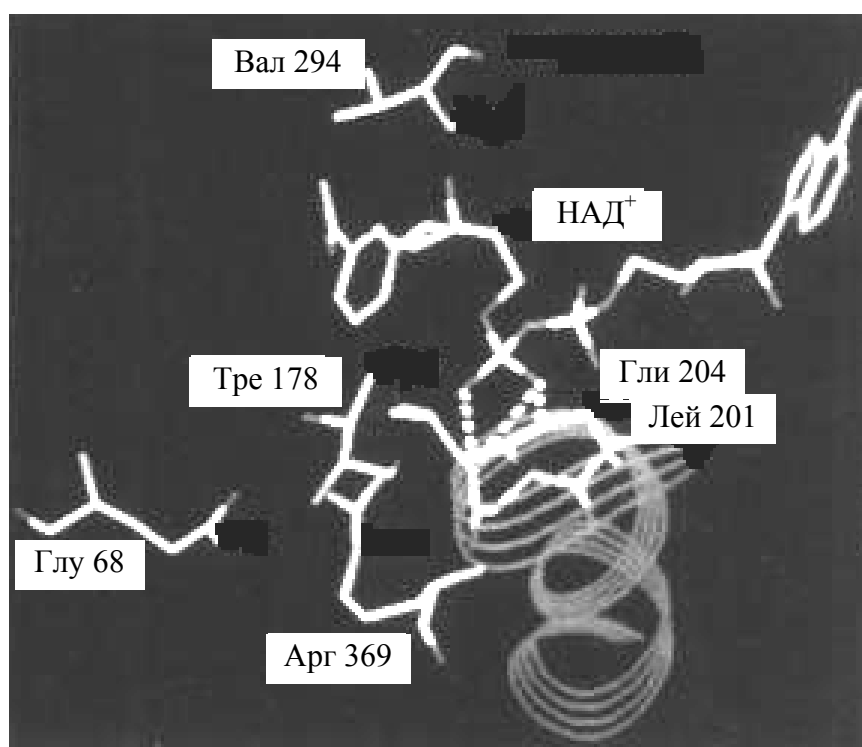


Рис. 1.6. Стабилизация отрицательного заряда фосфатов НАД⁺ диполями α -спирали 201–212 АДГ человека

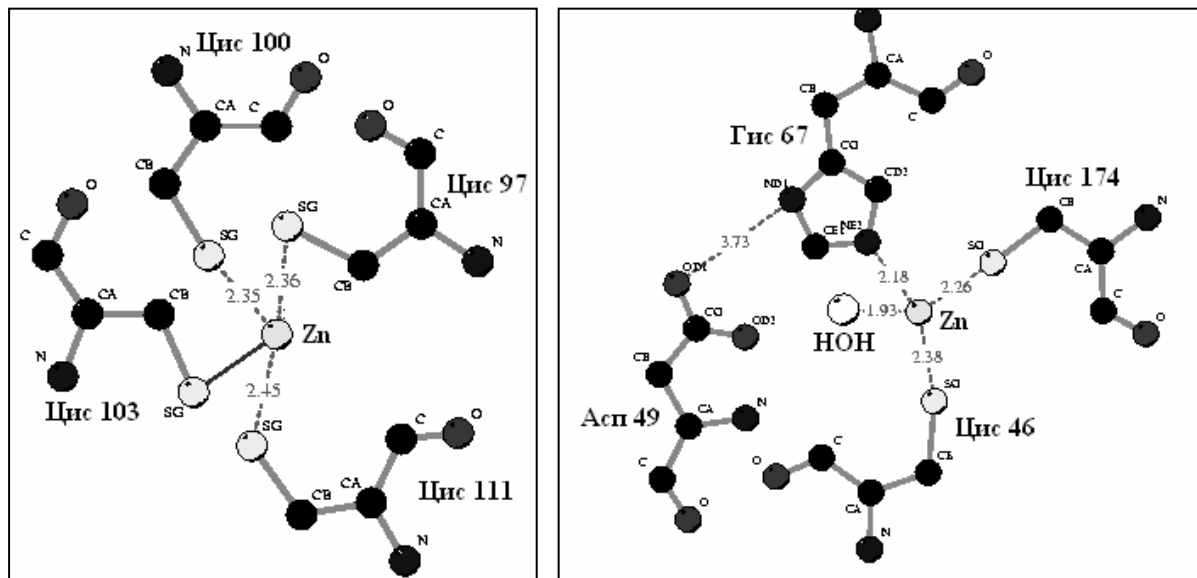
Примечание. α -Спираль построена на атомах С и N. Белой пунктирной линией обозначены потенциальные водородные связи.

Как и в других нуклеотид-связывающих ферментах, в АДГ1В1 остатки фосфорной кислоты молекул НАД⁺ также стабилизируются взаимодействиями с положительно заряженными остатками аминокислот (Арг-47 и Арг-369). Атом водорода ϵ -N остатка аргинина в 47-м положении взаимодействует с кислородом фосфата аденозина НАД⁺, образуя с ним одну или две водородные связи. Эти связи являются более прочными по сравнению с таковыми ортологов, что объясняется отсутствием взаимодействия Арг-47 с рядом расположенной Асп-50 (она взаимодействует с остатком Гис-363). Значение этого остатка аргинина подтверждается и тем, что его замена на гистидин, которая наблюдается в последовательности АДГ1В2, вызывает значительные изменения кинетики связывания кофермента [169].

В заключение следует сказать, что к наиболее важным остаткам, участвующим в образовании холофермента, являются остатки в 47, 48, 51, 269 и 271-м положениях. Именно они и составляют кофермент-связывающий пакет АДГ.

1.2.3. Аминокислотные остатки, взаимодействующие с ионами цинка

Как было сказано выше, каждый димер АДГ связывает 4 иона цинка, 2 из которых принимают непосредственное участие в катализе. С некаталитическим



ионом цинка взаимодействуют сульфгидрильные группы 4 остатков цистеина, расположенные в 97, 100, 103 и 111-м положениях (рис. 1.7).

С каталитическим цинком взаимодействуют 3 аминокислотных остатка (Цис-46, Гис-67 и Цис-174), а также молекула воды (рис. 1.7) [80]. Между NH имидазольного кольца остатка Гис-67 и кислородом остатка аспарагиновой кислоты, расположенной в 49-м положении, образуется водородная связь.

Рис. 1.7. Аминокислотные остатки последовательности АДГ1В1, взаимодействующие с некаталитическим (слева) и каталитическим (справа) Zn^{2+}

1.2.4. Характеристика субстрат-связывающего пакета и образование трехкомпонентного комплекса, удерживаемого ионами цинка

Примечательно, что, несмотря на более чем 90 % гомологии аминокислотных последовательностей АДГ 1-го класса, их субстрат-связывающие пакеты сходны приблизительно лишь на 50 %, что и обуславливает их субстратную специфичность.

Субстрат-связывающий пакет алкогольдегидрогеназы описывается как цилиндр, имеющий диаметр 7–10 Å и тянущийся на протяжении 15 Å от каталитического иона цинка до поверхности фермента (рис. 1.8) [80, 189].

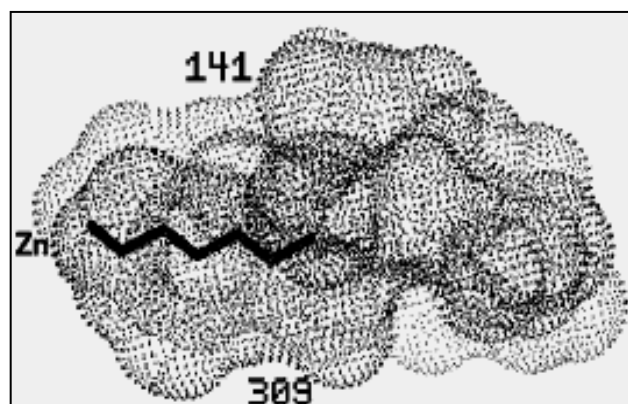


Рис. 1.8. Субстрат-связывающие пакеты АДГ4 и АДГ1В1

Примечание. Субстрат-связывающий пакет АДГ4 обозначен темными точками, ион каталитического цинка расположен слева, а вход в пакет — справа

Аминокислотные остатки, формирующие этот цилиндр (рис. 1.9), являются преимущественно алифатическими или ароматическими, за исключением функционально важного остатка треонина (или серина) в 48-м положении, который взаимодействует с кислородом субстрата [80, 112]. По близости к каталитическому цинку все составляющие субстрат-связывающий пакет аминокислотные остатки делятся на три региона — внутренний, средний и наружный.

Внутренняя часть субстрат-связывающего пакета состоит из остатков, расположенных в 48-м и 93-м положениях, в непосредственной близости от которых располагается никотинамидное кольцо НАД⁺. Наибольшие изменения субстратной специфичности связаны с заменами аминокислот именно во внутреннем участке субстрат-связывающего пакета. Аминокислотный остаток, занимающий 48-ю позицию, участвует в каталитической реакции, облегчая перенос протона от молекулы спирта в реакционную среду. Активные формы алкогольдегидрогеназы имеют в этом положении остатки серина или треонина, за счет гидроксильной группы боковых цепей которых и осуществляется перенос протона. Ферменты, содержащие треонин в 48-м положении, обладают несколько меньшей специфичностью ко вторичным спиртам, что связано с наличием дополнительной метильной группы в боковой цепи треонина [80, 189].

Аминокислотный остаток, расположенный в 93-м положении, также оказывает огромное влияние на субстратную специфичность. В большинстве алкогольдегидрогеназ в этом положении находятся остатки ароматических аминокислот (Фен, Тир или Три), которые формируют дно субстрат-связывающего пакета и создают строгие стереограничения на связывание вторичных спиртов [166]. В результате этого большинство алкогольдегидрогеназ предпочтительно катализируют реакции с их S, а не R-энантиомерами.

Средняя часть пакета формируется остатками, занимающими 140, 141, 294, 309, 318 и 319-е положения, при этом 309-й остаток предоставляется второй субъединицей димера. Среди изоферментов 1-го класса аминокислотные

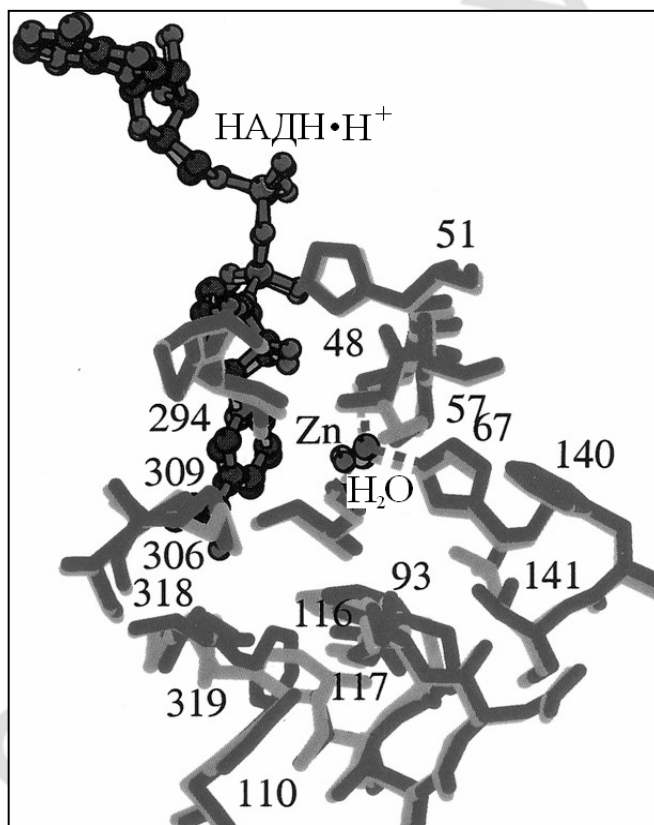


Рис. 1.9. Стереодиаграмма субстрат-связывающего пакета АДГ1В1 (выделена светло-серым цветом) и АДГ1С2 (выделена темно-серым цветом) в комплексе с коферментом

остатки в 140, 294 и 309-м положениях идентичны, а в 141, 318 и 319-м — варьируют. Этот участок субстрат-связывающего пакета взаимодействует с алифатическими хвостами длинных субстратов, таких как бутанол, пентанол и др. [189].

Наружная часть субстрат-связывающего пакета состоит из 57, 58, 110, 116, 117, 297 и 306-го остатков, при этом остаток в 306-м положении также предоставляется второй субъединицей. Аминокислотные остатки, занимающие 57, 116, 117 и 297-е положение, формируют вход в субстрат-связывающий пакет, часто сравниваемый с горлышком бутылки из-за его малого диаметра (6 Å). Изофермент АДГ1В1 имеет более узкий вход в субстрат-связывающий пакет (5 Å), что объясняется конформацией боковой цепи Лей-116. Этот остаток обычно существует в двух конформациях, одна из которых частично закрывает вход в субстрат-связывающий сайт, а вторая — нет [173]. При образовании трехкомпонентного комплекса происходят конформационные изменения, в результате которых каталитический и кофермент-связывающий домены сближаются, и вход в субстрат-связывающий сайт уменьшается. Однако его размеры остаются достаточными для проникновения большого количества субстратов [80, 189]. Остатки, занимающие 58, 110, 117 и 297-е положение, взаимодействуют только с очень длинными спиртами (более 10 атомов углерода), которые имеют гидрофильные группы на противоположном реакционному конце молекулы.

Аминокислотные остатки, предоставляемые второй субъединицей (306, 309-й) в субстрат-связывающий пакет, идентичны в изоферментах первого класса, поэтому гетеродимеры АДГ 1-го класса имеют ту же субстратную специфичность, что и гомодимеры [189].

При образовании трехкомпонентного комплекса место молекулы воды, связанной с каталитическим ионом цинка, занимает кислород ОН-группы молекулы спирта, в результате чего ион цинка остается тетраэдрическим [80]. Но при этом образуется острый угол между кислородом субстрата, ионом цинка и NE2 остатка Гис-67, что обуславливает малое (3,1 Å) расстояние между кислородом субстрата и указанным азотом остатка гистидина [80]. Из сказанного выше ясно, что созданная безводная среда необходима для протекания каталитической реакции. Доступное для реакционной части субстрата пространство в области каталитического цинка строго

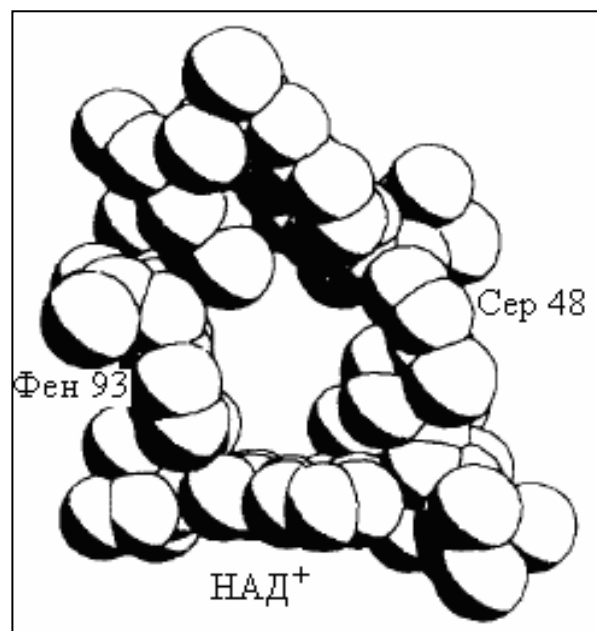


Рис. 1.10. Структура свободного субстрат-связывающего пакета АДГ1 лошади

ограничивается компонентами внутренней части субстрат-связывающего пакета и молекулой НАД⁺ (рис. 1.10).

Так, гидроксильная группа 48-го остатка располагается таким образом, что образует водородную связь с кислородом субстрата, находящимся от нее на расстоянии 2,8 Å [80]. В результате атомы углерода этанола оказываются прочно зафиксированными боковыми радикалами Тре-48 и Фен-93. При этом С1-атом водорода молекулы спирта оказывается в удобном для прямой передачи положении, а между метильной группой, никотинамидным кольцом и остатком Тре-48 возникают благоприятные взаимодействия. Таким образом, с помощью ионов цинка и ключевых аминокислотных остатков происходит ориентация и связывание молекулы спирта.

1.2.5. Собственно каталитическая реакция

Согласно данным литературы, осуществляемая АДГ реакция катализа состоит из двух несвязанных между собой реакций — переноса протона в реакционную среду и переноса гидрид-иона на С4-атом никотинамидного кольца [80].

Исследования механизма действия АДГ, проведенные в различных лабораториях, показали, что рН оказывает влияние на скорость реакции [133]. Эта зависимость объясняется тем, что выделение протона и превращение спирта в алкоксианион предшествуют переносу гидрид-иона [80, 99]. Рассмотрим подробно механизм этой зависимости.

Еще в 1972 г. было показано, что для максимальной активности окисления этанола необходима депротонизация группы (или групп) с рК 6,4 в комплексе фермента с НАД⁺ [100]. Выделение этих групп является достаточно сложным, поскольку ионизированные группы белков часто являются компонентами сложных систем, связанных водородными связями. Таким образом, величина рК может относиться к группе или системе, а различные группы с близкими значениями рК могут участвовать в реакции на разных этапах механизма действия АДГ. Более того, ионизация группы может оказывать влияние на активность посредством конформационных изменений. Простейшее объяснение зависимости рН заключается в том, что связывание молекулы спирта с ионом цинка уменьшает рК этанола. Хотя положительный заряд иона цинка редуцируется двумя меркаптидными лигандами и, таким образом, не может оказывать большого влияния на рК этанола, но рядом располагается положительно заряженное никотинамидное кольцо (расстояние от кислорода спирта до центра кольца приблизительно равно 3,7 Å), что может влиять на рК. Д. Квассман предположил, что ионизация самого этанола (возможно, как части системы депротонизации) приводит к выделению протона [174].

Основанная на предварительной модели апофермента система депротонизации была описана в фундаментальных работах, опубликованных в 1975–1976 гг. А. Бренденом и соавт., Х. Эклундом и соавт. [80, 188]. Впоследствии при изучении АДГ1 с помощью рентгеноструктурного анализа было обнаружено, что к

водород-связывающей системе относится и гидроксильная группа кофермента. Таким образом, в настоящее время к системе выделения протона относятся: ОН-группа спирта, 2'-ОН-группа рибозы никотинамида, ОН-группа остатка Тре-48, имидазольное кольцо остатка Гис-51 и каталитический ион цинка, взаимодействующий с остатками Цис-46, Гис-67 и Цис-174. Возможные состояния ионизации этой системы, согласно Х. Эклунду и соавт., показаны на рисунке 1.11 [80].

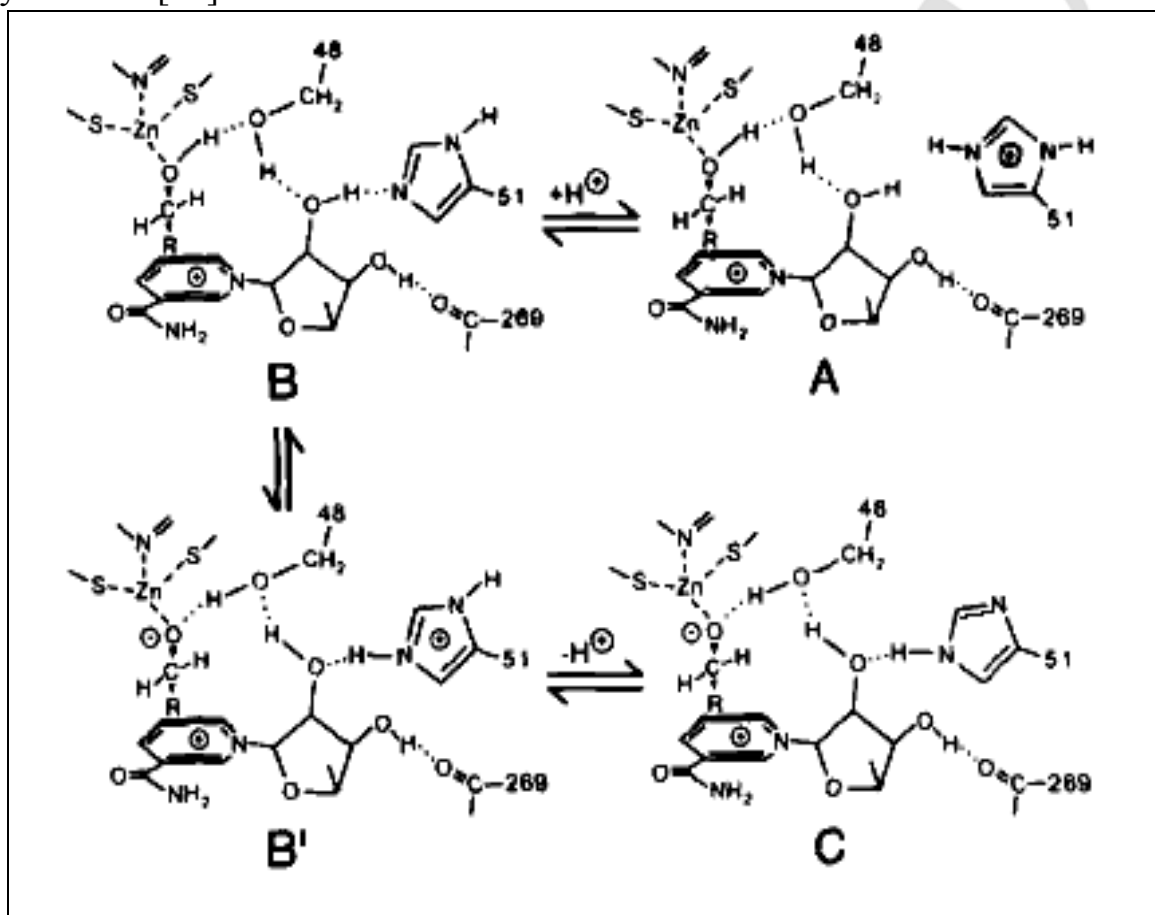


Рис. 1.11. Схема депротонизации системы переноса протона АДГ1

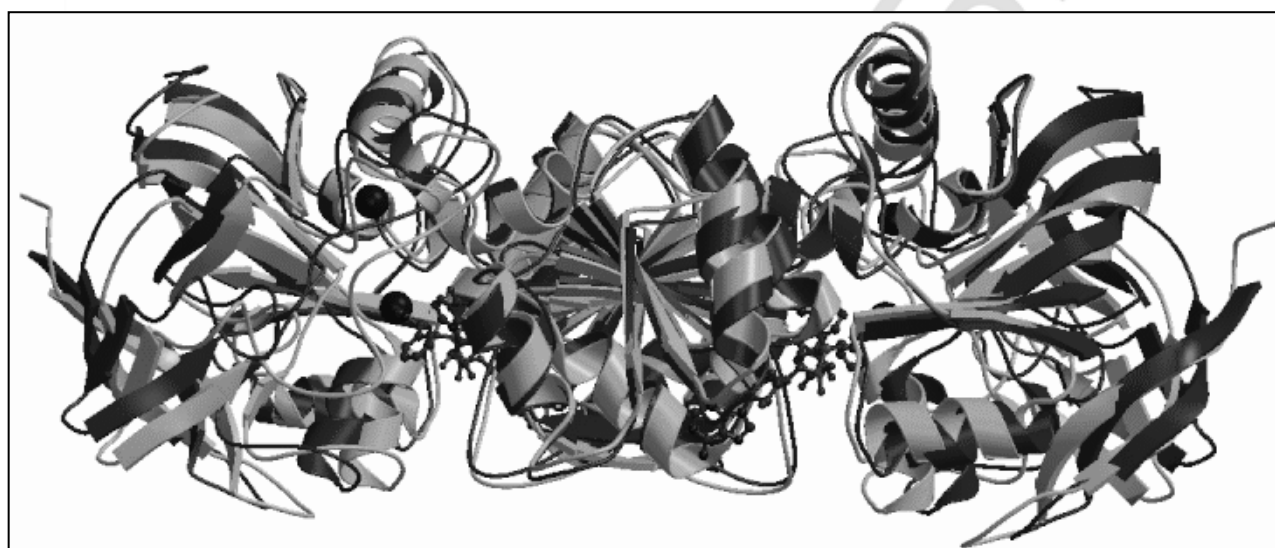
Предполагается, что система существует в виде структуры В или таутомера В', а при взаимодействии компонентов она может переходить в протонированную форму А или депротонированную форму С. Последняя является наиболее вероятной, поскольку при ее образовании в реакционную среду выделяется протон, а молекула спирта превращается в алкоксианион.

Затем происходит вращение атомов вокруг одинарных связей алкоксианиона для сближения водорода с С4-атомом никотинамидного кольца, что обеспечивает легкий прямой перенос гидрид-иона [80]. В результате этого процесса образуется соответствующий альдегид или кетон, а также восстановленный кофермент.

1.2.6. Структурные особенности алкогольдегидрогеназ 3-го класса

Структура алкогольдегидрогеназы 3-го класса (рис. 1.12) имеет наибольшие отличия от рассмотренной выше структуры АДГ1. Большое количество замен аминокислот, в том числе и в активном центре, обуславливает наличие уникальной каталитической активности. Также заметим, что АДГ3 является филогенетически наиболее древней формой всех алкогольдегидрогеназ [103, 135, 151].

Для АДГ3 характерна точная координация каталитического иона цинка с помощью остатка Глу-68, что создает уникальное его окружение [121, 170, 171, 172]. Расположение 47-го остатка (Гис) наводит на мысль о наличии у него двух функций. Это, во-первых, акцептирование протона, а во-вторых, связывание аденозина НАД⁺. Одним из субстратов АДГ3 является глутатион. В связы-



вании глутатиона участвуют остатки Асп-57 и Арг-115, в то время как в связывании ω -гидроксижирных кислот принимает участие только Арг-115 [120, 170]. Уникальным свойством АДГ3 является активация гидрофобными анионами, в частности жирными кислотами, увеличивающими скорость реакций приблизительно в 30 раз [144]. Особенностью механизма действия АДГ3 является то, что протон ОН-группы субстрата переносится в раствор непосредственно через кофермент без участия остатка гистидина [120].

Рис. 1.12. Структуры димеров АДГ3 и АДГ1В1 человека

Примечание. АДГ3 выделена черным, АДГ1В1 — серым цветом, каталитические домены расположены по краям, а кофермент-связывающие домены — в центре

1.2.7. Тканевая и клеточная локализация алкогольдегидрогеназ

Представители всех классов алкогольдегидрогеназ имеют строго определенную тканевую и органную локализацию. Изоферменты АДГ1 содержатся в большом количестве в печени, тонком кишечнике, сетчатке глаза, в меньшем количестве — в почках, яичниках, матке и в наименьшем количестве — в спинном мозге, тимусе, сердце, слизистой оболочке желудка, коже и яичках. Примечательно, что в мозге и селезенке АДГ 1-го класса не обнаружена [85, 97,

111]. АДГ2 обнаружена лишь в печени и, возможно, коже, что свидетельствует о ее сильно ограниченной тканевой локализации [97]. АДГ5 обнаружена лишь в печени эмбриона. Алкогольдегидрогеназа 4-го класса, в основном, локализуется в эпителиальной ткани, ее высокое содержание наблюдается в слизистой оболочке желудка, меньшее — в тимусе, коже, роговице глаз, яичниках, очень низкое — в печени, тонком кишечнике и матке [97, 111, 117, 138]. Алкогольдегидрогеназа 3-го класса имеется в большинстве тканей и органов и в отличие от всех остальных представителей семейства АДГ присутствует в мозге. При этом наибольшее ее содержание отмечается в нейронах красного ядра, сосудистых сплетениях головного мозга, среднее содержание — в кортикальных нейронах, клетках Пуркинье, клетках гиппокампа и черного вещества [85, 96, 110, 111].

При сравнении локализации АДГ 1-го и 4-го классов в пищеварительном тракте отмечено, что алкогольдегидрогеназа 4-го класса содержится в большом количестве в его верхних (пищевод и желудке) и нижних (колоректальных) участках, а АДГ1 — в тонком кишечнике и в незначительном количестве — в желудке. При этом АДГ4 обнаруживается в поверхностных слоях клеток, а АДГ1 — во внутренних. Вышеназванные особенности локализации АДГ можно легко объяснить в связи с выполняемыми ими функциями, что сделано нами ниже.

Из-за выраженной тканевой специфичности АДГ 1-го класса часто называют печеночной (или классической), АДГ3 — мозговой, АДГ4 — желудочной, а АДГ5 — эмбриональной.

Представители всех классов АДГ обнаружены в цитоплазме клеток, а алкогольдегидрогеназа 3-го класса выделена еще и из ядра. Это говорит о возможности выполнения ею функции защиты различных клеточных структур, включая ДНК, от действия формальдегида [60].

1.3. Регуляция активности алкогольдегидрогеназ

Регуляция активности алкогольдегидрогеназ носит очень сложный и многообразный характер, что обусловлено множеством выполняемых функций и специфичной тканевой локализацией. АДГ подвержены действию большого количества эффекторов, таких как производные пиразола, формамидов, карбоновых кислот и никотинамида, а также сульфоксидов, азидов, гормонов щитовидной железы и многих других [1, 102, 112, 124, 125, 161, 165, 181, 182].

1.3.1. Конкурентное ингибирование

Как сказано выше, пиразол и его замещенные по 4-му положению производные являются конкурентными ингибиторами АДГ. Механизм их действия связан с формированием компактного комплекса с холоферментом, в котором азот пиразола взаимодействует с каталитическим ионом цинка и С4-атомом молекулы НАД⁺ [112, 189, 192]. Наиболее чувствительными к действию пира-

зола являются АДГ 1-го класса (K_i для 4-метилпиразола равна 0,2–0,3 μM), значительно менее чувствительными — АДГ 4-го класса ($K_i = 10 \mu\text{M}$) и нечувствительными — АДГ2 ($K_i = 400 \mu\text{M}$) и АДГ3 ($K_i > 50000 \mu\text{M}$) [186].

Конкурентное ингибирование возможно и между различными субстратами АДГ. Такое ингибирование было показано для окисления ретинола алкогольдегидрогеназами человека классов 1 ($K_i = 0,04\text{--}3,8 \text{ mM}$) и 4 ($K_i = 6\text{--}12 \text{ mM}$) при алкогольной интоксикации. Так, этанол конкурентно ингибирует АДГ, а значения K_i соответствуют таковым, достигаемым при среднем количестве употребляемого алкоголя. Ингибирование этанолом окисления ретинола неминуемо приведет к уменьшению клиренса токсичного ретинола и нарушению синтеза участвующей в сигнализации ретиноевой кислоты [159, 160]. Помимо этого, при постоянном употреблении алкоголя происходит индуцирование ряда ферментов, разрушающих ретиноевую кислоту. С этим механизмом ингибирования алкогольдегидрогеназ в последнее время все чаще связывают канцерогенез. При этом зоны высокой активности АДГ и низкой активности ацетальдегиддегидрогеназ (пищевод и толстый кишечник) считаются наиболее уязвимыми; в них вследствие нарушения синтеза ретиноевой кислоты может увеличиваться пролиферация клеток и иметь место неоплазия [111].

1.3.2. Неконкурентное ингибирование

В 1969 г. было показано, что триодтиронин и тироксин являются неконкурентными ингибиторами по отношению к НАД^+ . Они действуют путем формирования неактивного комплекса с холоферментом, а значение K_i для них составляет около 1 μM [125, 181]. Неконкурентными ингибиторами алкогольдегидрогеназ также являются и сульфоксиды, которые связываются с холоферментом. С помощью рентгеноструктурного анализа установлено, что сульфоксиды также взаимодействуют с бензольным кольцом остатка фенилаланина, занимающим 93-е положение [165]. Так, например, АДГ1С2 наиболее подвержена ингибированию 3-бутилтиолан-1-оксидом ($K_i = 0,30 \mu\text{M}$) и 3-гексилтиолан-1-оксидом ($K_i = 0,35 \mu\text{M}$).

Недавно были опубликованы результаты исследований, посвященных изучению способности производных N-формамидов селективно ингибировать изоферменты АДГ человека. Механизм ингибирования сводится к взаимодействию амидной NH-группы и бензольного кольца остатка Фен-93. К наиболее возможным ингибиторам были отнесены N-циклопентил-N-циклобутилформамид, N-бензилформамид и N-1-метилгептилформамид для изоферментов АДГ1А, АДГ1В и АДГ1С2 соответственно. Так, например, для АДГ1С2 значение K_i N-1-метилгептилформамидом равно 0,41 μM . Селективное связывание ингибиторов легко объяснить на примере АДГ1А, в 93-м положении последовательности которой наблюдается замена остатка фенилаланина на аланин. Освободившееся в результате этого значительное пространство легко занимает двухзамещенное производное N-формамида. Считается, что при различных

концентрациях субстрата формамиды являются неконкурентными ингибиторами этанола и конкурентными ингибиторами циклогексанона [112, 126].

1.3.3. Другие виды регуляции

В последнее время стало уделяться внимание ингибированию алкогольдегидрогеназ некоторыми лекарственными средствами. К ним относятся антагонисты H_2 -рецепторов (циметидин, ранитидин, фамотидин и низадин), антипиретики (салициловая кислота, ацетаминофен), антипротозойные препараты (метронидазол), антипаркинсонические и противовирусные препараты (производные адамантана), препараты, используемые при лечении лучевой болезни (меркаптаны) [1, 101, 115].

Получены данные о регуляции АДГ гормоном роста, который повышает активность промотора АДГ посредством ЦЦААТ-энхансер-связывающего β -белка и фактора активации транскрипции 5b [102]. Липополисахарид эндотоксина, имеющегося у грамотрицательных бактерий, также повышает активность АДГ, но благодаря регуляторному белку [102]. Кроме этого, участок промотора АДГ1С, называемый RARE (retinoic acid response element, элемент ответа ретиноевой кислоты) взаимодействует с ретиноевой кислотой, на основании чего выдвинута гипотеза о положительной обратной связи синтеза активной формы витамина А [159]. Имеются данные о возможной регуляции алкогольдегидрогеназ посредством гликозилирования. Так, по ϵ -аминогруппе Лиз-231 АДГ1 с высокой вероятностью (70–75 %) может присоединяться молекула глюкозы [163].

Кроме этого, очевидно существование и других механизмов регуляции, потому что активность АДГ зависит от этнической принадлежности, пола, возраста и общесоматического состояния организма. Так, у монголоидов АДГ2 характеризуется замещением аргинина на гистидин в 47-й позиции, в результате чего активность в отношении этанола повышается в 50–100 раз.

У мужчин активность АДГ выше, чем у женщин. Активность АДГ у мужчин снижается с возрастом, а у женщин увеличивается, достигая максимума в 41–60 лет, а затем уменьшается.

Некоторые хронические заболевания (хронические и атрофические гастриты, преимущественно связанные с *H. pylori*) сопровождаются снижением алкогольдегидрогеназной активности [115].

В заключение надо сказать, что хотя алкогольдегидрогеназная система является главным метаболическим путем этанола (~90 %), при ингибировании АДГ альтернативные системы окисления (цитохром P450 микросом и каталаза пероксисом) и экскреция также могут выполнять эту функцию.

1.4. Общие и специфические функции алкогольдегидрогеназ

К общим функциям АДГ всех классов относят их участие в окислении спиртов и восстановлении альдегидов. Однако различия в строении активных

сайтов обуславливают их выраженную субстратную специфичность, соответственно, специфические функции. Рассмотрим наиболее важные из них.

1.4.1. Участие алкогольдегидрогеназ в метаболизме этанола

Субстратная специфичность АДГ различных классов имеет существенные различия и прежде всего эти различия касаются их способности окислять этанол и восстанавливать ацетальдегид. В широком диапазоне концентраций эта функция присуща, в первую очередь, АДГ 1-го и 4-го классов, а при высоких концентрациях субстрата и АДГ 2 [70]. Следует подчеркнуть, что АДГ 4 ($K_m = 41$ мМ) более активна в отношении этанола, чем АДГ 1 ($K_m = 1$ мМ) [115, 135].

Катализируемая этими ферментами реакция характеризуется положением равновесия, которое смещено влево при близких к физиологическим концентрациях. Это отражает детоксицирующее действие АДГ по отношению к ацетальдегиду, постоянно образующемуся при многих метаболических процессах. Формирующиеся при этом концентрации этанола (1–10 мкг/мл крови) заведомо нетоксичны. Физиологическое значение эндогенного этанола заключается в поляризации мембран и активации аденилатциклазы, приводящей к повышению содержания цАМФ.

Однако при поступлении экзогенного этанола происходит повышение его концентрации в крови и равновесие реакции смещается вправо, а АДГ становятся генераторами ацетальдегида [1]. Важно подчеркнуть, что при поступлении экзогенных спиртов (или альдегидов) АДГ 4 действует как первый метаболический барьер, т. к. контактирует с их высокими концентрациями в верхней части желудочно-кишечного тракта, являющейся зоной сильного окислительного стресса. Вторым метаболическим барьером является АДГ 1, потому что она локализуется в последующих отделах желудочно-кишечного тракта и преимущественно в его внутренних слоях. Однако АДГ 1 может выполнять роль и первого метаболического барьера, но лишь при низких концентрациях этанола. Нельзя забывать, что при участии микрофлоры кишечника постоянно образуется небольшое количество эндогенного этанола и именно необходимостью его метаболизма объясняется высокое содержание АДГ 1 в нижних отделах желудочно-кишечного тракта [85, 111].

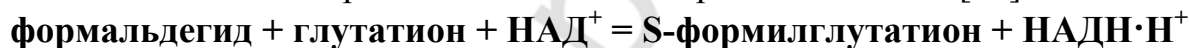
Повреждая ряд ферментов, надмолекулярных образований, мембран ацетальдегид индуцирует разнообразные патологические процессы. К таким процессам относится и модификация части аминокислотных групп белков с образованием ацетальдегидных аддуктов [1]. Такая двойственность роли АДГ 1-го и 4-го классов еще более усиливается тем фактом, что изофермент АДГ 1С способен катализировать реакцию дисмутации, в результате которой возможно окисление ацетальдегида до ацетата [70]. Этот процесс имеет большое значение при физиологических концентрациях этанола и ацетальдегида, однако при поступлении значительных количеств этанола извне большая часть ацетальдегида окисляется ацетальдегиддегидрогеназной системой [1].

1.4.2. Участие алкогольдегидрогеназ в метаболизме метанола и формальдегида

Эту функцию АДГ следует рассматривать в двух аспектах: окисление метанола до формальдегида и глутатион-зависимое окисление последнего. Алкогольдегидрогеназы 1-го и 4-го классов обладают относительно невысокой способностью окислять метанол с образованием высокотоксичного формальдегида, в то время как представители других классов АДГ вовсе лишены этой способности. Негативная роль АДГ в этой ситуации может быть частично компенсирована отвлечением ее на окисление экзогенного этанола. На этом основан путь лечения отравлений метанолом посредством введения значительных количеств этанола [1].

Следует учитывать, что в организме человека обнаруживается эндогенный (образуется на нескольких метаболических путях) и экзогенный формальдегид (продуцируется в небольших количествах в природе и в значительно больших количествах — в результате промышленной деятельности), а суммарный его уровень в крови составляет 0,46–2,81 μM . В связи с этим важно участие алкогольдегидрогеназы 3-го класса в специфической для нее реакции окисления формальдегида с участием глутатиона, в ходе которой образуется S-формилглутатион и восстановленный НАДН·Н⁺.

Схематически эта реакция может быть представлена так [67]:



Именно с этой реакцией связана выполняемая АДГ3 функция защиты клетки от генерируемого при многих метаболических процессах формальдегида. В этом контексте легко понять, почему АДГ3 присутствует во всех органах и тканях. При поступлении существенных количеств метанола извне окисление образующегося формальдегида не обеспечивается АДГ3 в рассмотренной выше реакции. Следует подчеркнуть, что рассмотренная функция АДГ сопряжена с рядом процессов метаболизма одноуглеродных радикалов в организме [1].

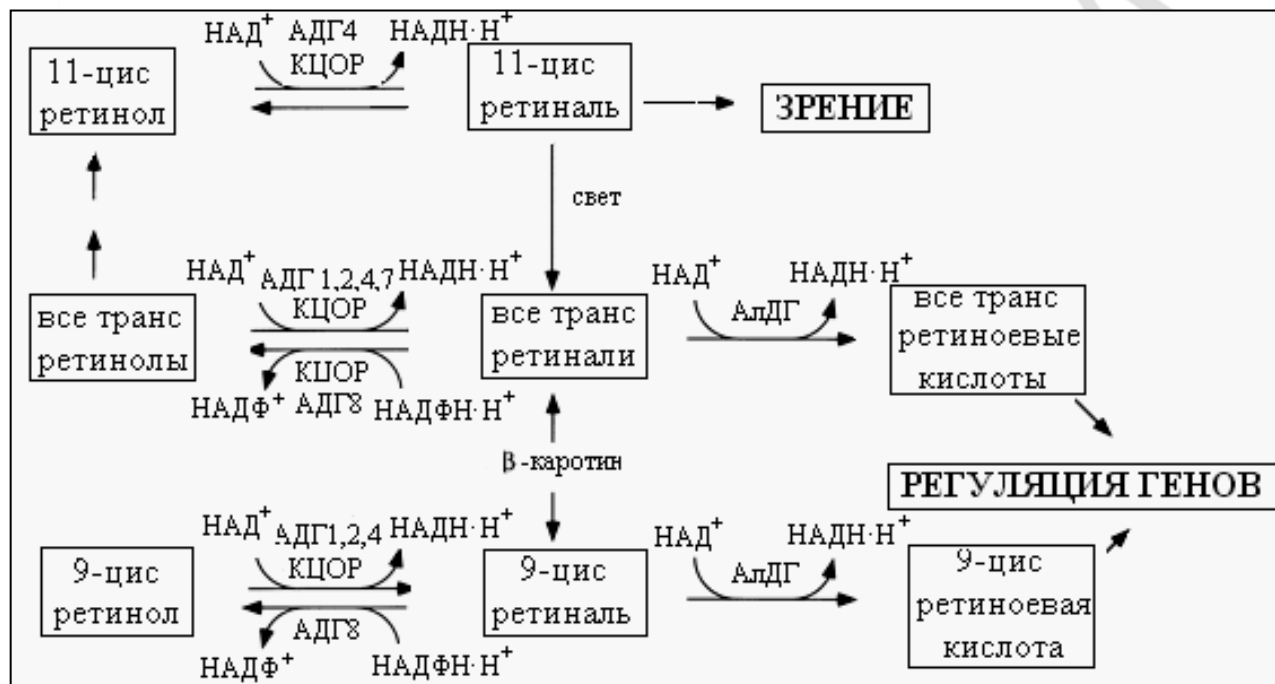
В последующем к образующемуся S-формилглутатиону одноименной гидролазой необратимо присоединяется молекула воды, в результате чего образуются формиат и глутатион.

Имеются данные, подтверждающие тесную взаимосвязь участия АДГ в метаболизме метанола и этанола. Увеличение в цитозоле количества НАДН·Н⁺, восстановленного в ходе реакций окисления спиртов, ингибирует окисление жирных кислот в пероксисомах. Механизм этого ингибирования заключается в том, что в ходе угнетается активность β -гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы, которой необходим НАД⁺. В противоположном случае, когда увеличение количества восстановленного НАДН·Н⁺ связано с окислением жирных кислот, образуется перекись водорода, разрушаемая впоследствии каталазой. Важно, что в каталазной реакции метанол окисляется до формальдегида, который является специфичным субстратом для АДГ3 [157].

1.4.3. Участие алкогольдегидрогеназ в метаболизме ретинола

Наибольшее физиологическое значение имеют такие метаболиты ретинола (витамина А), как 11-цис-ретиноаль, все транс-ретиновые кислоты и 9-цис-ретиновая кислота (рис. 1.13).

Первой функцией метаболитов ретинола является участие в восприятии света сетчаткой глаза. Так, 11-цис-ретиноаль, являясь простетической группой липопротеина опсина, входит в состав воспринимающего свет пигмента сетчатки — родопсина. Печеночная АДГ1 является одним из первых ферментов, у ко-



торых была обнаружена способность окислять ретинол в ретиноаль. Однако следует сказать, что АДГ1 преимущественно взаимодействует лишь с транс-ретинолом.

Необходимо отметить, что эта реакция обратима, но т. к. при физиологических условиях соотношение $\text{НАД}^+/\text{НАДН}\cdot\text{Н}^+$ составляет 1000, равновесие смещено в сторону образования ретиналя.

Рис. 1.13. Метаболические пути ретинола и его функционально важных производных

Примечание. КЦОР — короткоцепочечные оксидоредуктазы, АлДГ — альдегиддегидрогеназы

Алкогольдегидрогеназа 4-го класса в равной степени окисляет все транс- и 9-цис-ретинолы и делает это более эффективно, чем АДГ1 [97, 138]. Сходно с АДГ1, но в значительно меньшей степени, АДГ2 окисляет все транс-ретинолы. Наиболее высокая активность АДГ1 и АДГ4 характерна для мозгового слоя надпочечников, главного центра синтеза ретиновой кислоты [1]. Очевидно также функциональное значение АДГ-зависимого (с участием АДГ4) синтеза ретиналя в сетчатке глаза и в подкожной клетчатке. При этом окисляется именно свободный ретинол в цитоплазме клетки. Ретинол, связанный с белком-носителем, окисляется в митохондриях короткоцепочечными оксидоредуктазами [97].

Второй, присущей лишь хордовым животным, функцией метаболитов ретинола является генная регуляция дифференцировки эпителиальных клеток и эмбрионального развития, которую выполняет активная форма витамина А — ретиноевая кислота [72, 85]. Все транс- и 9-цис-ретиноевые кислоты являются лигандами ядерных ретиноидных рецепторов, подразделяемых на 2 семейства — RAR (retinoic acid receptor, рецептор ретиноевой кислоты) и RXR (retinoic X-receptor, ретиноевый X-рецептор). Активным рецептором является гетеродимер RAR/RXR, который превращается в фактор транскрипции, связывающийся с регуляторными участками ДНК и таким образом регулирующий транскрипцию гена в ответ на связывание лиганда. При этом RAR связывается с транс- и 9-цис-ретиноевыми кислотами, а RXR — только с 9-цис-ретиноевой кислотой. Под действием ретиноевой кислоты происходит индукция многих ключевых генов, к которым относятся важные для эмбрионального развития гены и гены, кодирующие внеклеточные белки. Представителями последних являются коллаген и ламинин В1, необходимые для дифференцировки многих клеток [97]. Как видно на рисунке 1.13, эту функцию также выполняют АДГ 1, 2 и 4-го классов.

1.4.4. Участие алкогольдегидрогеназ в метаболизме хинонов

В 1994 г. была доказана способность алкогольдегидрогеназы 2-го класса выполнять функцию хинонредуктазы, восстанавливая бензохинонимин и бензохиноны. Наибольшую активность АДГ2 проявляет в отношении таких субстратов, как 1,4-бензохинонимин, 1,4-бенхинон и 2-метил-1,4-бензохинон, в то время как нафтохиноны не являются субстратами. Следует сказать, что АДГ2 играет важную роль в восстановлении паранитрозофенола в парааминофенол. Активность АДГ2 человека в ходе этих реакций более чем в 100 раз выше по сравнению с ортологом лошади [1, 136].

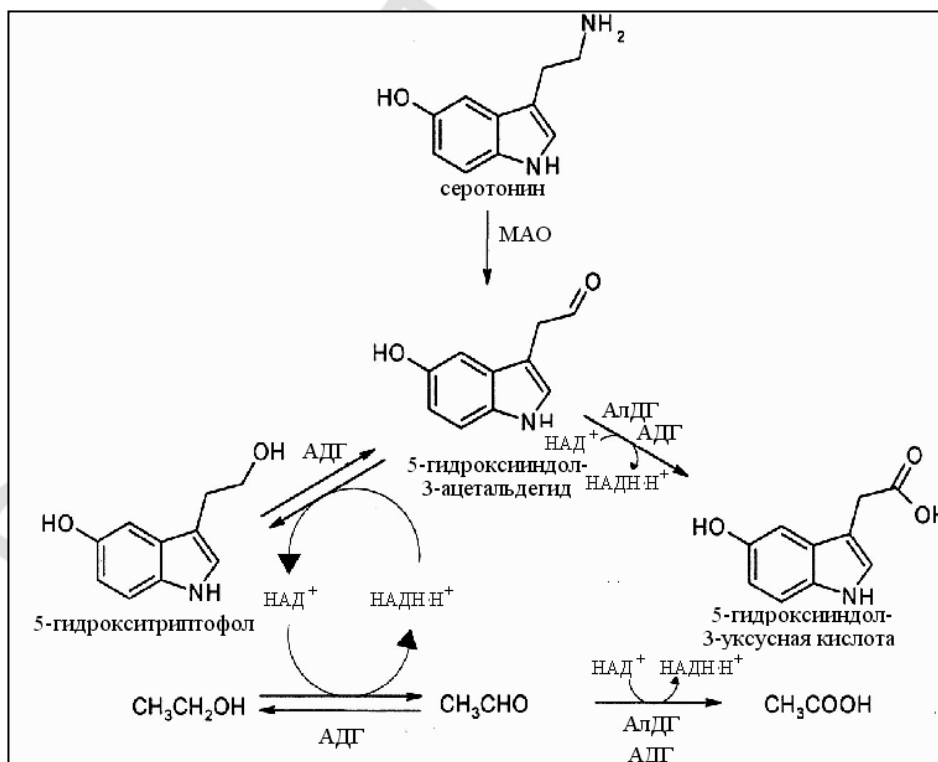
1.4.5. Участие алкогольдегидрогеназ в метаболизме серотонина, дофамина и норадреналина

Рассмотрим участие АДГ в метаболизме вышеназванных соединений на примере серотонина (рис. 1.14).

Рис. 1.14. Участие АДГ в метаболизме этанола и серотонина

Примечание. MAO — моноаминоксидаза, АлДГ — ацетальдегиддегидрогеназа.

Первоначально серотонин (5-гидрокситриптамин) подвергается окислительному дезаминированию моноаминоксидазой, что ведет к образованию 5-гидроксииндол-3-ацетальдегида. В обычных условиях большая часть образовавшегося альдегида окисляется АлДГ или АДГ до 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, что связано с малой внутриклеточной концентрацией НАДН·Н⁺ (0,5 μM), а меньшая часть восстанавливается АДГ до 5-гидрокси-триптофола, выделяющегося далее с мочой. При поступлении больших количеств экзогенного этанола происходит его интенсивное окисление, что вызывает увеличение соотношения НАДН·Н⁺/НАД⁺. В этих условиях восстановление 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты становится предпочтительным, т. к. оно уменьшает соотношение восстановленного и окисленного кофермента. Важно, что возможное реокисление 5-гидрокси-триптофола ингибируется этанолом. Алкогольдегидрогеназа играет аналогичную роль в метаболизме норадреналина и серотонина, восстанавливая образующиеся при их метаболизме альдегиды до 4-гидрокси-3-метоксифенилгликоля и 3,4-дигидроксифенилэтанола. Эти реакции катализируются преимущественно АДГ 1-го и 2-го классов [70].



1.4.6. Участие алкогольдегидрогеназ в метаболизме NO

Известно, что биологическое действие оксида азота (II) заключается в вазодилатации, ингибировании агрегации тромбоцитов и передачи нервного импульса. В дополнение к эндогенному образованию NO может поступать экзогенно с вдыхаемым воздухом, сигаретным дымом и образовываться при метаболизме ряда лекарственных средств. Ранее предполагалось, что NO взаимодействует с тиолами в реакциях нитрозилирования, что ведет к образованию S-нитрозо-тиолов. Глутатион также может связывать NO с образованием S-нитрозо-глутатиона. В 2003 г. была обнаружена способность АДГЗ необратимо катализировать реакцию восстановления S-нитрозоглутатиона до сульфамида глутатиона с участием кофермента НАДН·Н⁺ (рис. 1.15) [110, 158].

Низкое соотношение НАДН·Н⁺/НАД⁺ в цитоплазме делает рассмотренную реакцию маловероятной [70]. Однако это соотношение может увеличиваться при поступлении экзогенного этанола или связанном с ним увеличенном выходе лактата из печени, что свидетельствует о возможной роли АДГЗ в метаболизме NO [158].

1.4.7. Участие алкогольдегидрогеназ в метаболизме других эндогенных соединений

Заслуживают внимания данные о способности АДГ катализировать превращение янтарного семиальдегида, образующегося из γ -аминомасляной кислоты, в γ -оксимасляную кислоту. Роли последней как самостоятельного нейромедиатора и антиоксиданта в последнее время уделяется все большее внимание [1].

Способность АДГ1 катализировать окисление различных гидроксистероидов не вызывает сомнений. Так, изофермент АДГ1С взаимодействует с $3\beta,5\beta$ -гидроксистероидами, АДГ1В — с $3\alpha,5\beta$ -гидроксистероидами (метаболитами желчных кислот), а у АДГ1А и АДГ4 показано отсутствие способности окислять гидроксистероиды [69, 127, 152].

Получены данные об участии алкогольдегидрогеназы 7-го класса в метаболизме транс-ретинолов и $3\beta,5\alpha$ -гидроксистероидов. Открытие многочисленного семейства короткоцепочечных оксидоредуктаз, многие из которых оказа-

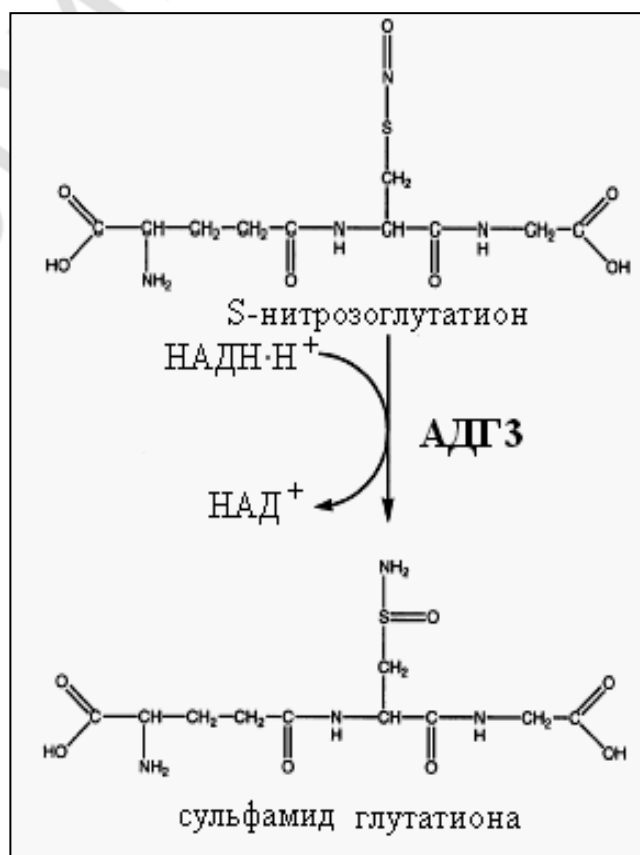


Рис. 1.15. Восстановление S-нитрозоглутатиона АДГЗ до сульфамида глутатиона

лись достаточно специфичными катализаторами метаболизма половых гормонов, не позволяет пока вполне объективно оценить значимость АДГ в этой области превращений биорегуляторов. Все больше данных появляется об участии АДГ в синтезе и катаболизме холестерина, ω -гидроксижирных кислот и простагландинов, хотя и в этом случае пока трудно дифференцировать роли АДГ и короткоцепочечных оксидоредуктаз [1].

1.4.8. Роль АДГ в обезвреживании ксенобиотиков

Известно, что АДГ участвует в обезвреживании ряда ксенобиотиков, таких как этанол, метанол, формальдегид, бензохиноны, NO (рассмотрены выше), экзогенные гликоли, родственные метил-азобензену аминокрасители (N-сульфонилокси-4-метиламино-3'-метилазобензен, 3'-метил-N,N-диметил-4-амино-азобензен и др.), дериваты 1,3-бутадиена (содержатся в бензине, сигаретном дыме и продуктах, выделяющихся при производстве резины) и др.

Список ксенобиотиков, обезвреживаемых с участием АДГ, постоянно растет. При этом следует отметить, что главными органами барьерами, где АДГ осуществляют эти функции, являются слизистая оболочка желудка, печень и кожа [1].

Следует отметить, что в ряде случаев действие АДГ может приводить к возникновению более токсических продуктов. Например, при поступлении значительных количеств этиленгликоля происходит его окисление алкогольдегидрогеназой 2-го класса до соответствующего альдегида и далее до щавелевой кислоты, обладающей выраженной токсичностью.

Один из путей подавления этого процесса состоит в отвлечении АДГ посредством введения при отравлениях этиленгликолем существенных количеств этанола [1]. Суммируя вышесказанное, основные общие и специфичные функции АДГ представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1

Основные функции, выполняемые АДГ 1–4-го классов

Функция	Фермент			
	АДГ1	АДГ2	АДГ3	АДГ4
Окисление эндогенного этанола	+++	+	–	++
Окисление экзогенного этанола	+	++	–	+++
Окисление ацетальдегида	+	–	–	–
Окисление метанола	+	–	–	+
Глутатион-зависимое окисление формальдегида	–	–	+++	–
Окисление ретинола	++	+	–	+++
Окисление длинноцепочечных алифатических и ароматических спиртов	++	+	+	+
Окисление хинонов	+	+++	+	–
Связывание NO	–	–	++	–
Катаболизм серотонина, норадреналина, дофамина	++	+	–	–
Обезвреживание ксенобиотиков	++	+	–	++

Участие в метаболизме стероидов	++	–	+	++
Синтез и катаболизм ω -гидроксижирных кислот, простагландинов	++	–	+	–

Примечание. Отсутствие функции обозначено знаком «–», наличие функции — знаком «+», наличие сильно выраженной функции — знаком «++», а основная функция — знаком «+++».

1.5. Нерешенные проблемы

Несмотря на пристальное внимание, которое уделяется алкогольдегидрогеназам, в доступной нам литературе имеются лишь единичные работы, посвященные эволюции этого фермента, причем основное внимание традиционно фокусируется на классической печеночной АДГ. Понимая невозможность охватить все стороны и аспекты молекулярной эволюции большого семейства алкогольдегидрогеназ, мы поставили перед собой задачу охватить лишь наиболее, с нашей точки зрения, интересные из них:

1. Каковы эволюционные взаимоотношения и предполагаемые времена дивергенции различных классов алкогольдегидрогеназ человека?
2. Соответствует ли структурно-эволюционная классификация алкогольдегидрогеназ человека существующей классификации Эденберга–Дуэстера?
3. Какова стратегия кодирования и особенности нуклеотидного состава экзонов и интронов генов алкогольдегидрогеназ человека?
4. Являются ли постоянными и сходными по величине скорости эволюции представителей разных классов алкогольдегидрогеназ и их различных в функциональном отношении участков? А если это не так, то чем обусловлены эти различия?
5. Каковы закономерности изменения в процессе эволюции мутационного давления в генах, кодирующих алкогольдегидрогеназы, и каково его влияние на стратегию кодирования и аминокислотный состав алкогольдегидрогеназ?
6. Сходны ли селективные ограничения, налагаемые в процессе эволюции на замены нуклеотидов мРНК, кодирующих моно- и полисубстратные изоферменты АДГ?
7. Каков характер аминокислотных замен, наблюдаемых в последовательностях алкогольдегидрогеназ? Есть ли зависимость их характера от количества связывающих мутационных шагов и от вида нуклеотидных замен?

Г Л А В А 2

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МАТЕРИАЛАХ И МЕТОДИКАХ ПРОВОДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве материалов исследования изучены аминокислотные последовательности АДГ 1-го класса человека (*Homo sapiens* — H.s, А-, В- и С-изоферменты [156]), шимпанзе (*Pan troglodytes* — P.t., В-изофермент [123]), бабуина (*Papio hamadryas* — P.h., В-изофермент [84]), лошади (*Equus caballus* — E.c. [127]), кролика (*Oryctolagus cuniculus* — O.c. [129]), мыши (*Mus musculus* — M.m. [116]), петуха (*Gallus gallus* — G.g. [79]), киви (*Apteryx australis* — A.a. [74]), шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* — X.l. [76]), нематоды (*Caenorhabditis elegans* — C.e. [82]); АДГ 2-го класса человека [187], мыши [68] и нематоды [82]; 3-го класса человека [83], мыши [73], кролика [168], петуха [184], шпорцевой лягушки [184], костных рыб (*Danio rerio* — D.r. [93], *Sparus aurata* — S.a. [139], *Oryzias latipes* — O.l. [146]), ланцетника (*Branchiostoma floridae* — B.f. [77]), оболочника (*Ciona intestinalis* — C.i. [78]), дрозофилы (*Drosophila melanogaster* — D.m. [113]), нематоды [82]; 4-го класса человека [75, 117] и мыши [85]; 5-го класса человека [190] и мыши [145]. Также изучены нуклеотидные последовательности мРНК, кодирующие вышеназванные белки, и гены АДГ человека 1 (А, В, С), 2, 3, 4, 5-го классов и мыши 3-го класса.

2.1. Анализ аминокислотных последовательностей

2.1.1. Определение показателей сходства

Показатели сходства (S') и их достоверность (E) для аминокислотных последовательностей определены методом BLAST-анализа 2.2.9 [28, 114].

2.1.2. Выравнивание последовательностей

Выравнивание аминокислотных (нуклеотидных) последовательностей проведено с помощью программ ClustalW [86].

2.1.3. Определение картины замещений аминокислот (нуклеотидов)

Для определения картины замен в сравниваемых последовательностях рассчитан индекс несоответствия (index disparity — ID) и использован ID-тест для определения вероятности (P) отклонения на 5 %-ном уровне нулевой гипотезы о гомогенной картине замещений аминокислот (нуклеотидов) [52, 94, 95].

2.1.4. Вычисление эволюционных дистанций

Эволюционная дистанция (d) между аминокислотными последовательностями — среднее число аминокислотных замен, приходящихся на один сайт двух сравниваемых последовательностей генетических макромолекул двух видов организмов [58]. Эволюционные дистанции между аминокислотными последовательностями вычислены методом EIM (Equal Input Model, модель равных вставок [48, 147]) и JTT (Jones–Taylor–Thornton, Джонса–Тэйлора–Торнтон) [185].

Вычисление EIM-дистанции проведено по формуле:

$$d_{EIM} = -b \log \left(1 - \frac{p}{b} \right), \quad (2.1)$$

где $b = 1 - \sum_i g_i^2$; g_i — частота аминокислоты i ; p — доля различных аминокислот. Варiances d_{EIM} ($V(d_{EIM})$) рассчитывается следующим образом:

$$V(d_{EIM}) = \frac{b^2 p(1-p)}{(b-p)^2 n}. \quad (2.2)$$

В случае гетерогенной картины замен дистанция вычислялась по формуле Тамуры–Кумара [48, 109]:

$$d_{EIM} = -b \log \left(1 - \frac{p}{c} \right), \quad (2.3)$$

где $b = 1 - \sum_i g_i^2$; $c = 1 - \sum_i \sum_j g_{1i} g_{2i}$; g_{1i} — частота аминокислоты i для последовательности 1; g_{2i} — частота аминокислоты i для последовательности 2; g_i — средняя частота аминокислоты i для пары последовательностей. Вычисление JTT-дистанции и ее варианты проведено по формулам (при $\alpha = 2,4$):

$$d_{JTT} = a \left[(1-p)^{\frac{1}{a}} - 1 \right], \quad (2.4)$$

$$V(d_{JTT}) = \frac{p \left[(1-p)^{-\left(1+\frac{2}{a}\right)} - 1 \right]}{n}. \quad (2.5)$$

2.1.5. Вычисление скорости молекулярной эволюции

Скорость аминокислотных (нуклеотидных) замен (r) вычислена по формуле, предложенной М. Кимурой:

$$r = \frac{d}{2T}, \quad (2.6)$$

где T — число лет, прошедших после эволюционной дивергенции двух цепей от общей для них предковой цепи; множитель 2 в знаменателе соответствует двум ветвям подразумеваемого филогенетического древа [44].

2.1.6. Анализ эволюционных взаимоотношений между аминокислотными (нуклеотидными) последовательностями

Для анализа эволюционных взаимоотношений между аминокислотными (нуклеотидными) последовательностями (построение дендрограмм) использованы методы связывания ближайших соседей (Neighbour-joining — NJ) и парного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (Unweighted pair-group method using arithmetic averages — UPGMA) [53, 183].

2.1.7. Определение характера аминокислотных замен

Характер одношаговых аминокислотных замен определен по коэффициенту Снита (\emptyset , [164]), показателю функциональной близости аминокислот Бачинского (ФБА, [9]) и физико-химической дистанции Грантсема (Grantham distance, GD, [119]) (табл. 2.1).

Таблица 2.1

**Значения коэффициента Снита, показателя функциональной близости
взаимозаменяемых (при одношаговых заменах) аминокислотных остатков**

Замена АО	Показатели		Замена АО	Показатели	
	Ø	ФБА		Ø	ФБА
P-S	0,321	12	A-D	0,156	17
P-T	0,330	9	L-H	0,450	5
P-A	0,553	12	L-M	0,515	15
P-L	0,432	4	L-R	0,360	5
P-Q	0,168	10	L-W	0,368	4
P-H	0,172	3	K-Q	0,545	18
P-R	0,155	5	K-E	0,435	17
G-S	0,323	25	K-M	0,482	5
G-V	0,437	13	K-R	0,733	25
G-A	0,659	29	K-N	0,401	17
G-E	0,049	14	Q-E	0,685	25
G-R	0,149	8	Q-H	0,406	12
G-D	0,015	18	Q-R	0,561	15
G-C	0,290	2	E-D	0,840	31
G-W	0,138	5	H-R	0,396	7
S-Y	0,354	7	H-D	0,200	6
S-T	0,668	31	H-N	0,459	14
S-I	0,360	7	M-R	0,522	6
S-F	0,380	4	R-C	0,324	1
S-A	0,477	29	R-W	0,288	3
S-L	0,411	7	D-N	0,637	27
S-R	0,317	12	C-W	0,188	0
S-N	0,581	25	I-V	0,843	35
S-C	0,613	4	I-F	0,487	10
S-W	0,243	4	I-L	0,889	24
Y-F	0,729	28	I-K	0,474	5
Y-H	0,504	9	I-M	0,494	10
Y-D	0,287	5	Y-R	0,342	7
Y-N	0,391	7	I-N	0,456	3
Y-C	0,223	1	V-F	0,380	8
T-I	0,493	12	V-A	0,675	17
T-A	0,417	27	V-L	0,785	23
T-K	0,269	19	V-E	0,239	9
T-M	0,409	7	V-M	0,465	11
T-R	0,258	13	V-D	0,279	5
T-N	0,488	17	F-L	0,570	16
A-E	0,159	18	F-C	0,398	1

Характер многошаговых аминокислотных замен определялся по дистанции Грэнтсема (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Матрица физико-химических дистанций Грэнтсема для одно- и многошаговых аминокислотных замен

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
A	100	9	41	50	45	73	59	54	50	54	59	45	86	54	45	54	73	68	32	45
C		100	27	23	4	27	18	9	4	9	9	36	23	27	18	45	32	9	0	9
D			100	77	18	54	59	23	50	18	27	86	50	68	54	68	59	27	14	27
E				100	36	54	82	36	73	36	41	77	54	86	73	64	68	41	27	41
F					100	27	54	86	50	86	86	27	45	45	54	27	50	77	82	86
G						100	54	36	41	36	41	64	77	59	41	73	73	50	14	32
H							100	54	82	54	59	68	64	86	86	59	77	59	45	59
I								100	50	95	95	32	54	50	54	32	59	86	68	82
K									100	50	54	54	50	73	86	41	64	54	50	59
L										100	91	27	54	45	50	32	54	82	68	82
M											100	32	59	50	54	36	59	86	68	82
N												100	54	77	59	77	68	36	18	32
P													100	64	50	64	82	68	32	50
Q														100	77	68	77	54	41	54
R															100	50	64	54	50	64
S																100	73	41	18	32
T																	100	68	41	54
V																		100	59	73
W																			100	82
Y																				100

2.1.8. Оценка конформационной подвижности остова полипептидной цепи

Для определения конформационной подвижности основной цепи вычисляли среднюю величину энтропии, приходящейся на аминокислотный остаток, по методу В. В. Поройкова и соавт. [54].

2.2. Анализ нуклеотидных последовательностей

2.2.1. Вычисление эволюционных дистанций

Эволюционная дистанция между нуклеотидными последовательностями — среднее число нуклеотидных замен, приходящихся на один сайт двух сравниваемых последовательностей нуклеиновых кислот двух видов организмов. В случае гомогенной картины замещений эволюционные дистанции (d) рассчитаны по методам:

- Джукса–Кантора [62, 131]:

$$d_{\text{ДК}} = -\frac{3}{4} \ln \left(1 - \frac{4}{3} p \right), \quad (2.7)$$

где $p = \frac{dnu}{L}$ — доля различных нуклеотидных сайтов, по которым сравниваются две гомологичные нуклеотидные последовательности; dnu — число отличающихся друг от друга нуклеотидных позиций (сайтов); L — общее число нуклеотидных сайтов, по которым сравниваются две последовательности. При подсчете числа различий участки, не имеющие соответствия с одной из сопоставляемых последовательностей и возникающие в результате вставок и делеций, не рассматривались. Варианса $V_{ar}(d_{\text{ДК}})$ рассчитывается по формуле:

$$V_{ar}(d_{\text{ДК}}) = \frac{p(1-p)}{\left(1 - \frac{4}{3}p\right)^2 \times L}. \quad (2.8)$$

- Кимуры [62, 132]:

$$d_{\text{К}} = \frac{1}{2} \ln \left[(1 - 2P - Q) \sqrt{1 - 2Q} \right]. \quad (2.9)$$

Приведенная формула может использоваться для оценки эволюционного расстояния между двумя последовательностями, выраженного через число замен оснований, происшедших за T лет эволюции в расчете на сайт. Здесь $P = \frac{n_1}{n}$, а $Q = \frac{n_2}{n}$, где n_1 и n_2 — числа сайтов двух сравниваемых последовательностей, различающихся заменами по типу транзиции и трансверсии соответственно, а n — общее число сравниваемых сайтов.

Варианса $V_{ar}(d_{\text{К}})$ рассчитывается по формуле:

$$V_{ar}(d_{\text{К}}) = \frac{c_1^2 P + c_3^2 Q - (c_1 P + c_3 Q)^2}{L}, \quad (2.10)$$

где $c_1 = \frac{1}{1 - 2P - Q}$; $c_3 = \frac{1}{2(c_1 + c_2)}$; $c_2 = \frac{1}{1 - 2Q}$; L — число сравниваемых сайтов.

- Тадзимы–Нея [62, 106]:

$$d_{\text{ТН}} = -b \ln \left(1 - \frac{p}{b} \right), \quad (2.11)$$

где $b = \frac{(b_1 + b_2)}{2}$ и рассчитывается по формуле:

$$b = \frac{1 - \sum_{i=1}^4 q_i^2 + \frac{p^2}{h}}{2}. \quad (2.12)$$

Варианса рассчитывается по формуле:

$$V_{ar}(d_{\text{ТН}}) = \frac{b^2 p(1-p)}{(b-p)^2 L}, \quad (2.13)$$

где L — число сравниваемых между собой сайтов.

- Тамуры [62, 178]:

$$d_{\text{T}} = -w_0 \ln(w_1) - \frac{1}{2}(1-w_0) \ln w_2, \quad (2.14)$$

где $w_0 = 2\theta(1-\theta)$; $w_1 = 1 - \frac{P}{w_0} - Q$; $w_2 = 1 - 2Q$; P и Q — доля сайтов с различия-

ми по типу транзиций и трансверсий; $\theta = g_{\text{ц}} + g_{\text{г}}$; $g_{\text{ц}}$ и $g_{\text{г}}$ — средние частоты встречаемости цитозина и гуанина в двух сравниваемых последовательностях.

Варианса $V_{ar}(d_{\text{T}})$ рассчитывается по формуле:

$$V_{ar}(d_{\text{T}}) = \frac{c_1^2 P + c_3^2 Q - (c_1 P + c_3 Q)^2}{L}, \quad (2.15)$$

где $c_1 = \frac{1}{w_1}$; $c_3 = w_0 c_1 + (1-w_0)c_1$; L — число сравниваемых сайтов.

- Тамуры–Нея [62, 107]:

$$d_{\text{ТамН}} = -k_1 \ln w_1 - k_2 \ln w_2 - k_3 \ln w_3, \quad (2.16)$$

где P_1 и P_2 — доли транзиций между нуклеотидами А и Г и между У и Ц соответственно; Q — доля различий по типу трансверсий; $g_{\text{А}}$, $g_{\text{Ц}}$, $g_{\text{Г}}$, $g_{\text{У}}$ — средние частоты встречаемости А, Ц, Г и У в двух сравниваемых последовательностях;

$g_r = g_{\text{А}} + g_{\text{Г}}$; $g_Y = g_{\text{У}} + g_{\text{Ц}}$; $k_1 = 2 \frac{g_{\text{А}} \cdot g_{\text{Г}}}{g_r}$; $k_2 = 2 \frac{g_{\text{У}} \cdot g_{\text{Ц}}}{g_Y}$; $k_3 = 2 \left(g_r \cdot g_Y - \frac{g_{\text{А}} \cdot g_{\text{Г}} \cdot g_Y}{g_r} - \frac{g_{\text{У}} \cdot g_{\text{Ц}} \cdot g_r}{g_Y} \right)$;

$w_1 = 1 - \frac{P_1}{k_1} - \frac{Q}{2g_r}$; $w_2 = 1 - \frac{P_2}{k_2} - \frac{Q}{2g_Y}$; $w_3 = 1 - \frac{Q}{2g_r g_Y}$. Варианса рассчитывается по

формуле:

$$V_{ar}(d_{\text{ТамН}}) = \frac{c_1^2 P_1 + c_2^2 P_2 + c_4^2 Q - (c_1 P_1 + c_2 P_2 + c_4 Q)^2}{L}, \quad (2.17)$$

где $c_1 = \frac{1}{w_1}$; $c_2 = \frac{1}{w_2}$; $c_3 = \frac{1}{w_3}$; $c_4 = \frac{k_1 \cdot c_1}{2g_r} + \frac{k_2 \cdot c_2}{2g_Y} + \frac{k_3 \cdot c_3}{2g_r \cdot g_Y}$.

В случае гетерогенной картины замен эволюционные дистанции рассчитаны по методам:

- Тадзимы–Нея [62, 106]:

$$d_{\text{ТНгер}} = -b \ln \left(1 - \frac{p}{f_b} \right), \quad (2.18)$$

где p — доля сайтов с различными нуклеотидами, $b = (1 - \pi_{\text{А}}^2 - \pi_{\text{У}}^2 - \pi_{\text{Ц}}^2 - \pi_{\text{Г}}^2)$;

π_i — средние частоты соответствующих нуклеотидов в двух сравниваемых последовательностях; $f_b = (1 - \pi_{1\text{А}} \cdot \pi_{2\text{А}} - \pi_{1\text{У}} \cdot \pi_{2\text{У}} - \pi_{1\text{Ц}} \cdot \pi_{2\text{Ц}} - \pi_{1\text{Г}} \cdot \pi_{2\text{Г}})$ (индексы 1 и 2

указывают на частоту данного нуклеотида в первой и второй последовательностях соответственно).

- Тамуры [62, 178]:

$$d_{\text{Тет}} = -w_0 \ln w_1 - \frac{1}{2} (1 - w_0) \ln w_2, \quad (2.19)$$

где P и Q — доли сайтов с различиями по типу транзиций и трансверсий соответственно; $w_0 = 2\theta(1 - \theta)$; $w_1 = \frac{1-P}{\theta_1(1-\theta_2) + \theta_2(1-\theta_1) - Q}$; $w_2 = 1 - 2Q$; $\theta_1 = g_{1Ц} + g_{1Г}$;

$$\theta_2 = g_{2Ц} + g_{2Г}; \quad \theta = \frac{(\theta_1 + \theta_2)}{2};$$

- Тамуры–Нея [62, 107]:

$$d_{\text{ТамНея}} = -2 \frac{g_A g_G}{g_R} \cdot \ln \left(1 - \frac{g_R p_{AG}}{f_{AG}} - \frac{p_{RY}}{2g_R} \right) - 2 \frac{g_Y g_C}{g_Y} \ln \left(1 - \frac{g_Y p_{YC}}{f_{YC}} - \frac{p_{RY}}{2g_Y} \right) - 2 \left(g_R g_Y - \frac{g_A g_G g_Y}{g_R} - \frac{g_Y g_C g_R}{g_Y} \right) \ln \left(1 - \frac{p_{RY}}{f_{RY}} \right), \quad (2.20)$$

где g_{ij} и g_i — доля нуклеотидной пары i и j между сравниваемыми последовательностями и средняя частота нуклеотида i соответственно; $g_R = g_A + g_G$; $g_Y = g_Y + g_C$; $p_{RY} = p_{AY} + p_{AC} + p_{GY} + p_{GC}$; $f_{ij} = g_{1i}g_{2j} + g_{1j}g_{2i}$ (индексы 1 и 2 указывают на частоту данного нуклеотида в первой и второй последовательностях соответственно).

2.2.2. Определение синонимичной и несинонимичной дистанций

Синонимичная (p_S) и несинонимичная (p_N) p -дистанции вычислены по модифицированному методу Нея–Годжобори [59, 122, 153, 162].

2.2.3. Определение синонимичной компоненты эволюционной дистанции

Синонимичную компоненту скорости замен нуклеотидов по третьему положению кодонов ($d_{S'}$) оценивали по формуле [44]:

$$d_{S'} = -\frac{1}{2} \ln(1 - 2P - Q). \quad (2.21)$$

2.2.4. Изучение нуклеотидного состава

Содержание нуклеотидов, расчетное соотношение транзиций и трансверсий (R), содержание претерминальных и ГЦЗ-кодонов, а также показатель относительного использования кодонов (relative synonymous codon's usage, RSCU) вычислены с помощью пакета программ MEGA3 [137]. Средние относительные вероятности трансверсий (w) и транзиций ($1 - w$) рассчитывали по формуле:

$$\frac{w}{1-w} \cdot p = q, \quad (2.22)$$

где p — соотношение трансверсии/транзиции, согласно таблице генетического кода; q — соотношение трансверсии/транзиции в сравниваемых нуклеотидных последовательностях [51].

2.2.5. Определение мутационного давления

Мутационное давление (μ_D) вычислено по методу, предложенному Н. Суекой [176]:

$$\mu_D = \frac{u}{u+v}, \quad (2.23)$$

где $u = n(A \rightarrow G) + n(T \rightarrow C) + n(T \rightarrow G) + n(A \rightarrow C)$, $v = n(G \rightarrow A) + n(C \rightarrow T) + n(G \rightarrow T) + n(C \rightarrow A)$; $n(X \rightarrow Y)$ — число замен нуклеотида X на нуклеотид Y .

2.3. Статистическая обработка полученных результатов

Полученные результаты были обработаны статистически с помощью пакета программ Microsoft Excel 2000 и MEGA 3.0.

2.3.1. Определение средней арифметической

Вычисление средней арифметической проводили по формуле:

$$M = \frac{\sum V}{n}, \quad (2.24)$$

где V — варианта; n — число наблюдений.

2.3.2. Вычисление среднего квадратичного отклонения

Определение среднего квадратичного отклонения (стандартной девиации, SD) проводили по формуле:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n}}, \quad (2.25)$$

где $d = M - V$; n — число наблюдений (или — здесь и далее — $n - 1$ при числе наблюдений менее 30).

2.3.3. Вычисление стандартной ошибки абсолютной величины

Стандартную ошибку (SE) абсолютной величины определяли по формуле:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}. \quad (2.26)$$

2.3.4. Определение достоверности различий абсолютных величин

Достоверность различий абсолютных величин рассчитывали по критерию Стьюдента:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{SE_1^2 + SE_2^2}}. \quad (2.27)$$

2.3.5. Определение стандартной ошибки относительных величин

Стандартная ошибка (SE) относительных показателей рассчитывалась по формуле:

$$SE = \pm \sqrt{\frac{P \cdot (100 - P)}{n}}, \quad (2.28)$$

где P — значение показателя, выраженное в процентах.

2.3.6. Вычисление достоверности различий относительных величин

Достоверность различий относительных показателей определяли по критерию Стьюдента:

$$t = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{SE_1^2 + SE_2^2}}. \quad (2.29)$$

2.3.7. Определение корреляции показателей

Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента Пирсона (r).

2.3.8. Определение стандартной ошибки коэффициента корреляции

Стандартная ошибка коэффициента корреляции (SE_r) вычислялась по формуле:

$$SE_r = \pm \sqrt{\frac{1 - r^2}{n - 2}}, \quad (2.30)$$

где n — число пар сравниваемых признаков.

2.3.9. Вычисление достоверности коэффициента корреляции

Достоверность коэффициента корреляции была определена по критерию Стьюдента:

$$t = \frac{r}{SE_r}. \quad (2.31)$$

2.3.10. Уровень значимости различий

Различия между абсолютными и относительными величинами, а также значение коэффициента корреляции считалось значимым при $t > 2$, что соответствует уровню значимости более 0,95 (т. е. вероятности достоверности более 95 %).

2.3.11. Проведение регрессионного анализа

При значении коэффициента корреляции больше 0,7 проводился регрессионный анализ.

2.3.12. Статистическая обработка дендрограмм

Статистическое подтверждение корректности дендрограмм осуществляли методом бутстрэп (bootstrap) при 1000 повторов путем вычисления индекса BCL (bootstrap confidence level). Статистически значимыми считались точки ветвления дендрограмм со значениями BCL больше 0,95 [18, 99].

Г Л А В А 3

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ, СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ И СТРАТЕГИЯ КОДИРОВАНИЯ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ ЧЕЛОВЕКА

Появление большого количества экспериментальных данных по последовательностям нуклеиновых кислот и белков, а также разработка новых теоретических методов их анализа послужили стимулом к возникновению и развитию новой области науки — молекулярной эволюции. Первые аминокислотные последовательности были расшифрованы в 50-е годы прошлого столетия, нуклеотидные последовательности — в 60-е, а к настоящему времени крупнейшие международные банки данных содержат сведения примерно об одном миллиарде секвенированных нуклеотидов (~1,6 млн генов и их фрагментов) и об аминокислотных последовательностях миллионов белков. Большое число новых последовательностей белков публикуется в постоянно пополняющемся издании «Атлас аминокислотных последовательностей и структур белков», издаваемом М. Дэйхофф. Несмотря на это, секвенированные последовательности составляют незначительную часть потенциально доступных и важных белков. Однако имеющихся данных достаточно, чтобы определить эволюционные дистанции и скорости эволюции некоторых структурных генов и сопоставить их с данными морфологической эволюции [58].

Сосредоточение большинства исследований на эволюции белков человека обусловлено возможностью применения полученных результатов в исследованиях прикладного характера, связанных с изучением механизмов нарушения их функции при различных патологических состояниях. Один из разделов молекулярной эволюции — эволюция генетических макромолекул — посвящен изучению изменений белков и нуклеиновых кислот в процессе эволюции, а также определению закономерностей и механизмов этих изменений. Это возможно при определении методами молекулярной эволюции основных показателей эволюционных изменений аминокислотных и нуклеотидных последовательностей. В данной главе рассмотрены основные параметры эволюции нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих АДГ человека. На основании полученных данных сформулированы важнейшие закономерности их эволюционных изменений и охарактеризована стратегия кодирования с точки зрения влияния ГЦ-давления. Также определены особенности экзон-интронной структуры и нуклеотидного состава генов АДГ человека.

3.1. Показатели сходства аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ человека, эволюционные дистанции и расчетные соотношения транзиций и трансверсий для кодирующих их последовательностей матричных РНК

По ряду причин исследования в области молекулярной эволюции принято начинать с анализа аминокислотных последовательностей. Во-первых, они более консервативны и поэтому дают информацию о долгосрочной эволюции генов и видов. Во-вторых, аминокислотные последовательности важны для выравнивания белок-кодирующих участков последовательностей нуклеиновых кислот. И, в-третьих, математическая модель эволюционных изменений аминокислотных последовательностей значительно проще таковой последовательностей ДНК и мРНК. Одним из важнейших параметров эволюции аминокислотных последовательностей являются коэффициенты сходства, полученные при проведении BLAST-анализа [35].

Данная часть настоящей главы посвящена определению показателей сходства аминокислотных последовательностей АДГ человека, поиску их эволюционных предшественников, а также изучению закономерностей эволюционных изменений кодирующих их последовательностей мРНК.

Первоначально определены с помощью BLAST-анализа значения показателей сходства (S') и их достоверность (E) для аминокислотных последовательностей АДГ человека с использованием в качестве контроля АДГ дрозофилы (3-го класса) и нематоды (1, 2 и 3-го классов) (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Значения показателей сходства и их достоверность для аминокислотных последовательностей АДГ человека

Контроль	Класс АДГ человека						
	1A	1B	1C	2	3	4	5
АДГ1 С.е.	75 4e-13	73 2e-12	82 3e-15	88 4e-17	77 1e-13	79 2e-14	63 1e-09
АДГ2 С.е.	69 3e-11	65 4e-10	76 2e-13	83 2e-15	80 9e-15	70 9e-12	66 2e-10
АДГ3 С.е.	342 2e-93	346 1e-94	339 1e-92	348 2e-95	486 e-137	322 2e-87	306 1e-82
АДГ3 D.m.	391 e-10	397 e-11	385 e-10	407 e-11	535 e-15	378 e-10	360 6e-9

Примечание. Значения показателей сходства выделены жирным шрифтом.

Установлено, что наибольшее сходство с АДГ человека имеют АДГ 3-го класса нематоды и дрозофилы. При этом наибольшие значения S' и E характерны для АДГ 3-го класса человека, что легко объяснить принадлежностью их к одному классу (и соответственно, структурно-функциональным сходством) с

контролем. Изучаемые ферменты нематоды 1-го и 2-го классов слабо сходны с АДГ человека, и поэтому, вероятно, являются боковой ветвью эволюции. Вместе с тем при использовании АДГ цианорабдитис 3-го класса в качестве контроля получены более достоверные результаты, что свидетельствует о том, что данный фермент нематоды является эволюционным предшественником АДГ человека и их ортолога у дрозофилы.

Таким образом, можно констатировать, что эволюционный предшественник алкогольдегидрогеназ человека и соответствующего ортолога дрозофилы существовал уже на ранних этапах формирования биохимических систем многоклеточных беспозвоночных, т. е. около 1 млрд лет назад.

Для вычисления эволюционных дистанций и расчетных соотношений транзиций и трансверсий проведены попарные сравнения последовательностей мРНК, кодирующих АДГ человека. Так, последовательность мРНК, кодирующая АДГ класса 1А, выровнена и сравнена со всеми остальными последовательностями мРНК, кодирующими АДГ (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Эволюционные дистанции (d) и расчетные соотношения транзиций и трансверсий (R) в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ человека классов 1А и 1В

Модель замещения	Все положения кодонов		Первое положение кодонов		Второе положение кодонов		Третье положение кодонов	
	d	R	d	R	d	R	d	R
Джукса–Кантора	0,05 ± 0,007	—	0,04 ± 0,011	—	0,02 ± 0,008	—	0,09 ± 0,016	—
Кимура	0,05 ± 0,007	3,19 ± 0,994	0,04 ± 0,011	1,71 ± 0,895	0,02 ± 0,008	2,03 ± 1,446	0,09 ± 0,017	5,83 ± 2,878
Таджима–Ней	0,05 ± 0,007	—	0,04 ± 0,011	—	0,02 ± 0,008	—	0,09 ± 0,017	—
Тамура	0,05 ± 0,007	3,19 ± 0,994	0,04 ± 0,011	1,71 ± 0,896	0,02 ± 0,008	2,03 ± 1,447	0,09 ± 0,017	5,83 ± 2,878
Тамура–Ней	0,05 ± 0,007	3,19 ± 1,096	0,04 ± 0,011	1,71 ± 1,487	0,02 ± 0,008	2,03 ± 2,138	0,09 ± 0,017	5,84 ± 5,067

Аналогичные выравнивания и сравнения проведены для представителей всех остальных классов АДГ. Причем в каждом случае рассчитаны средние значения эволюционных дистанций и расчетных соотношений транзиций и трансверсий суммарно для всех положений нуклеотида в кодоне, а также для каждого положения в отдельности.

Среднее значение эволюционной дистанции для последовательностей мРНК, кодирующих АДГ классов 1А и 1В, составляет: $d = 0,05$. Для первого положения получено следующее значение: $d_1 = 0,04$, для второго — $d_2 = 0,02$ и для третьего положения $d_3 = 0,09$, что значительно превышает значения d_1 и d_2 . Исходя из этих данных, установлено соотношение: $d_3 > d_1 > d_2$, где наибольшая эволюционная дистанция характерна для третьего положения кодонов, меньшая — для первого и наименьшая — для второго.

Данное соотношение эволюционных дистанций было ранее получено рядом исследователей, а также нами при анализе эволюционных изменений нуклеотидных последовательностей, соответствующим другим белкам (G-белкам [30], аденилатциклазам [51] и др.). Это означает, что данное соотношение, вероятно, является одной из основных закономерностей эволюции последовательностей ДНК и мРНК.

Среднее значение расчетного соотношения транзиций и трансверсий для данных последовательностей составляет $R = 3,193$. Для первого положения $R_1 = 1,708$, для второго — $R_2 = 2,032$, для третьего — $R_3 = 5,836$, что также больше значений R_1 и R_2 . Получено соотношение: $R_3 > R_2 > R_1$, где наибольшее расчетное соотношение транзиций и трансверсий характерно для третьего положения кодонов, меньшее — для второго и наименьшее — для первого.

Описанная выше закономерность для средних значений эволюционных дистанций отмечена во всех случаях проведенных попарных сравнений, в отличие от закономерности для средних расчетных соотношений транзиций и трансверсий ($R_3 > R_2 > R_1$), наблюдаемой только в 33,3 % случаев. Соотношение $R_3 > R_1 > R_2$ наблюдалось в 61,9 %, а соотношение $R_2 > R_3 > R_1$ — в 4,8 % случаев. Средние эволюционные дистанции и средние расчетные соотношения транзиций и трансверсий для всех положений нуклеотида в кодонах мРНК, кодирующих АДГ человека, представлены в таблице 3.3.

Следует отметить чрезвычайно малые эволюционные дистанции между изоферментами АДГ1А, 1В и 1С, колеблющиеся в пределах 0,047–0,064, и высокие расчетные соотношения транзиций и трансверсий для них (1,886–3,193), что свидетельствует об эволюционном сходстве данных изоферментов.

Таблица 3.3

Средние эволюционные дистанции и средние расчетные соотношения транзиций и трансверсий для всех положений нуклеотидов в кодонах мРНК, кодирующих АДГ человека

Класс АДГ	1А	1В	1С	2	3	4	5
1А		0,053	0,064	0,459	0,477	0,353	0,438
1В	3,193		0,047	0,464	0,472	0,345	0,443
1С	2,561	1,886		0,462	0,472	0,356	0,437
2	0,961	0,958	0,902		0,458	0,513	0,500
3	1,099	1,130	1,075	0,948		0,468	0,493
4	1,107	1,030	1,038	0,940	1,077		0,455
5	1,063	1,060	0,979	0,808	0,956	1,170	

Примечание. Средние расчетные соотношения транзиций и трансверсий выделены жирным шрифтом.

Значения эволюционных дистанций между последовательностями мРНК, соответствующими изоферментам других классов, почти на порядок выше, что

говорит об их эволюционной отдаленности и невозможности объединения на основе эволюционных дистанций других классов АДГ.

На рисунке 3.1 проиллюстрированы средние значения эволюционных дистанций и расчетных соотношений транзиций и трансверсий для всех мРНК, кодирующих АДГ человека.

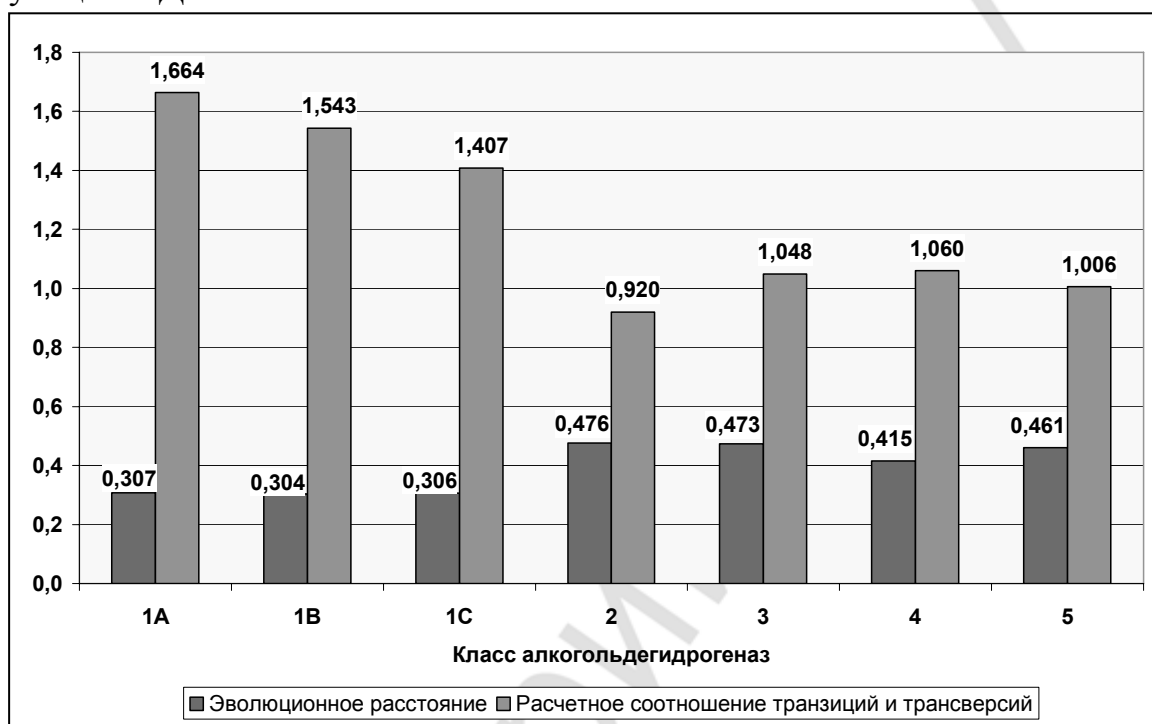


Рис. 3.1. Средние эволюционные дистанции и расчетные соотношения транзиций и трансверсий в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ человека

Наименьшие значения средних эволюционных дистанций и наибольшие значения расчетных соотношений транзиций и трансверсий характерны для последовательностей мРНК, кодирующих АДГ1А, 1В и 1С (1,664; 1,543; 1,407 и 0,307; 0,304; 0,306 соответственно). Близость средних значений эволюционных дистанций и средних расчетных соотношений транзиций и трансверсий в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ1А, 1В и 1С, свидетельствует в пользу целесообразности их объединения в один класс [36].

Эволюционные взаимоотношения между последовательностями мРНК, кодирующими АДГ человека, представлены на дендрограмме, построенной методом NJ на основании дистанций Кимуры с АДГ3 нематоды в качестве внешней группы (рис. 3.2).

Полученная для последовательностей мРНК дендрограмма после обработки методом бутстрэп (при 1000 повторов) при уровне вероятности безошибочного прогноза более 95 % несколько модифицируется (рис. 3.3).

На данной дендрограмме четко выделяется эволюционный предшественник (АДГ 3-го класса нематоды), от которого при высоких значениях BCL последовательно отходят АДГ человека 3, 2, 5, 4 и 1-го классов. При этом АДГ1А, 1В и 1С имеют общую точку ветвления (BCL = 100), что еще раз подтверждает

их эволюционную близость [34]. Вместе с тем, учитывая полученные результаты BLAST-анализа, можно полагать, что дупликации генов АДГ именно 3-го класса, по-видимому, служили основой для возникновения 2, 4 и 5-го классов АДГ.

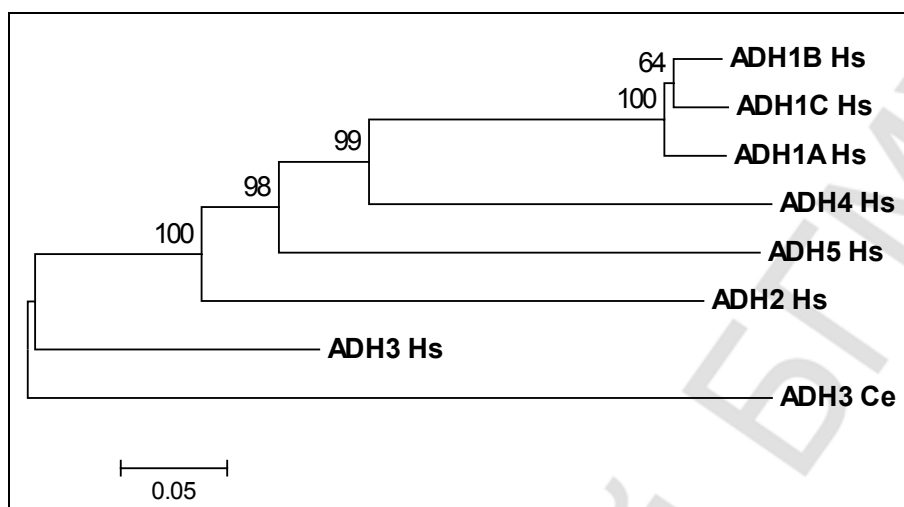


Рис. 3.2. Дендрограмма для нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих АДГ человека

Примечание. Над точками ветвления указаны значения BCL.

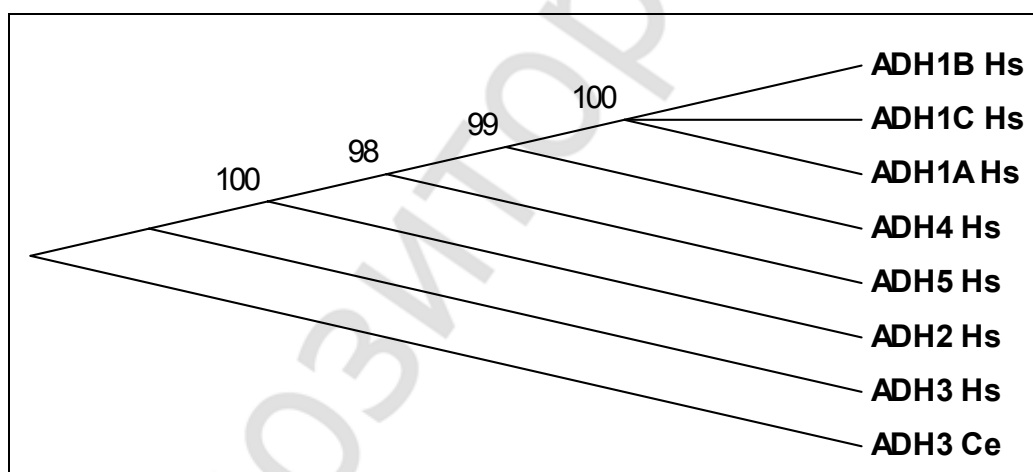


Рис. 3.3. Дендрограмма, обработанная методом бутстрэп, для нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих АДГ человека

Примечание. Над точками ветвления указаны значения BCL.

Таким образом, наиболее филогенетически древней является АДГ 3-го класса, от которой последовательно возникли 1, 2, 5 и 4-й классы АДГ, а затем в пределах 1-го класса выделились три изофермента.

Для определения времен, соответствующих точкам ветвления, нами методом NJ по эволюционным дистанциям Кимуры построена линеризованная дендрограмма с АДГ3 нематоды в качестве внешней группы и АДГ1Е лошади в качестве реперной точки (90 млн лет). Время существования предшественника

АДГ1В и 1С человека составило 28,1 млн лет, АДГ1В, 1С и 1А — 35,1 млн лет. Согласно построенной дендрограмме, время существования общего предшественника 1-го и 4-го классов равно 210,0 млн лет; 1-го и 5-го — 264,7 млн лет; 1-го и 2-го, а также 1-го и 3-го классов — 283,3 млн лет. Однако эти времена не являются точными, поскольку не учитываются возможные различия в скоростях эволюционных изменений изучаемых нуклеотидных последовательностей. Для учета этого фактора нами предложена методика их поправки [34], для которой необходимо предварительно вычислить скорости эволюции по общепринятой методике. Затем полученное время необходимо умножить на скорость эволюции наиболее сходных последовательностей (в данном случае АДГ 1-го класса) и разделить на скорость эволюции изучаемых последовательностей (используемая методика расчета эволюционных дистанций и скоростей эволюции подробно описана в главах 2 и 4).

Так, время существования общего предшественника 1-го и 3-го классов равно $283,3 \text{ млн лет} \times 0,60 \times 10^{-9}$ замен на нуклеотидный сайт в год делить на $0,40 \times 10^{-9}$ замен на нуклеотидный сайт в год (скорость эволюции АДГ 3-го класса) = 422,8 млн лет. Эти данные согласуются с тем, что у трески обнаружен фермент со смешанными свойствами 1-го и 3-го классов, а общепринятое время дивергенции костных рыб составляет 405–410 млн лет [103].

Определить таким способом времена существования общих предшественников 1-го и 4-го, 1-го и 5-го, 1-го и 2-го классов не представляется возможным, поскольку в настоящее время секвенированы лишь нуклеотидные последовательности АДГ 2, 4 и 5-го классов грызунов и приматов. Определение скоростей эволюции по этим последовательностям может привести к значительному завышению истинных скоростей из-за высокой скорости эволюционных изменений нуклеотидных и аминокислотных последовательностей у грызунов.

3.2. Стратегия кодирования и структурно-функциональная классификация алкогольдегидрогеназ человека

Из-за вырожденности генетического кода большинство аминокислот кодируются более чем одним кодоном. Так как синонимичные замены не вызывают изменения кодируемой аминокислоты, а естественный отбор действует главным образом на уровне белков, то синонимичные замены следует считать нейтральными. Если это так, то частоты использования кодонов в пределах одной серии должны быть одинаковыми. Однако существует предпочтение кодонов — явление, при котором частоты использования кодонов в серии различаются [88].

Для объяснения этого явления предложен ряд гипотез. Так, в 1979 г. Л. Пост связал предпочтение кодонов с количеством соответствующих тРНК и со степенью экспрессии данного гена [149]. В последующем установлено наличие очень сильной корреляции между содержанием различных тРНК и частотой

использования соответствующих кодонов в генах дрожжей и *E. coli*. Однако может иметь место и обратная ситуация, когда соотношение между различными тРНК, определяемое числом их генов, подгоняется к относительным частотам синонимичных кодонов [44]. Вполне вероятно, что количество изоакцепторных тРНК и значения RSCU взаимосвязаны, т. е. изменение одного из этих показателей вызывает изменение другого и наоборот. Также были высказаны гипотезы о влиянии на неслучайное использование синонимичных кодонов содержания гуанина и цитозина, а также о возможной роли воблинга (способности тРНК узнавать не только свой кодон), особенно в случае модификации оснований в первом положении антикодона [47]. Следует сказать, что в начале 80-х годов прошлого столетия Р. Грэнтсем предложил геномную гипотезу, согласно которой большинство генов данного генома имеют одинаковую кодирующую стратегию [87].

В предварительно проведенных исследованиях мы обнаружили влияние ГЦ-давления на использование претерминальных кодонов в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса [63]. По этой причине, с нашей точки зрения, содержание гуанина и цитозина является одним из наиболее вероятных факторов, определяющих неслучайное использование синонимичных кодонов. Для подтверждения или опровержения этого предположения определено содержание гуанина, цитозина и использование синонимичных кодонов в последовательностях мРНК, соответствующих АДГ человека.

Как известно, молекула ДНК состоит из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей, соединенных друг с другом при помощи водородных связей, возникающих между азотистыми основаниями разных цепочек. Причем между аденином и тиминном устанавливаются две связи, а между гуанином и цитозином — три. Насыщенность молекулы ДНК гуанином и цитозином является одним из факторов, обеспечивающих ее термодинамическую стабильность. Об этом можно судить, исходя из насыщенности гуанином и цитозином мРНК, образовавшейся в процессе транскрипции. Для определения стратегии кодирования АДГ человека установлено процентное содержание гуанина и цитозина в соответствующих последовательностях мРНК (табл. 3.4).

Таблица 3.4

Процентное содержание гуанина и цитозина в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ человека

Класс АДГ	G + C, %	G1 + C1, %	G2 + C2, %	G3 + C3, %	GC3-кодоны, %
1A	47,7	53,2	42,6	47,0	43,6
1B	49,4	54,8	43,1	50,5	47,9
1C	48,2	54,0	43,0	47,6	44,9
2	44,8	50,9	44,3	39,2	37,2
3	45,9	53,6	43,2	40,8	37,6
4	46,8	51,4	43,5	45,3	42,1
5	45,6	51,0	42,1	43,9	41,2

Общее содержание гуанина и цитозина колеблется в пределах 44,8–49,4 %, причем наибольшее содержание вышеназванных азотистых оснований характерно для АДГ класса 1В (49,4 %), а наименьшее — для АДГ 2-го класса (44,8 %). Бóльшая насыщенность гуанином и цитозином последовательности мРНК, кодирующей АДГ класса 1В человека, может свидетельствовать о бóльшей термодинамической стабильности соответствующего участка молекулы ДНК.

Кроме этого, проанализировано содержание гуанина и цитозина в каждом положении нуклеотида в кодоне в отдельности. Так, для АДГ1А класса наибольшее содержание Г+Ц отмечено в первом положении нуклеотида в кодоне (53,2 %), меньшее — в третьем (47,0 %), а наименьшее — во втором (42,6 %). Для последовательностей мРНК, соответствующих АДГ1А, 1С, 2, 3, 4, 5-го классов, характерно преобладание общего ГЦ-содержания над содержанием гуанина и цитозина в третьем положении кодона, что позволяет говорить о наличии в изучаемых последовательностях АТ-давления. Для последовательности мРНК, кодирующей АДГ1В класса, характерно незначительное преобладание содержания гуанина и цитозина в третьем положении кодона над общим ГЦ-содержанием, а следовательно, наличие слабого ГЦ-давления.

Полученные данные по содержанию гуанина и цитозина в зависимости от положения кодона позволяют сформулировать следующую закономерность: $G_1 + C_1 > G_3 + C_3 > G_2 + C_2$, которая характерна для всех мРНК, кодирующих АДГ человека, за исключением АДГ 2-го и 3-го классов, в которых содержание гуанина и цитозина во втором положении больше, чем в третьем ($G_1 + C_1 > G_2 + C_2 > G_3 + C_3$) [24]. Существование двух закономерностей последовательного количественного распределения гуанина и цитозина в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ человека, позволяет предположить наличие, по крайней мере, двух подсемейств АДГ человека. В пользу этого предположения также свидетельствует более низкий процент ГЦЗ-кодонов (кодонов, содержащих в третьем положении гуанин или цитозин) в мРНК, кодирующих АДГ 2-го и 3-го классов (37,2 и 37,6 % соответственно).

Таким образом, к первому подсемейству можно отнести АДГ 2-го и 3-го классов, а ко второму — 1, 4 и 5-го классов. Возможность такой классификации АДГ подтверждена полученными дендрограммами (рис. 3.2, 3.3), на которых АДГ 2-го и 3-го классов наиболее близки к корню, а следовательно, являются наиболее филогенетически древними. В то же время АДГ 1, 4 и 5-го классов, напротив, удалены от корня. Более того, АДГ 2-го и 3-го классов объединяет наличие детоксикационной функции, которая у АДГ3 ярко выражена в отношении формальдегида, а у АДГ2 — в отношении хинонов. АДГ 1, 4 и 5-го классов преимущественно участвуют в метаболизме спиртов (этанола и ретинола). На основании этих данных нами предложена структурно-функциональная классификация среднепочечных АДГ человека (рис. 3.4), в которой АДГ разделены

на метаболизирующие формальдегид и хиноны (2 и 3-й классы) и метаболизирующие спирты (1, 4 и 5-й класс) [34]. Следует сказать, что данная классификация полностью согласуется с функциональной классификацией АДГ по их чувствительности к пиразолу.

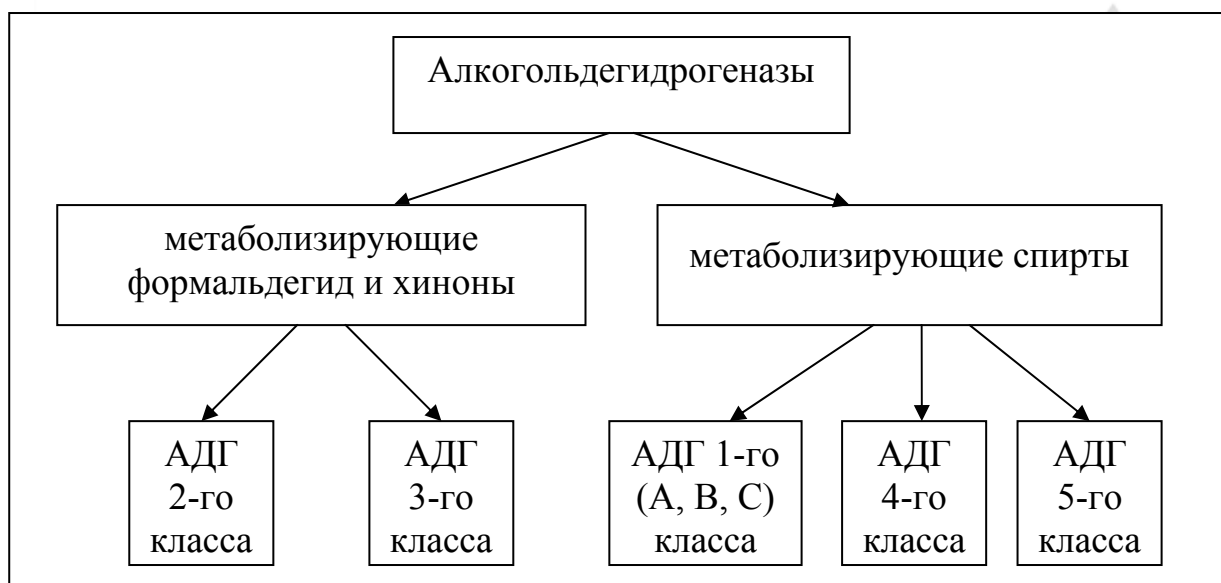


Рис. 3.4. Структурно-функциональная классификация АДГ человека

Для установления стратегии кодирования определен показатель относительного использования синонимичных кодонов (RSCU), содержащих в третьем положении гуанин или цитозин, для АДГ1В и 2-го классов человека, как наиболее отличающихся по содержанию гуанина и цитозина (рис. 3.5).

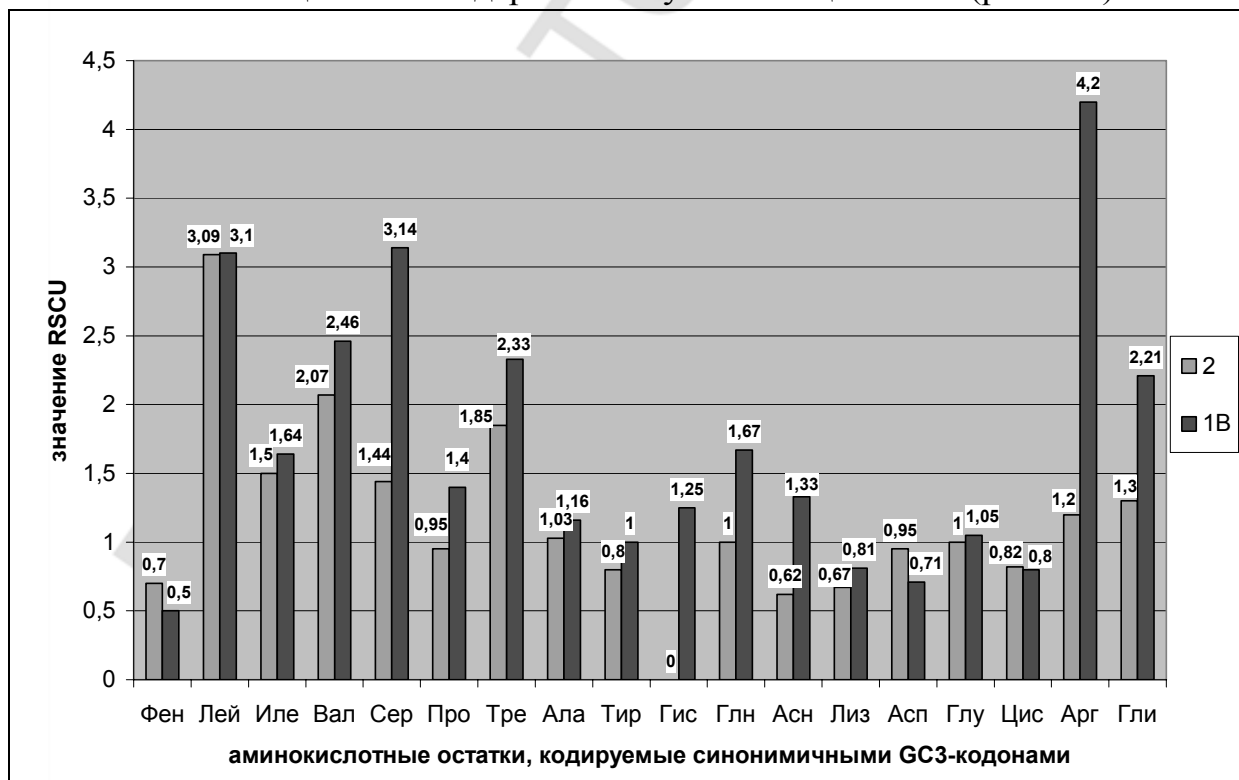


Рис. 3.5. Показатель относительного использования синонимичных GC3-кодонов для АДГ1В и 2-го классов человека

Из приведенных на рисунке 3.5 данных видно, что для 15 (83,3 %) аминокислотных остатков, кодируемых GC3-кодонами, значение RSCU увеличивается с ростом общего содержания гуанина и цитозина и лишь для трех аминокислот (фенилаланина, цистеина и аспарагиновой кислоты) — уменьшается.

Таким образом, при уменьшении АТ-содержания наблюдается преимущественное использование синонимичных ГЦЗ-кодонов, соответствующих 8 аминокислотным остаткам (изолейцину, серину, треонину, гистидину, глутамину, аспарагину, аргинину и глицину). При росте ГЦ-содержания происходит увеличение использования ГЦЗ-кодонов, кодирующих 7 аминокислот (лейцин, валин, пролин, аланин тирозин, лизин и глутаминовую кислоту), а также уменьшение использования ГЦЗ-кодонов, соответствующих трем аминокислотам (фенилаланину, цистеину и аспарагиновой кислоте) [31]. Поскольку АДГ классов 1В и 2 в основном синтезируется в одних и тех же клетках (гепатоцитах), обладающих одним пулом тРНК, трудно согласится с мнением [44] о том, что содержание изоакцепторных тРНК является главным фактором, определяющим предпочтительное использование синонимичных кодонов.

Для статистического подтверждения зависимости между ГЦ-содержанием и значениями RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов нами вычислены коэффициенты корреляции, их ошибка и достоверность корреляционных связей (табл. 3.5). Только для пяти (валин, серин, пролин, глицин и аспарагин) из восемнадцати рассмотренных аминокислотных остатков, кодируемых GC3-кодонами, характерно наличие достоверных прямых корреляционных связей между значением RSCU и общим содержанием гуанина и цитозина. При этом для аспарагина характерна связь средней силы, а для валина, серина, пролина и глицина — сильная связь.

Таблица 3.5

Показатели корреляции между содержанием гуанина и цитозина и значениями RSCU для ГЦЗ-кодонов в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ человека

Аминокислота	Фен	Вал	Арг	Лей	Сер	Про	Тре	Ала	Гли
GC3-кодона	УУЦ	ГУЦ ГУГ	ЦГЦ ЦГГ АГГ	УУГ ЦУЦ ЦУГ	УЦЦ УЦГ АГЦ	ЦЦЦ ЦЦГ	АЦЦ АЦГ	ГЦЦ ГЦГ	ГГЦ ГГГ
$r \pm m$	-0,26 ± 0,431	0,76 ± 0,291*	0,58 ± 0,363	-0,40 ± 0,409	0,92 ± 0,170*	0,73 ± 0,307*	0,65 ± 0,341	-0,38 ± 0,414	0,82 ± 0,259*
Аминокислота	Лиз	Асн	Глн	Асп	Гис	Глу	Иле	Цис	Тир
GC3-кодона	ААГ	ААЦ	ЦАГ	ГАЦ	ЦАЦ	ГАГ	АУЦ	УГЦ	УАЦ
$r \pm m$	-0,16 ± 0,441	0,67 ± 0,334*	0,59 ± 0,362	-0,17 ± 0,441	0,54 ± 0,376	0,36 ± 0,417	0,25 ± 0,433	-0,37 ± 0,416	0,62 ± 0,350

* Достоверные корреляционные связи ($p < 0,05$).

Между сравниваемыми показателями для фенилаланина, лейцина, аланина, лизина, аспарагиновой кислоты и цистеина характерны отрицательные корреляционные связи, не являющиеся, однако, достоверными.

Изменение значения RSCU можно объяснить, исходя из двух механизмов. Во-первых, изменение RSCU может быть связано с заменами в третьем положении кодона, т. е. с взаимными переходами АТЗ- и GCЗ-кодонов. Во-вторых, изменение RSCU может быть обусловлено заменами в первом и втором положениях кодона, что приводит к изменению кодируемой аминокислоты. При наличии прямой корреляционной связи между RSCU и GC-содержанием наиболее вероятен первый механизм, а в обратном случае — второй. Замена кодируемой аминокислоты в этом случае позволяет думать о ее бóльшем структурно-функциональном значении.

Таким образом, используя этот подход, можно предположить существенное значение фенилаланина, лейцина, аланина, лизина, аспарагиновой кислоты и цистеина для активности АДГ человека. В первой главе было показано, что все вышеназванные аминокислотные остатки действительно необходимы для структуры и функции АДГ. Так, фенилаланин участвует в формировании внутренней части, а лейцин — наружной части субстрат-связывающего пакета, что во многом определяет субстратную специфичность АДГ. Лизин вместе с аспарагиновой кислотой играет важную роль в образовании фермент-коферментного комплекса. Остатки цистеина и аспарагиновой кислоты обеспечивают образование холофермент-субстратного комплекса, удерживаемого ионами цинка. Остатки аланина, по-видимому, принимают участие в поддержании структуры фермента.

В таблице 3.6 показана зависимость между ГЦ-содержанием и содержанием 20 аминокислот в последовательностях АДГ человека.

Между ГЦ-содержанием и содержанием валина, пролина, изолейцина и триптофана существуют достоверные корреляционные связи. Причем для валина характерна прямая связь средней силы, для пролина — прямая сильная связь, а для изолейцина и триптофана — обратные сильные связи. По показателям корреляции, полученным для АДГ человека, все входящие в их последовательности аминокислоты можно разделить на три группы.

Таблица 3.6

Коэффициенты корреляции между содержанием гуанина и цитозина и содержанием аминокислот в последовательностях АДГ человека

Аминокислота	Фен	Вал	Арг	Лей	Сер	Про	Тре	Ала	Гли	Мет
$r \pm m$	$-0,26 \pm 0,431$	$0,69 \pm 0,323^*$	$0,46 \pm 0,397$	$-0,03 \pm 0,447$	$-0,44 \pm 0,402$	$0,85 \pm 0,238^*$	$-0,15 \pm 0,442$	$-0,21 \pm 0,437$	$-0,50 \pm 0,386$	$0,51 \pm 0,383$
Аминокислота	Лиз	Асн	Глн	Асп	Гис	Глу	Иле	Цис	Тир	Три
$r \pm m$	$0,27 \pm 0,431$	$0,19 \pm 0,439$	$-0,48 \pm 0,393$	$0,00 \pm 0,447$	$0,65 \pm 0,338$	$-0,17 \pm 0,440$	$-0,82 \pm 0,259^*$	$-0,43 \pm 0,403$	$-0,13 \pm 0,444$	$-0,70 \pm 0,320^*$

* Достоверные корреляционные связи ($p < 0,05$).

К первой группе отнесены аминокислоты, содержание которых достоверно положительно коррелирует с содержанием гуанина и цитозина (валин и пролин). Ко второй группе — аминокислоты, содержание которых достоверно отрицательно коррелирует с содержанием гуанина и цитозина (изолейцин и триптофан). А к третьей группе — аминокислоты, содержание которых не коррелирует достоверно с содержанием гуанина и цитозина (фенилаланин, аргинин, лейцин, серин, треонин, аланин, глицин, метионин, лизин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, глутамин, аспарагин, гистидин, цистеин и тирозин).

Наблюдаемый на рисунке 3.6 перекрест трендов для валина и изолейцина можно объяснить транзициями А→Г в первом положении кодона под влиянием ГЦ-давления. В пользу этого говорит и тот факт, что транзиции более вероятны, чем трансверсии [6, 21, 18, 33, 44, 51], а замены А→Г происходят чаще, чем любые другие замены [6].

Следует отметить, что сходная классификация аминокислот, входящих в состав бактериальных белков, в зависимости от насыщенности гуанином и цитозином кодирующих их последовательностей мРНК была ранее произведена Н. Суеоккой [175]. При этом 11 из 18 изученных им аминокислот (61,1 %) аналогично классифицированы нами. Отсутствие полной идентичности, вероятно, связано с различиями стратегий кодирования белков у человека и бактерий, а также с малым диапазоном колебаний значений ГЦ-содержания АДГ человека (44,8–49,4 %).

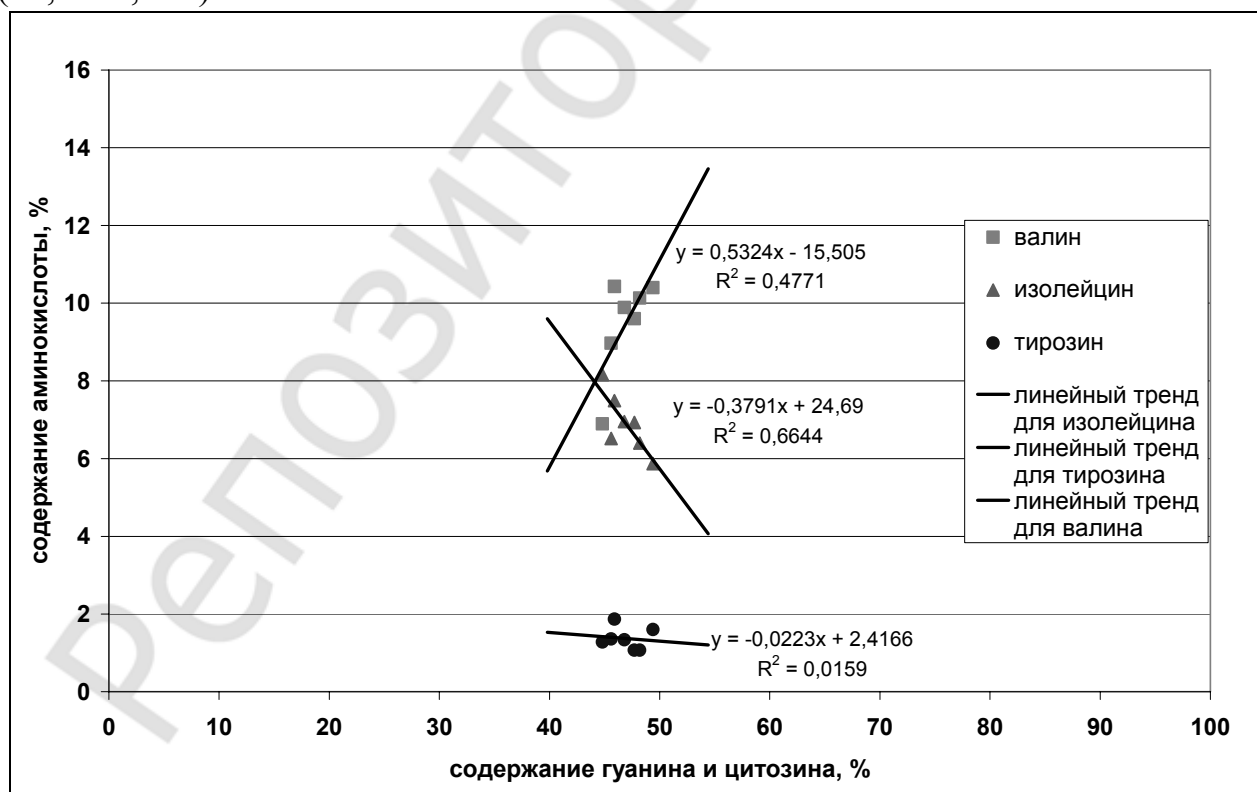


Рис. 3.6. Зависимость содержания изолейцина, валина и тирозина в последовательностях АДГ человека от общего содержания гуанина и цитозина в кодирующих их последовательностях мРНК

3.3. Особенности экзон-интронной структуры и нуклеотидного состава генов АДГ человека

Как известно, гены эукариот характеризуются мозаичным строением, поскольку они состоят из экзонов — фрагментов, кодирующих белок, и интронов — участков, расположенных между ними и не несущих информацию о кодируемом белке. Сравнение строения и эволюционных изменений экзонов и интронов отдельных генов, безусловно, позволит получить биологически важную информацию. Количество нуклеотидов в экзонах и интронах генов АДГ 1–5-го классов человека приведено в таблице 3.7.

Таблица 3.7

Количество нуклеотидов в экзонах и интронах генов АДГ 1–5-го классов человека

Экзоны	АДГ1А	АДГ1В	АДГ1С	АДГ2	АДГ3	АДГ4	АДГ5
1	18	18	18	18	12	54	18
2	102	102	102	102	102	102	102
3	138	138	138	141	141	138	141
4	87	87	87	87	87	87	87
5	222	222	222	234	222	219	219
6	261	261	261	261	261	261	261
7	135	135	135	135	135	135	135
8	138	138	138	138	138	138	144
9	27	27	27	27	27	27	—
Интроны							
1–2	3231	2427	4811	1424	3472	5582	2872
2–3	575	600	600	996	2998	901	2413
3–4	2046	1743	1739	2392	522	317	3103
4–5	97	97	97	2363	4441	97	116
5–6	1792	1816	1806	4701	151	6979	1153
6–7	2066	2164	2084	4159	1242	1411	1086
7–8	579	617	859	476	2202	3369	2382
8–9	2777	2900	2800	2127	131	2305	1875

Из данных, приведенных в таблице 3.7, видно, что 6 из 9 экзонов изучаемых генов (2, 3, 4, 6, 7, 8) содержат приблизительно одинаковое число нуклеотидов, а первый и пятый экзоны отличаются по этому показателю. Примечательно, что девятый экзон отсутствует в гене АДГ 5-го класса человека.

Вместе с тем первый и девятый экзоны генов АДГ состоят из небольшого количества (< 30) нуклеотидов, что может ограничивать репрезентативность получаемой на их основе информации. Все восемь интронов генов АДГ значительно различаются между собой по числу нуклеотидов. Содержание гуанина и цитозина в экзонах и интронах гена АДГ класса 1В человека показано на рисунке 3.7.

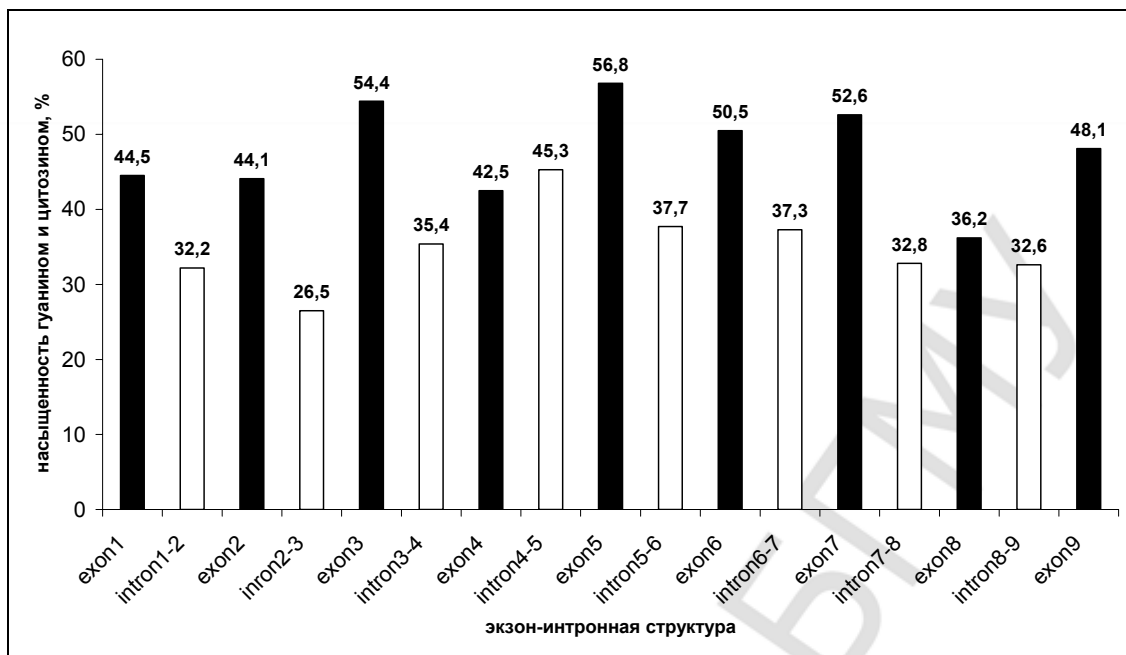


Рис. 3.7. Насыщенность гуанином и цитозином экзонов и интронов гена АДГ класса 1В человека

Аналогичным образом нами были построены и профили насыщенности гуанином и цитозином экзонов генов АДГ человека классов 1А, 1С, 2–5. На рисунке 3.7 видно, что содержание гуанина и цитозина в экзонах генов АДГ широко варьирует в пределах 34,1–56,8 % (первый и девятый экзоны исключены). Минимальная насыщенность гуанином и цитозином характерна для восьмых экзонов изучаемых генов (за исключением гена АДГ класса 2), а максимальная — для вторых (ген АДГ2), третьих (ген АДГ1А), пятых (гены АДГ1В, 1С) и седьмых (гены АДГ 3, 4, 5-го классов) экзонов. Обращает на себя внимание мозаичность содержания гуанина и цитозина в генах АДГ, заключающаяся в чередовании более ГЦ-насыщенных экзонов с менее ГЦ-насыщенными интронами.

Для анализа наблюдаемых различий вычислено среднее содержание гуанина и цитозина в экзонах и интронах изучаемых генов АДГ (табл. 3.8).

Таблица 3.8

Среднее содержание гуанина и цитозина в экзонах и интронах генов АДГ 1–5-го классов человека

Класс АДГ	1А	1В	1С	2	3	4	5
Экзоны	45,4 ± 2,37	47,7 ± 2,31	46,5 ± 2,33	45,7 ± 1,98	45,8 ± 3,35	46,1 ± 1,49	45,3 ± 1,89
Интроны	35,9 ± 2,02	35,0 ± 2,07	36,3 ± 1,91	35,1 ± 2,02	38,1 ± 1,43	34,4 ± 1,89	34,1 ± 2,41
Достоверность различий	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001

Из данных, приведенных в таблицы 3.8, следует, что экзоны изучаемых генов имеют достоверно бóльшую ГЦ-насыщенность по сравнению с интронами [16]. Такое строение генов АДГ человека за счет водородных связей будет обеспечивать чередование более термодинамически стабильных участков мо-

лекулы ДНК (соответствующих экзонам) и менее стабильных (соответствующих интронам).

Вероятно, это необходимо для ускорения раскручивания цепочек ДНК хеликазой при репликации и транскрипции. Кроме этого, большая прочность участков ДНК, соответствующих экзонам, предположительно будет способствовать усилению их защиты от мутагенов. Для подтверждения или опровержения этого предположения необходимо определить эволюционные дистанции между соответствующими экзонами и интронами АДГ. В качестве примера изучены последовательности генов, кодирующих АДГ 3-го класса (как наиболее филогенетически древнего) человека и мыши, а также методом М. Кимуры определены эволюционные дистанции между ними (табл. 3.9).

Таблица 3.9

Эволюционные дистанции между экзонами и интронами генов, кодирующих АДГ 3-го класса человека и мыши

Эзоны	d, замен на сайт	Интроны	d, замен на сайт
1	0,09 ± 0,091	1–2	0,92 ± 0,044
2	0,12 ± 0,037	2–3	0,67 ± 0,032
3	0,09 ± 0,026	3–4	0,44 ± 0,042
4	0,06 ± 0,028	4–5	1,00 ± 0,040
5	0,14 ± 0,027	5–6	0,45 ± 0,085
6	0,14 ± 0,025	6–7	0,96 ± 0,055
7	0,14 ± 0,033	7–8	0,84 ± 0,060
8	0,15 ± 0,036	8–9	0,87 ± 0,159
9	0,08 ± 0,058		

На основании полученных значений эволюционных дистанций вычислены скорости эволюции между экзонами и интронами АДГ3 человека и мыши (рис. 3.8).

На данном рисунке видна четкая закономерность чередования медленно эволюционирующих участков (экзонов) с быстро эволюционирующими (интронами). Средняя скорость эволюции для экзонов гена АДГ 3-го класса человека и мыши составила $0,51 \pm 0,050 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год, что достоверно ($p < 0,001$) ниже таковой для интронов ($3,49 \pm 0,355 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год) [32]. Полученное значение скорости эволюции интронов согласуется с таковой, описанной Ю. Г. Матушкиным ($3,55 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год) [47]. Этот факт наводит на мысль, что данное числовое значение данного показателя является одной из важных характеристик эволюционных изменений интронов. Согласно данным В. Ли и соавт., скорость замен на сайт α -псевдоглобиновых генов равна $4,6 \times 10^{-9}$ и является одной из самых больших среди известных в настоящее время темпов нуклеотидных замен [154]. К данному значению близка полученная нами скорость эволюционных изменений интрона 4–5 гена, кодирующего АДГ

3-го класса ($4,54 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год), что позволяет отнести ее к одной из самых высоких скоростей эволюции.

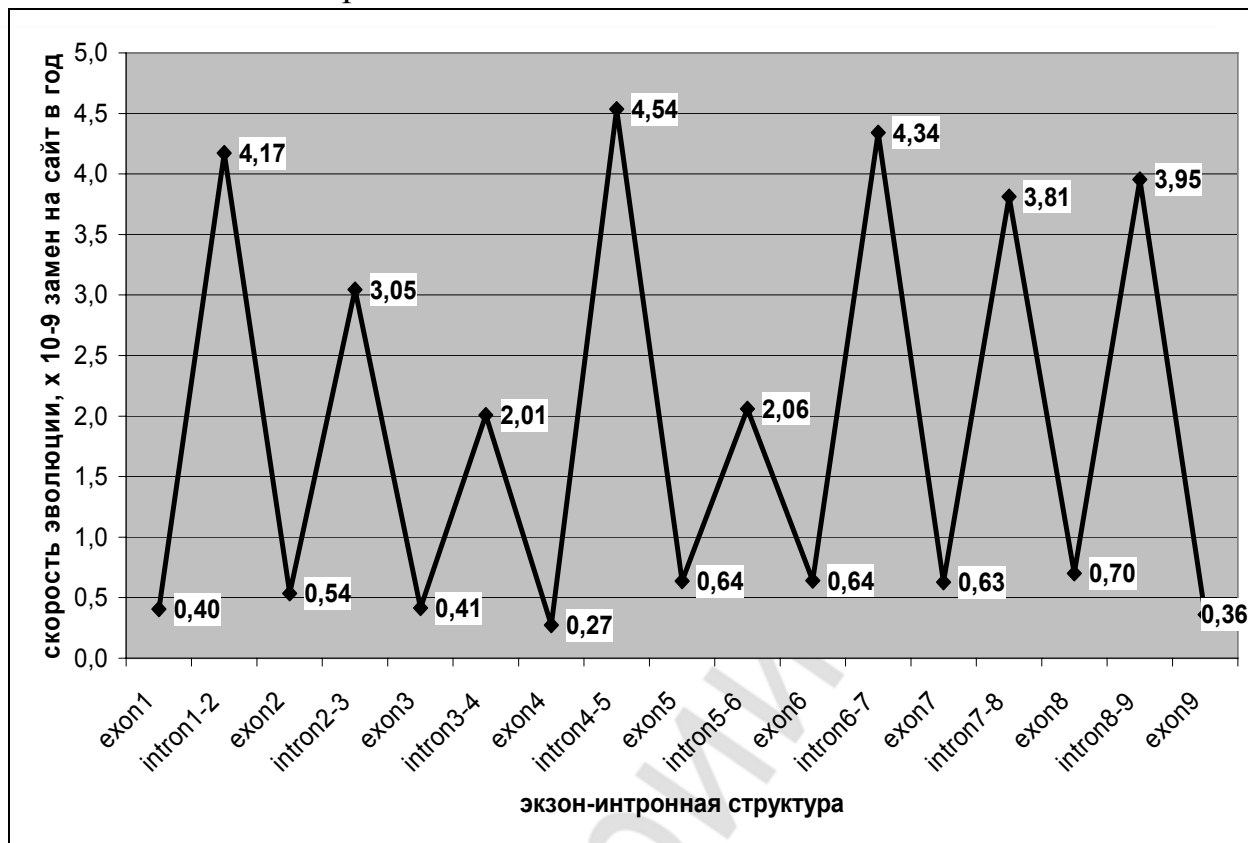


Рис. 3.8. Скорости эволюции экзонов и интронов гена АДГ3 человека и мыши

Между скоростями эволюции экзонов и интронов АДГ 3-го класса и их насыщенностью гуанином и цитозином обнаружено наличие достоверной ($p < 0,05$) отрицательной корреляционной связи средней силы ($r = -0,46 \pm 0,229$). Таким образом, бóльшая ГЦ-насыщенность экзонов изучаемого гена в процессе эволюции сохраняется благодаря малой скорости их эволюции. Напротив, относительно высокая скорость эволюционных изменений интронов сопряжена с меньшей термодинамической стабильностью соответствующего участка ДНК, что обусловлено их меньшей ГЦ-насыщенностью.

Наибольший интерес при изучении генов АДГ человека представляет возможность оценки их эволюционных изменений в связи с появлением у изучаемых ферментов новых функций. Поэтому гены АДГ классов 1С, 3 (относящиеся, согласно предложенной нами классификации, к разным подклассам) человека послужили объектами для дальнейшего тщательного анализа. Профили ГЦ-насыщенности экзонов данных генов представлены на рисунке 3.9.

Профили содержания гуанина и цитозина в экзонах изучаемых генов АДГ отличаются, но достоверные отличия по ГЦ-насыщенности обнаруживаются лишь при сравнении их пятых экзонов ($p < 0,01$). Для подтверждения наблюдаемых различий сопоставлена ГЦЗ-насыщенность экзонов генов АДГ классов 1С и 3 человека (рис. 3.10).

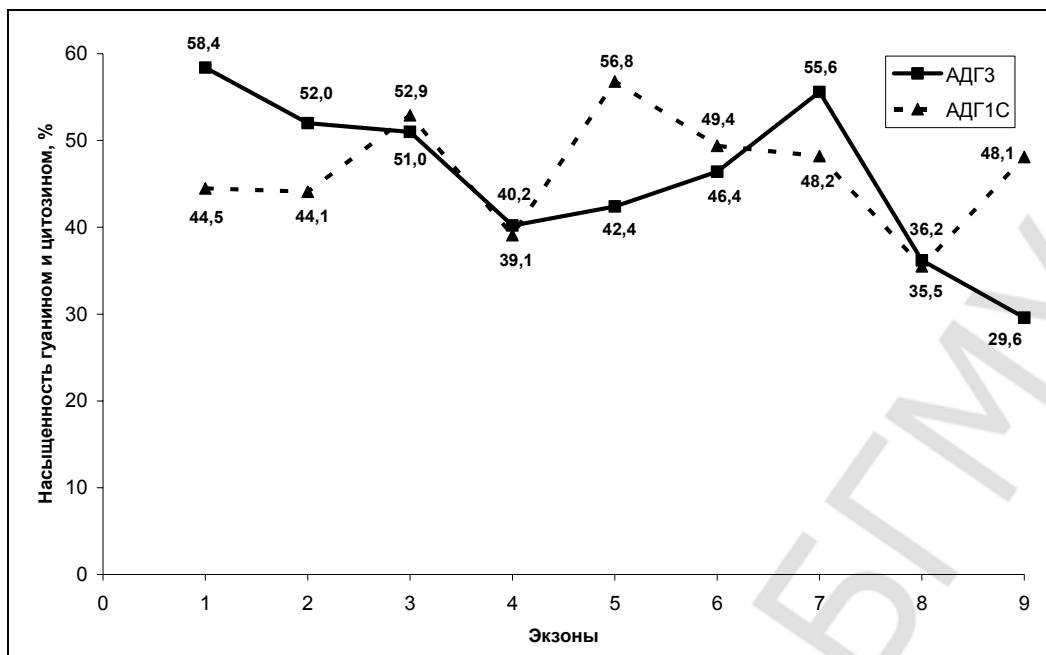


Рис. 3.9. Общая ГЦ-насыщенность экзонов генов АДГ1С и 3 человека

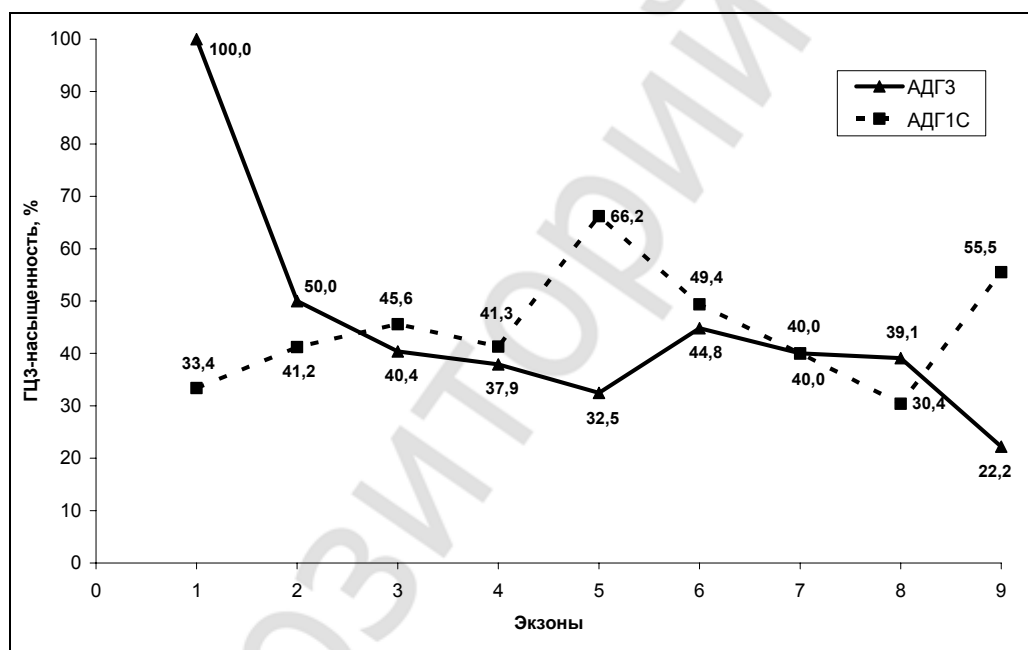


Рис. 3.10. Насыщенность гуанином и цитозином третьего положения кодонов в экзонах генов АДГ классов 1С и 3 человека

Профили ГЦЗ-насыщенности изучаемых генов АДГ также отличаются и, сходно с профилями содержания гуанина и цитозина, достоверные отличия по ГЦ-насыщенности обнаруживаются при сравнении их пятых экзонов ($p < 0,001$). Выявленные отличия наводят на мысль о важности пятого экзона в структурно-функциональных отличиях двух изучаемых классов АДГ.

Полученные результаты согласуются с таковыми, полученными при вычислении числа мутаций в соответствующих декапептидах участках мРНК, кодирующих АДГ классов 1С и 3 человека (рис. 3.11, нумерация дана по АДГ1С, начиная с 16-го нуклеотида).

На рисунке 3.12 видно, что первичная структура данных участков АДГ сходна, а вторичная — несколько различается. Так, в области N-конца участка АДГ 3-го класса, соответствующего пятому экзону, имеется α -спиральный фрагмент, который отсутствует в соответствующем участке АДГ класса 1С. Наблюдаемые различия вторичной структуры, безусловно, сопряжены с изменениями третичной структуры и функции изучаемых ферментов. Действительно, рентгеноструктурным анализом было показано, что аминокислотные остатки, соответствующие пятому экзону, участвуют в связывании субстратов. Остатки, занимающие 116, 117, 140, 141-е положения, входят в состав субстрат-связывающего пакета, а остаток Arg-115 АДГ 3-го класса связывает глутатион и ω -гидроксижирные кислоты [144, 169]. Таким образом, нами впервые предложен оригинальный способ определения функционально отличающихся участков эволюционно родственных белков по профилям содержания ГЦ и ГЦЗ [29].

С крайней степенью осторожности мы полагаем, что в процессе эволюции происходил положительный отбор мутаций на N-конце соответствующего пятому экзону участка АДГ1С и 3. Для выявления отбора определены синонимичная (число синонимичных замен в расчете на синонимичный сайт) и несинонимичная дистанции (число несинонимичных замен в расчете на несинонимичный сайт). При равных значениях d_S и d_N (или p_S и p_N) отбор в сравниваемых сайтах отсутствует. Преобладание значений d_S (p_S) свидетельствует о сильном очищающем отборе, а преобладание d_N (p_N) — о сильном положительном отборе аминокислотных замен, дающих селективные преимущества для организма [91, 179].

Как правило, значения d_S и d_N (или p_S и p_N) рассчитываются для всех кодонов гена или мРНК [17, 89]. Однако молекулярная адаптация в белке, находящаяся под давлением положительного отбора, часто встречается для немногих остатков и, возможно, только в отдельных линиях (родах). Каноническим примером данной ситуации принято считать положительный отбор аминокислотных остатков фермента, вовлеченных в связывание субстрата, при сильном очищающем отборе (высокой консервативности) остатков, составляющих активный центр. В этом случае соотношение d_N/d_S (или p_N/p_S) для всего белка может быть значительно меньше, чем 1. Поэтому в большинстве случаев, положительный отбор может быть доказанным только путем расчета сайт-специфических соотношений d_N/d_S (или p_N/p_S) [91]. В таблице 3.10 показаны определенные модифицированным методом Нея–Годжобори синонимичные и несинонимичные дистанции для всей последовательности мРНК, кодирующих АДГ классов 1С и 3 человека, участков мРНК, соответствующих пятым экзонам, и десяти N-концевых кодонов данных участков мРНК.

Полученные нами соотношения p_N/p_S при сравнении всей последовательности изучаемых мРНК и их участков, соответствующих пятым экзонам, равны и являются достаточно низкими (0,38), что согласуется с данными, полученными

ми другими исследователями [180]. Для десяти N-концевых кодонов участков сравниваемых мРНК, соответствующих пятым экзонам, соотношение несинонимичной и синонимичной дистанций значительно выше (0,88). Данное значение, однако, не превышает единицы. Именно по этой причине традиционное определение положительного отбора с помощью доступных селекционных тестов оказалось невозможным из-за их технических недостатков [57].

Таблица 3.10

Синонимичные и несинонимичные дистанции для последовательностей мРНК, кодирующих АДГ1С и 3 человека, и их участков

Сравниваемые последовательности мРНК	Показатель			
	соотношение транзиций и трансверсий	P_s , синонимичных замен на синонимичный сайт	P_n , несинонимичных замен на несинонимичный сайт	соотношение p_n/p_s
Вся последовательность	1,07	$0,64 \pm 0,028$	$0,24 \pm 0,015$	0,38
Участок, соответствующий пятому экзону	0,87	$0,68 \pm 0,060$	$0,26 \pm 0,035$	0,38
10 N-концевых кодонов участка, соответствующего пятому экзону	0,92	$0,84 \pm 0,123$	$0,74 \pm 0,096$	0,88

Согласно данным К. Крэндела и соавт. [150], при использовании общепринятой границы между наличием и отсутствием положительного отбора (соотношение несинонимичной и синонимичной дистанций, равное 1) часто не выявляются функционально значимые изменения белков. Установлено, что при $0,6 < d_N/d_S < 1,0$ происходит ослабление функциональных ограничений, что позволяет предполагать наличие положительного отбора мутаций [180]. В этой связи все потенциально эволюционирующие в режиме положительного отбора гены были разделены на две группы. В первую включены те из них, для которых $d_N/d_S > 1,0$ (гены, кодирующие CD3-рецепторы Т-лимфоцитов, белки главного комплекса гистосовместимости класса 2 и др.), а во вторую — те из них, для которых $0,6 < d_N/d_S < 1,0$ (гены, кодирующие рецептор пролактина, сывороточный препоальбумин и др.) [180].

В пользу предположения о существовании положительного отбора свидетельствует и то, что в десяти выровненных N-концевых кодонах участков мРНК, соответствующих пятому экзону генов АДГ классов 1С и 3 человека, достоверно преобладают многошаговые мутации ($80,0 \pm 13,33 \%$, $p < 0,01$).

По средней физико-химической дистанции между 10 данными аминокислотными сайтами ($75,8 \pm 5,04$) достаточно сложно оценить характер замен (степень их консервативности и радикальности). Однако такие радикальные замены в данном функционально важном участке, как аргинина на аспарагиновую ки-

слоту (в 116-м положении; нумерация по АДГ1С), треонина на лейцин (в 123-м положении) и пролина на глутамин (в 125-м положении), безусловно, могли закрепиться только в результате положительного отбора.

Рассмотрим потенциальное значение некоторых из них. Известно, что потеря положительно заряженного остатка аргинина в 115-м положении, необходимого для связывания отрицательно заряженной молекулы глутатиона, привела к полной утрате формальдегиддегидрогеназной активности и способности активации жирными кислотами [144]. В этой связи следует отметить, что в АДГ1Е лошади остаток Асп-115 не играет существенной роли в связывании субстрата, поскольку он закрыт остатком Лей-116 [127].

Понятно, что большое количество фиксированных замен аминокислот на участке 116–125 не могло не повлиять на конформационную подвижность главной цепи. Для количественного определения этого влияния нами вычислена средняя энтропия, приходящаяся на аминокислотные остатки, расположенные в положениях 116–125 АДГ классов 1С и 3 человека (рис. 3.13).

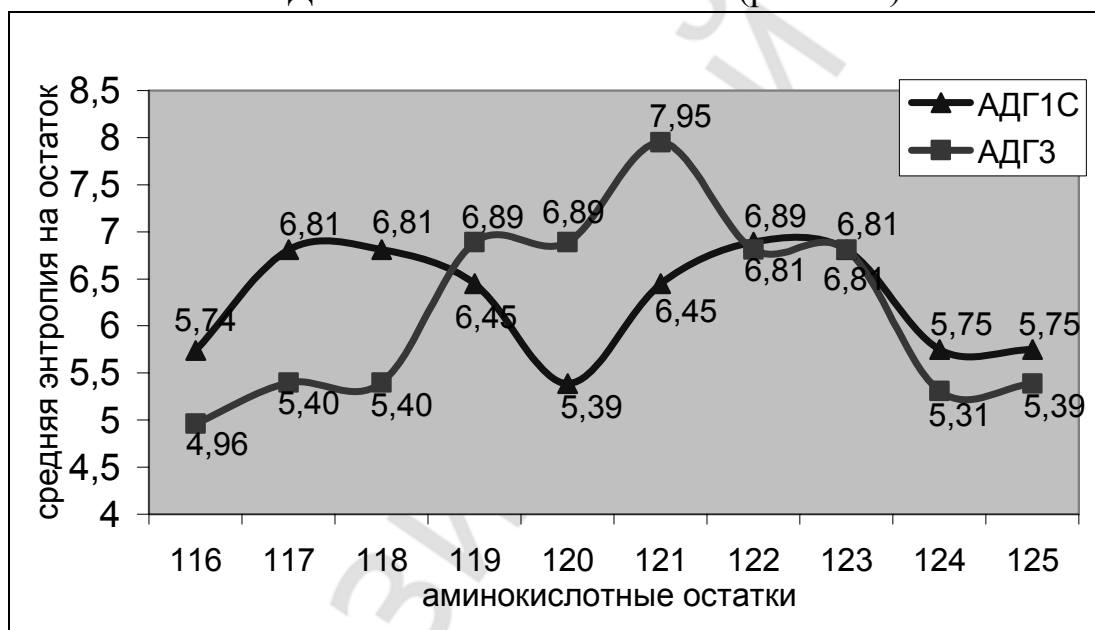


Рис. 3.13. Средняя энтропия в расчете на аминокислотный остаток для 116–125 участков последовательностей АДГ1С и 3 человека

На данном рисунке видно, что замены аминокислот в положениях 116–118 последовательности АДГ1С привели к росту средней энтропии, а следовательно, увеличению гибкости остова основной цепи. Появление остатка лейцина в 116-м положении (в результате замены Вал→Лей) позволило дифференцировать доступ и ретенцию различных по размеру субстратов в активный центр АДГ (благодаря наличию его двух конформационных состояний). Важно, что занимающие 116-е и 117-е положения остатки участвуют в формировании входа в субстрат-связывающий пакет, часто сравниваемый с горлышком бутылки из-за его малого диаметра. Большая подвижность данных остатков, по-видимому, обеспечивает его расширение, что способствует окислению больших

по объему субстратов. Для сравнения следует отметить, что подвижность остатка валина в АДГЗ ограничена, т. к. разветвление его боковой цепи происходит у β -углеродного атома.

Вместе с тем объем бокового радикала остатка Лей ($0,1134 \text{ нм}^3$) больше такового остатка Вал ($0,0863 \text{ нм}^3$) [61], что привело бы к стерическим помехам его с С и D кольцами стероида [127]. Однако данные помехи не возникают, поскольку в результате замен в 115-м (Арг→Асп) и 117-м положениях (Тре→Гли) происходит уменьшение объемов боковых радикалов взаимозаменяемых аминокислотных остатков. Так, объем бокового радикала остатка аспарагиновой кислоты ($0,0584 \text{ нм}^3$) меньше такового остатка аргинина ($0,1257 \text{ нм}^3$), а остатка глицина ($0,0051 \text{ нм}^3$) — такового треонина ($0,0631 \text{ нм}^3$).

Поэтому значение данных замен заключается в том, что они обеспечивают возникновение выраженной способности АДГ1С окислять стероиды благодаря большей подвижности главной цепи и появлению дополнительного пространства в относительно небольшом субстрат-связывающем пакете. Можно полагать, что общей целью фиксации замен в участке АДГ1С 116–125, вероятно, была подстройка субстрат-связывающего пакета для улучшения взаимодействия и более эффективного окисления спиртов и стероидов.

Таким образом, нами предложен оригинальный способ не только определения по профилям содержания ГЦ и ГЦЗ функционально отличающихся участков эволюционно родственных белков, но и участков, потенциально эволюционирующих в режиме положительного отбора [40].

Вместе с тем изоферменту АДГ1С свойственно наличие уникальных (по сравнению с остальными алкогольдегидрогеназами) функциональных особенностей, заключающихся в способности катализировать реакцию дисмутации. В ходе этой реакции из двух молекул ацетальдегида образуются ацетат и этанол, который может быть вновь окислен как АДГ1С, так и другими АДГ. С определенной степенью осторожности мы полагаем, что положительный отбор мутаций в гипервариабельном участке 346–375 мРНК, кодирующих АДГ классов 1С и 3, также может быть связан и с возникновением вышеназванной каталитической активности.

Известно [56], что общая активность пиразолчувствительных алкогольдегидрогеназ в сыворотке крови у больных алкоголизмом женщин ($2,61 \pm 0,16 \text{ Е/л}$) достоверно ($p < 0,05$) выше таковой по сравнению с группой контроля ($0,37 \pm 0,06 \text{ Е/л}$). С увеличением длительности заболевания первоначально наблюдается рост активности данных ферментов (от $2,45 \pm 0,70 \text{ Е/л}$ при давности менее 5 лет до $3,61 \pm 0,98 \text{ Е/л}$ при давности 5–10 лет), а затем снижение (до $1,85 \pm 0,40 \text{ Е/л}$ при давности более 10 лет). Автором также показана зависимость активности пиразолчувствительных АДГ от количества ежемесячно потребляемого этанола. Так, активность данных ферментов при потреблении до 1 л алкоголя в месяц равна $1,01 \pm 0,40 \text{ Е/л}$, при потреблении 1,0–2,5 л в месяц — $2,85 \pm 0,80 \text{ Е/л}$ и при

потреблении более 2,5 л в месяц — $3,50 \pm 0,96$ Е/л. Активность альдегиддегидрогеназы у больных алкоголизмом, напротив, была достоверно ниже, чем в контрольной группе и оставалась пониженной после лечения. Возникающий в результате дисбаланс между активностью ферментов наработки и окисления ацетальдегида при хронической алкогольной интоксикации приводит к повышению содержания в крови токсичного ацетальдегида.

В связи с этим для диагностики алкоголизма было предложено определение активности альдегиддегидрогеназы (чувствительность — 90,2 %, специфичность — 84,2 %) и алкогольдегидрогеназы (чувствительность — 74,5 %, специфичность — 86,2 %) в сыворотке крови [56]. В этом аспекте необходимо отметить, что в доступной нам литературе отсутствует информация об активности АДГ1С при алкоголизме. Мы полагаем, что наиболее интересной в этом плане была бы дифференцированная оценка этанолдегидрогеназной и ацетальдегиддегидрогеназной активности АДГ1С.

Способность АДГ1С в отличие от остальных изоферментов алкогольдегидрогеназ катализировать два этапа окисления этанола, а также полученные данные о высокой вероятности положительного отбора мутаций в этом изоферменте позволяют предположить, что определение активности АДГ1С может выступать в качестве более чувствительного и специфичного маркера для диагностики алкоголизма. На основании вышеизложенных фактов предполагается разработка метода определения активности АДГ1С для диагностики, определения степени тяжести и оценки проводимого лечения алкоголизма.

Аминокислоты, соответствующие второму вариабельному участку, не выполняют какой-либо важной функции [189]. Следовательно, большинство возможных аминокислотных замен являются приемлемыми и селективно нейтральными. Поэтому замены нуклеотидов (и соответственно, аминокислот) в данном участке, по-видимому, происходили в режиме нейтральной эволюции.

Для анализа особенностей нуклеотидного состава генов АДГ человека определим зависимость содержания гуанина и цитозина в каждом из положений нуклеотида в кодоне от общей ГЦ-насыщенности экзонов гена АДГ3 человека (рис. 3.14).

Общий характер взаимосвязи между сопоставляемыми значениями указывает на то, что с увеличением общей ГЦ-насыщенности наблюдается различной степени линейный рост содержания гуанина и цитозина во всех положениях нуклеотида в кодоне. Наибольший рост характерен для значений ГЦ3 (наклон тренда — 1,61), что свидетельствует о выраженном влиянии на замены в данном положении кодона мутационного давления и слабом влиянии отрицательного отбора [13]. Это легко объяснить тем, что 72 % замен по третьему положению не приводят к изменению кодируемой аминокислоты [50]. Меньший наклон тренда по значениям ГЦ1, равный 0,99, связан с меньшей долей синонимичных замен (5 %). Несмотря на то, что все замены по второму положению

несинонимичны, наклон тренда по значениям ГЦ2 является положительным (0,39). Объяснить этот факт можно тем, что часть замен аминокислот является нейтральной, т. е. не приводит к изменению функции белка. В этом случае отрицательный отбор не оказывает никакого влияния на данную мутацию, и она закрепляется, отражая основное направление нуклеотидных замен. Следует подчеркнуть, что данный график является классическим, поскольку он был ранее получен многими исследователями по генам, кодирующими различные белки.

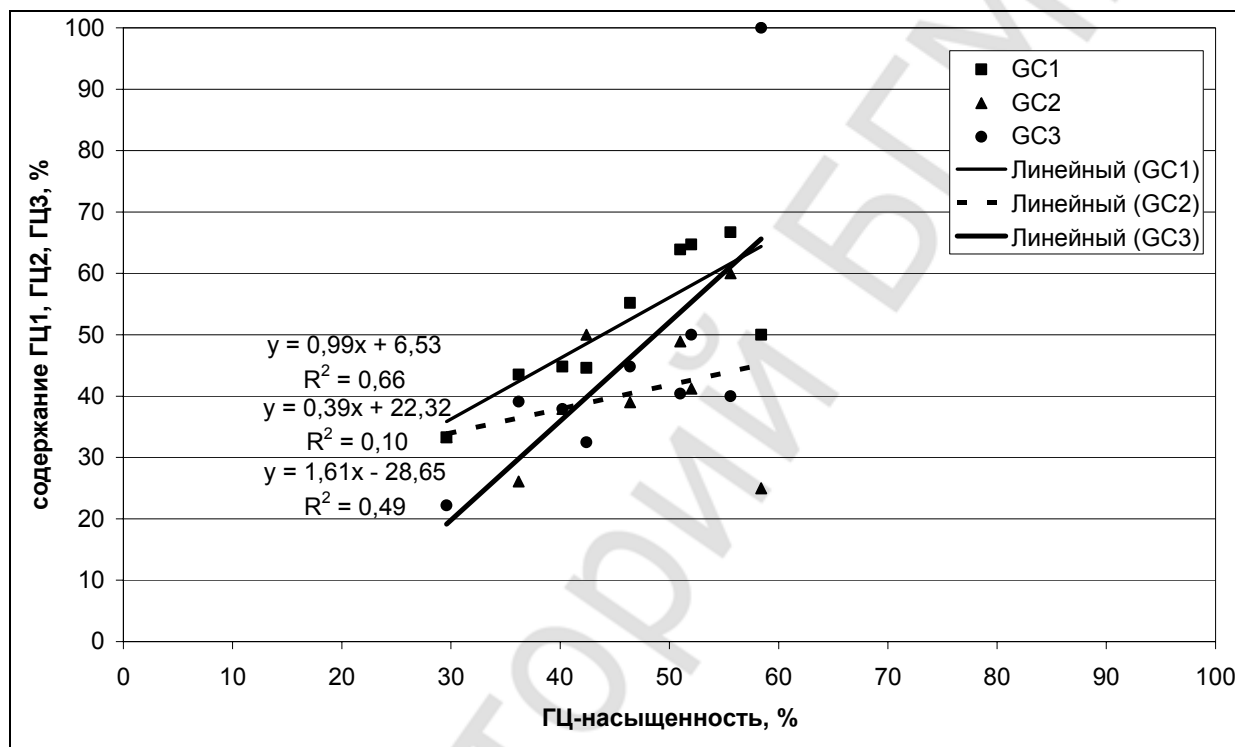


Рис. 3.14. Зависимость содержания гуанина и цитозина в отдельных положениях кодона от общей ГЦ-насыщенности экзонов гена АДГ3 человека

Таким образом, можно утверждать, что в экзонах изучаемого гена АДГ «разрешены» преимущественно замены в третьем положении кодона, в меньшей степени — в первом, а в наименьшей степени — во втором, что связано с вероятностью синонимичных и несинонимичных замен. Выраженное предпочтение синонимичных замен свидетельствует о структурно-функциональных ограничениях, налагаемых на молекулу, а получение такого графика может выступать в качестве одного из критериев ее эволюционной сформированности. Зависимость содержания гуанина и цитозина в каждом из положений кодона от общей ГЦ-насыщенности генов АДГ классов 1В, 1С и 5 человека показана в таблице 3.11.

Установлено, что закономерности зависимости ГЦ-содержания в каждом из положений кодона от общей ГЦ-насыщенности экзонов генов АДГ классов 1В, 1С и 5 человека сходны с таковой для АДГ 3-го класса. Это позволяет утверждать, что гены АДГ1В, 1С, 3 и 5 кодируют эволюционно «совершенные» белки.

Зависимость ГЦ-содержания в каждом из положений кодона от общей
ГЦ-насыщенности экзонов генов АДГ классов 1В, 1С и 5 человека

Ген АДГ	Наклоны линейных трендов		
	по значениям ГЦ и ГЦ1 (R^2)	по значениям ГЦ и ГЦ2 (R^2)	по значениям ГЦ и ГЦ3 (R^2)
1В	0,86 (0,20)	0,72 (0,15)	1,41 (0,69)
1С	0,99 (0,27)	0,67 (0,15)	1,34 (0,63)
5	1,12 (0,34)	0,71 (0,11)	1,17 (0,70)

Аналогичным образом нами изучены экзоны генов АДГ классов 1А, 2 и 4 человека (рис. 3.15–3.17).

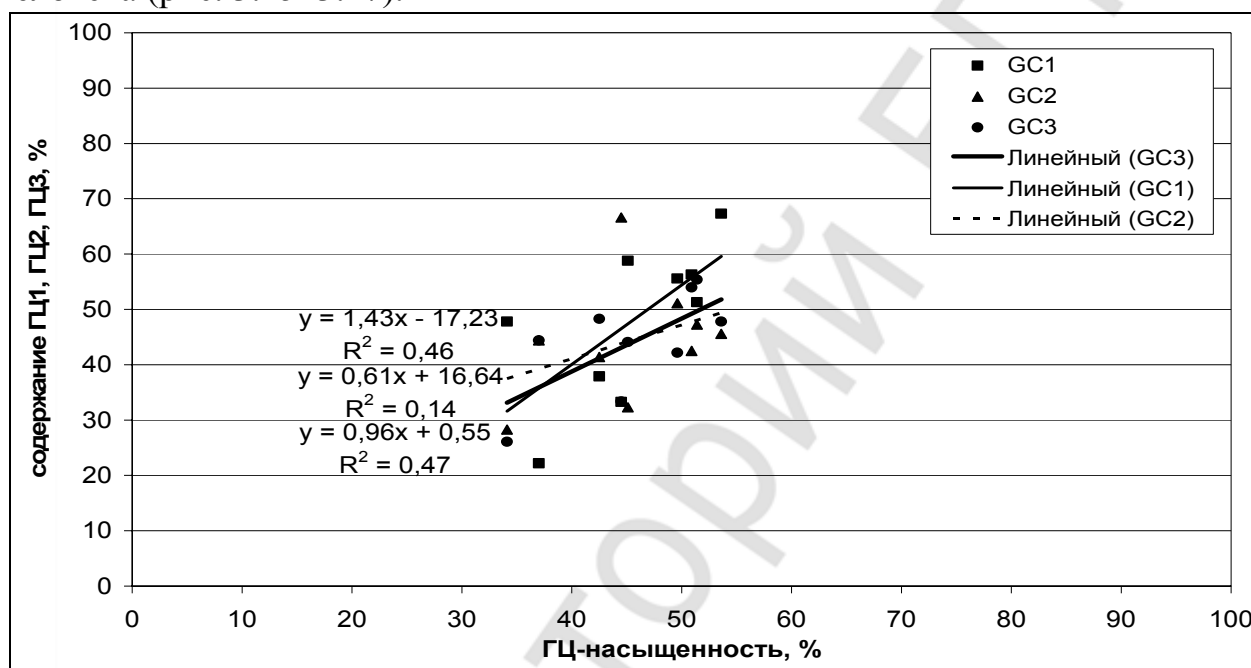


Рис. 3.15. Зависимость содержания гуанина и цитозина в первом, втором и третьем положении нуклеотида в кодоне от общей ГЦ-насыщенности экзонов гена АДГ1А человека

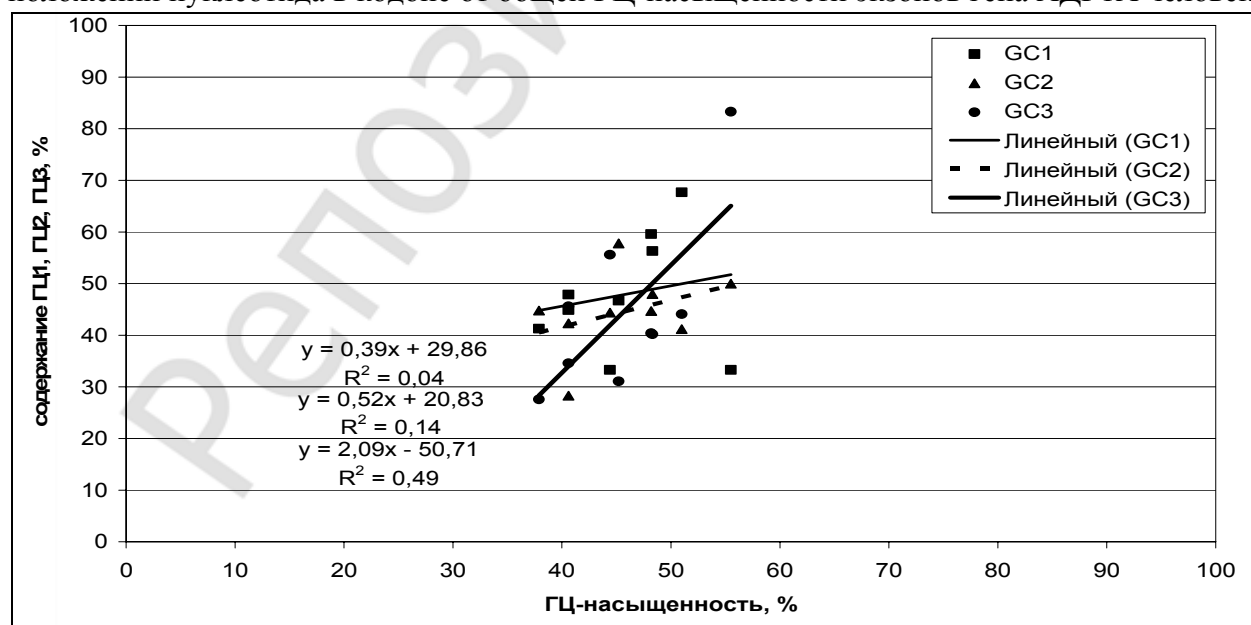


Рис. 3.16. Зависимость содержания гуанина и цитозина в первом, втором и третьем положении нуклеотида в кодоне от общей ГЦ-насыщенности экзонов гена АДГ2 человека

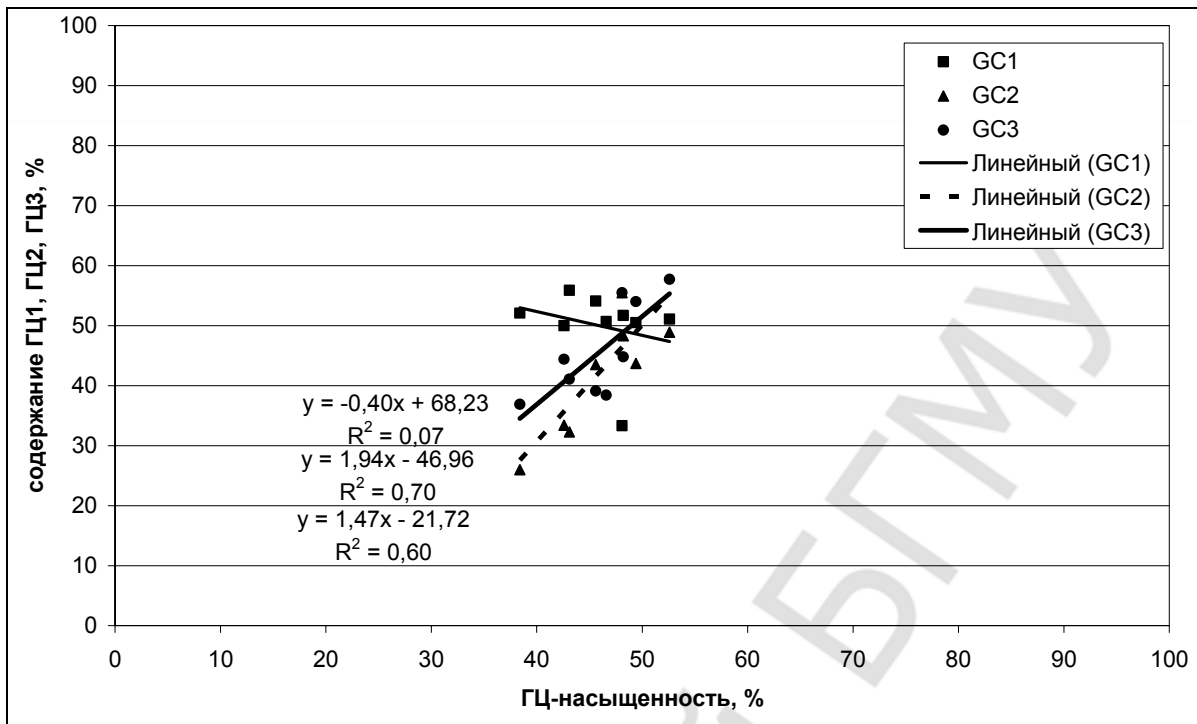


Рис. 3.17. Зависимость содержания гуанина и цитозина в первом, втором и третьем положении нуклеотида в кодоне от общей ГЦ-насыщенности экзонов гена АДГ4 человека

Графики, построенные для АДГ классов 1А, 2 и 4 человека, значительно отличаются по наклонам трендов. Так, для АДГ4 максимальный наклон тренда характерен для значений ГЦ2, меньший — для ГЦ3 и минимальный — для ГЦ1 при низком значении R^2 для последнего. Это означает, что замены нуклеотидов во втором положении кодона не ограничиваются отрицательным отбором и следуют мутационному давлению. Для АДГ1А присуща иная закономерность: максимальный наклон тренда характерен для ГЦ1, меньший — для ГЦ3 и минимальный — для ГЦ2. Этот факт свидетельствует о том, что в экзонах данного гена замены по первому положению нуклеотида не ограничиваются отрицательным отбором и следуют мутационному давлению. Обнаруженные отличия графиков, построенных по генам АДГ1А и 4, от классического варианта наводят на мысль, что данные гены находятся в стадии активных эволюционных изменений, т. е. кодируют эволюционно «несовершенные» белки. Что касается гена АДГ 2-го класса человека, то степень его эволюционной сформированности следует определять с помощью других критериев, поскольку при малых значениях R^2 наклон тренда по значениям ГЦ2 выше такового по ГЦ1. Проверить данную гипотезу возможно путем установления более высокой скорости эволюции по сравнению с остальными изоферментами АДГ. Определить скорость эволюции гена АДГ1А не представляется возможным, т. к. пока он секвенирован только у человека и макаки, дивергировавших относительно недавно друг от друга. Скорость эволюции нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих АДГ4 мыши и человека, действительно высока и составляет $0,72 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год [11, 38].

3.4. Выводы

Анализ полученных данных по аминокислотным последовательностям алкогольдегидрогеназ человека, а также кодирующим их нуклеотидным последовательностям мРНК позволяет сделать ряд выводов по закономерностям их эволюционных изменений.

Результаты BLAST-анализа и полученные дендрограммы для последовательностей мРНК, кодирующих АДГ человека, свидетельствует о том, что эволюционным предшественником АДГ человека является АДГ3 нематоды. Эволюционный предшественник АДГ человека и соответствующего ортолога дрожофилы существовал уже на ранних этапах формирования биохимических систем многоклеточных беспозвоночных, т. е. около 1 млрд лет назад. Возникновение отдельных классов АДГ человека достоверно происходило в последовательности: класс 3 → класс 1 → класс 2 → класс 5 → класс 4, а затем в пределах 1-го класса выделились три подкласса (1А, 1В и 1С). По предложенной нами методике, учитывающей различия скоростей эволюции, установлено время существования общих предшественников АДГ 1-го и 3-го классов (422,8 млн лет).

Вычисленные эволюционные дистанции между изучаемыми нуклеотидными последовательностями мРНК, кодирующими АДГ человека, и расчетные соотношения транзиций и трансверсий в них указывают на высокое сходство АДГ1А, 1В и 1С, что свидетельствует о корректности объединения их на основании эволюционных параметров в один класс, что отражено в классификациях Х. Эденберга и Г. Дуэстера. Наибольшая эволюционная дистанция для изучаемых последовательностей мРНК характерна для третьего положения кодонов, меньшая — для первого и наименьшая — для второго. При сопоставлении средних расчетных соотношений транзиций и трансверсий по каждому из положений нуклеотида в кодоне обнаружены три закономерности их последовательного количественного распределения.

Наибольшее содержание гуанина и цитозина характерно для АДГ 1-го класса В (49,4 %), а наименьшее — для АДГ 2-го класса (44,8 %). При этом существуют две закономерности последовательного количественного распределения Г + Ц в нуклеотидных последовательностях мРНК, кодирующих АДГ. На основании этого параметра полученных дендрограмм для последовательностей мРНК, соответствующих АДГ человека, и выполняемых функций все среднецепочечные АДГ человека разделены нами на два подсемейства.

К первому подсемейству (АДГ, метаболизирующие формальдегид и хиноны) отнесены АДГ 3-го и 2-го классов, а ко второму семейству (АДГ, метаболизирующие спирты) — АДГ1 (А, В, С), 4-го и 5-го классов.

Для валина, серина, пролина, глицина и аспарагина из 18 рассмотренных аминокислотных остатков, кодируемых GC3-кодонами, характерно наличие достоверных прямых корреляционных связей между значением RSCU и общим содержанием гуанина и цитозина. Между сравниваемыми показателями для

фенилаланина, лейцина, аланина, лизина, аспарагиновой кислоты и цистеина характерны отрицательные корреляционные связи, не являющиеся, однако, достоверными. Мы предположили, что эти аминокислоты имеют структурно-функциональное значение для обеспечения активности алкогольдегидрогеназ человека. Используя приведенные в главе 1 данные о структуре и механизме действия АДГ, мы подтвердили свое предположение: фенилаланин, лейцин, лизин, аспарагиновая кислота и цистеин участвуют в связывании кофермента, ионов цинка и субстрата, а аланин, вероятно, важен для поддержания структуры АДГ.

По показателям корреляции между содержанием аминокислот в последовательностях АДГ человека и ГЦ-насыщенностью кодирующих их последовательностей мРНК все аминокислоты можно разделить на 3 группы:

1. Аминокислоты, содержание которых достоверно положительно коррелирует с содержанием гуанина и цитозина, — валин и пролин.

2. Аминокислоты, содержание которых достоверно отрицательно коррелирует с содержанием гуанина и цитозина, — изолейцин и триптофан.

3. Аминокислоты, содержание которых не коррелирует достоверно с содержанием гуанина и цитозина, — фенилаланин, аргинин, лейцин, серин, треонин, аланин, глицин, метионин, лизин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, глутамин, аспарагин, гистидин, цистеин и тирозин.

Предложенная нами классификация аминокислот на 61,1 % аналогична классификации аминокислот, входящих в состав бактериальных белков, предложенной Н. Суеоккой. Из этого следует, что для бактериальных белков и белков человека (АДГ) характерны сходные стратегии кодирования в зависимости от содержания гуанина и цитозина, несмотря на малый диапазон колебаний значений ГЦ-содержания в мРНК, кодирующих АДГ человека. Для последовательностей мРНК, соответствующих АДГ 1А, 1С, 2, 3, 4, 5-го классов, характерно наличие АТ-давления, а для последовательности мРНК, кодирующей АДГ 1В класса, — наличие слабого ГЦ-давления.

Таким образом, стратегия кодирования АДГ человека заключается в том, что при слабом ГЦ-давлении по сравнению с АТ-давлением преимущественно используются синонимичные ГЦЗ-кодоны, кодирующие изолейцин, серин, треонин, гистидин, глутамин, аспарагин, аргинин и глицин, увеличивается использование ГЦЗ-кодонов, кодирующих лейцин, валин, пролин, аланин, тирозин, лизин и глутаминовую кислоту, а также уменьшается использование ГЦЗ-кодонов, соответствующих фенилаланину, цистеину и аспарагиновой кислоте.

Особенности нуклеотидного состава экзонов и интронов генов АДГ заключается в том, что экзоны имеют достоверно бóльшую ГЦ-насыщенность по сравнению с интронами. Чередование экзонов и интронов, т. е. участков с бóльшим и меньшим содержанием гуанина и цитозина, служит основой ГЦ-мозаичного строения генов АДГ человека. Такое строение за счет водородных связей будет обеспечивать чередование более термодинамически стабильных

участков молекулы ДНК (соответствующих экзонам) и менее стабильных (соответствующих интронам). Минимальная насыщенность гуанином и цитозином характерна для восьмых экзонов изучаемых генов (за исключением гена АДГ 2-го класса), а максимальная — для вторых (ген АДГ2), третьих (ген АДГ1А), пятых (гены АДГ1В, 1С) и седьмых (гены АДГ 3, 4, 5-го классов) экзонов.

При сравнении последовательностей мРНК, кодирующих АДГ классов 1С и 3 человека, обнаружены два участка с высокой частотой мутаций. Первый варибельный участок (346–375) соответствует части пятого экзона, а второй (886–915) — седьмого экзона. Построенные профили ГЦ-содержания и ГЦЗ-содержания в экзонах генов АДГ классов 1С и 3 человека отличаются, но достоверные отличия по ГЦ-насыщенности обнаруживаются лишь при сравнении их пятых экзонов ($p < 0,01$). Вторичная структура участков аминокислотных последовательностей АДГ, соответствующих пятым экзонам, различается: в области N-конца участка АДГ 3-го класса имеется α -спиральный фрагмент, который отсутствует в АДГ класса 1С. Наблюдаемые различия вторичной структуры, безусловно, сопряжены с изменениями третичной структуры и функции изучаемых ферментов. Действительно, рентгеноструктурным анализом было показано, что аминокислотные остатки, соответствующие пятому экзону, участвуют в связывании субстратов. Остатки, занимающие 116, 117, 140, 141-е положения, входят в состав субстрат-связывающего пакета, а остаток Арг-115 АДГ 3-го класса связывает глутатион и ω -гидроксигирные кислоты. Таким образом, нами предложен оригинальный способ определения по профилям содержания ГЦ и ГЦЗ функционально отличающихся участков эволюционно родственных белков.

Установлено, что замены аминокислот в положениях 116–118 последовательности АДГ1С привели к увеличению гибкости остова основной цепи. Появление остатка лейцина в 116-м положении (в результате замены Вал→Лей) позволило дифференцировать доступ и ретенцию различных по размеру субстратов в активный центр АДГ. Вместе с тем для компенсации увеличения объема бокового радикала 116-го остатка произошли замены на аминокислоты с меньшим объемом боковых радикалов в 115-м (Арг→Асп) и 117-м положениях (Тре→Гли). Общей целью фиксации замен в участке АДГ1С 116–125, вероятно, была подстройка субстрат-связывающего пакета для улучшения взаимодействия и более эффективного окисления спиртов и стероидов.

Высокое соотношение несинонимичной и синонимичной дистанций (0,88), достоверное преобладание многошаговых аминокислотных замен, наличие трех высокорадикальных замен аминокислот, увеличение гибкости остова основной цепи, сопряженное с изменением объемов боковых радикалов цепи, на N-конце соответствующего пятому экзону участка АДГ классов 1С и 3 человека, по-видимому, свидетельствуют о наличии положительного отбора мутаций.

Известно, что при алкоголизме наблюдается дисбаланс между активностью ферментов наработки и окисления ацетальдегида, что приводит к повышению содержания в крови токсичного ацетальдегида. В связи с этим для диагностики алкоголизма было предложено определение активности альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы. Необходимо отметить, что в доступной нам литературе отсутствует информация об активности АДГ1С при алкоголизме.

Способность АДГ1С в отличие от остальных изоферментов алкогольдегидрогеназ катализировать два этапа окисления этанола, а также полученные данные о высокой вероятности положительного отбора мутаций в этом изоферменте позволяют предположить, что определение активности АДГ1С может выступать в качестве более чувствительного и специфичного маркера для лабораторной диагностики алкоголизма. На основании вышеизложенных фактов предполагается разработка метода определения активности АДГ1С для диагностики, определения степени тяжести и оценки эффективности проводимого лечения алкоголизма.

Общий характер взаимосвязи между общим ГЦ-содержанием и содержанием гуанина и цитозина в каждом из положений кодона в экзонах генов АДГ человека классов 1В, 1С, 3 и 5 указывает на то, что с увеличением общей ГЦ-насыщенности наблюдается различной степени линейный рост содержания гуанина и цитозина во всех положениях нуклеотида в кодоне. Наибольший рост характерен для значений ГЦ3, меньший — для значений ГЦ1 и наименьший — для значений ГЦ2. Это означает, что на замены в третьем положении кодона значительно влияет мутационное давление и слабо влияет отрицательный отбор. Влияние мутационного давления уменьшается, а влияние отрицательного отбора увеличивается в отношении замен нуклеотидов в первом и особенно во втором положении кодона. Это легко объяснить тем, что 72 % замен по третьему положению являются синонимичными. Меньший наклон тренда по значениям ГЦ1, равный 0,99, связан с меньшей долей синонимичных замен (5 %). Несмотря на то, что все замены по второму положению несинонимичны, наклон тренда по значениям ГЦ2 является положительным (0,39). Объяснить этот факт можно тем, что часть замен аминокислот является нейтральной, т. е. не приводит к изменению функции белка. В этом случае отрицательный отбор не оказывает никакого влияния на данную мутацию, и она закрепляется, отражая основное направление нуклеотидных замен.

Можно утверждать, что в экзонах данных генов АДГ «разрешены» преимущественно замены в третьем положении кодона, в меньшей степени — в первом, а в наименьшей степени — во втором, что связано с вероятностью синонимичных и несинонимичных замен. Выраженное предпочтение синонимичных замен свидетельствует о налагаемых на молекулы структурно-функциональных ограничениях, а получение такого графика может выступать в качестве одного из критериев ее эволюционной сформированности.

Установлено, что графики, построенные для АДГ1В, 1С и 5-го классов человека, сходны с таковым для АДГ 3-го класса. Это позволяет утверждать, что данные гены АДГ кодируют эволюционно «совершенные» белки. Графики, построенные для АДГ классов 1А и 4 человека, значительно отличаются по наклонам трендов. Так, для АДГ4 максимальный наклон тренда характерен для значений ГЦ2, меньший — для ГЦ3 и минимальный — для ГЦ1 при низком значении R^2 для последнего. Это означает, что замены нуклеотидов во втором положении кодона не ограничиваются отрицательным отбором и следуют мутационному давлению. Для АДГ1А характерна иная закономерность: максимальный наклон тренда характерен для ГЦ1, меньший — для ГЦ3 и минимальный — для ГЦ2. Этот факт свидетельствует о том, что в экзонах данного гена замены по первому положению нуклеотида не ограничиваются отрицательным отбором и следуют мутационному давлению. Обнаруженные отличия графиков, построенных по генам АДГ1А и 4, от классического варианта наводят на мысль, что данные гены находятся в стадии активных эволюционных изменений, т. е. кодируют эволюционно «несовершенные» белки.

Г Л А В А 4

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ ХОРДОВЫХ И КОДИРУЮЩИХ ИХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МАТРИЧНЫХ РНК

Еще в 1962 г. Э. Цукеркэндл высказал мысль, что изучение эволюции аминокислотных последовательностей белков может дать наиболее точное представление об эволюционных взаимоотношениях и о некоторых фундаментальных механизмах эволюции. М. Дэйхофф высказала надежду, что с помощью новых методов будет возможно создать полное, снабженное количественными показателями филогенетическое древо — историю происхождения всех видов живых существ. При этом главной гипотезой при построении филогенетического древа на основании молекулярных данных является постоянная частота замен в пределах каждого набора гомологичных последовательностей. Эта гипотеза, сформулированная в 1962–1965 гг. Э. Цукеркэндлом и Л. Полингом, была названа гипотезой молекулярных эволюционных часов [194].

В конце 60-х годов прошлого столетия были выдвинуты две фундаментальные теории молекулярной эволюции.

Первая из них (теория нейтральной молекулярной эволюции) была предложена в 1968 г. М. Кимура на основании данных популяционной генетики и на установленных скоростях замещений аминокислотных остатков в ряде белков и нуклеотидов в нуклеиновых кислотах [44]. Суть этой теории можно изложить в виде пяти постулатов, первые четыре из которых — эмпирические, а пятый был установлен теоретическим путем.

1. Скорость эволюции любого белка, выраженная через число аминокислотных замен на сайт в год, приблизительно постоянна и одинакова в разных филогенетических линиях, если функция и третичная структура этого белка остаются в основном неизменными. Этот постулат формулирует гипотезу Э. Цукеркэндла и Л. Полинга о молекулярных эволюционных часах.

2. Функционально менее важные молекулы или их части эволюционируют (накапливая мутационные замены) быстрее, чем более важные.

3. Мутационные замены, приводящие к меньшим нарушениям структуры и функции молекулы (консервативные замены) в ходе эволюции происходят чаще тех, которые вызывают более существенное нарушение структуры и функции этой молекулы.

4. Появлению нового в функциональном отношении белка всегда должна предшествовать дупликация гена.

5. Селективная элиминация вредных мутаций и случайная фиксация селективно нейтральных или слабо вредных мутаций происходят в ходе эволю-

ции гораздо чаще, чем положительный дарвиновский отбор благоприятных мутаций.

До настоящего времени остается нерешенным ряд проблем систематики. Ранее времена дивергенции и систематика основных групп организмов основывались на данных палеонтологии, сравнительной морфологии и физиологии. В последнее время для этой цели все чаще используются корректировки в соответствии с данными молекулярной эволюции. Это обуславливает необходимость изучения эволюционных изменений большого количества нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, полученных из различных источников.

Данная глава посвящена изучению темпов эволюционных изменений аминокислотных последовательностей АДГ и их различных в функциональном отношении участков, а также кодирующих их последовательностей мРНК. Нами также определены времена дивергенции от общих предшественников АДГ хордовых.

4.1. Темпы эволюционных изменений аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ 1-го и 3-го классов хордовых

Определение эволюционных дистанций и скоростей эволюции аминокислотных последовательностей белков по ряду причин является начальным этапом их изучения. Во-первых, получаемые данные позволяют отнести белок к медленно или быстро эволюционирующим. Во-вторых, установление высокой скорости эволюции белка наводит на мысль о наличии положительного отбора, что можно проверить с помощью селекционных тестов. В-третьих, по белкам, эволюционирующим с малой скоростью, используя гипотезу о молекулярных часах, можно определять времена дивергенции различных систематических групп организмов, что, как было сказано выше, важно для таксономии.

В таблице 4.1 представлены ЕИМ- и ЈТТ-дистанции между аминокислотными последовательностями АДГ 3-го класса хордовых. Картина замен не учитывалась, поскольку в проведенных попарных сравнениях она преимущественно гомогенна ($91,1 \pm 4,24$ % сравнений). Установлено, что значения ЈТТ-дистанций больше или равны таковым ЕИМ-дистанций, однако различия между ними не значительны. Для получения средних значений эволюционных дистанций для АДГ каждого из организмов необходимо учитывать только те дистанции, которые получены при сравнении аминокислотной последовательности АДГ этого организма с последовательностями данного фермента таксономически вышестоящих организмов [50]. Так, при расчете средней эволюционной дистанции для АДГ оболочника следует учитывать дистанции, полученные при сравнении его аминокислотной последовательности АДГ 3-го класса с последовательностями АДГ 3-го класса ланцетника, трех видов костных рыб, земноводных, птиц и трех видов млекопитающих.

**Значения EIM-дистанции и дистанции Джонса-Тейлора-Торнтона
для АДГ 3-го класса хордовых**

Вид	H. s.	O. c.	M. m.	G. g.	X. l.	S. a.	D. r.	O. l.	B. f.	C. i.
H. s.		0,058 ± 0,0122	0,075 ± 0,0144	0,152 ± 0,0203	0,151 ± 0,0199	0,206 ± 0,0229	0,212 ± 0,0233	0,196 ± 0,0226	0,300 ± 0,0296	0,330 ± 0,0324
O. c.	0,058 ± 0,0122		0,084 ± 0,0142	0,139 ± 0,0197	0,160 ± 0,0213	0,192 ± 0,0223	0,192 ± 0,0224	0,170 ± 0,0210	0,293 ± 0,0294	0,311 ± 0,0309
M. m.	0,075 ± 0,0146	0,083 ± 0,0141		0,139 ± 0,0194	0,154 ± 0,0208	0,205 ± 0,0238	0,206 ± 0,0236	0,209 ± 0,0236	0,304 ± 0,0296	0,326 ± 0,0308
G. g.	0,156 ± 0,0210	0,143 ± 0,0202	0,143 ± 0,0207		0,168 ± 0,0226	0,207 ± 0,0233	0,184 ± 0,0220	0,201 ± 0,0237	0,322 ± 0,0316	0,337 ± 0,0319
X. l.	0,152 ± 0,0209	0,161 ± 0,0212	0,155 ± 0,0209	0,171 ± 0,0219		0,181 ± 0,0215	0,198 ± 0,0229	0,188 ± 0,0221	0,277 ± 0,0275	0,336 ± 0,0301
S. a.	0,210 ± 0,0248	0,196 ± 0,0240	0,211 ± 0,0253	0,217 ± 0,0256	0,187 ± 0,0232		0,101 ± 0,0162	0,046 ± 0,0112	0,255 ± 0,0283	0,287 ± 0,0299
D. r.	0,215 ± 0,0246	0,195 ± 0,0242	0,210 ± 0,0253	0,192 ± 0,0242	0,202 ± 0,0241	0,104 ± 0,0165		0,104 ± 0,0167	0,259 ± 0,0271	0,280 ± 0,0288
O. l.	0,201 ± 0,0251	0,173 ± 0,0229	0,215 ± 0,0263	0,211 ± 0,0265	0,194 ± 0,0241	0,047 ± 0,0115	0,107 ± 0,0168		0,238 ± 0,0256	0,287 ± 0,0301
B. f.	0,319 ± 0,0319	0,307 ± 0,0308	0,319 ± 0,0319	0,344 ± 0,0336	0,289 ± 0,0299	0,267 ± 0,0284	0,272 ± 0,0279	0,252 ± 0,0275		0,286 ± 0,0303
C. i.	0,343 ± 0,0326	0,327 ± 0,0321	0,343 ± 0,0331	0,355 ± 0,0340	0,347 ± 0,0321	0,303 ± 0,0314	0,296 ± 0,0316	0,307 ± 0,0315	0,306 ± 0,0335	

Примечание. Расшифровку сокращений видов см. в гл. 2. Ошибка эволюционных дистанций определена методом бутстрэп при 1000 повторов; эволюционные дистанции, вычисленные методом EIM, и их ошибка выделены жирным шрифтом.

В таблице 4.2 показаны средние EIM-дистанции и JTT-дистанции для 3-го класса АДГ хордовых. Установлено, что полученные двумя методами значения эволюционных дистанций статистически неразличимы.

Таблица 4.2

**Средние значения EIM-дистанции и дистанции Джонса-Тэйлора-Торнтона
для 3-го класса АДГ хордовых**

Вид	Дистанции	
	EIM	Джонса-Тэйлора-Торнтона
O. c.	0,058 ± 0,0122	0,058 ± 0,0122
M. m.	0,080 ± 0,0062	0,079 ± 0,0058
G. g.	0,144 ± 0,0052	0,147 ± 0,0052
X. l.	0,158 ± 0,0044	0,160 ± 0,0049
S. a.	0,198 ± 0,0056	0,204 ± 0,0062
D. r.	0,198 ± 0,0055	0,203 ± 0,0049
O. l.	0,193 ± 0,0075	0,199 ± 0,0083
B. f.	0,281 ± 0,0108	0,296 ± 0,0119
C. i.	0,309 ± 0,0084	0,325 ± 0,0080

На рисунке 4.1 полученные средние эволюционные дистанции сопоставлены с общепринятыми в молекулярной эволюции и эволюционной биохимии

временами дивергенции различных организмов. Так, время дивергенции оболочников составляет около 575 млн лет, ланцетников — 550 млн лет, костных рыб — 405 млн лет, земноводных — 365 млн лет, птиц — 310 млн лет, грызунов — 110 млн лет и зайцеобразных — 91 млн лет [46, 92, 105].

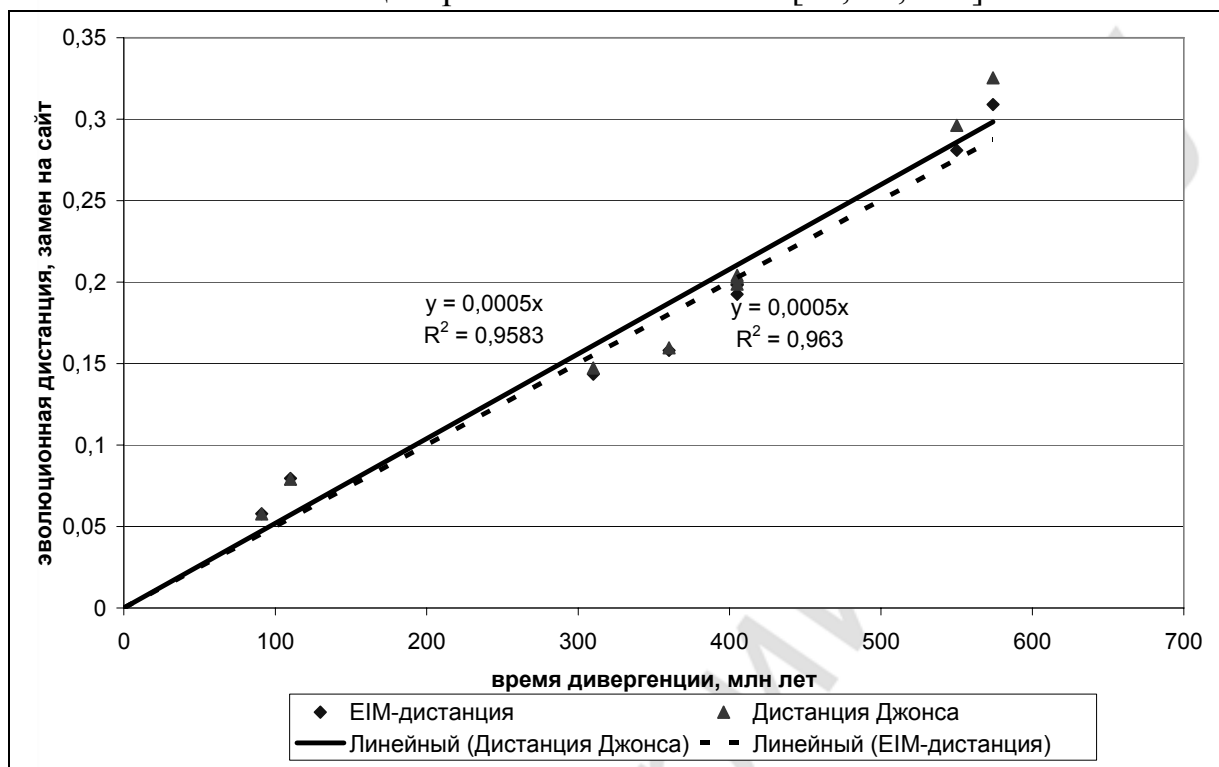


Рис. 4.1. Зависимость между средними значениями эволюционных дистанций и временами дивергенции аминокислотных последовательностей АДГ 3-го класса хордовых

Из приведенных данных видно, что зависимость между эволюционными дистанциями и временами дивергенции носит линейный характер, что свидетельствует о постоянстве темпов эволюционных изменений изучаемых аминокислотных последовательностей АДГ 3-го класса. Наклон линейных трендов составляет 0,0005, что дает скорость эволюции аминокислотных последовательностей АДГ 3-го класса хордовых животных $r = d/2t = 0,0005/2t = 0,25 \times 10^{-9}$ замен на аминокислотный сайт в год = 0,25 По [48]. Построенные тренды по EIM- и JTT-дистанциям описываются общим уравнением, однако тренд по EIM-дистанциям характеризуется большей достоверностью аппроксимации ($R^2 = 0,963$). По этой причине вычисление EIM-дистанций между аминокислотными последовательностями АДГ 1-го класса более предпочтительно.

Гомогенная картина замен аминокислот наблюдается в 64 из 66 проведенных попарных сравнений ($97,0 \pm 2,10$ %) аминокислотных последовательностей АДГ 1-го класса хордовых и АДГ 3-го класса ланцетника, являющейся их эволюционным предшественником, что позволяет не учитывать вид картины замен при расчете эволюционной дистанции. Эволюционные дистанции между аминокислотными последовательностями АДГ 1-го класса хордовых, вычисленные методом EIM, показаны в таблице 4.3.

Значения EIM-дистанции для АДГ 1-го класса хордовых

Вид	H. s. A	H.s. B	H.s. C	P. t.	P. h.	E. c.	O. c.	M. m.	G. g.	A. a.	X. l.	B. f.
H. s. A		0,061 ± 0,0129	0,064 ± 0,0133	0,064 ± 0,0132	0,073 ± 0,0142	0,138 ± 0,0195	0,151 ± 0,0212	0,188 ± 0,0232	0,320 ± 0,0363	0,360 ± 0,0316	0,365 ± 0,0417	0,576 ± 0,0489
H. s. B			0,055 ± 0,0119	0,006 ± 0,0037	0,026 ± 0,0081	0,142 ± 0,0198	0,161 ± 0,0217	0,181 ± 0,0227	0,301 ± 0,0349	0,333 ± 0,0304	0,353 ± 0,0415	0,592 ± 0,0492
H. s. C				0,055 ± 0,0120	0,064 ± 0,0129	0,125 ± 0,0198	0,125 ± 0,0186	0,165 ± 0,0218	0,293 ± 0,0355	0,328 ± 0,0316	0,359 ± 0,0421	0,597 ± 0,0497
P. t.					0,020 ± 0,0073	0,142 ± 0,0201	0,161 ± 0,0216	0,175 ± 0,0223	0,297 ± 0,0349	0,328 ± 0,0305	0,342 ± 0,0409	0,603 ± 0,0496
P. h.						0,142 ± 0,0204	0,171 ± 0,0226	0,181 ± 0,0227	0,301 ± 0,0347	0,319 ± 0,0313	0,365 ± 0,0425	0,603 ± 0,0499
E. c.							0,129 ± 0,0195	0,185 ± 0,0228	0,297 ± 0,0345	0,333 ± 0,0304	0,388 ± 0,0438	0,597 ± 0,0479
O. c.								0,185 ± 0,0238	0,312 ± 0,0367	0,342 ± 0,0322	0,394 ± 0,0437	0,624 ± 0,0513
M. m.									0,332 ± 0,0366	0,361 ± 0,0324	0,359 ± 0,0410	0,619 ± 0,0514
G.g.										0,135 ± 0,0198	0,331 ± 0,0442	0,536 ± 0,0496
A.a.											0,382 ± 0,0393	0,584 ± 0,0445
X. l.												0,480 ± 0,0479

Средние значения эволюционных дистанций между данными белками были вычислены по методике, описанной выше. Так, для ланцетника среднее значение $d = 0,583 \pm 0,0131$, для земноводных $d = 0,364 \pm 0,0070$, для птиц $d = 0,322 \pm 0,0055$, для грызунов $d = 0,180 \pm 0,0033$, для непарнокопытных $d = 0,138 \pm 0,0035$, для зайцеобразных $d = 0,154 \pm 0,0087$, для павиана $d = 0,045 \pm 0,0184$, а для шимпанзе $d = 0,041 \pm 0,0221$.

Точки на рисунке 4.2 соответствуют средним значениям эволюционных дистанций, приуроченным к соответствующим временам дивергенции. Дополнительно воспользуемся общепринятыми временами дивергенции непарнокопытных (92 млн лет), павиана (23 млн лет) и шимпанзе (5,5 млн лет) [105].

На рисунке 4.2 виден четкий параллелизм между полученными значениями средних эволюционных дистанций и общепринятыми временами дивергенции, все точки довольно хорошо ложатся на линию тренда, что также свидетельствует о постоянстве темпов аминокислотных замен. Ранее примерное постоянство темпов аминокислотных замен было показано на примере других белков: цитохромов, гемоглобинов, аденилатциклаз [8, 44]. Данное наблюдение является одним из наиболее веских аргументов в пользу теории М. Кимуры, объясняющей этот факт селективной нейтральностью большинства наблюдаемых аминокислотных замен. С позиций селекционизма достаточно трудно объяснить такое постоянство скоростей эволюции белков. Наклон тренда на ри-

сунке 4.2 равен 0,0011, что дает $r = \frac{d}{2t} = \frac{0,0011}{2t} = 0,55 \text{ По}$. Данное значение значительно превосходит скорость эволюционных изменений другого структурно-функционального класса АДГ (3-го класса), равную 0,25 По [39].

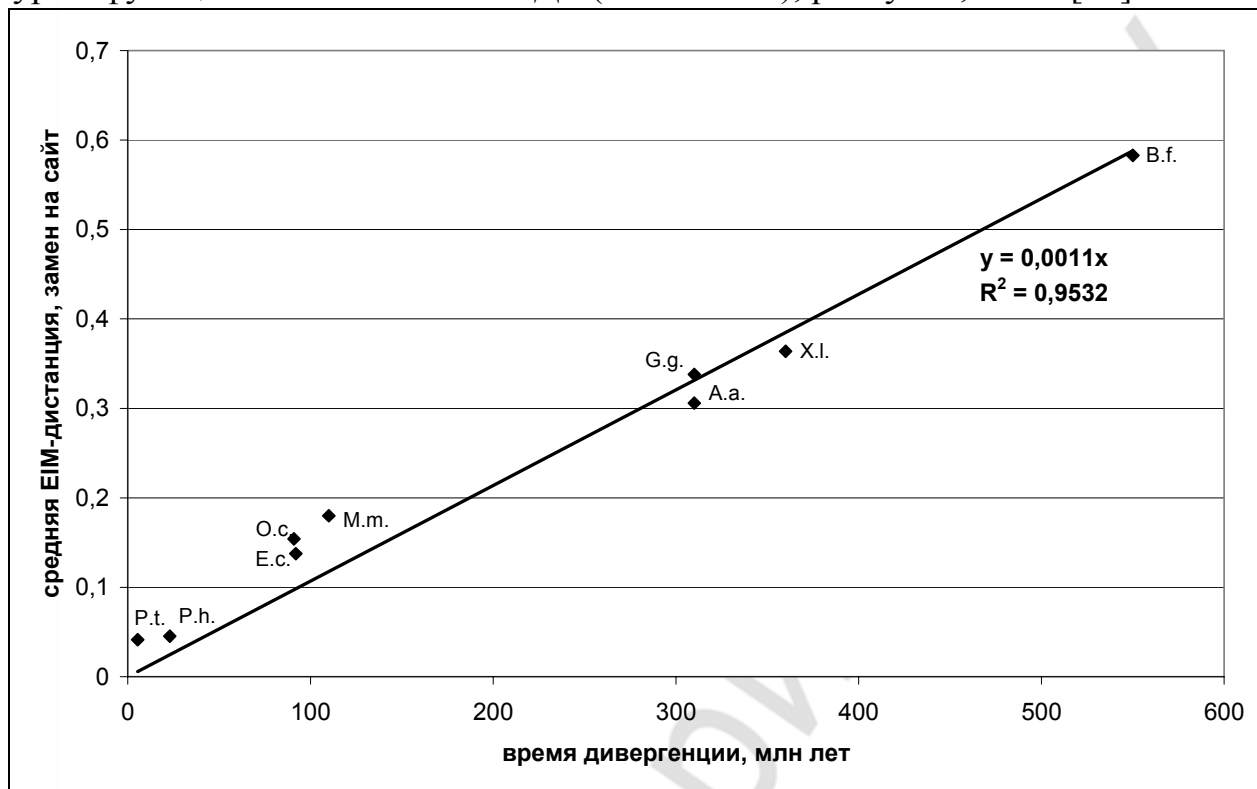


Рис. 4.2. Зависимость между средними значениями эволюционных дистанций для аминокислотных последовательностей АДГ 1-го класса хордовых и временем их дивергенции

Полученные данные согласуются с представлениями о том [44], что моносубстратный фермент (АДГ 3-го класса) должен эволюционировать с меньшей скоростью, чем полисубстратный фермент (АДГ 1-го класса). Это легко объяснить тем, что многие замены аминокислот в последовательности полисубстратного фермента, в отличие от моносубстратного, могут повысить эффективность образования комплекса с одним из субстратов и, следовательно, быть закрепленными отбором в процессе эволюции. Логично предположить, что наблюдаемые отличия скоростей эволюции последовательностей АДГ 1 и 3-го классов в первую очередь связаны с отличиями скоростей эволюции их субстрат-связывающих (каталитических) доменов, что рассмотрено ниже.

Интересно сравнить полученные скорости эволюции с таковыми других ядерных белков (табл. 4.4).

Из содержащихся в таблице 4.4 данных видно, что самая низкая скорость эволюции наблюдается у гистона H4 (0,01 По), а наибольшая — у фибринопептидов (8,30 По). Полученные нами значения скоростей эволюции АДГ 1-го и 3-го классов являются относительно низкими. Однако для более точного сравнения следует воспользоваться медианной скоростью эволюции (по 60 белкам),

равной 0,74 По [44]. При скорости эволюции белка больше медианной белок можно считать быстро эволюционирующим, а в обратном случае — медленно эволюционирующим.

Таблица 4.4

Скорости эволюции ряда ядерных белков различных животных

Белок	Скорость эволюции, По	Группа организмов, белки которых преимущественно проанализированы	Источник литературы
Гистон H4	0,01	Млекопитающие	[44]
Креатинкиназа	0,17	Хордовые	[66]
Инсулин	0,36	Хордовые	[43]
Аденилатциклаза 9	0,60	Позвоночные	[4, 8]
Проинсулин	0,75	Хордовые	[43]
Миоглобин	0,89	Млекопитающие	[44]
Препроинсулин	0,90	Хордовые	[43]
α -Цепь гемоглобина	1,20	Млекопитающие	[44]
Сигнальный пептид	1,34	Хордовые	[43]
Релаксин 3	1,65	Хордовые	[45]
Лизоцим	2,00	Хордовые	[44]
Панкреатическая рибонуклеаза	2,10	Млекопитающие	[44]
С-пептид	2,37	Хордовые	[43]
Фибринопептиды	8,30	Млекопитающие	[44]

Таким образом, АДГ 1-го и 3-го классов можно отнести к медленно эволюционирующим белкам.

Согласно второму положению теории М. Кимуры, функционально менее важные части молекул эволюционируют (накапливая мутационные замены) быстрее, чем более важные.

Данное положение было экспериментально подтверждено нами при анализе темпов эволюционных изменений различных участков мембраносвязанных аденилатциклаз 9-го типа и G-белков [7, 27].

Поэтому особый интерес представляет проверка данного положения на примере доменов АДГ путем определения их эволюционных дистанций и скоростей эволюции. Определенные методом ЕИМ эволюционные дистанции по доменам АДГ 1-го и 3-го классов хордовых показаны в таблицах 4.5 и 4.6.

Таблица 4.5

Эволюционные дистанции для каталитического и кофермент-связывающего доменов АДГ 3-го класса хордовых

Вид	H. s.	O. c.	M. m.	G. g.	X. l.	D. r.	O. l.	S. a.	B. f.	C. i.
H. s.		0,083 ± 0,0256	0,083 ± 0,0241	0,148 ± 0,0329	0,156 ± 0,0355	0,237 ± 0,0442	0,200 ± 0,0397	0,209 ± 0,0401	0,284 ± 0,0493	0,366 ± 0,0576
O. c.	0,039 ± 0,0132		0,107 ± 0,0285	0,131 ± 0,0315	0,209 ± 0,0415	0,200 ± 0,0413	0,156 ± 0,0354	0,182 ± 0,0392	0,284 ± 0,0483	0,314 ± 0,0528

Вид	H.s.	O. c.	M. m.	G. g.	X. l.	D. r.	O. l.	S. a.	B. f.	C. i.
M. m.	0,066 ± 0,0166	0,071 ± 0,0172		0,115 ± 0,0279	0,165 ± 0,0355	0,237 ± 0,0443	0,227 ± 0,0419	0,209 ± 0,0402	0,314 ± 0,0514	0,345 ± 0,0543
G. g.	0,149 ± 0,0258	0,144 ± 0,0252	0,154 ± 0,0261		0,200 ± 0,0412	0,209 ± 0,0422	0,218 ± 0,0419	0,209 ± 0,0405	0,304 ± 0,0519	0,345 ± 0,0546
X. l.	0,142 ± 0,0252	0,132 ± 0,0241	0,147 ± 0,0255	0,149 ± 0,0252		0,227 ± 0,0438	0,227 ± 0,0431	0,191 ± 0,0384	0,255 ± 0,0453	0,398 ± 0,0609
D. r.	0,198 ± 0,0293	0,188 ± 0,0287	0,188 ± 0,0292	0,170 ± 0,0275	0,181 ± 0,0274		0,123 ± 0,0316	0,091 ± 0,0270	0,200 ± 0,0405	0,265 ± 0,0465
O. l.	0,193 ± 0,0296	0,178 ± 0,0280	0,198 ± 0,0307	0,191 ± 0,0299	0,166 ± 0,0268	0,093 ± 0,0197		0,059 ± 0,0213	0,174 ± 0,0362	0,294 ± 0,0510
S. a.	0,204 ± 0,0302	0,198 ± 0,0297	0,204 ± 0,0312	0,207 ± 0,0312	0,176 ± 0,0274	0,107 ± 0,0212	0,039 ± 0,0121		0,182 ± 0,0372	0,284 ± 0,0498
B. f.	0,310 ± 0,0398	0,298 ± 0,0388	0,298 ± 0,0392	0,333 ± 0,0410	0,289 ± 0,0376	0,295 ± 0,0374	0,278 ± 0,0361	0,301 ± 0,0383		0,304 ± 0,0494
C. i.	0,310 ± 0,0405	0,310 ± 0,0401	0,316 ± 0,0408	0,333 ± 0,0417	0,301 ± 0,0388	0,289 ± 0,0375	0,284 ± 0,0368	0,289 ± 0,0373	0,277 ± 0,0361	

Примечание. Значения по каталитическому домену выделены жирным шрифтом.

Таблица 4.6

Эволюционные дистанции для каталитического и кофермент-связывающего доменов АДГ 1-го класса хордовых

Вид	H.s. A	H.s. B	H.s. C	P. t.	P. h.	O. c.	E. c.	M. m.	A. a.	G. g.	X. l.	B. f.
H.s. A		0,033 ± 0,0146	0,033 ± 0,0150	0,033 ± 0,0146	0,033 ± 0,0150	0,124 ± 0,0291	0,132 ± 0,0293	0,117 ± 0,0276	0,320 ± 0,0491	0,293 ± 0,0478	0,276 ± 0,0538	0,554 ± 0,0744
H.s. B	0,091 ± 0,0199		0,033 ± 0,0149	0,000 ± 0,0000	0,013 ± 0,0088	0,154 ± 0,0328	0,154 ± 0,0327	0,139 ± 0,0308	0,294 ± 0,0456	0,267 ± 0,0444	0,276 ± 0,0538	0,554 ± 0,0739
H.s. C	0,106 ± 0,0209	0,076 ± 0,0182		0,033 ± 0,0149	0,033 ± 0,0149	0,117 ± 0,0287	0,117 ± 0,0274	0,109 ± 0,0266	0,294 ± 0,0466	0,267 ± 0,0452	0,276 ± 0,0540	0,567 ± 0,0747
P.t.	0,096 ± 0,0205	0,009 ± 0,0062	0,076 ± 0,0182		0,013 ± 0,0088	0,154 ± 0,0328	0,154 ± 0,0327	0,139 ± 0,0308	0,294 ± 0,0456	0,267 ± 0,0444	0,276 ± 0,0538	0,554 ± 0,0739
P.h.	0,126 ± 0,0242	0,047 ± 0,0139	0,096 ± 0,0210	0,037 ± 0,0124		0,154 ± 0,0332	0,154 ± 0,0329	0,147 ± 0,0317	0,311 ± 0,0470	0,285 ± 0,0455	0,276 ± 0,0539	0,580 ± 0,0774
O.c.	0,142 ± 0,0241	0,132 ± 0,0243	0,132 ± 0,0247	0,132 ± 0,0244	0,137 ± 0,0251		0,139 ± 0,0308	0,147 ± 0,0318	0,311 ± 0,0496	0,285 ± 0,0470	0,301 ± 0,0578	0,608 ± 0,0776
E.c.	0,174 ± 0,0271	0,174 ± 0,0285	0,137 ± 0,0260	0,174 ± 0,0288	0,191 ± 0,0304	0,132 ± 0,0250		0,147 ± 0,0305	0,330 ± 0,0508	0,303 ± 0,0493	0,340 ± 0,0614	0,608 ± 0,0771
M.m.	0,237 ± 0,0337	0,219 ± 0,0330	0,202 ± 0,0321	0,208 ± 0,0321	0,219 ± 0,0331	0,185 ± 0,0296	0,197 ± 0,0303		0,302 ± 0,0474	0,276 ± 0,0467	0,288 ± 0,0562	0,608 ± 0,0780
A.a.	0,336 ± 0,0437	0,316 ± 0,0411	0,297 ± 0,0407	0,310 ± 0,0411	0,304 ± 0,0408	0,291 ± 0,0403	0,291 ± 0,0395	0,342 ± 0,0435		0,109 ± 0,0265	0,301 ± 0,0586	0,541 ± 0,0724
G.g.	0,433 ± 0,0564	0,397 ± 0,0528	0,380 ± 0,0520	0,389 ± 0,0525	0,354 ± 0,0494	0,371 ± 0,0519	0,363 ± 0,0506	0,415 ± 0,0554	0,150 ± 0,0302		0,327 ± 0,0607	0,541 ± 0,0720
X.l.	0,475 ± 0,0633	0,445 ± 0,0602	0,455 ± 0,0605	0,425 ± 0,0583	0,465 ± 0,0618	0,465 ± 0,0613	0,425 ± 0,0583	0,415 ± 0,0565	0,396 ± 0,0576	0,452 ± 0,0733		0,440 ± 0,0799
B.f.	0,640 ± 0,0664	0,667 ± 0,0669	0,686 ± 0,0689	0,686 ± 0,0691	0,677 ± 0,0672	0,640 ± 0,0653	0,696 ± 0,0700	0,658 ± 0,0684	0,579 ± 0,0610	0,696 ± 0,0793	0,579 ± 0,0726	

Примечание. Значения по каталитическому домену выделены жирным шрифтом.

В таблице 4.7 показаны рассчитанные по описанной выше методике средние эволюционные дистанции между аминокислотными последовательностями доменов АДГ 1-го и 3-го классов хордовых. Установлено, что эволюционные дистанции, полученные по каталитическому домену АДГ 1-го класса, как правило, достоверно больше таковых по НАД⁺-связывающему домену АДГ1 (за исключением дистанций для шимпанзе, лошади, кролика и киви). Вместе с тем различия эволюционных дистанций, вычисленных для доменов АДГ 3-го класса, в большинстве случаев недостоверны.

Таблица 4.7

Средние эволюционные дистанции для аминокислотных последовательностей доменов АДГ 1-го и 3-го классов хордовых

Организм	Домены АДГ					
	1-го класса			3-го класса		
	каталитический	кофермент-связывающий	р	каталитический	кофермент-связывающий	р
P.t.	0,060 ± 0,0320	0,022 ± 0,0134	> 0,05	–	–	–
P.h.	0,076 ± 0,0242	0,023 ± 0,0066	< 0,05	–	–	–
E.c.	0,135 ± 0,0023	0,141 ± 0,0093	> 0,05	–	–	–
O. c.	0,164 ± 0,0119	0,142 ± 0,0077	> 0,05	0,039 ± 0,0132	0,083 ± 0,0256	> 0,05
M. m.	0,210 ± 0,0069	0,135 ± 0,0063	< 0,001	0,068 ± 0,0033	0,095 ± 0,0170	> 0,05
G. g.	0,388 ± 0,0101	0,280 ± 0,0050	< 0,001	0,149 ± 0,0036	0,131 ± 0,0117	> 0,05
A.a.	0,311 ± 0,0073	0,307 ± 0,0052	> 0,05	–	–	–
X. l.	0,442 ± 0,0090	0,294 ± 0,0083	< 0,001	0,143 ± 0,0043	0,183 ± 0,0149	< 0,05
D. r.	–	–	–	0,185 ± 0,0053	0,222 ± 0,0083	< 0,001
S. a	–	–	–	0,170 ± 0,0197	0,206 ± 0,0149	> 0,05
O. l.	–	–	–	0,162 ± 0,0324	0,200 ± 0,0063	> 0,05
B. f.	0,655 ± 0,0133	0,560 ± 0,0150	< 0,001	0,300 ± 0,0061	0,250 ± 0,0213	< 0,05
C. i.	–	–	–	0,301 ± 0,0063	0,324 ± 0,0151	> 0,05

Для определения скоростей эволюции доменов изучаемых изоферментов АДГ нами построен график зависимости средних эволюционных дистанций от предполагаемых времен дивергенции (рис. 4.3, 4.4). На рисунке 4.3 видно, что наклон линейных трендов, построенных по двум доменам АДГ 1-го класса, отличается. Так, наклон тренда для каталитического домена равен 0,0012, что дает $r = \frac{d}{2t} = \frac{0,0012}{2t} = 0,6 \text{ По}$, а для кофермент-связывающего домена — 0,0010 ($r = 0,50 \text{ По}$). Разные темпы эволюционных изменений доменов АДГ 1-го класса говорят о различиях структурно-функциональных ограничений, налагаемых на замены аминокислот в них. Одним из факторов, обуславливающих данные ограничения, по-видимому, является различное количество лигандов у доменов. Так, НАД⁺-связывающий домен АДГ1 имеет лишь один лиганд (НАД⁺), а каталитический домен — множество (спирты, альдегиды, стероиды, жирные кислоты и др.).

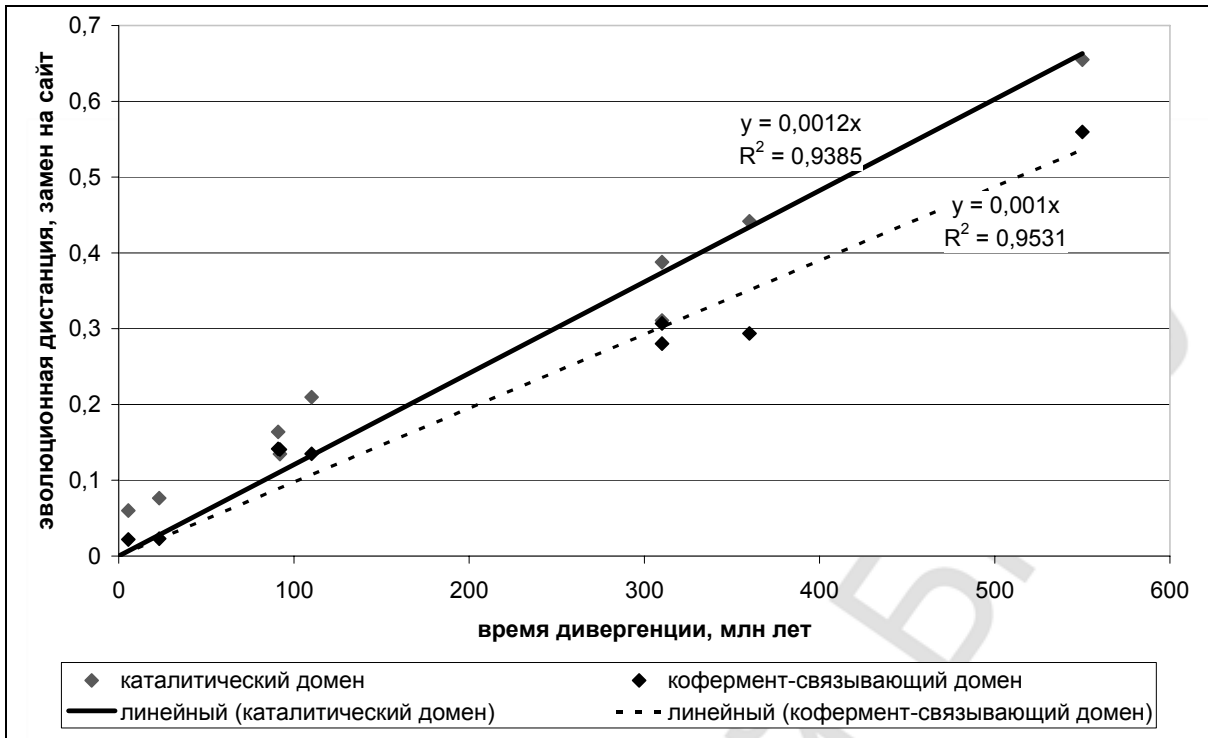


Рис. 4.3. Зависимость между средними значениями эволюционных дистанций для аминокислотных последовательностей доменов АДГ 1-го класса хордовых и временем их дивергенции

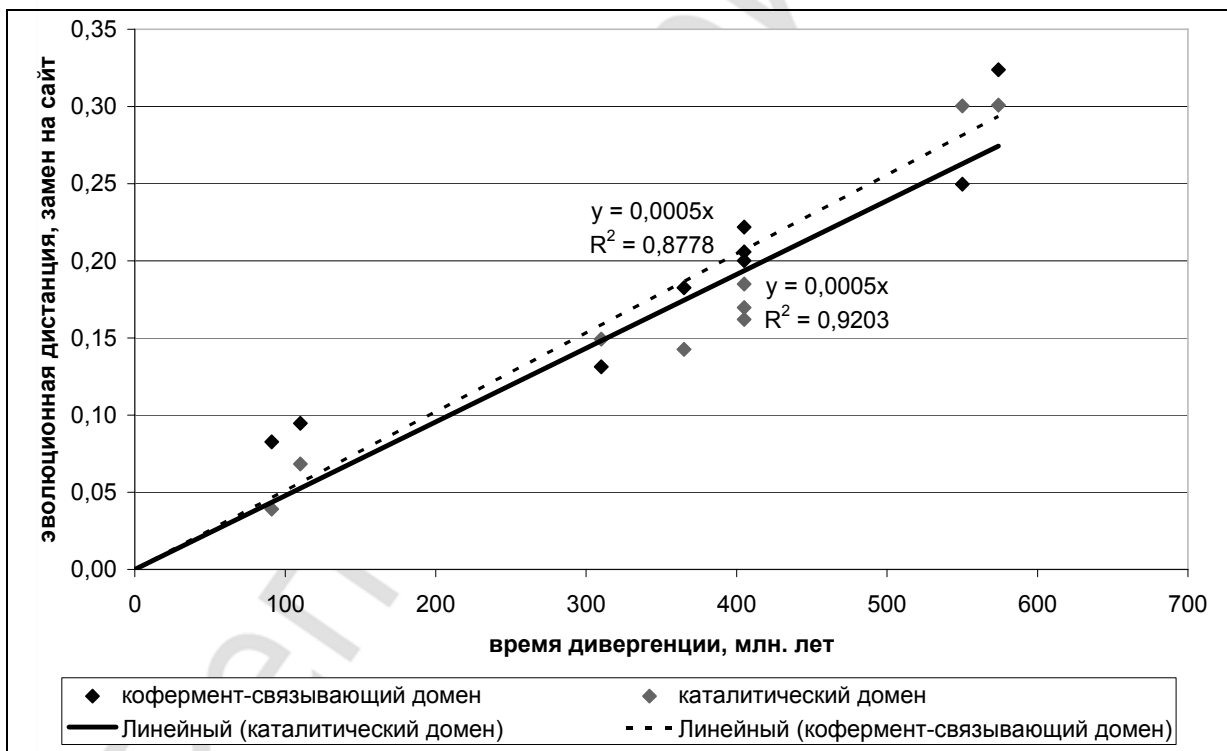


Рис. 4.4. Зависимость между средними значениями эволюционных дистанций для аминокислотных последовательностей доменов АДГ 3-го класса хордовых и временем их дивергенции

На рисунке 4.4 линии трендов очень близки друг к другу, они описываются идентичными уравнениями. Наклоны трендов составляют 0,0005, отсюда скорость эволюции доменов АДГ3 равна 0,25 По.

Аналогичным образом равные скорости эволюции двух доменов АДГ3 можно связать с приблизительно одинаковым количеством лигандов: НАД⁺-связывающий домен имеет лишь один лиганд (НАД⁺), а каталитический домен — несколько (формальдегид и глутатион в реакции глутатион-зависимого окисления формальдегида; S-нитрозоглутатион в реакции его восстановления). Из данных табл. 4.7 видно, что эволюционные дистанции для доменов АДГ1 мыши (M.m.), кролика (O.c.), петуха (G.g.), лягушки (X.l.) и ланцетника (V.f.) достоверно ($p < 0,05$) выше таковых для АДГ 3-го класса. Скорости эволюции каталитических и кофермент-связывающих доменов АДГ 1-го класса в 2,4 и 2,0 раза соответственно выше таковых для АДГ3. Большие различия темпов эволюционных изменений говорят о правильности выдвинутого нами предположения, однако для его подтверждения также необходимо определить темпы эволюционных изменений различных в функциональном отношении сайтов АДГ хордовых.

4.2. Эволюционные изменения различных в функциональном отношении сайтов алкогольдегидрогеназ 1-го и 3-го классов хордовых

Известно, что скорость эволюции может быть неодинаковой не только для разных молекул, но и для разных участков одной и той же молекулы. Так, например, ключевую роль в функционировании гемоглобина играют аминокислотные остатки, примыкающие к гему (гемовый «карман»), и темпы их эволюционных изменений в 10 раз меньше таковых наружной части молекулы. Ранее установлено, что данные отличия обусловлены разными селективными ограничениями, налагаемыми на молекулы и их участки, при одинаковых темпах мутирования [44]. Оценим эволюционные изменения функционально важных сайтов аминокислотных последовательностей АДГ 1-го и 3-го классов хордовых.

В таблицах 4.8–4.11 показаны аминокислотные остатки вышеназванных АДГ, участвующие в связывании субстратов, коферментов, каталитических и некаталитических ионов цинка.

Таблица 4.8

Субстрат-связывающие аминокислотные остатки АДГ3 хордовых

Вид	Сайты														
	48	57	58	93	110	116	117	140	141	294	297	306	309	318	319
H.s.	T	D	E	Y	L	V	T	Y	M	V	S	F	V	A	F
O.c.	T	D	E	Y	L	V	T	Y	M	V	A	F	V	A	F
M.m.	T	D	E	Y	L	V	T	F	M	V	S	F	V	A	F
G.g.	T	D	E	Y	L	V	T	F	M	V	A	F	V	A	F
X.l.	T	D	E	Y	L	I	T	F	M	V	S	F	V	A	F
S.a./O.l./	T	D	E	Y	L	I/V/V	T/T/S	F	M	V	A	F	V	A	F
V.r.	T	D	E	Y	L	T	T	F	M	V	A	F	V	A	F
C.i.	T	D	E	Y	L	I	S	F	M	V	R	F	V	A	F

Таблица 4.9

Субстрат-связывающие аминокислотные остатки АДГ1 хордовых

Вид	Сайты														
	48	57	58	93	110	116	117	140	141	294	297	306	309	318	319
H.s. A/B/C	T/T/S	M/L/L	V	A/F/F	Y	V/L/L	S/G/G	F	L/L/V	V	D/A/D	M	L	I/V/I	L/Y/F
P.t.	T	L	V	F	Y	L	G	F	L	V	A	M	L	V	Y
P.h.	T	L	V	F	Y	L	S	F	V	V	D	M	L	V	Y
E.c.	S	L	V	F	F	L	S	F	L	V	D	M	L	I	F
O.c.	S	L	A	F	F	L	L	F	I	V	D	M	L	I	F
M.m.	S	L	V	F	F	L	L	F	I	V	N	M	L	I	F
A.a./G.g.	S	L	V/A	F	L	I	G/S	F	I/V	V	A	M	F	V	F
X.l.	S	I	S	F	L	I	G	F	L	V	-	-	-	-	-

Таблица 4.10

Аминокислотные остатки АДГ3 хордовых, участвующие в связывании кофермента, каталитического и некаталитического ионов цинка

Вид	Сайты											
	связывания кофермента					каталитического Zn			некаталитического Zn			
	47	48	51	269	271	46	67	174	97	100	103	111
H.s.	H	T	Y	I	N	C	H	C	C	C	C	C
O.c.	H	T	Y	I	N	C	H	C	C	C	C	C
M.m.	H	T	Y	I	N	C	H	C	C	C	C	C
G.g.	H	T	Y	I	N	C	H	C	C	C	C	C
X.l.	H	T	Y	I	N	C	H	C	C	C	C	C
S.a./O.l./D.r.	H	T	Y	I	N	C	H	C	C	C	C	C
B.r.	H	T	Y	I	N	C	H	C	C	C	C	C
C.i.	H	T	F	I	N	C	H	C	C	C	C	C

Таблица 4.11

Аминокислотные остатки АДГ1 хордовых, участвующие в связывании кофермента, каталитического и некаталитического ионов цинка

Вид	Сайты											
	связывания кофермента					каталитического Zn			некаталитического Zn			
	47	48	51	269	271	46	67	174	97	100	103	111
H.s. A/B/C	G/H/R	T/T/S	H	I	R	C	H	C	C	C	C	C
P.t.	R	T	H	I	R	C	H	C	C	C	C	C
P.h.	R	T	H	I	R	C	H	C	C	C	C	C
E.c.	R	S	H	I	R	C	H	C	C	C	C	C
O.c.	R	S	H	I	R	C	H	C	C	C	C	C
M.m.	R	S	H	I	R	C	H	C	C	C	C	C
A.a./G.g.	R	S	H	I	H/R	C	H	C	C	C	C	C
X.l.	R	S	H	I	N	C	H	C	C	C	C	C

Согласно приведенным в таблице 4.8 данным, 11 из 15 ($73,3 \pm 11,82$ %) связывающих субстраты аминокислотных сайтов АДГ 3-го класса хордовых содержат идентичные аминокислоты. В 116-м положении наблюдаются замены $I \rightarrow T \rightarrow I \rightarrow V$ (средняя $GD = 68$), в 117-м — $S \rightarrow T$ ($GD = 73$), в 140-м — $F \rightarrow Y$ ($GD = 86$), а в 297-м положении — $R \rightarrow A \rightarrow S \rightarrow A \rightarrow S \rightarrow A \rightarrow S$ (средняя $GD = 52,5$). Таким образом, средняя дистанция Грэнтсема по данным 15 сайтам равна $92,0 \pm 4,06$, что свидетельствует о преобладании высококонсервативных замен аминокислот.

Вместе с тем идентичные аминокислоты содержат лишь 4 ($26,7 \pm 11,82$ %) вовлеченных в связывание субстрата сайта АДГ 1-го класса хордовых, что достоверно ($p < 0,05$) ниже по сравнению с АДГ 3-го класса. Замены в остальных 11 сайтах носят более сложный характер. Так, в 48-м положении наблюдается замена $S \rightarrow T$ ($GD = 73$), в 57-м — $I \rightarrow L$ ($GD = 95$), в 58-м — $S \rightarrow V \rightarrow A \rightarrow V$ (средняя $GD = 59$), в 110-м — $L \rightarrow F \rightarrow Y$ (средняя $GD = 86$), в 116-м — $I \rightarrow L$ ($GD = 95$), в 117-м — $G \rightarrow L \rightarrow S \rightarrow G$ (средняя $GD = 47$), в 141-м — $L \rightarrow I \rightarrow L \rightarrow V \rightarrow L$ (средняя $GD = 88,5$), в 297-м — $A \rightarrow N \rightarrow D \rightarrow A$ (средняя $GD = 57,3$), в 309-м — $F \rightarrow L$ ($GD = 86$), в 318-м — $V \rightarrow I \rightarrow V$ (средняя $GD = 86$) и в 319-м положении — $F \rightarrow Y$ ($GD = 86$). Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее низкие значения дистанции Грэнтсема наблюдаются для замен по 58, 117 и 297-му положениям, т. е. сайтам наружной части субстрат-связывающего пакета, взаимодействующим лишь с длинными спиртами. По-видимому, ограничения на замены в данных участках незначительны, что и обуславливает малую консервативность данных замен.

При попарных сравнениях субстрат-связывающих сайтов АДГ 3-го класса человека с таковыми кролика ЕИМ-дистанция составила 0,069 замен на сайт, мыши — 0,069, петуха — 0,145, лягушки — 0,145, рыб (S.a. — 0,227, O.l. — 0,145, D.r. — 0,227), ланцетника — 0,227, оболочника — 0,3166 замен на сайт. При сопоставлении этих значений с общепринятыми временами дивергенции (рис. 4.5) обнаружено существование между данными показателями линейной зависимости, описываемой уравнением регрессионного анализа: $y = 0,0005x$. Точки хорошо ложатся на линию тренда ($R^2 = 0,82$), что свидетельствует о приблизительно постоянных темпах эволюционных изменений субстрат-связывающего пакета АДГ3. Таким образом, этот факт в совокупности с высокой консервативностью происходящих аминокислотных замен означает, что на протяжении 574 млн лет (время дивергенции оболочника) происходила лишь структурная подстройка данной части активного центра АДГ 3-го класса.

При попарных сравнениях субстрат-связывающих сайтов В-изофермента 1-го класса АДГ человека с таковыми шимпанзе ЕИМ-дистанция равна 0 замен на сайт (замены аминокислот отсутствуют), бабуина — 0,228, лошади — 0,543, кролика — 0,840, мыши — 0,680, киви — 0,539, петуха — 0,837, лягушки — 0,760 замен на сайт. При сравнении полученных значений эволюционных дис-

танций с общепринятыми временами дивергенции, в отличие от АДГ 3-го класса, точки по АДГ1 значительно разбросаны от линии тренда (рис. 4.5). Следовательно, темп эволюционных изменений данных сайтов не является постоянным, поскольку замены аминокислот имеют различное направление в разных филогенетических линиях. Это в совокупности с меньшей консервативностью замен аминокислот (по сравнению с АДГ 3-го класса) означает, что данный участок активного центра АДГ1 находится в стадии активных эволюционных изменений.

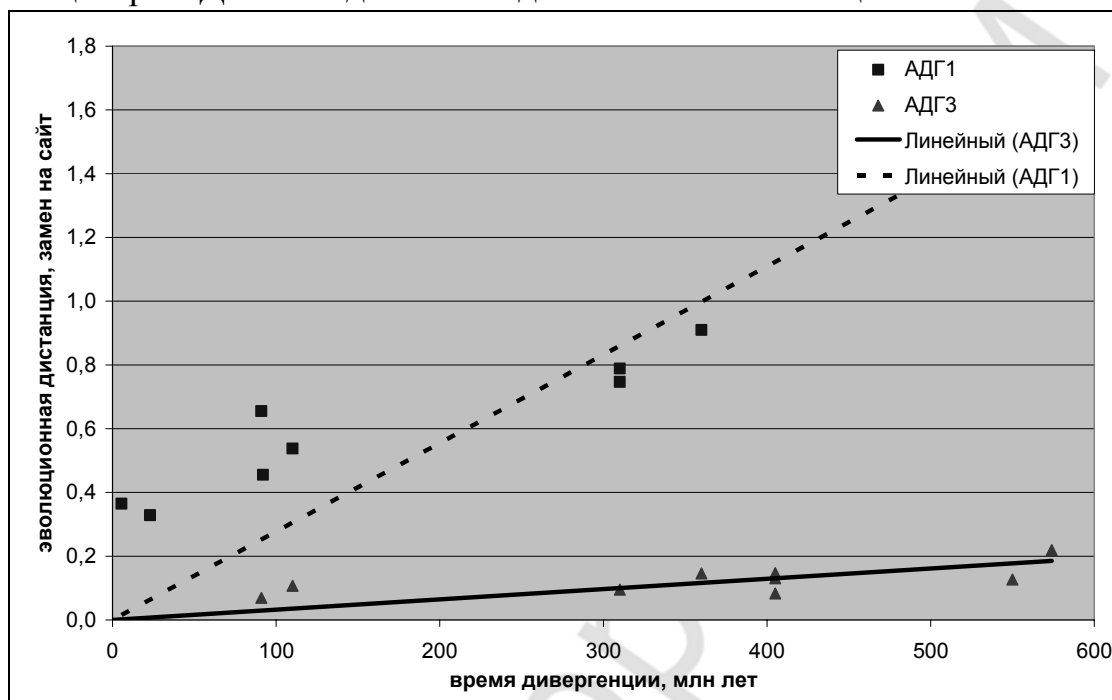


Рис. 4.5. Зависимость значений EIM-дистанции для субстрат-связывающих сайтов между АДГ 1-го и 3-го классов человека и таковыми других хордовых от предполагаемых времен дивергенции

Установлено, что фиксированные замены аминокислотных остатков в последовательностях АДГ 1-го и 3-го классов хордовых, связывающих каталитический и некаталитический ионы цинка, отсутствуют, что говорит об исключительно важной роли Zn^{2+} в акте катализа.

В связывающих кофермент сайтах АДГ3 хордовых наблюдается лишь одна аминокислотная замена (фенилаланин на тирозин у оболочника), а в аналогичных сайтах АДГ1 — две замены (серина на треонин в 48-м положении и аспарагина на аргинин в 271-м положении). Малое количество замен аминокислот определяет высокую консервативность кофермент-связывающих сайтов АДГ 1-го и 3-го классов хордовых. Таким образом, среди функционально важных сайтов АДГ 1-го и 3-го классов хордовых наиболее консервативными являются сайты связывания ионов цинка, наименее консервативными — сайты связывания субстратов, а промежуточное положение по консервативности занимают сайты связывания кофермента.

Установлено меньшее количество замен в функционально важных сайтах АДГ 3-го класса (по сравнению с АДГ 1-го класса) и их более консервативный

характер. Это также подтверждает выдвинутую нами выше гипотезу о влиянии числа лигандов на скорости эволюции изучаемых алкогольдегидрогеназ хордовых.

4.3. Эволюционные дистанции, скорости эволюции и времена дивергенции нуклеотидных последовательностей матричных РНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 1-го и 3-го классов хордовых

Для определения картины замещений в последовательностях мРНК, кодирующих АДГЗ хордовых, проведены их попарные сравнения, а также вычислены индекс несоответствия (ID) и полученная в ходе ID-теста вероятность отклонения нулевой гипотезы о гомогенной картине замен нуклеотидов (табл. 4.12).

Таблица 4.12

Значения ID и результаты ID-теста для мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых

Вид	H. s.	O. c.	M. m.	G. g.	X. l.	D. r.	S. a.	O. l.	B. f.	C. i.
H. s.		0,096	1,094	0,616	0,000	2,600	4,157	4,379	11,732	0,018
O. c.	> 0,05		0,388	0,112	0,000	1,461	2,728	2,828	9,391	0,290
M. m.	< 0,05	< 0,05		0,000	0,422	0,092	0,796	0,908	5,523	1,825
G. g.	< 0,05	> 0,05	> 0,05		0,249	0,419	1,169	1,340	6,300	1,456
X. l.	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05		1,739	3,051	3,048	10,062	0,125
D. r.	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05		0,004	0,100	3,044	3,934
S. a.	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05		0,000	1,680	5,826
O. l.	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05		1,957	5,766
B. f.	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05		14,696
C. i.	> 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения вероятности отклонения на 5 %-ном уровне нулевой гипотезы о гомогенной картине замещений нуклеотидов; ячейки со значениями $P > 0,05$ заштрихованы серым цветом.

Гомогенная картина замещений наблюдается в 13 проведенных попарных сравнениях ($28,9 \pm 6,76$ %), а гетерогенная — в 32 ($71,1 \pm 6,76$ %).

Наличие двух картин замещений в нуклеотидных последовательностях мРНК, соответствующих АДГ 3-го класса хордовых, свидетельствует о необходимости дифференцированного подхода при определении эволюционных дистанций [41].

В таблице 4.13 показаны средние эволюционные дистанции по трем положениям нуклеотида в кодоне, полученные, исходя из соответствующих картин замещения, для мРНК, кодирующих АДГЗ хордовых.

Установлено, что среднее значение эволюционной дистанции для *Ciona intestinalis* равно $0,425 \pm 0,0088$, для *Branchiostoma floridae* — $0,423 \pm 0,0138$, для костных рыб — $0,330 \pm 0,0064$, для *Xenopus laevis* — $0,289 \pm 0,0097$, для *Gallus gallus* — $0,261 \pm 0,0100$, для *Mus musculus* — $0,125 \pm 0,0002$ и для *Oryctolagus cuniculus* — $0,082 \pm 0,0007$.

Таблица 4.13

Средние эволюционные дистанции по трем положениям нуклеотида в кодоне мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых

Вид	H.s.	O. c.	M. m.	G. g.	X. l.	D. r.	S. a.	O. l.	B. f.	C. i.
H. s.		$0,082 \pm 0,0002$	$0,125 \pm 0,0007$	$0,259 \pm 0,0010$	$0,289 \pm 0,0017$	$0,339 \pm 0,0026$	$0,345 \pm 0,0022$	$0,323 \pm 0,0017$	$0,453 \pm 0,0019$	$0,410 \pm 0,0010$
O. c.			$0,131 \pm 0,0007$	$0,248 \pm 0,0008$	$0,284 \pm 0,0017$	$0,326 \pm 0,0035$	$0,330 \pm 0,0026$	$0,316 \pm 0,0019$	$0,442 \pm 0,0029$	$0,410 \pm 0,0014$
M. m.				$0,276 \pm 0,0012$	$0,312 \pm 0,0031$	$0,342 \pm 0,0018$	$0,325 \pm 0,0019$	$0,309 \pm 0,0010$	$0,426 \pm 0,0015$	$0,427 \pm 0,0009$
G. g.					$0,272 \pm 0,0011$	$0,311 \pm 0,0022$	$0,349 \pm 0,0024$	$0,331 \pm 0,0018$	$0,432 \pm 0,0011$	$0,436 \pm 0,0011$
X. l.						$0,314 \pm 0,0014$	$0,351 \pm 0,0018$	$0,335 \pm 0,0013$	$0,419 \pm 0,0011$	$0,404 \pm 0,0012$
D. r.							$0,227 \pm 0,0009$	$0,232 \pm 0,0008$	$0,379 \pm 0,0011$	$0,401 \pm 0,0015$
S. a.								$0,136 \pm 0,0004$	$0,359 \pm 0,0010$	$0,433 \pm 0,0030$
O. l.									$0,357 \pm 0,0008$	$0,421 \pm 0,0018$
B. f.										$0,466 \pm 0,0022$

Сопоставим средние значения эволюционных дистанций с предполагаемыми временами дивергенции различных организмов (рис. 4.6).

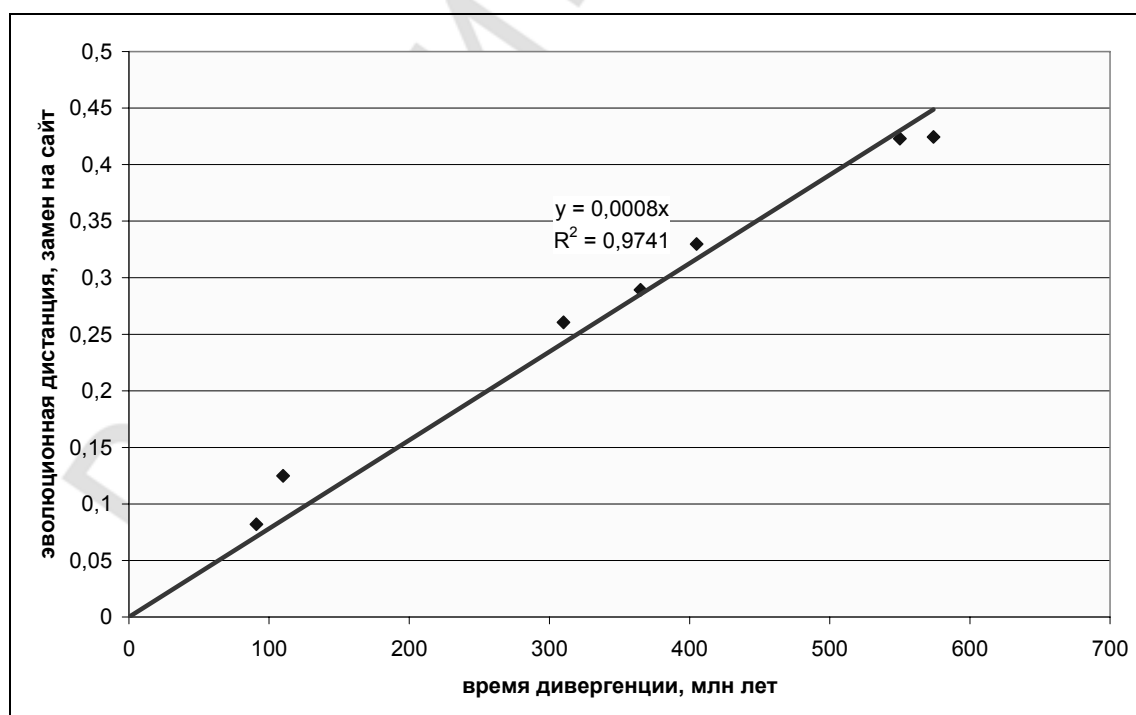


Рис. 4.6. Зависимость между средними значениями эволюционных дистанций для мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых и предполагаемыми временами дивергенции

На данном рисунке видно, что все точки хорошо ложатся на тренд ($R^2 = 0,97$), что говорит о постоянной скорости эволюции последовательностей мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых. Наклон тренда составляет 0,0008, что дает скорость замен нуклеотидов $r = \frac{d}{2t} = \frac{0,0008}{2t} = 0,40 \times 10^{-9}$ замен на нуклеотидный сайт в год [15]. Следует отметить, что скорость эволюции последовательностей мРНК, кодирующей АДГ 3-го класса, значительно больше скорости эволюции аминокислотных последовательностей данного изофермента, что может быть объяснено высокой долей «молчащих» замен нуклеотидов.

На рисунке 4.7 проиллюстрирована дендрограмма, полученная методом UPGMA на основании эволюционных дистанций Тамуры–Нея, для мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых.

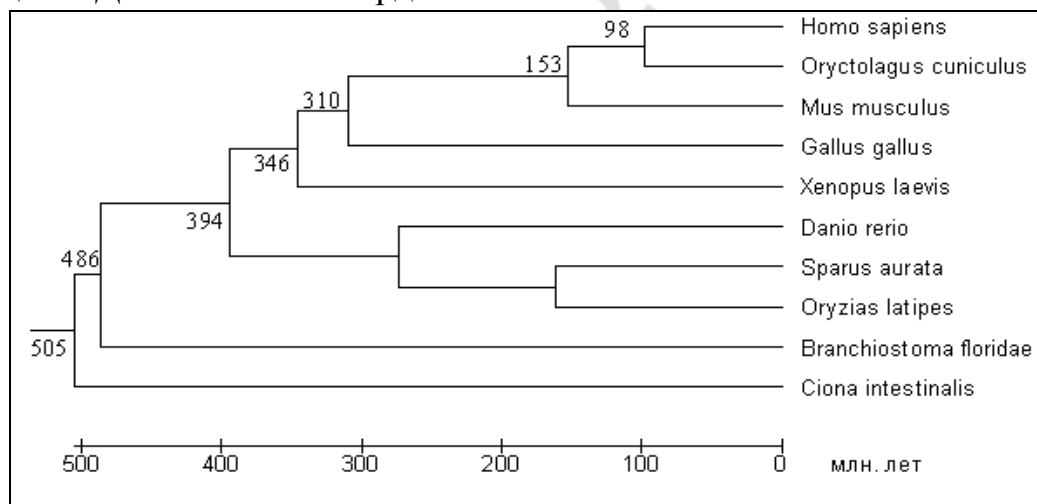


Рис. 4.7. Дендрограмма для мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых

Примечание. Над точками ветвления показаны предполагаемые времена дивергенции от общего предшественника.

В качестве калибровочной точки взято общепринятое время дивергенции птиц от общего предшественника с таксономически вышестоящими организмами (310 млн лет). На основании этой дендрограммы можно предположить, что дивергенция мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы *Homo sapiens* и *Oryctolagus cuniculus* произошла 98 млн лет назад, *Mus musculus* — 153 млн лет назад, *Xenopus laevis* — 346 млн лет назад, костных рыб — 394 млн лет назад, *Branchiostoma floridae* — 486 млн лет назад и, наконец, *Ciona intestinalis* — 505 млн лет назад [15].

Полученные данные для *Oryctolagus cuniculus*, *Xenopus laevis*, костных рыб, *Branchiostoma floridae* и *Ciona intestinalis* согласуются с таковыми, принятыми в палеонтологии и молекулярной эволюции (110, 365, 405, 550, 500–600 млн лет соответственно). Единственным несовпадающим с общепринятым зна-

чением времени дивергенции (110 млн лет назад) является время дивергенции *Mus musculus* (153 млн лет назад). Это можно объяснить высокой скоростью эволюции нуклеотидных последовательностей мРНК АДГ 3-го класса мыши, если, конечно, здесь нет ошибки в определении времени дивергенции. В свою очередь, высокая скорость эволюции изучаемой последовательности мРНК, соответствующей АДГ 3-го класса, у грызунов может быть объяснена коротким периодом их жизни, высокой активностью метаболических процессов и низким уровнем репарации ДНК [81, 141, 191].

После обработки методом бутстрэп на 95 %-ном уровне значимости количество точек ветвления дендрограммы уменьшается (рис. 4.8). На данном рисунке видно, что в отличие от исходной дендрограммы последовательности мРНК, кодирующие АДГ 3-го класса петуха и лягушки имеют общую точку ветвления. Этот факт можно объяснить близкими значениями их времен дивергенции (310 и 346 млн лет соответственно).

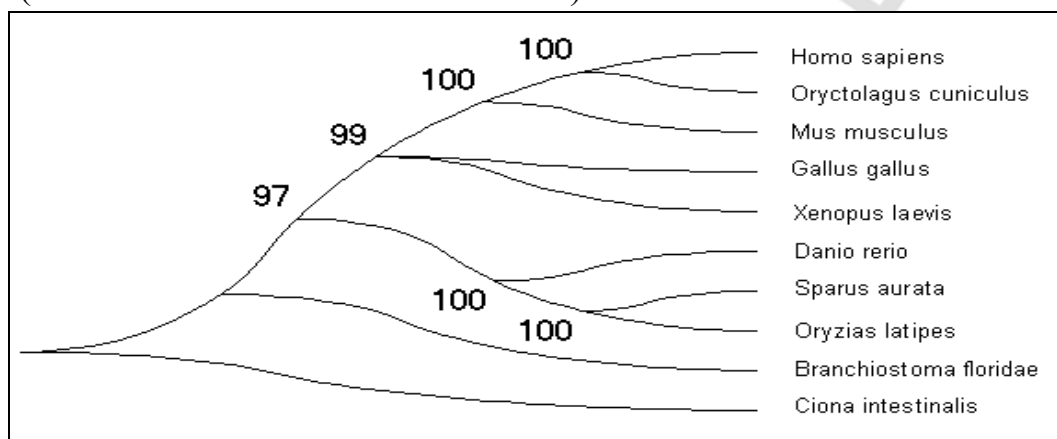


Рис. 4.8. Дендрограмма, обработанная методом бутстрэп, для мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых

Аналогично определена картина замещений в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса хордовых.

Таблица 4.14

Значения индекса несоответствия и вероятности отклонения нулевой гипотезы о гомогенной картине замен нуклеотидов для мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса хордовых

Вид	Н.с. А	Н.с. В	Н.с. С	Р. т.	Р. h.	О. с.	Е. с.	М. m	А. а.	Г. g.	Х. l.	В. f.
Н.с. А		0,149	0,000	0,255	0,199	0,048	0,227	1,263	0,000	2,674	0,984	9,072
Н.с. В	< 0,05		0,048	0,007	0,000	0,000	0,000	0,547	0,000	2,618	1,563	6,657
Н.с. С	> 0,05	> 0,05		0,107	0,065	0,000	0,077	1,097	0,000	2,580	1,122	8,247
Р. т.	< 0,05	> 0,05	< 0,05		0,000	0,000	0,000	0,514	0,000	2,678	1,830	6,192
Р. h.	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05		0,000	0,000	0,644	0,000	2,635	1,552	6,493
О. с.	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05		0,000	0,652	0,000	3,047	1,668	6,775
Е. с.	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05		0,360	0,000	2,796	2,661	5,921
М. m.	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05		0,223	3,329	3,034	4,339
А. а.	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05		2,433	1,051	6,889
Г. g.	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05		3,507	9,638
Вид	Н.с. А	Н.с. В	Н.с. С	Р. т.	Р. h.	О. с.	Е. с.	М. m	А. а.	Г. g.	Х. l.	В. f.

X. l.	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05		10,48
V. f.	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	

Примечание. Значения P выделены жирным шрифтом. Ячейки с P > 0,05 выделены серым цветом.

В таблице 4.14 гомогенная картина замещений наблюдается в 24 проведенных попарных сравнениях ($36,4 \pm 5,92$ %), а гетерогенная — в 42 ($63,6 \pm 5,92$ %). Следует отметить, что различия картин замен между изучаемыми классами АДГ не различимы статистически. В таблице 4.15 представлены средние эволюционные дистанции по трем положениям нуклеотида в кодоне, полученные различными методами с учетом соответствующих картин замещения, для мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса хордовых.

Для ланцетника среднее значение $d = 0,5855 \pm 0,0049$, для земноводных $d = 0,4216 \pm 0,0044$, для птиц $d = 0,3845 \pm 0,0227$, для грызунов $d = 0,2109 \pm 0,0021$, для непарнокопытных $d = 0,1491 \pm 0,0023$, для зайцеобразных $d = 0,1337 \pm 0,0022$, для павиана $d = 0,0263 \pm 0,0000$, а для шимпанзе $d = 0,0071 \pm 0,0000$.

Таблица 4.15

Средние эволюционные дистанции для мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса хордовых

Вид	H.s. A	H.s. B	H.s. C	P. t.	P. h.	O. c.	E. c.	M. m	A. a.	G. g.	X. l.	V. f.
H.s. A		0,052 ± 0,000	0,064 ± 0,000	0,053 ± 0,000	0,067 ± 0,000	0,130 ± 0,000	0,148 ± 0,000	0,217 ± 0,001	0,375 ± 0,001	0,404 ± 0,002	0,423 ± 0,002	0,589 ± 0,001
H.s. B			0,046 ± 0,000	0,007 ± 0,000	0,026 ± 0,000	0,137 ± 0,000	0,150 ± 0,000	0,209 ± 0,001	0,361 ± 0,001	0,388 ± 0,002	0,422 ± 0,002	0,579 ± 0,001
H.s. C				0,052 ± 0,000	0,056 ± 0,000	0,128 ± 0,000	0,150 ± 0,000	0,204 ± 0,000	0,366 ± 0,001	0,401 ± 0,003	0,429 ± 0,002	0,591 ± 0,001
P. t.					0,028 ± 0,000	0,134 ± 0,000	0,149 ± 0,000	0,212 ± 0,001	0,357 ± 0,001	0,388 ± 0,002	0,422 ± 0,002	0,582 ± 0,002
P. h.						0,137 ± 0,000	0,155 ± 0,000	0,216 ± 0,001	0,363 ± 0,001	0,394 ± 0,002	0,426 ± 0,002	0,590 ± 0,002
O. c.							0,140 ± 0,000	0,204 ± 0,000	0,371 ± 0,001	0,402 ± 0,002	0,429 ± 0,001	0,592 ± 0,001
E. c.								0,210 ± 0,001	0,359 ± 0,001	0,392 ± 0,002	0,432 ± 0,002	0,581 ± 0,001
M. m.									0,390 ± 0,001	0,431 ± 0,003	0,431 ± 0,003	0,598 ± 0,001
A. a.										0,139 ± 0,000	0,390 ± 0,002	0,592 ± 0,001
G. g.											0,407 ± 0,003	0,598 ± 0,000
X. l.												0,543 ± 0,000

На рисунке 4.9 показана зависимость полученных расчетных значений чисел нуклеотидных замен и соответствующих времен дивергенции.

Из рисунка 4.9 видно, что все точки, за исключением точек по эволюционным дистанциям для мыши и ланцетника, довольно хорошо ложатся на пря-

мую. Наклон этой прямой равен 0,0012, что дает $r_{\text{нукл}} = \frac{d}{2T} = 0,60 \times 10^{-9}$ замен на нуклеотидный сайт в год [14, 37]. Другими словами, темпы нуклеотидных замен в разных ветвях родословного древа хордовых были примерно одинаковыми. Значительное отклонение наблюдается только при сравнении мыши с другими млекопитающими, возможные причины чего объяснены выше.

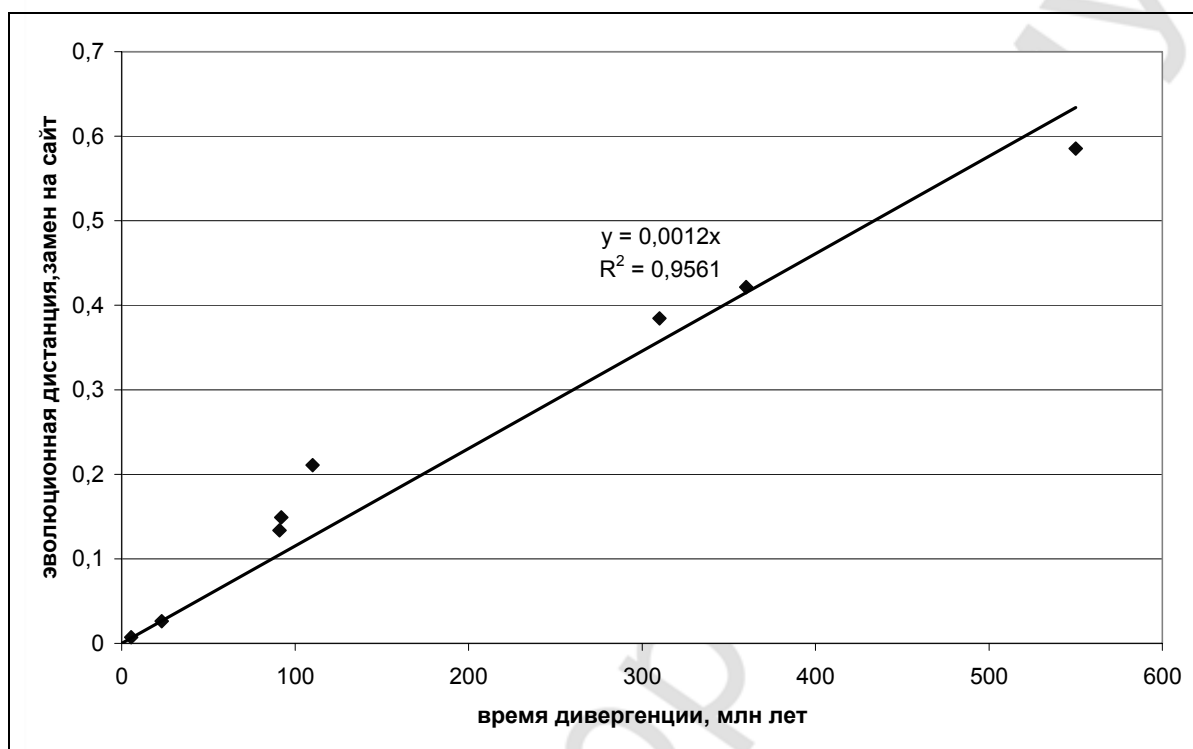


Рис. 4.9. Зависимость между значениями эволюционных дистанций для мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса хордовых, и временем дивергенции

Что же касается точки для ланцетника ($d = 0,5855$ замен на сайт, $T = 550$ млн лет), то ее отклонение от прямой ожидаемо, поскольку она соответствует расчетному значению числа нуклеотидных замен для другого структурно-функционального класса АДГ (3-го класса), эволюционирующих по нашим данным с меньшей скоростью ($0,40 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год).

Числовые значения скоростей эволюции аминокислотных последовательностей АДГ 1-го класса и кодирующих их мРНК близки ($0,55 \times 10^{-9}$ замен на аминокислотный сайт в год и $0,60 \times 10^{-9}$ замен на нуклеотидный сайт в год соответственно), что свидетельствует об относительно малой доле синонимичных замен нуклеотидов в данных мРНК в процессе эволюции.

На рисунке 4.10 представлена дендрограмма, отражающая родственные отношения между АДГ 1-го класса хордовых, сгруппированных методом UPGMA на основании значений эволюционных дистанций между последовательностями их мРНК, рассчитанных методом Тамуры–Нея по первому и второму положениям кодонов. Для определения времен дивергенции в качестве калибровочной точки взято общепринятое время дивергенции птиц от общего предшественника с таксономически вышестоящими организмами (310 млн лет).

На основании этой дендрограммы можно говорить о том, что дивергенция мРНК, кодирующих АДГ класса 1В *Homo sapiens* и *Pan troglodytes*, произошла 6 млн лет назад, *Papio hamadryas* — 22 млн лет назад, класса 1С *Homo sapiens* — 42 млн лет назад, класса 1А *Homo sapiens* — 48 млн лет назад. В соответствии с дендрограммой дивергенция мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса *Oryctolagus cuniculus* и таксономически вышестоящих организмов, произошла 107 млн лет назад, *Equus caballus* — 120 млн лет назад, *Mus musculus* — 170 млн лет назад, *Xenopus laevis* — 341 млн лет назад и, наконец, *Branchiostoma floridae* — 475 млн лет назад [14].

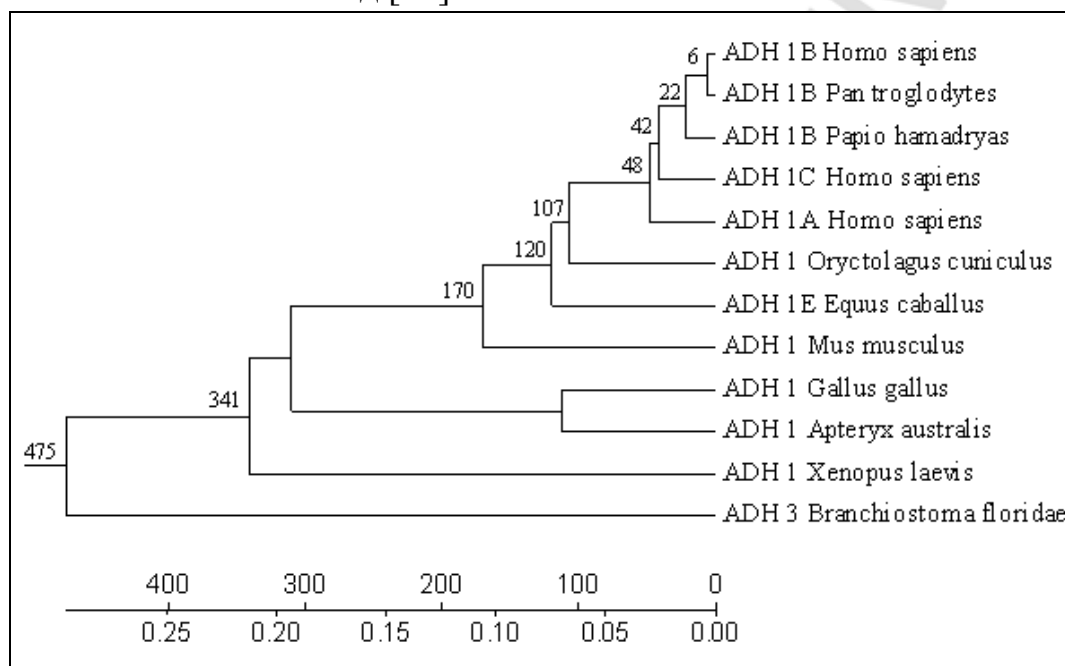


Рис. 4.10. Родственные отношения между мРНК, кодирующими АДГ 1-го класса хордовых
Примечание. Цифрами обозначены полученные времена дивергенции.

Полученные данные для *Pan troglodytes*, *Papio hamadryas*, *Oryctolagus cuniculus*, *Equus caballus*, *Xenopus laevis* и *Branchiostoma floridae* близки к таковым, принятым в эволюционной биохимии и молекулярной эволюции (6, 25, 92, 91, 365, 550 млн лет соответственно).

Единственным несовпадающим с общепринятым значением времени дивергенции (110 млн лет назад) является время дивергенции *Mus musculus* (170 млн лет назад), что может быть объяснено вышеназванными причинами.

После обработки методом бутстрэп полученной дендрограммы количество точек ветвления на ней значительно уменьшается (рис. 4.11).

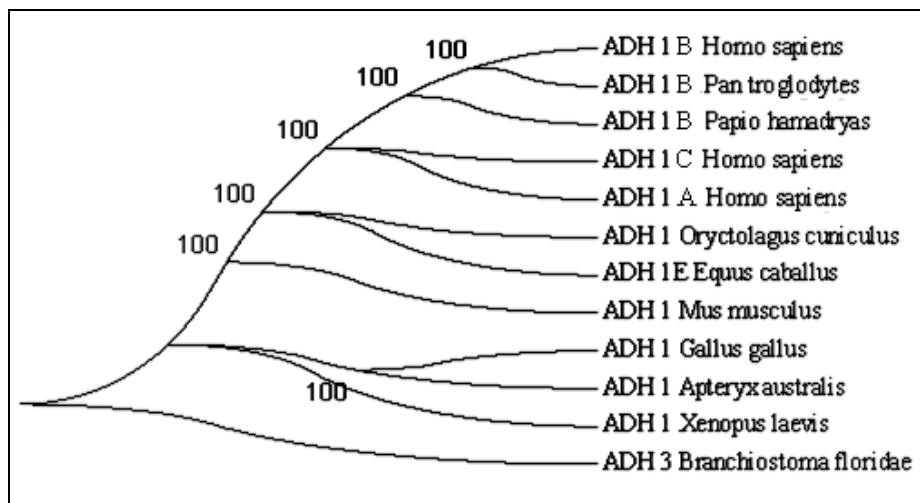


Рис. 4.11. Дендрограмма, обработанная методом бутстрэп, для мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса хордовых

На рисунке 4.11 видно, что общие точки ветвления появляются у последовательностей мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса петуха и лягушки, лошади и кролика, а также двух изоферментов человека (α и γ). Это также можно объяснить близкими значениями их времен дивергенции (310 и 346, 120 и 107, 42 и 48 млн лет соответственно).

4.4. Выводы

Гомогенная картина замен наблюдается в большинстве проведенных парных сравнений аминокислотных последовательностей АДГ 1-го и 3-го классов хордовых животных ($97,0 \pm 2,10$ %; $91,1 \pm 4,24$ %). Темпы аминокислотных замен в последовательностях АДГ 1-го и 3-го классов хордовых являются постоянными (0,55 и 0,25 По соответственно). АДГ 1-го и 3-го классов хордовых являются медленно эволюционирующими белками, поскольку значения скоростей их эволюции меньше медианной скорости эволюции (0,74 По).

В последовательностях мРНК, кодирующих АДГ 1-го и 3-го классов хордовых, преобладает гетерогенная картина замен нуклеотидов. Скорость эволюции последовательностей мРНК, кодирующих АДГ 3-го и 1-го классов, является приблизительно постоянной и составляет $0,40 \times 10^{-9}$ и $0,60 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год соответственно. Различия темпов эволюционных изменений аминокислотных последовательностей двух классов изучаемых ферментов, а также кодирующих их мРНК связаны с разным количеством субстратов (чем больше число субстратов, тем выше скорость эволюции).

Дивергенция мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса *Homo sapiens* и *Oryctolagus cuniculus*, произошла 98 млн лет назад, *Mus musculus* — 153 млн лет назад, *Xenopus laevis* — 346 млн лет назад, костных рыб — 394 млн лет назад, *Branchiostoma floridae* — 486 млн лет назад и, наконец, *Ciona intestinalis* — 505 млн лет назад. Время дивергенции мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы класса 1В *Homo sapiens* и *Pan troglodytes*, составляет 6 млн лет, *Papio hamadryas* — 22 млн лет, класса 1С *Homo sapiens* — 42 млн лет, класса 1А *Homo sapiens* — 48 млн лет, класса 1 *Oryctolagus cuniculus* — 107 млн лет,

Equus caballus — 120 млн лет, *Mus musculus* — 170 млн лет, *Xenopus laevis* — 341 млн лет и, наконец, *Branchiostoma floridae* — 475 млн лет. Полученные данные для *Pan troglodytes*, *Papio hamadryas*, *Oryctolagus cuniculus*, *Equus caballus*, *Xenopus laevis* и *Branchiostoma floridae* близки к таковым, принятым в эволюционной биохимии и молекулярной эволюции.

Эволюционные дистанции, полученные по каталитическому домену АДГ 1-го класса, как правило, достоверно выше таковых по кофермент-связывающему домену. Вместе с тем различия эволюционных дистанций, вычисленных для доменов АДГ3, в большинстве случаев недостоверны. Скорости эволюции каталитического и НАД⁺-связывающего доменов АДГ1 различны (0,60 и 0,50 По соответственно), а АДГ3 — одинаковы (0,25 По). Эволюционные дистанции для каталитических и кофермент-связывающих доменов алкогольдегидрогеназ 1-го класса достоверно ($p < 0,05$) выше таковых для АДГ3. Скорости эволюции каталитических и кофермент-связывающих доменов АДГ1 в 2,4 и 2,0 раза соответственно выше таковых для АДГ 3-го класса.

Большая часть ($73,3 \pm 11,82$ %) аминокислотных сайтов АДГ 3-го класса хордовых, связывающих субстраты, содержат идентичные аминокислоты. Средняя дистанция Грэнтсема по данным 15 сайтов равна $92,0 \pm 4,06$, что свидетельствует о преобладании высоко консервативных замен аминокислот. Темпы эволюционных изменений субстрат-связывающего пакета АДГ3 являются приблизительно постоянными. Этот факт в совокупности с высокой консервативностью происходящих аминокислотных замен означает, что на протяжении 574 млн лет (время дивергенции оболочника) происходила лишь структурная подстройка данной части активного центра АДГ 3-го класса.

Вместе с тем идентичные аминокислоты содержат лишь $26,7 \pm 11,82$ % вовлеченных в связывание субстрата сайта АДГ 1-го класса хордовых, что достоверно ($p < 0,05$) ниже по сравнению с АДГ 3-го класса. Замены в остальных 11 сайтах носят более сложный характер. Наиболее низкие значения дистанции Грэнтсема наблюдаются для замен по 58, 117 и 297-му положениям, т. е. сайтам наружной части субстрат-связывающего пакета, взаимодействующим лишь с длинными спиртами. Темпы эволюционных изменений субстрат-связывающих сайтов АДГ1 не являются постоянными, поскольку замены аминокислот имеют различное направление в разных филогенетических линиях. Это в совокупности с меньшей консервативностью замен аминокислот (по сравнению с АДГ 3-го класса) означает, что данный участок активного центра АДГ1 находится в стадии активных эволюционных изменений.

Фиксированные замены аминокислотных остатков в последовательностях АДГ 1-го и 3-го классов хордовых животных, связывающих каталитический и некаталитический ионы цинка, отсутствуют, что говорит об исключительно важной роли Zn^{2+} в акте катализа. Малое количество фиксированных замен аминокислот (1–2) определяет высокую консервативность НАД⁺-связывающих сайтов АДГ 1-го и 3-го классов хордовых.

Различия темпов эволюционных изменений аминокислотных последовательностей доменов АДГ 1-го и 3-го классов хордовых, а также меньшее количество замен в функционально важных сайтах АДГ3 (по сравнению с АДГ 1-го класса) и их более консервативный характер подтверждают выдвинутую нами гипотезу о влиянии числа лигандов на скорость эволюции изучаемых белков.

Репозиторий БГМУ

Г Л А В А 5

СТРАТЕГИЯ КОДИРОВАНИЯ И НЕЙТРАЛЬНОСТЬ ЗАМЕН НУКЛЕОТИДОВ В мРНК, КОДИРУЮЩИХ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ 3-ГО КЛАССА ХОРДОВЫХ

Второй фундаментальной теорией молекулярной эволюции является теория мутационного давления. Ее первичный вариант был разработан Н. Суеокой в 60-е годы XX века [177].

Данная теория, основанная на эмпирических исследованиях, провозгласила основной причиной возникновения генных мутаций направленное мутационное давление. Мутационное давление, согласно Н. Суеоке, представляет собой фактор молекулярной эволюции, дающий материал для естественного отбора. Оно обусловлено повышенной частотой возникновения и фиксации нуклеотидных замещений 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) [176]. Общим проявлением мутационного давления является закономерное снижение или повышение уровня ГЦ-насыщенности генома (или хромосомы) в ряду поколений.

Наиболее вероятными причинами возникновения мутационного давления считаются процессы ферментативного и спонтанного дезаминирования нуклеотидов, периодическое возникновение ошибок в процессе репликации и репарации ДНК за счет встраивания в цепочку ДНК 8-оксо-ГТФ или за счет дефектов работы самих ДНК-полимераз. Теория Н. Суеоки во многом базируется на теории нейтральной эволюции и не противоречит ее основным положениям. Однако с момента создания данных теорий не было предпринято попытки объединения и сопоставления их положений.

В данной главе нами определен характер изменений стратегии кодирования АДГ 3-го класса хордовых в процессе эволюции путем анализа мутационного давления, ГЦ-насыщенности, содержания претерминальных кодонов и синонимичных ГЦЗ-кодонов. Более того, нами предпринята попытка количественного сопоставления нейтральности замен нуклеотидов мРНК, определенной в рамках теории Н. Суеоки, с темпами не только их эволюционных изменений, но и кодируемых ими белков (вычисленными в рамках теории М. Кимуры).

5.1. Мутационное давление, ГЦ-насыщенность и содержание претерминальных кодонов в матричных РНК, соответствующих алкогольдегидрогеназам 3-го класса хордовых

Рассмотрим динамику стратегии кодирования АДГ в мРНК в процессе эволюции на примере АДГ 3-го класса. Содержание гуанина и цитозина, величины мутационного давления (определены с использованием мРНК АДГ 3-го класса нематоды в качестве контроля), а также претерминальных кодонов в мРНК, соответствующих АДГ 3-го класса хордовых, показаны в таблице 5.1.

Таблица 5.1

Мутационное давление, содержание гуанина и цитозина, претерминальных кодонов в мРНК, соответствующих АДГ 3-го класса хордовых

Организм	Общее ГЦ-содержание, %	ГЦ1-содержание, %	ГЦ2-содержание, %	ГЦ3-содержание, %	μ_D	Содержание ПТК, %
H. s.	45,9	53,6	43,2	40,8	0,37	33,3
O. c.	47,3	53,0	44,5	44,3	0,40	32,3
M. m.	50,2	54,6	44,3	51,7	0,45	30,1
G. g.	49,8	57,2	45,4	46,9	0,45	29,6
X. l.	46,9	53,3	44,1	43,2	0,39	30,5
D. r.	53,0	56,7	43,5	58,7	0,50	27,3
O. l.	54,5	56,8	44,0	62,6	0,54	29,2
S. a.	54,7	56,2	43,2	64,7	0,54	30,5
B. f.	60,6	59,0	46,0	76,8	0,65	26,5
C. i.	44,0	55,1	44,4	32,5	0,39	31,0

Обнаружена тенденция к росту в процессе эволюции содержания ПТК и снижению величины μ_D , ГЦ-насыщенности, а также содержания гуанина и цитозина в первом и третьем положениях кодонов мРНК, кодирующих изучаемые АДГ. Значения показателей мутационного давления связаны (рис. 5.1) с ГЦ-насыщенностью ($r = 0,98 \pm 0,062$; $p < 0,001$) и ГЦ3-содержанием ($r = 0,97 \pm 0,093$; $p < 0,001$).

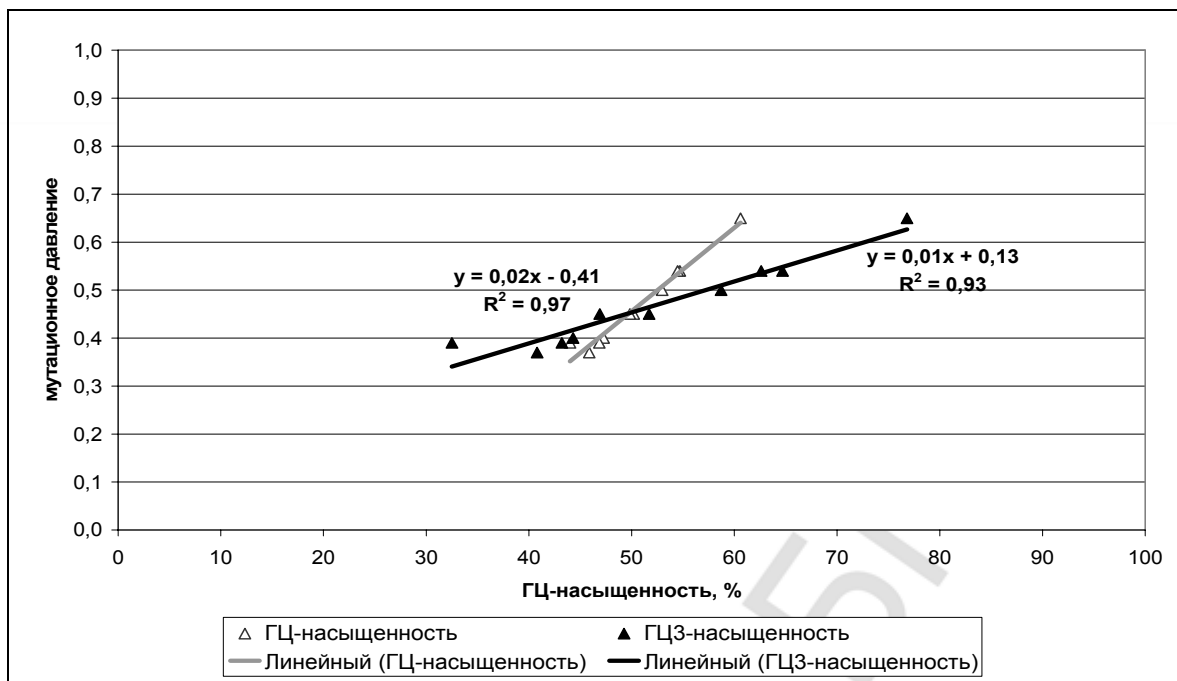


Рис. 5.1. Зависимость ГЦ-насыщенности, ГЦ3-содержания от значений мутационного давления в мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых

Это подтверждает утверждение Н. Суеоки о том, что ГЦ3-содержание может рассматриваться как показатель, эквивалентный мутационному давлению [176]. Тогда значениям μ_D , равным 0 и 1, должно соответствовать содержание гуанина и цитозина в третьем положении нуклеотида в кодоне 0 и 100 % соответственно. Однако на рисунке 5.1 видно, что экстраполяция тренда не приведет к соблюдению данного условия, что, вероятно, связано с малым количеством точек, используемых для построения тренда.

В свете приведенных данных становится понятно, что снижение величины μ_D связано с изменением направления мутационного давления с ГЦ на АУ (АТ в экзонах соответствующих генов). Мы предположили, что наиболее вероятной причиной появления мутационного АТ-давления в процессе эволюции экзонов генов, кодирующих АДГ (АУ-давления в мРНК), является изменение содержания гуанина и цитозина путем уменьшения количества ЦГ- и/или ГЦ-динуклеотидов. При сравнении выровненных нуклеотидных последовательностей 2–8 экзонов генов, кодирующих АДГ 3-го класса мыши и человека, обнаружено, что количество ГЦ-динуклеотидов является приблизительно постоянным (60 — в экзонах мыши, 59 — в экзонах человека), а количество ЦГ-динуклеотидов уменьшается (с 28 до 17). Отсюда следует, что это явление связано с мутациями в ЦГ-динуклеотидах.

Нами также обнаружено, что ЦГ-динуклеотиды являются более мутабельными по сравнению с ГЦ-динуклеотидами, поскольку при выравнивании последовательностей изучаемых экзонов мыши и человека обнаружены фиксированные мутации в $71,4 \pm 8,70$ % ЦГ-динуклеотидах и лишь в $15,0 \pm 4,61$ % ГЦ-динуклеотидах (различия достоверны, $p < 0,001$).

Учитывая высокую вероятность транзиций по сравнению с трансверсиями, мы предположили, что основными направлениями замен были ЦГ→ЦА и ЦГ→ТГ. На рисунке 5.2 показана зависимость между изменением количества ЦГ-динуклеотидов по сравнению с изменением количества ЦА- и ТГ-динуклеотидов в последовательностях экзонов генов, кодирующих АДГ3 мыши и человека.

На данном рисунке видно, что тренд, построенный по значениям Δ ЦГ и Δ ЦА, характеризуется низким значением R^2 (0,05). Это означает, что замены ЦГ→ЦА не являются основным направлением изменения ЦГ-динуклеотидов, о чем свидетельствует наличие недостоверной корреляционной связи между данными показателями ($r = -0,22 \pm 0,436$; $p > 0,05$). Тренду по значениям Δ ЦГ и Δ ТГ, напротив, свойственна высокая достоверность аппроксимации ($R^2 = 0,47$), а самим значениям — наличие достоверной обратной корреляционной связи средней силы ($r = -0,69 \pm 0,325$; $p < 0,05$). Это свидетельствует в пользу предположения о том, что большая часть ЦГ-динуклеотидов в последовательности экзонов изучаемого гена мыши превратилась в ТГ-динуклеотиды в последовательностях экзонов гена человека посредством транзиции Ц→Т.

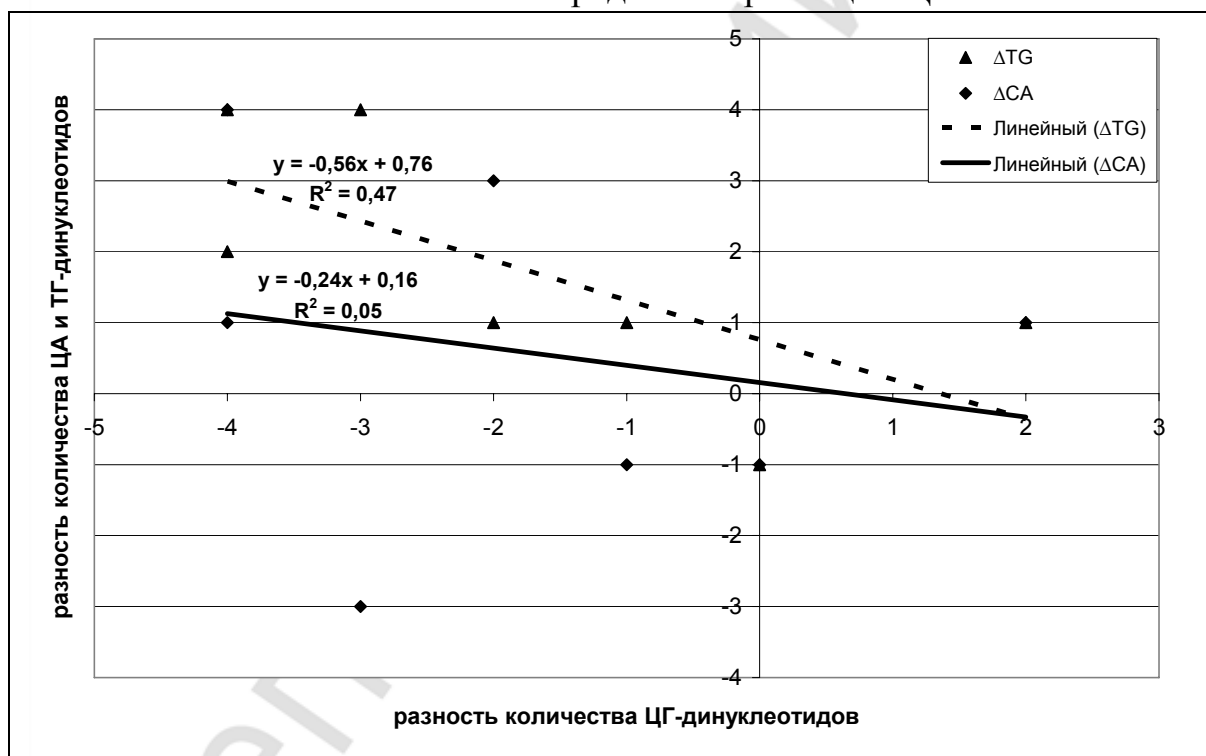


Рис. 5.2. Зависимость между изменением количества ЦГ-динуклеотидов и изменением количества ЦА- и ТГ-динуклеотидов в последовательностях экзонов генов, кодирующих АДГ 3-го класса мыши и человека

Биохимический механизм данной мутации детально изучен [10]. Как известно, первоначально с помощью метилазы осуществляется метилирование цитозина. Образующийся 5-метилцитозин при спонтанном или индуцированном дезаминировании легко превращается в тимин, который не в состоянии об-

разовать каноническую пару с гуанином, что является причиной транзиции Г→А во второй цепи молекулы ДНК. Важно, что метилирование ЦГ-динуклеотидов происходит чаще, чем иных, содержащих цитозин.

Однако пересечение линии линейного тренда по значениям $\Delta ЦГ$ и $\Delta ТГ$ с осями в точках $y = 0,76$ и $x = 1,36$ (рис. 5.2) говорит о том, что 1–2 мутации в динуклеотиде ЦГ могут происходить и по другим механизмам. Среди них, с нашей точки зрения, наиболее вероятными являются замены ЦГ→ЦА и ТГ→ГА, что связано с высокой вероятностью транзиций. Для подтверждения этого предположения мы вычислили коэффициент корреляции между значениями $\Delta ЦГ$ и $\Delta ТГ + \Delta ГА + \Delta ЦА$ ($r = -0,73 \pm 0,306$; $p < 0,05$), что позволило выявить наличие достоверной сильной обратной корреляционной связи между данными показателями.

Действительно, при дальнейшем анализе точечных мутаций, наблюдаемых при сравнении экзонов изучаемых генов, обнаружено, что 13 из 19 ($68,4 \pm 10,96$ %) мутировавших ЦГ-динуклеотидов превратились в ТГ-, ГА- и ЦА-динуклеотиды. В свою очередь, в 11 среди данных 13 динуклеотидов ($84,6 \pm 10,42$ %) произошли замены цитозина на тимин, что привело к возникновению ТГ-динуклеотидов. С нашей точки зрения, появление АГ-, ТЦ-, ЦТ- и ГГ-динуклеотидов на месте ЦГ-динуклеотидов связано не только с трансверсиями в самих ЦГ-динуклеотидах, но и в возникших на их основе ТГ-, ГА- и ЦА-динуклеотидах.

Таким образом, основным механизмом появления мутационного АТ-давления в генах, кодирующих АДГ хордовых, являются ЦГ→ТГ-мутации, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина [42].

Установлено, что между показателями общей ГЦ-насыщенности и ГЦЗ-содержания существует сильная достоверная положительная корреляционная связь ($r = 0,99 \pm 0,044$; $p < 0,001$). Полученные данные согласуются с данными других исследователей [5]. В ходе регрессионного анализа получено уравнение линейной зависимости данных показателей: $y = 2,62x - 80,74$ (y — ГЦЗ-содержание, x — ГЦ-насыщенность).

В изучаемых последовательностях мРНК содержание претерминальных кодонов находится в обратной линейной зависимости от ГЦ-насыщенности (рис. 5.3; $r = -0,79 \pm 0,216$; $p < 0,001$), ГЦЗ-содержания ($r = -0,74 \pm 0,236$; $p < 0,001$) и мутационного давления ($r = -0,81 \pm 0,207$; $p < 0,001$). Сходная зависимость между насыщенностью гуанином и цитозином и содержанием ПТК была получена по 59 мРНК, кодирующим аденилатциклазы различных бактерий (спирохет, актиномицетов и др.) [65]. Для мембраносвязанных аденилатциклаз многоклеточных животных была показана иная закономерность, заключающаяся в росте в процессе эволюции ГЦ-насыщенности кодирующих их мРНК, сопряженном с уменьшением частоты использования претерминальных кодонов [2].

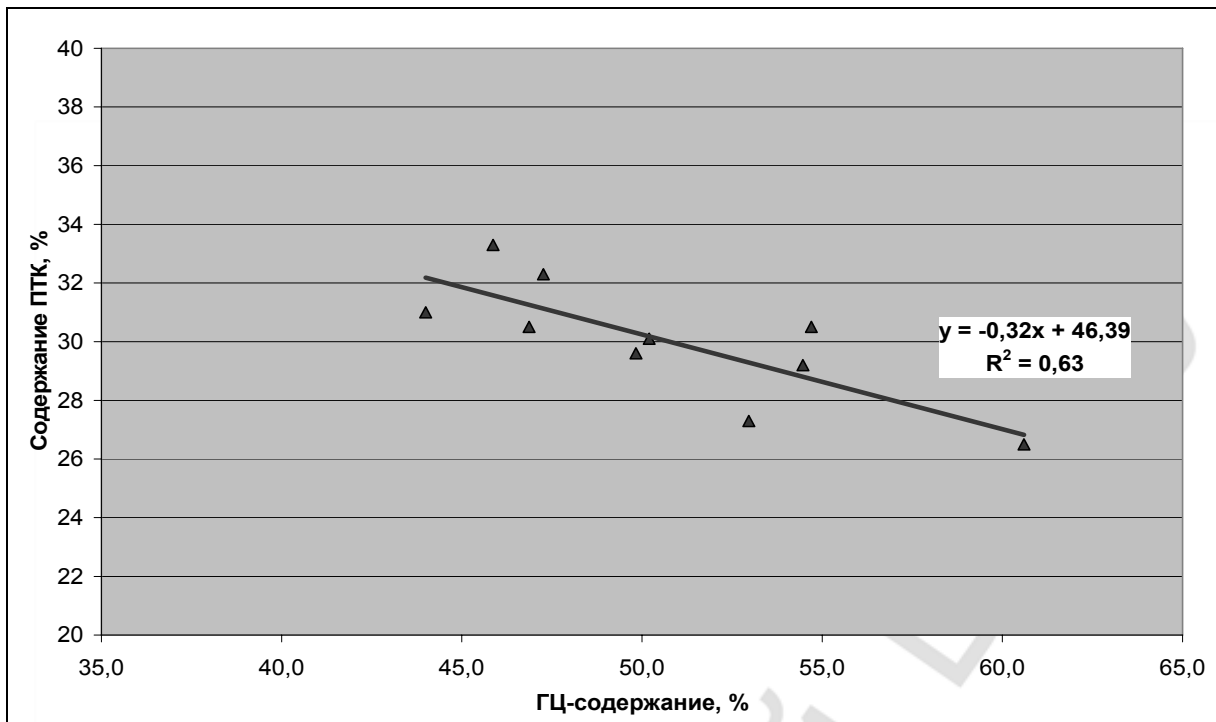


Рис. 5.3. Зависимость между ГЦ-насыщенностью и содержанием претерминальных кодонов в мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых

Анализ собственных данных и данных литературы позволяет предположить, что содержание ПТК контролируется естественным отбором в малой степени, поскольку в обратном случае оно должно было бы уменьшаться в процессе эволюции. По-видимому, данный показатель преимущественно обусловлен ГЦ-насыщенностью.

Определим зависимость содержания гуанина и цитозина в каждом из положений нуклеотида в кодоне от общей ГЦ-насыщенности мРНК, кодирующей АДГ3 хордовых (рис. 5.4)

На рисунке 5.4 виден различной степени выраженности линейный рост ГЦ-содержания в каждом из положений кодона. Наибольший наклон (3,18) характерен для тренда, построенного по значениям ГЦ3, меньший (0,71) — для тренда, построенного по значениям ГЦ1, а наименьший (0,14) — для тренда, соответствующего ГЦ2-содержанию.

Данный график соответствует классическому и предварительно полученному нами по экзонам гена АДГ3 человека и поэтому может быть объяснен аналогичным образом. Вместе с тем данная диаграмма лишней раз подтверждает правильность выдвинутых нами предположений об эволюционной сформированности генов (и, соответственно, мРНК) АДГ 3-го класса. Еще одним способом подтверждения выдвинутой нами гипотезы является определение нейтральности замен нуклеотидов в изучаемых мРНК, что сделано нами ниже.

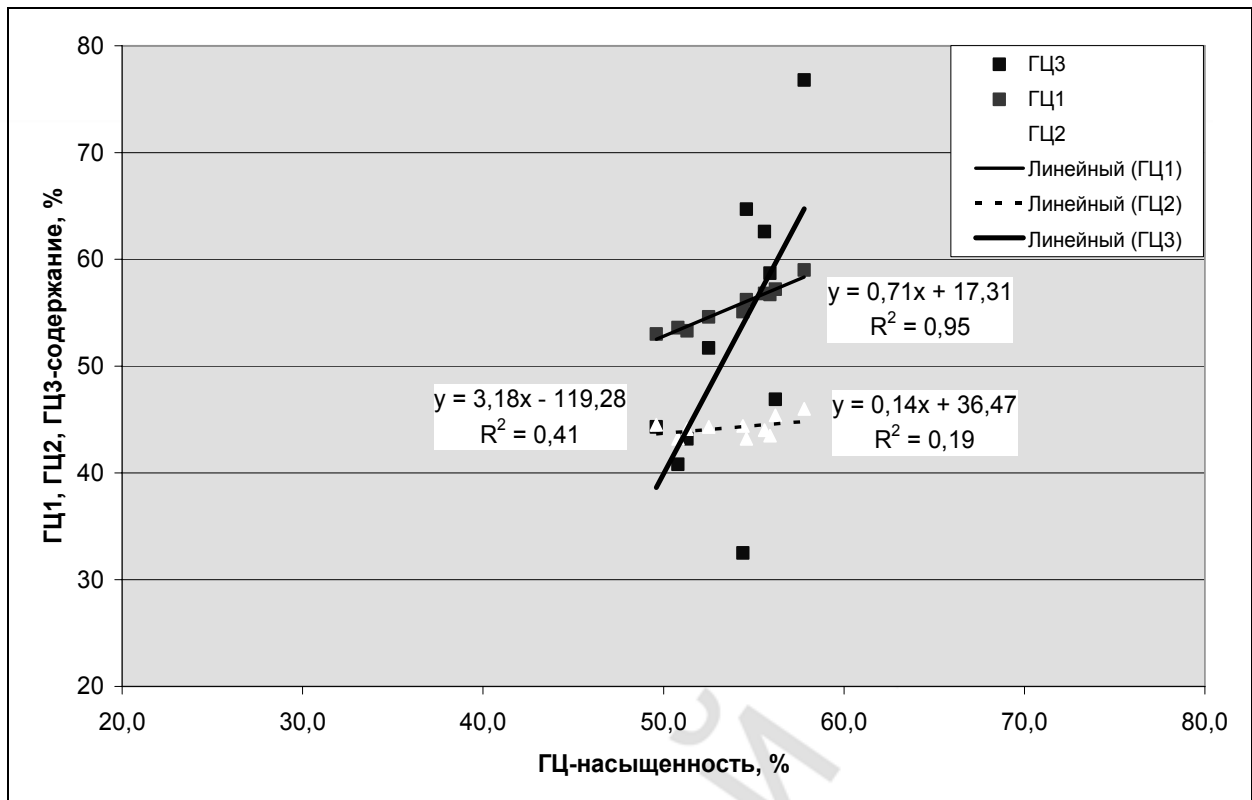


Рис. 5.4. Зависимость ГЦ-содержания в первом, втором и третьем положениях нуклеотида в кодоне от общей ГЦ-насыщенности мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых

5.2. Влияние мутационного давления и ГЦ-насыщенности матричных РНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 3-го класса хордовых, на использование кодонов и аминокислотный состав

Первоначально определим влияние мутационного давления, а также содержания гуанина и цитозина на значения RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов в мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Показатели корреляции значений мутационного давления и ГЦ-содержания со значениями RSCU для ГЦЗ-кодонов в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых

Аминокислота	Фен	Вал	Арг	Лей	Сер	Про	Тре	Ала	Гли
GC3-кодоны	УУЦ	ГУЦ ГУГ	ЦГЦ ЦГГ АГГ	УУГ ЦУЦ ЦУГ	УЦЦ УЦГ АГЦ	ЦЦЦ ЦЦГ	АЦЦ АЦГ	ГЦЦ ГЦГ	ГГЦ ГГГ
$r \pm m$ для μD и RSCU	$0,86 \pm 0,180^*$	$0,82 \pm 0,202^*$	$0,64 \pm 0,272^*$	$0,65 \pm 0,268^*$	$0,71 \pm 0,250^*$	$0,86 \pm 0,181^*$	$0,84 \pm 0,190^*$	$0,59 \pm 0,285^*$	$0,91 \pm 0,144^*$
$r \pm m$ для GC и RSCU	$0,82 \pm 0,204^*$	$0,82 \pm 0,203^*$	$0,72 \pm 0,247^*$	$0,74 \pm 0,238^*$	$0,76 \pm 0,231^*$	$0,84 \pm 0,191^*$	$0,87 \pm 0,173^*$	$0,63 \pm 0,273^*$	$0,92 \pm 0,136^*$

Аминокислота	Лиз	Асн	Глн	Асп	Гис	Глу	Иле	Цис	Тир
GC3-кодоны	ААГ	ААЦ	ЦАГ	ГАЦ	ЦАЦ	ГАГ	АУЦ	УГЦ	УАЦ
$r \pm m$ для μD и RSCU	0,87 ± 0,176*	0,72 ± 0,244*	0,54 ± 0,298	0,87 ± 0,172*	0,76 ± 0,228*	0,85 ± 0,189*	0,86 ± 0,182*	0,83 ± 0,199*	0,85 ± 0,184*
$r \pm m$ для GC и RSCU	0,90 ± 0,153*	0,71 ± 0,248*	0,52 ± 0,301	0,89 ± 0,162*	0,79 ± 0,218*	0,87 ± 0,174*	0,88 ± 0,166*	0,79 ± 0,217*	0,83 ± 0,199*

* Достоверные корреляционные связи ($p < 0,05$).

Установлено, что между значениями мутационного давления, а также ГЦ-насыщенностью изучаемых последовательностей мРНК и значениями RSCU для синонимичных ГЦ3-кодонов существуют достоверные прямые корреляционные связи (за исключением кодонов, соответствующих глутамину). При сравнении полученных данных с таковыми по АДГ человека (см. гл. 3) становится понятно, что в данном случае положительные корреляционные связи обусловлены взаимными заменами гуанина и цитозина на аденин и тимин в третьем положении кодонов соответствующего участка молекулы ДНК.

Понятно, что при АУ-давлении значения RSCU для синонимичных ГЦ3-кодонов будут уменьшаться, поскольку уменьшается содержание гуанина и цитозина. Перейдем к определению влияния на аминокислотный состав алкогольдегидрогеназ 3-го класса хордовых животных (ционы, ланцетника, данио, лягушки, мыши, кролика и человека) ГЦ-насыщенности кодирующих их мРНК. Сопоставим суммарное содержание GARP (глицина, аланина, аргинина и пролина) и FYMINK (фенилаланина, тирозина, метионина, изолейцина, аспарагина и лизина) в последовательностях АДГ3 с содержанием гуанина и цитозина в соответствующих мРНК (рис. 5.5).

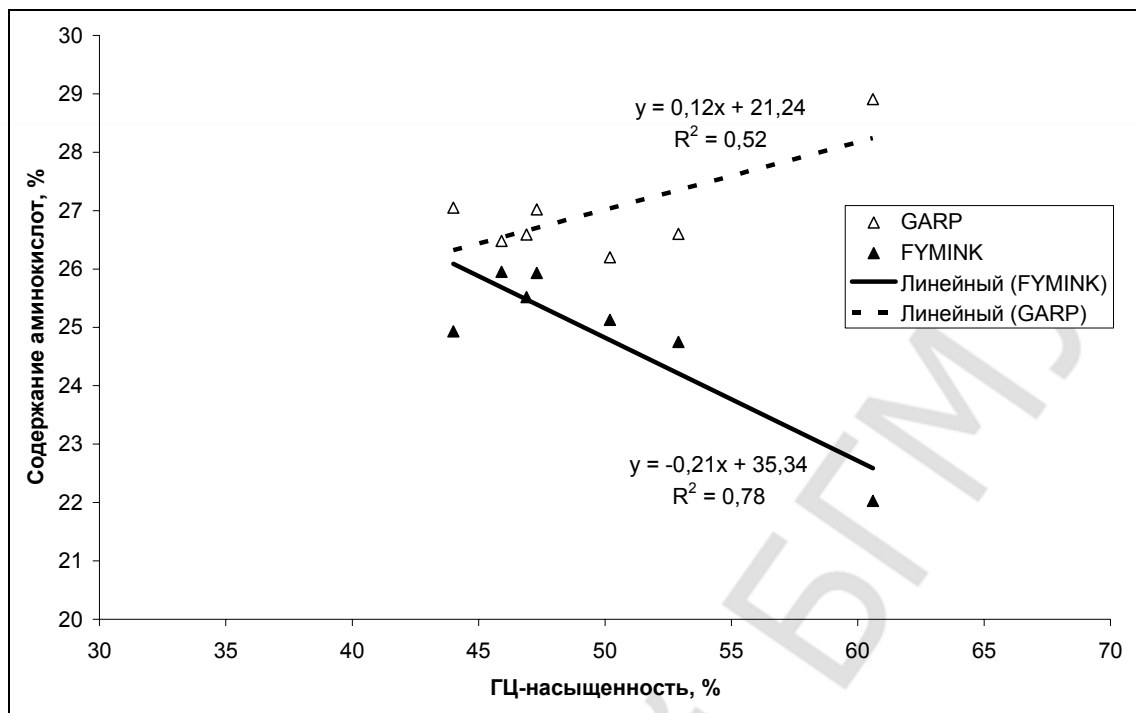


Рис. 5.5. Зависимость содержания GARP и FYMINK в АДГ 3-го класса хордовых от ГЦ-насыщенности кодирующих их мРНК

Установлено, что с ростом ГЦ-насыщенности изучаемых мРНК наблюдается линейный рост содержания аминокислот группы GARP ($r = 0,72 \pm 0,310$; $p < 0,05$) и линейное падение содержания аминокислот группы FYMINK ($r = -0,88 \pm 0,211$; $p < 0,001$). Аналогичная закономерность была получена и для 85 совокупностей кодирующих участков бактериальных мРНК и 74 совокупностей кодирующих участков двухцепочечных РНК-вирусов [3, 64].

Данное наблюдение можно объяснить тем, что все четырехкратно вырожденные серии кодонов, кодирующих глицин, аланин, аргинин и пролин, являются абсолютно ГЦ-насыщенными или ГЦ-насыщенными по первому и второму положениям (за исключением кодонов АГА и АГГ, соответствующих аргинину). Следовательно, с увеличением АУ-давления, наблюдаемым в мРНК АДГ3 в процессе эволюции, данные кодоны будут использоваться реже, что и обеспечит уменьшение содержания глицина, аланина, аргинина и пролина. Вместе с тем аминокислоты группы FYMINK кодируются либо абсолютно ГЦ-бедными, либо относительно ГЦ-богатыми кодонами. И поэтому с увеличением АУ-давления данные кодоны будут использоваться чаще, что приведет к увеличению содержания фенилаланина, тирозина, метионина, изолейцина, аспарагина и лизина.

Таким образом, уменьшение ГЦ-насыщенности мРНК, наблюдаемое в процессе эволюции АДГ 3-го класса хордовых, повлечет за собой уменьшение RSCU для синонимичных ГЦ3-кодонов, увеличение содержания аминокислот группы FYMINK и уменьшение содержания аминокислот группы GARP.

5.3. Взаимосвязь нейтральности замен нуклеотидов в первом и втором положениях кодона матричных РНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 3-го класса хордовых, с темпами их эволюционных изменений

Определим нейтральность замен нуклеотидов по первому и второму положениям кодона по методу Н. Суеоки (рис. 5.6).

На данном рисунке видно, что наклон линии тренда равен 0,0629. Этот показатель характеризует нейтральность замен нуклеотидов, возможных в первом и втором положениях кодона изучаемых мРНК, т. е. 6,3 % из них являются нейтральными, а на остальную часть замен (93,7 %) накладываются селективные ограничения.

Сопоставим данное значение нейтральности с таковым для мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса хордовых (рис. 5.7).

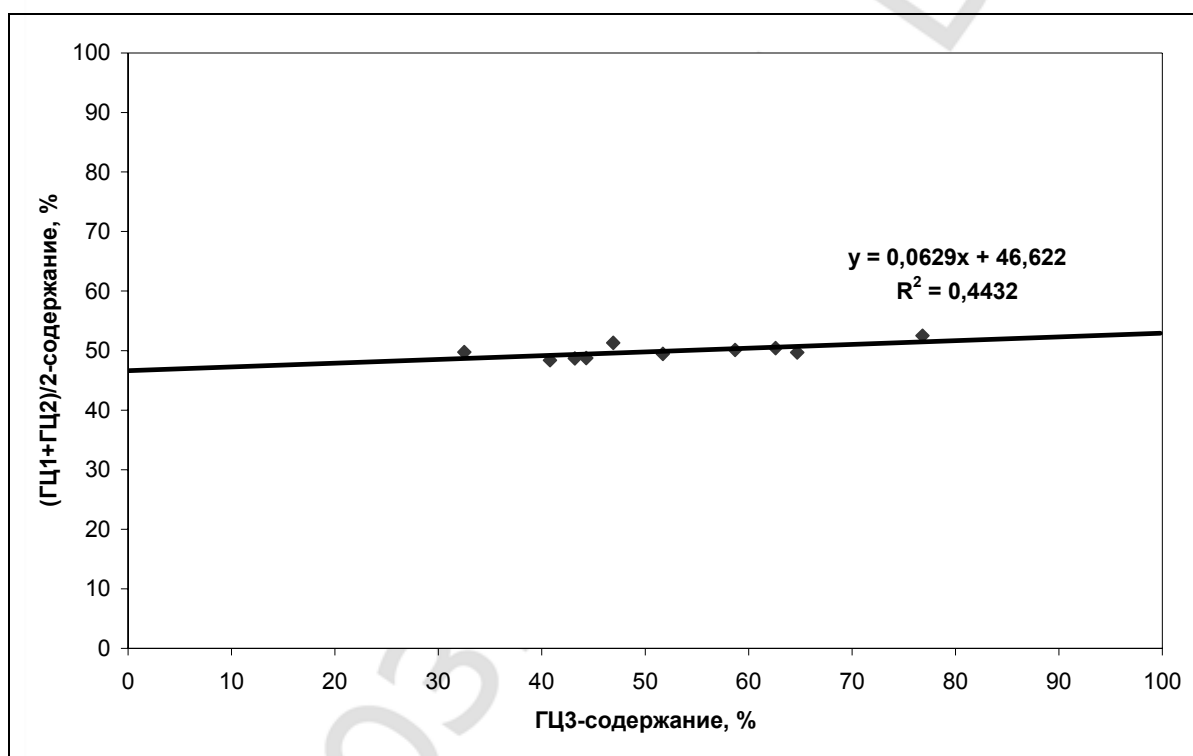


Рис. 5.6. Зависимость между (ГЦ1+ГЦ2)/2-содержанием и ГЦ3-насыщенностью мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых

Наклон тренда для мРНК, кодирующих АДГ1, составляет 0,097. Это означает, что нейтральность замен равна 9,7 %, а степень селективных ограничений составляет 90,3 %. Установленная бóльшая нейтральность замен в мРНК, соответствующих АДГ 1-го класса (по сравнению с АДГ3), служит экспериментальным подтверждением представлений М. Кимуры о том, что вероятность нейтральности мутационной замены гораздо меньше для субстрат-специфичных ферментов по сравнению с субстрат-неспецифичными [44].

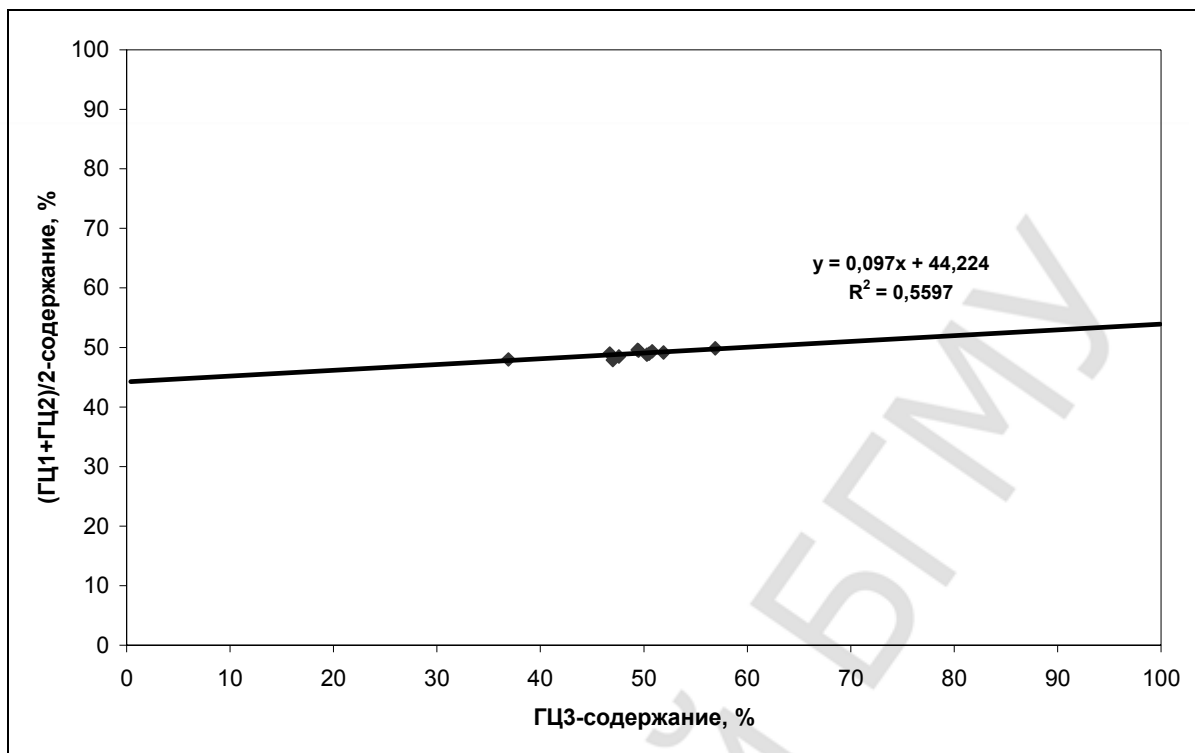


Рис. 5.7. Зависимость между (ГЦ1+ГЦ2)/2-содержанием и ГЦ3-насыщенностью мРНК, кодирующих АДГ 1-го класса хордовых

Следует отметить качественное отличие полученных данных от таковых, полученных другими исследователями. Так, Д. Гиллеспи и Ч. Лэнгли [118] была предпринята попытка подтвердить эти представления, сравнивая изменчивость моно- и полисубстратных ферментов дрозофилы, мыши и человека. Ими установлено, что субстрат-специфичным ферментам свойственна меньшая гетерозиготность по сравнению с субстрат-неспецифичными ферментами.

При сопоставлении полученных значений степени налагаемых на молекулы селективных ограничений с вычисленными в главе 4 скоростями эволюции аминокислотных последовательностей АДГ 1-го и 3-го классов (равные $0,55$ и $0,25$ По соответственно), а также кодирующих их мРНК ($0,60 \times 10^{-9}$ и $0,40 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год соответственно) установлено, что эти показатели связаны друг с другом по следующему принципу: чем выше значения нейтральности и меньше селективные ограничения, налагаемые на замены нуклеотидов по первым двум положениям кодона мРНК, тем выше темпы эволюционных изменений мРНК и соответствующего белка. Столь тесный характер взаимосвязи, с нашей точки зрения, позволяет утверждать, что полученные величины нейтральности и степени селективных ограничений применимы не только к первому и второму положению кодона мРНК, но и ко всей молекуле в целом. Если это так, то различия селективных (функциональных) ограничений должны быть связаны с различиями темпов и характера изменений наиболее функционально важных сайтов АДГ изучаемых классов (сайтов связывания субстратов, кофермента и ионов цинка). Действительно, в главе 4 нами обнаружено мень-

шее количество замен в функционально важных сайтах АДГ 3-го класса (по сравнению с АДГ1) и их более консервативный характер. Это подтверждает наличие четкой взаимосвязи между степенью селективных ограничений и скоростью эволюционных изменений генетических макромолекул. Более полному изучению рассматриваемой проблемы, безусловно, будет способствовать тщательная проверка данного наблюдения на большем числе белков и кодирующих их мРНК, что, вероятно, станет объектом наших исследований в ближайшем будущем.

5.4. Выводы

При анализе нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих АДГ 3-го класса хордовых, установлено, что значения показателей мутационного давления связаны достоверными прямыми сильными корреляционными связями с ГЦ-насыщенностью и ГЦЗ-содержанием. Обнаружено существование между показателями общей ГЦ-насыщенности и ГЦЗ-содержанием достоверной положительной сильной корреляционной связи. В ходе регрессионного анализа получено уравнение линейной зависимости данных показателей: $y = 2,62x - 80,74$ (y — ГЦЗ-содержание, x — ГЦ-насыщенность). В изучаемых последовательностях мРНК содержание претерминальных кодонов находится в обратной линейной зависимости от ГЦ-насыщенности ($r = -0,79 \pm 0,216$; $p < 0,001$), ГЦЗ-содержания ($r = -0,74 \pm 0,236$; $p < 0,001$) и мутационного давления ($r = -0,81 \pm 0,207$; $p < 0,001$). Анализ собственных данных и данных литературы по содержанию ПТК и ГЦ-насыщенности мРНК, кодирующих белки хордовых и бактерий, позволил предположить, что содержание претерминальных кодонов в малой степени контролируется отбором, являясь функцией ГЦ-насыщенности.

Динамика стратегии кодирования АДГ3 в мРНК хордовых заключается в уменьшении величины μ_D и изменении направления мутационного давления (с ГЦ на АУ), что приводит к снижению ГЦ-насыщенности, содержания гуанина и цитозина в третьем положении нуклеотида в кодоне, увеличению содержания претерминальных кодонов, уменьшению значений RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов, увеличению содержания аминокислот группы FYMINK и уменьшению содержания аминокислот группы GARP. Основным молекулярным механизмом изменения направления мутационного давления в изучаемых мРНК являются ЦГ→ТГ-мутации в экзонах соответствующих генов, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина. Нами показано, что часть мутаций в ЦГ-динуклеотидах может происходить по другим механизмам (ЦГ→ЦА и ТГ→ТА), что связано с высокой вероятностью транзиций.

Характер зависимости содержания гуанина и цитозина в каждом из положений кодона от общей ГЦ-насыщенности мРНК, кодирующих АДГ 3-го

класса хордовых, подтверждает выдвинутую нами гипотезу об эволюционной сформированности данного класса АДГ.

Для мРНК, кодирующих полисубстратные ферменты (АДГ1) хордовых, характерна бóльшая нейтральность замен по первому и второму положениям кодона (и, соответственно, меньшие селективные ограничения) по сравнению с мРНК, кодирующими моносубстратные ферменты (АДГ3). Между темпами эволюционных изменений аминокислотных последовательностей АДГ 1-го и 3-го классов, а также кодирующих их мРНК и селективными ограничениями, налагаемыми на замены в них, существует обратная связь. Для формулировки достоверных выводов о характере этой взаимосвязи необходимо определить нейтральность замен и темпы эволюционных изменений большего количества белков.

Г Л А В А 6

ТРАНЗИЦИИ И ТРАНСВЕРСИИ

В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ мРНК, А ТАКЖЕ ХАРАКТЕР АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ 1–4-Х КЛАССОВ ХОРДОВЫХ

Благодаря данным Э. Цукеркэндла и Л. Полинга, опубликованным еще в 1965 г., стало известно, что в ходе эволюции белков чаще всего происходят взаимные замены аминокислот, лишь незначительно отличающихся по структуре и свойствам. Позднее М. Кимура обобщил имеющиеся по этой проблеме многочисленные данные и сформулировал на их основании третье положение теории нейтральной молекулярной эволюции [44]. Это положение говорит о преимущественно консервативной природе мутационных замен, к которой предрасположен генетический код. Это свойство генетического кода, отмеченное Э. Цукеркэндлом и Л. Полингом, обусловлено тем, что замена одного основания в кодоне часто приводит к сходной аминокислоте или к синонимичному кодону.

Первым, кто исследовал консервативную природу замен, был Ч. Эпштейн, предложивший для этой цели коэффициент различия аминокислот по полярности и размеру [104]. В рамках теории нейтральной молекулярной эволюции природу консервативных замен легко объяснить, приняв во внимание, что чем меньше различия между взаимозаменяемыми аминокислотами, тем выше вероятность селективной эквивалентности соответствующих мутаций [44]. Следовательно, вероятность взаимозамены с селективно нейтральными последствиями выше для сходных аминокислот, а значит, такие замены, осуществляющиеся в ходе эволюции благодаря генетическому дрейфу, должны происходить чаще. Под генетическим дрейфом понимается флуктуация частот генов в популяции, вызванная воздействием стохастических факторов.

Однако, несмотря на преимущественно консервативную природу аминокислотных замен, для осуществления положительной дарвиновской эволюции необходимы радикальные изменения, носящие благоприятный характер и обуславливающие функциональные отличия модифицированного белка от исходного.

Характер аминокислотных замен определяется путем отнесения их к консервативным или радикальным. Данные литературы по аминокислотным последовательностям фибринопептидов А и В у парнокопытных свидетельствуют о том, что аминокислотные замены распределены по молекуле неравномерно; радикальные сконцентрированы в вариабельных участках, а консервативные — в инвариабельных [90].

Очевидно, что инвариабельным участком у ферментов является активный центр и его ближайшее окружение, т. к. практически любая замена аминокис-

лоты в них приведет к нарушению взаиморасположения каталитических остатков, что вызовет снижение или исчезновение специфической ферментативной активности. Конечно, крайне редко выявляются и радикальные замены в инвариабельном участке, но зачастую с ними связано появление новой ферментативной активности. Вариабельными являются участки аминокислотных последовательностей ферментов, расположенные вдали от активного центра. На замещения аминокислотных остатков в них налагаются меньшие структурно-функциональные ограничения. Таким образом, выявление большого количества (высокой доли) консервативных замен аминокислот в молекуле или ее участке свидетельствует о наличии жестких молекулярных ограничений и наоборот.

Следует подчеркнуть, что до настоящего времени объектами исследований, посвященных вопросам характера аминокислотных замен, являлись гемоглобин, миоглобин, инсулин, цитохром *c*, рибонуклеаза, аденилатциклаза, фибринопептиды, лизоцим и гистоны [2, 44, 90, 108]. Вопросы о том, характерны ли для представителей семейства алкогольдегидрогеназ аминокислотные замены, описанные для других белков, есть ли специфические закономерности динамики изменения характера аминокислотных замен в последовательностях АДГ, остается открытым.

В данной главе приведены сведения о синонимичных и несинонимичных заменах, транзициях и трансверсиях в нуклеотидных последовательностях мРНК, кодирующих АДГ 4-го класса мыши и человека; сведения о характере аминокислотных замен в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека, а также рассмотрена динамика изменений характера аминокислотных замен в последовательностях АДГ 3-го класса в широком филогенетическом ряду хордовых животных.

6.1. Несинонимичные и синонимичные мутации, транзиции и трансверсии в нуклеотидных последовательностях матричных РНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 4-го класса мыши и человека

В данной части нашей работы проведен анализ 138 одношаговых точечных мутаций, выявленных при сравнении нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 4-го класса мыши и человека. Данные последовательности сравнивались по 1122-м нуклеотидным сайтам, соответствующим 374-м кодонам (аминокислотным сайтам). В 92 сайтах этих двух последовательностей обнаружены различия по типу транзиции, а в 46 — по типу трансверсии. Таким образом, $P = 0,0820$ и $Q = 0,0410$, отсюда вычисленная по методу Кимуры эволюционная дистанция $d = 0,136 \pm 0,0103$ [20]. Поскольку грызуны и приматы дивергировали около 110 млн лет назад ($T = 0,11 \times 10^9$), то

скорость эволюции этих последовательностей будет равна $r_{\text{нукл}} = \frac{d}{2T} = 0,62 \times 10^{-9}$ замен на нуклеотидный сайт в год. Эта величина показывает общую скорость нуклеотидных 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 374 сайта, получены следующие значения: $P_1 = 0,0267$, $Q_1 = 0,0214$ и $d_1 = 0,050 \pm 0,0092$ (индекс 1 указывает, что значение d относится к первому положению кодонов). Для второго положения имеем $P_2 = 0,0160$, $Q_2 = 0,0107$, что дает $d_2 = 0,027 \pm 0,0069$. И, наконец, для третьего положения $P_3 = 0,2032$, $Q_3 = 0,0909$, теперь $d_3 = 0,394 \pm 0,0409$, что превышает значения d_1 и d_2 . Исходя из этих данных, получаем соотношение $d_3 > d_1 > d_2$, из которого видно, что наибольшая скорость мутационных замен характерна для третьего положения кодонов, меньшая — для первого и наименьшая — для второго. Эта закономерность была получена нами ранее и для последовательностей мРНК, кодирующих аденилатциклазы VII типа мыши и человека, а к ее объяснению можно приступить только после анализа скоростей синонимических и несинонимических мутационных замен.

Теперь оценим синонимическую компоненту эволюционной дистанции по третьему положению. Вычисление ее дает $d_s = 0,344 \pm 0,0417$. Скорость эволюции по трем положениям кодонов и для синонимической компоненты составляет $r_1 = 0,23 \times 10^{-9}$, $r_2 = 0,12 \times 10^{-9}$ и $r_3 = 1,79 \times 10^{-9}$, а $r_s = 1,56 \times 10^{-9}$ на нуклеотидный сайт в год.

При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих АДГ 4-го класса мыши и человека, получено следующее отношение числа трансверсий к числу транзиций $q = 46/92 = 0,50$. Для нахождения относительных вероятностей трансверсий и транзиций необходимо найти их возможные числа согласно таблице генетического кода. Всего возможно $64 \times 9 = 576$ однократных замещений в кодонах. Из них в 50 замещениях фигурируют терминальные кодоны, 134 замены являются синонимичными и 392 — несинонимичными. При рассмотрении 526 мутаций, включающих синонимичные и несинонимичные замены, 350 были трансверсиями и 176 — транзициями. Их соотношение равно $p = 350 / 176 = 1,99$. По формуле (2.22) находим средние относительные вероятности трансверсий (w) и транзиций ($1 - w$) и получаем $w = 0,20$; $1 - w = 0,80$. Транзиции в 4 раза более вероятны, чем трансверсии.

Теперь оценим относительные вероятности отдельных несинонимичных и синонимичных замен в кодонах мРНК. Данные о мутациях n_M , полученные при сравнительном анализе выровненных нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 4-го класса мыши и человека, приведены в таблице 6.1. В ней также приведены данные кодовой таблицы n_K и относительные вероятности отдельных замен w_i , полученные при сравнении значений n_M и n_K .

$$w_i \frac{n_K}{526} = \frac{n_M}{138}$$

Таблица 6.1

Числа наблюдаемых и следующих из кодового словаря мутаций, а также относительные вероятности замещения нуклеотидов w_i при сравнительном анализе мРНК, кодирующих АДГ 4-го класса мыши и человека

Заменяемый нуклеотид	Заменяющий нуклеотид											
	А			Г			Ц			У		
	n_M	n_K	w_i	n_M	n_K	w_i	n_M	n_K	w_i	n_M	n_K	w_i
А	—	—	—	12	43	0,09	5	44	0,04	4	41	0,03
Г	33	43	0,24	—	—	—	2	46	0,01	9	44	0,07
Ц	10	44	0,07	7	46	0,05	—	—	—	28	45	0,20
У	7	41	0,05	2	44	0,01	19	45	0,13	—	—	—

Примечание. Транзиции выделены жирным шрифтом; значения w_i нормированы к единице.

Из этой таблицы видно, что вероятности транзиций А↔Г (0,24 + 0,09 = 0,33) и Ц↔У, (0,13 + 0,20 = 0,33) равны, но превосходят вероятности трансверсий А↔Ц, А↔У, Г↔Ц, Г↔У. Очевидно, что найденные таким образом вероятности w_i характеризуют именно сравниваемые мРНК, а не кодируемые ими белки.

Для характеристики аминокислотных последовательностей АДГ 4-го класса мыши и человека были проанализированы только одношаговые несинонимичные замены нуклеотидов в кодирующих их мРНК. Всего выявлена 31 такая замена, из которых трансверсий — 18, а транзиций — 13. Исходя из этих данных, получаем отношение количества трансверсий к количеству транзиций $q = 1,38$. Согласно таблице генетического кода, из 392 несинонимических замен 116 являются трансверсиями, а 276 — транзициями. Отсюда $p = 2,38$. Подставляя данные значения q и p в формулу, имеем $w = 0,37$, $1 - w = 0,63$. Транзиции для синонимичных замен приблизительно в 1,7 раза более вероятны, чем трансверсии.

Поскольку общее число несинонимичных замен нуклеотидов в кодонах мРНК, соответствующих АДГ4 мыши и человека, равно числу аминокислотных замен, обусловленными одношаговыми заменами в кодонах, в кодируемых ими аминокислотных последовательностях, то, воспользовавшись формулами, получаем $d = 0,088 \pm 0,0155$ и $r_{\text{аминокисл.}} = 0,40 \times 10^{-9}$ на сайт в год.

При сопоставлении $r_{\text{нукл.}} (0,62 \times 10^{-9})$ и $r_{\text{аминокисл.}} (0,40 \times 10^{-9})$ видно, что скорость замен нуклеотидов мРНК приблизительно в 1,5 раза больше таковой для аминокислот, что обусловлено относительно высокой долей синонимичных замен от общего числа замен нуклеотидов.

Для несинонимичных замен $P = 0,0116$, $Q = 0,0160$, откуда $d = 0,028 \pm 0,0034$ и $r_{\text{нукл.}} = 0,13 \times 10^{-9}$ на сайт в год. Последняя величина отображает общую скорость несинонимичных замен в трех положениях кодонов. Для первого положения (7

транзиций и 8 трансверсий) $P_1 = 0,0187$, $Q_1 = 0,0214$ и $d_1 = 0,041 \pm 0,0076$, $r_1 = 0,19 \times 10^{-9}$ на сайт в год. Для второго положения (6 транзиций и 4 трансверсии) имеем $P_2 = 0,0160$, $Q_2 = 0,0107$, что дает $d_2 = 0,027 \pm 0,0069$ и $r_2 = 0,12 \times 10^{-9}$ на сайт в год. Для третьего положения (транзиции отсутствуют, 6 трансверсий) — $P_3 = 0$, $Q_3 = 0,0160$, тогда $d_3 = 0,016 \pm 0,0016$ и $r_3 = 0,07 \times 10^{-9}$ на сайт в год.

В соответствии с полученными данными имеем соотношение $r_1 > r_2 > r_3$, из которого следует, что наибольшая скорость несинонимичных замен характерна для первого положения нуклеотида в кодоне, промежуточная — для второго, а наименьшая — для третьего [19]. Данная закономерность может быть объяснена только после анализа характера аминокислотных замен.

В таблице 6.2 приведены данные о несинонимичных мутациях n_M , полученные при анализе сравниваемых нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих АДГ 4-го класса мыши и человека, данные кодовой таблицы n_K и относительные вероятности отдельных замещений w_i , полученные из соотношения:

$$w_i \frac{n_K}{392} = \frac{n_M}{31}.$$

Точно такие же данные могут быть получены при сравнении соответствующих аминокислотных последовательностей.

Таблица 6.2

Числа наблюдаемых несинонимичных мутаций, числа несинонимичных мутаций, следующие из кодового словаря, и относительные вероятности замещения нуклеотидов w_i при сравнительном анализе мРНК, кодирующих АДГ 4-го класса мыши и человека

Заменяемый нуклеотид	Заменяющий нуклеотид											
	А			Г			Ц			У		
	n_M	n_K	w_i	n_M	n_K	w_i	n_M	n_K	w_i	n_M	n_K	w_i
А	—	—	—	1	31	0,03	3	33	0,10	0	32	0
Г	9	31	0,30	—	—	—	1	38	0,03	3	35	0,09
Ц	4	33	0,13	4	38	0,11	—	—	—	2	27	0,08
У	2	32	0,07	1	35	0,03	1	27	0,04	—	—	—

Примечание. Транзиции выделены жирным шрифтом; значения w_i нормированы к единице.

Из приведенных данных видно, что вероятности транзиций $A \leftrightarrow G$ ($0,30 + 0,03 = 0,33$) существенно превосходят вероятности транзиций $C \leftrightarrow U$, ($0,04 + 0,08 = 0,12$) и трансверсий $A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow U$, $G \leftrightarrow C$, $G \leftrightarrow U$.

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

При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей мРНК, соответствующих АДГ 4-го класса мыши и человека найдено 107 замен, из которых транзиций — 79, а трансверсий — 28 ($q = 0,35$). Следует отметить, что

синонимичные мутации во втором положении для данных нуклеотидных последовательностей отсутствуют. Тогда, $w = 0,22$ и $1 - w = 0,78$. Таким образом, транзиции приблизительно в 3,5 раза более вероятны, чем трансверсии.

Получаем $P = 0,0704$, $Q = 0,0250$, $d = 0,104 \pm 0,0092$ и $r_{\text{нукл}} = 0,47 \times 10^{-9}$ на сайт в год. Таким образом, скорость синонимичных замен ($0,47 \times 10^{-9}$) в 3,6 раза выше таковой для несинонимичных замен ($0,13 \times 10^{-9}$).

Для первого положения (3 транзиции, трансверсии отсутствуют) $P_1 = 0,0080$, $Q_1 = 0$ и $d_1 = 0,008 \pm 0,0047$, $r_1 = 0,04 \times 10^{-9}$ на сайт в год. Для третьего положения (76 транзиций и 28 трансверсий) — $P_3 = 0,2032$, $Q_3 = 0,0749$, тогда $d_3 = 0,369 \pm 0,0397$ и $r_3 = 1,68 \times 10^{-9}$ на сайт в год. Скорость синонимичных замен по третьему положению кодонов в 42 раза выше таковой по первому положению.

Легко рассчитать, что скорость синонимичных замен по первому положению ($0,04 \times 10^{-9}$) приблизительно в 5 раз ниже скорости несинонимичных замен по тому же положению ($0,19 \times 10^{-9}$), а по третьему положению ($1,68 \times 10^{-9}$), наоборот, в 24 раза выше таковой для несинонимичных замен ($0,07 \times 10^{-9}$).

Тот факт, что средняя скорость синонимичных замен выше, чем несинонимичных для разных генов был установлен рядом исследователей. Полученное нами расчетное значение синонимической компоненты замен в третьем положении составляет $r_s = 1,56 \times 10^{-9}$ на нуклеотидный сайт в год, а истинная скорость синонимических замен по третьему положению нуклеотидов в кодоне равна $1,68 \times 10^{-9}$ на сайт в год. Эти величины незначительно отличаются друг от друга.

Рассмотрим относительные вероятности отдельных замещений w_i (табл. 6.3), рассчитанные по формуле:

$$w_i \frac{n_K}{134} = \frac{n_M}{107}.$$

Таблица 6.3

Числа наблюдаемых синонимичных мутаций, числа синонимичных мутаций, следующие из кодового словаря, и относительные вероятности замещения нуклеотидов w_i при сравнительном анализе мРНК, кодирующих АДГ 4-го класса мыши и человека

Заменяемый нуклеотид	Заменяющий нуклеотид											
	А			Г			Ц			У		
	n_M	n_K	w_i	n_M	n_K	w_i	n_M	n_K	w_i	n_M	n_K	w_i
А	—	—	—	12	12	0,10	5	11	0,05	4	9	0,05
Г	24	12	0,20	—	—	—	2	8	0,03	9	9	0,10
Ц	6	11	0,06	7	8	0,09	—	—	—	28	18	0,16
У	5	9	0,06	2	9	0,02	19	18	0,11	—	—	—

Примечание. Транзиции выделены жирным шрифтом; значения w_i нормированы к единице.

Для синонимичных замен вероятности трансверсий $A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow U$, $G \leftrightarrow C$, $G \leftrightarrow U$ (0,43) приблизительно в 1,3 раза меньше вероятностей транзиций (0,57). Следует отметить, что в отличие от несинонимичных замен вероятности транзиций $A \leftrightarrow G$ (0,30) и $C \leftrightarrow U$ (0,27) примерно равны.

Все приводящие к терминальным кодомам мутации могут быть разделены на 8 классов. К первому классу относится одна трансверсия $A \rightarrow U$ в кодонах AAA, AAG, AGA ко второму — одна трансверсия $U \rightarrow A$ в кодонах UUG, UGU, к третьему — одна трансверсия $G \rightarrow U$ в кодонах GAA, GAG, GGA, к четвертому — одна трансверсия $C \rightarrow A$ в кодонах UCG и UGC. Пятый класс представлен двумя трансверсиями $U \rightarrow G$ и $U \rightarrow A$ в кодонах UUA, UAU, шестой — одной транзицией $C \rightarrow U$ в кодонах ЦАА, ЦГА, ЦАГ, седьмой — двумя трансверсиями $C \rightarrow G$ и $C \rightarrow A$ в кодонах УЦА, УАЦ и, наконец, восьмой класс — двумя транзициями $G \rightarrow A$ в кодоне УГГ. Средняя относительная вероятность приводящих к терминальным кодомам мутаций 1-го класса равна $W = 0,04 \pm 0,01$, второго — $W = 0,07 \pm 0,01$, третьего — $0,05 \pm 0,01$ и четвертого — $W = 0,07 \pm 0,01$. Аналогичный показатель для пятого класса составляет $W = 0,05 + 0,07 = 0,12$, для шестого — $W = 0,22 \pm 0,01$, для седьмого — $W = 0,06 + 0,07 = 0,13$ и, наконец, для восьмого класса — $0,18 + 0,18 = 0,36$. Наименьшая относительная вероятность приводящих к терминальным кодомам мутаций характерна для 1-го класса ($W = 0,04$), а наибольшая — для восьмого класса ($W = 0,36$) [25]. Следовательно, вероятность терминальной мутации при замещении нуклеотида в самом «опасном» кодоне УГГ (кодирующем триптофан) в 9 раз больше, чем в кодонах первого класса.

6.2. Характеристика одно- и многошаговых аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ 1–4-х классов мыши и человека

Известно, что аминокислотная замена может быть обусловлена замещением одного (одношаговая замена), двух (двухшаговая замена) и трех нуклеотидов в кодоне (трехшаговая замена). Количество наблюдаемых одно- (n_{dI}), двух- (n_{dII}) и трехшаговых (n_{dIII}) аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ 1–4-х классов мыши и человека приведено в таблице 6.4.

Из приведенных данных видно, что большая часть замен ($58,6 \pm 2,61$ %) в изучаемых аминокислотных последовательностях АДГ является одношаговыми, что согласуется с данными других исследователей. По этой причине анализ характера аминокислотных замещений следует начинать с изучения характера одношаговых аминокислотных замен. Еще одной причиной является и то, что из 190 всевозможных пар взаимозаменяемых аминокислотных остатков 75 ($39,5 \pm 3,55$ %) связаны одним мутационным шагом.

Количество одно-, двух- и трехшаговых аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ 1–4-х классов мыши и человека

Класс АДГ	1А	1В	1С	2	3	4	Всего
n _{dI}	33	33	30	61	20	31	208
n _{dII}	24	25	22	35	6	8	120
n _{dIII}	6	5	4	9	1	2	27
общее, n _d	63	63	56	105	27	41	355

Известно, что опасность мутации для биологической функции белка тем больше, чем меньше значения коэффициента Снита, показателя ФБА и дистанции Грэнтсема для взаимозаменяемых остатков. Подразделение одношаговых аминокислотных замен на консервативные и радикальные производится следующим образом: если для аминокислотной замены $\phi > 0,416$; ФБА $> 12,4$ и GD $> 57,9$, то она считается консервативной (эти величины получены исходя из предположения о произвольном замещении любого остатка на любой без учета кодирования). Средние значения коэффициента Снита, показателя ФБА и дистанции Грэнтсема, а также процент консервативных одношаговых аминокислотных замен в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека представлены в таблице 6.5.

Таблица 6.5

Показатели консервативности для одношаговых аминокислотных замен в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека

Класс АДГ	1А	1В	1С	2	3	4	Среднее
$\phi \pm SE$	$0,61 \pm 0,03$ (90,9 % ⁴)*	$0,61 \pm 0,03$ (87,9 %)	$0,64 \pm 0,03$ (93,3 % ⁴)*	$0,62 \pm 0,03$ (82,0 %)	$0,66 \pm 0,04$ (95,0 % ⁴)*	$0,57 \pm 0,04$ (67,7 % ^{1A,1C,3})*	$0,61 \pm 0,01$ (85,1 %)
ФБА $\pm SE$	$23,91 \pm 1,53$ (87,9 %)	$24,03 \pm 1,56$ (81,8 %)	$25,83 \pm 1,53$ (90,0 %)	$22,75 \pm 1,15$ (80,3 %)	$24,25 \pm 1,59$ (90,0 %)	$21,77 \pm 1,73$ (83,9 %)	$23,58 \pm 0,61$ (84,6 %)
GD $\pm SE$	$72,58 \pm 2,27$ (90,9 % ⁴)*	$74,48 \pm 2,12$ (84,8 %)	$74,53 \pm 2,07$ (86,7 %)	$74,30 \pm 1,86$ (86,9 %)	$80,00 \pm 2,63$ ⁴ *	$70,58 \pm 3,24$ ³ *	$73,92 \pm 0,96$ (85,1 %)

Примечание. В скобках указан процент консервативных замен.

* Статистически достоверные ($p < 0,05$) различия с соответствующим изоферментом.

Для изучаемых аминокислотных последовательностей АДГ средние значения коэффициента Снита и дистанции Грэнтсема незначительно варьируют, максимальные значения характерны для АДГ 3-го класса ($0,66 \pm 0,04$ и $80,00 \pm 2,63$ соответственно), а минимальные ($0,57 \pm 0,04$ и $70,58 \pm 3,24$ соответственно) — для АДГ 4-го класса. Наименьшее значение показателя ФБА также отмечается у АДГ 4-го класса ($21,77 \pm 1,73$), а наибольшее — у АДГ класса 1С ($25,83 \pm 1,53$).

Наиболее высокий процент консервативных замен в соответствии с коэффициентом Снита характерен для АДГ классов 1С и 3 (93,3 и 95,0 % соответственно), с ФБА — для классов 1С и 3 (по 90,0 %), с дистанцией Грэнтсема — для классов 1А и 3 (90,9 и 90,0 % соответственно). Наименьший процент консервативных замен в соответствии с коэффициентом Снита и дистанцией Грэн-

тсема наблюдается у АДГ 4-го класса (67,7 и 71,0 %), а в соответствии с показателем ФБА — у АДГ 2-го класса (80,3 %).

Для получения более корректных результатов следует рассчитать средний процент консервативных замен по трем показателям, т. к. коэффициент Снита и дистанция Грэнтсема учитывают лишь физико-химические свойства взаимозаменяемых аминокислот, а показатель Бачинского — лишь их биохимические свойства. Так для АДГ класса 1А средний процент консервативных замен равен 89,9 %, для 1В — 84,8 %, 1С — 90,0 %, 2-го класса — 83,1 %, 3-го класса — 91,7 % и, наконец, для 4-го класса — 74,2 %. Таким образом, замены в аминокислотных последовательностях алкогольдегидрогеназ 4-го класса наименее, а классов 1А, 1С и 3-го — наиболее консервативны. Эволюционная консервативность АДГ3 обусловлена универсальностью катализа глутатионзависимого окисления формальдегида, лежащего в основе многих процессов переноса одноуглеродных остатков.

В зависимости от положения нуклеотида в кодоне, в котором произошла мутация, одношаговые аминокислотные замены подразделяются на 3 группы (обусловленные заменой в первом (n_1), втором (n_2) и третьем положениях кодона (n_3)). Количество одношаговых аминокислотных замен в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека, обусловленных заменами в первом (n_{d11}), втором (n_{d12}) и третьем (n_{d13}) положениях кодона, показано в таблице 6.6.

Таблица 6.6

Количество одношаговых аминокислотных замен в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека, обусловленных заменами в первом, втором и третьем положениях кодона

Класс АДГ	1А	1В	1С	2	3	4	Всего
n_{d11}	18	18	17	34	12	15	114
n_{d12}	8	7	4	16	4	10	49
n_{d13}	7	8	9	11	4	6	45

Из приведенных в таблице 6.6 данных видно, что большая часть одношаговых замен обусловлена изменением нуклеотида в первом положении кодона (54,8 %), меньшая — во втором (23,6 %), а наименьшая — в третьем (21,6 %) [23]. Определим средние значения коэффициента Снита, показателя ФБА и дистанции Грэнтсема для одношаговых аминокислотных замен в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека в зависимости от положения кодона, в котором произошла замена (табл. 6.7).

Из приведенных в таблице 6.7 данных видно, что наибольшие значения коэффициента Снита и дистанции Грэнтсема характерны для замен в третьем положении нуклеотида в кодоне, меньшие — для первого, а наименьшие — для

второго. Максимальные значения ФБА наблюдаются при заменах в первом положении кодона, меньшие — в третьем, а минимальные — во втором.

Таблица 6.7

Средние значения показателей консервативности для одношаговых замен в первом, втором и третьем положениях кодона в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека

Показатель	Положение кодона		
	первое	второе	третье
$\phi \pm SE$	$0,62 \pm 0,02$ (89,5 % ³)*	$0,56 \pm 0,03^{3*}$ (81,6 %)	$0,67 \pm 0,03^{2*}$ (77,8 % ¹)*
ФБА $\pm SE$	$25,04 \pm 0,81^{2*}$ (90,4 % ³)*	$20,53 \pm 1,16^{1*}$ (79,6 %)	$23,20 \pm 1,35$ (75,6 % ¹)*
GD $\pm SE$	$74,67 \pm 1,36$ (86,0 %)	$71,67 \pm 1,83$ (87,8 %)	$75,22 \pm 1,99$ (80,0 %)

Примечание. В скобках указан процент консервативных замен.

* Статистически достоверные ($p < 0,05$) различия с соответствующим положением кодона.

Средний процент консервативных замен по трем показателям для первого положения нуклеотида в кодоне составляет 88,6 %, для второго — 83,0 % и для третьего — 77,8 %. Исходя из этого следует, что замены нуклеотидов в первом положении сопровождаются заменами на такие аминокислоты, физико-химические и функциональные свойства которых отличаются от свойств замещаемых кислот сильнее, чем в случае замен по второму и третьему положениям, что соответствует теории нейтральности. Можно также предположить, что именно высокая частота радикальных аминокислотных замен, связанных с мутациями в третьем положении нуклеотида в кодоне, обуславливает низкую скорость несинонимичных замен в этом положении. Кроме того, нами обнаружено существование четкой связи между долей консервативных замен и частотой замен в зависимости от положения нуклеотида в кодоне [22].

Перейдем к сравнению характера одно- и многошаговых аминокислотных замен. Для этого проанализируем средние значения дистанции Грэнтсема и процент консервативных замен в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека (табл. 6.8). При сравнении последовательностей АДГ 3-го класса мыши и человека обнаружена лишь одна трехшаговая замена, поэтому значение дистанции Грэнтсема для нее ($9,00 \pm n/calc$) не учитывалось при анализе.

Для одношаговых замен в изучаемых аминокислотных последовательностях АДГ средние значения дистанции Грэнтсема незначительно варьируют, максимальные значения характерны для АДГ 3-го класса ($80,00 \pm 2,63$), а минимальные ($70,58 \pm 3,24$) — для АДГ 4-го класса. Наименьшее значение GD для двухшаговых замен отмечается у АДГ 3-го класса ($60,50 \pm 8,55$), а трехшаговых — АДГ класса 1С ($38,50 \pm 6,06$). Наибольшее значение дистанции Грэнтсема по двухшаговым заменам характерно для АДГ1В и 4 ($68,44 \pm 3,75$ и $68,00 \pm 6,08$

соответственно), а по трехшаговым — для АДГ 4-го класса ($63,50 \pm 6,36$).

Таблица 6.8

Средние значения дистанции Грэнтсема для одно- и многошаговых аминокислотных замен и их стандартная ошибка в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека

Замены	Класс АДГ					
	1A	1B	1C	2	3	4
Одношаговые	$72,58 \pm 2,27$	$74,48 \pm 2,12$	$74,53 \pm 2,07$	$74,30 \pm 1,86$	$80,00 \pm 2,63^{4*}$	$70,58 \pm 3,24^{3*}$
Двухшаговые	$66,17 \pm 4,05$	$68,44 \pm 3,75$	$65,64 \pm 3,96$	$66,00 \pm 3,51$	$60,50 \pm 8,55$	$68,00 \pm 6,08$
Трехшаговые	$41,67 \pm 6,98^*$	$44,40 \pm 8,0$	$38,50 \pm 6,06^*$	$52,33 \pm 3,9$	$9,00 \pm n/calc$	$63,50 \pm 6,36^{1A, 1C*}$

* Статистически достоверные ($p < 0,05$) различия с соответствующим классом АДГ.

Из приведенных в таблице 6.8 данных видно, что для всех классов АДГ наибольшие значения дистанции Грэнтсема характерны для одношаговых замен, меньшие — для двухшаговых и наименьшие — для трехшаговых. Среднее значение GD для одношаговых замен, наблюдаемых во всех изучаемых алкогольдегидрогеназах, составило $73,92 \pm 0,96$, для двухшаговых — $66,33 \pm 1,72$ и для трехшаговых — $45,67 \pm 3,05$ (различия статистически достоверны, $p < 0,01$). Между значениями физико-химической дистанции и частотой замен в зависимости от их вида (одно-, двух- или трехшаговые) обнаружена четкая связь ($r = 0,97 \pm 0,243$; $p < 0,001$).

Определим, какой вид замен нуклеотидов определяет более консервативный и более радикальный характер аминокислотных замен. Для этого вычислим средние значения коэффициента Снита, показателя ФБА и дистанции Грэнтсема и процент консервативных замен для одношаговых замен аминокислот в последовательностях алкогольдегидрогеназ 1–4-х классов мыши и человека (табл. 6.9).

Таблица 6.9

Значения показателей консервативности одношаговых аминокислотных замен, наблюдаемых в последовательностях алкогольдегидрогеназ 1–4-х классов мыши и человека, в зависимости от вида произошедшей замены нуклеотида

Показатель	A↔Г n = 63	Ц↔У n = 15	A↔Ц n = 29	Г↔Ц n = 37	Г↔У n = 33	A↔У n = 31
φ ± SE	$0,66 \pm 0,03$ (87,3 %)	$0,51 \pm 0,04$ (73,3 %)	$0,54 \pm 0,03$ (86,2 %)	$0,65 \pm 0,03$ (81,1 %)	$0,55 \pm 0,03$ (87,9 %)	$0,67 \pm 0,03$ (87,1 %)
ФБА ± SE	$27,44 \pm 1,00$ (93,7 %)	$12,93 \pm 1,13$ (40,0 %)	$17,31 \pm 0,92$ (96,6 %)	$24,14 \pm 1,24$ (86,5 %)	$23,09 \pm 1,73$ (72,7 %)	$26,61 \pm 1,40$ (83,9 %)
GD ± SE	$81,94 \pm 0,97$ (96,8 %)	$63,27 \pm 4,08$ (93,3 %)	$73,55 \pm 2,36$ (89,7 %)	$72,78 \pm 2,03$ (83,8 %)	$66,55 \pm 3,18$ (48,5 %)	$73,42 \pm 2,29$ (87,1 %)

Примечание. В скобках указан процент консервативных замен.

Из приведенных в таблице 6.9 данных видно, что минимальные средние значения всех трех показателей консервативности отмечаются для транзиции Ц↔У (различия статистически достоверны по сравнению со средними значениями трех показателей для замен А↔Г, Г↔Ц, А↔У с $p < 0,05$). Наибольшая величина коэффициента Снита характерна для замен А↔Г, Г↔Ц и А↔У, а показателя ФБА — для замен А↔Г и А↔У. Максимальное значение дистанции Грэнтсема наблюдается для транзиции А↔Г, что достоверно выше ($p < 0,01$) таковых для всех остальных замен. Таким образом, судя по средним значениям показателей консервативности наиболее благоприятными являются замены аминокислот, обусловленные мутациями А↔Г, а наименее благоприятными — Ц↔У [26]. В этом контексте легко понять преобладание числа транзиций А↔Г над числом транзиций Ц↔У более, чем в 4 раза.

Средний процент консервативных замен аминокислот по трем показателям для транзиций А↔Г составил 96,2 %, для Ц↔У — 68,9 %, для трансверсий А↔Ц — 90,8 %, Г↔Ц — 83,8 %, Г↔У — 69,8 % и А↔У — 86,0 %. Эти данные наводят на мысль о том, что существует определенная взаимосвязь между частотой закрепленных мутаций нуклеотидов и процентом консервативных аминокислотных замен. Так в изучаемых последовательностях АДГ наблюдается большое количество ($n = 63$) вызванных транзициями А↔Г замен аминокислот, носящих высоко консервативный характер (92,6 % замен). И в то же время отмечается малое количество ($n = 15$) замен, связанных с транзициями Ц↔У и характеризующихся более низкой долей консервативных замен (68,9 %).

6.3. О динамике изменений характера аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ в филогенетическом ряду

Характер рассмотренных выше аминокислотных замен в последовательностях АДГ мыши и человека дает представление в первую очередь о том, замены в каком из классов АДГ являются наиболее консервативными или наиболее радикальными, т. е. на какой из изоферментов в процессе эволюции налагаются наибольшие структурно-функциональные ограничения.

Не менее важно оценить и динамику изменений характера замен аминокислот в последовательностях АДГ, выделенных из широкого филогенетического ряда организмов. Для этого можно воспользоваться двумя подходами: динамическим и шаговым. Динамический подход заключается в проведении попарных сравнений изучаемых последовательностей (нуклеиновых кислот или белков) с таковыми человека, что позволяет проанализировать динамику накопления замен в филогенетическом ряду. В основе широко использовавшегося в предыдущих исследованиях шагового подхода лежит сравнение изучаемых по-

следовательностей, выделенных из наиболее таксономически близких организмов (например, последовательности лягушки сравнивались с таковыми петуха, а последовательности петуха с таковыми мыши и т. д.).

Воспользовавшись динамическим подходом, определим количество наблюдаемых одно-, двух- и трехшаговых аминокислотных замен в последовательностях АДГ 3-го класса хордовых животных (табл. 6.10).

Таблица 6.10

Количество одно-, двух и трехшаговых аминокислотных замен, полученное с использованием динамического подхода, в последовательностях алкогольдегидрогеназ 3-го класса в филогенетическом ряду хордовых животных

Попарные сравнения	Н.с.- С.і.	Н.с.- В.ф.	Н.с.- S.a.	Н.с.- D.r.	Н.с.- O.і.	Н.с.- X.і.	Н.с.- G.g.	Н.с.- M.m.	Н.с.- O.c.	Общее
n _{дI}	31	17	17	20	19	18	21	20	15	178
n _{дII}	57	57	41	39	35	26	23	6	6	289
n _{дIII}	15	21	10	11	11	8	8	1	0	85
n _д	103	95	68	70	65	52	52	27	21	552

В филогенетическом ряду АДГ 3-го класса хордовых животных наблюдается 552 аминокислотные замены, причем доля двухшаговых замен ($52,4 \pm 2,13$ %) достоверно выше таковой для одно- ($32,2 \pm 1,99$ %) и трехшаговых ($15,4 \pm 1,54$ %) замен ($p < 0,01$). Сопоставим количество наблюдаемых одно-, двух- и трехшаговых замен с общепринятыми в молекулярной эволюции и эволюционной биохимии временами дивергенции основных таксономических групп организмов (рис. 6.1).

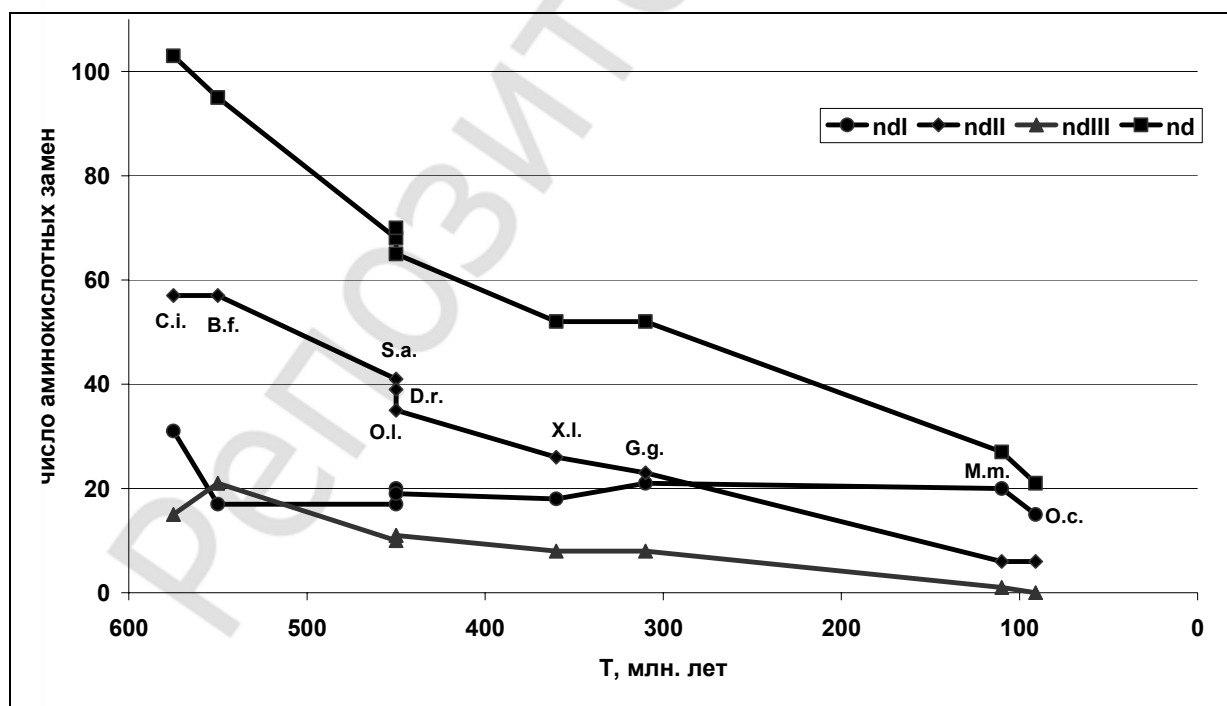


Рис. 6.1. Динамика изменений количества одно- и многошаговых аминокислотных замен, полученных с использованием динамического подхода, в последовательностях АДГ 3-го класса хордовых животных

На рисунке 6.1 видно, что общее количество аминокислотных замен в процессе эволюции постепенно уменьшается, что совпадает с данными других исследователей. Это уменьшение в большей степени обусловлено уменьшением количества двухшаговых и в меньшей степени — трехшаговых аминокислотных замен. Количество аминокислотных замен, связанных одним мутационным шагом, является приблизительно постоянным во всем изученном филогенетическом ряду АДГ 3-го класса хордовых животных. Это не согласуется с данными, полученными при анализе динамики изменений характера замен аминокислот других белков, где количество одношаговых аминокислотных замен возрастает с уменьшением филогенетического родства организмов, из которых они выделены.

Обнаруженную закономерность можно объяснить, исходя из трех позиций. Во-первых, несогласование данных может быть связано с различиями в подходах для оценки характера замен аминокислот в филогенетическом ряду. Во-вторых, возможно существование специфики характера аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ. В-третьих, как было показано выше, многошаговые замены являются более радикальными, а согласно данным Дж. Стеббинса [90], радикальные замены характерны преимущественно для вариабельных участков. Таким образом, уменьшение количества многошаговых замен в процессе эволюции может быть связано с уменьшением числа вариабельных (структурно и функционально маловажных) участков. Если это предположение справедливо, то средние значения показателей консервативности в процессе эволюции должны увеличиваться.

Рассмотрим подробно каждое из трех предположений для их подтверждения или опровержения. Первоначально с помощью шагового подхода определим число наблюдаемых в последовательностях АДГ 3-го класса хордовых животных одношаговых замен, а также вычислим средние значения показателей консервативности для них (табл. 6.11).

Таблица 6.11

Количество одношаговых аминокислотных замен и значения показателей консервативности для них, полученные с использованием шагового подхода, в последовательностях алкогольдегидрогеназ 3-го класса хордовых

Попарные сравнения	Число замен	$\phi \pm SE$	ФБА $\pm SE$	GD $\pm SE$	Средний процент консервативных замен, %
C.i. – B.f.	16	0,63 \pm 0,04 (81,3 %)	22,31 \pm 2,18 (93,8 %)	72,19 \pm 5,47 (81,3 %)	85,5
B.f. – D.r.	21	0,65 \pm 0,05 (90,5 %)	23,81 \pm 1,51 (95,2 %)	74,81 \pm 3,10 (90,5 %)	92,1
B.f. – O.l.	18	0,65 \pm 0,05 (88,9 %)	22,39 \pm 1,87 (88,9 %)	74,67 \pm 2,43 (94,4 %)	90,7
B.f. – S.a.	21	0,62 \pm 0,04 (81,0 %)	23,43 \pm 1,58 (95,2 %)	73,29 \pm 2,60 (85,7 %)	87,3

D.r. – X.l.	20	0,68 ± 0,05 (90,0 %)	24,05 ± 2,41 (80,0 %)	72,50 ± 4,50 (85,0 %)	85,0
O.l. – X.l.	17	0,64 ± 0,06 (82,4 %)	24,53 ± 2,38 (88,2 %)	71,94 ± 5,28 (82,4 %)	84,3

Окончание табл. 6.11

Попарные сравнения	Число замен	$\phi \pm SE$	ФБА ± SE	GD ± SE	Средний процент консервативных замен, %
S.a. – X.l.	13	0,67 ± 0,06 (84,6 %)	26,15 ± 2,29 (92,3 %)	75,31 ± 3,54 (84,6 %)	85,8
X.l. – G.g.	22	0,72 ± 0,03 (100,0 %)	28,27 ± 1,45 (95,5 %)	79,45 ± 2,27 (90,9 %)	95,5
G.g. – M.m.	13	0,63 ± 0,05 (84,6 %)	22,92 ± 2,74 (76,9 %)	75,69 ± 4,81 (84,6 %)	82,0
M.m. – O.c.	20	0,60 ± 0,03 (85,0 %)	22,35 ± 1,83 (85,0 %)	73,40 ± 3,12 (75,0 %)	81,7
O.c. – H.s.	15	0,55 ± 0,04 (80,0 %)	19,80 ± 2,25 (86,7 %)	66,47 ± 4,22 (60,0 %)	75,6

Примечание. В скобках указан процент консервативных замен.

При использовании шагового подхода нами обнаружено 196 одношаговых аминокислотных замен в изучаемых последовательностях АДГ 3-го класса. Из приведенных в таблице 6.11 данных следует, что полученное при попарных сравнениях количество одношаговых замен колеблется в незначительных пределах, не имеет тенденций к снижению или повышению и, следовательно, является приблизительно постоянной величиной. Это позволяет исключить различия, связанные с использованием разных подходов. Наименьшее значение среднего процента консервативных замен наблюдается при сравнении последовательностей АДГ 3-го класса человека и кролика (75,6 %), а наибольшее — лягушки и петуха (95,5 %). В общем, значения трех показателей консервативности и определенного по ним процента консервативных замен являются высокими и сильно отличаются от таковых для случайных замен аминокислот.

Воспользовавшись динамическим подходом, определим средние значения трех показателей консервативности с процентом консервативных замен в первую очередь для замен, связанных одним мутационным шагом (табл. 6.12).

Таблица 6.12

Значения показателей консервативности для одношаговых аминокислотных замен, полученные с использованием динамического подхода, в последовательностях АДГ 3-го класса в филогенетическом ряду хордовых животных

Попарные сравнения	H.s.-C.i.	H.s.-V.f.	H.s.-S.a.	H.s.-D.r.	H.s.-O.l.	H.s.-X.l.	H.s.-G.g.	H.s.-M.m.	H.s.-O.c.
$\phi \pm SE$	0,62 ± 0,03 (80,6 %)	0,63 ± 0,05 (94,1 %)	0,64 ± 0,05 (82,4 %)	0,62 ± 0,04 (95,0 %)	0,63 ± 0,05 (94,7 %)	0,56 ± 0,05 (83,3 %)	0,60 ± 0,05 (85,7 %)	0,66 ± 0,04 (95,0 %)	0,55 ± 0,04 (80,0 %)
ФБА ± SE	23,29 ± 1,38	26,41 ± 1,78	21,71 ± 2,36	25,00 ± 1,77	21,79 ± 1,77	22,11 ± 1,71	23,05 ± 1,99	24,59 ± 1,59	19,80 ± 2,25

	(93,5 %)	(100,0 %)	(82,4 %)	(95,0 %)	(84,2 %)	(94,4 %)	(85,7 %)	(90,0 %)	(86,7 %)
GD ± SE	76,23 ± 2,29 (83,9 %)	75,06 ± 2,59 (88,2 %)	74,65 ± 5,51 (82,4 %)	73,45 ± 2,98 (80,0 %)	78,26 ± 2,87 (89,5 %)	73,50 ± 3,28 (77,8 %)	75,10 ± 3,39 (76,2 %)	80,00 ± 2,63 (90,0 %)	80,00 ± 2,63 (60,0 %)

Примечание. В скобках указан процент консервативных замен.

Из приведенных в таблице 6.12 данных видно, что средние значения коэффициента Снита, показателя ФБА и дистанции Грэнтсема колеблются в пределах 0,55–0,66, 19,80–26,41 и 73,45–80,00 соответственно. При этом в изучаемом филогенетическом ряду отсутствуют тенденции к снижению или повышению средних значений показателей консервативности. А полученные значения также значительно отличаются от таковых для случайных замещений аминокислот, что свидетельствует о консервативной природе одношаговых аминокислотных замен в последовательностях АДГ 3-го класса хордовых животных.

Средний процент консервативных замен по трем показателям консервативности, наблюдаемых при сравнении последовательности алкогольдегидрогеназ 3-го класса человека с таковой ционы составил 86,0 %; ланцетника — 94,1 %; трех видов костных рыб — 82,4, 90,0 и 89,5 %; лягушки — 85,2 %; петуха — 82,5 %; мыши — 91,7 % и кролика — 75,6 %. Таким образом, для изучаемых последовательностей характерен высокий процент консервативных одношаговых аминокислотных замен и не обнаружены тенденции изменений этого показателя в процессе эволюции.

Сравним средние значения физико-химической дистанции для одно- и многошаговых аминокислотных замен в последовательностях АДГ 3-го класса хордовых животных (табл. 6.13).

Таблица 6.13

Средние значения дистанции Грэнтсема и их стандартная ошибка для одно-, двух- и трехшаговых аминокислотных замен, полученные с использованием динамического подхода, в последовательностях АДГ 3-го класса в филогенетическом ряду хордовых

Замены	Попарные сравнения								
	Н.с.-С.і.	Н.с.-В.ф.	Н.с.-S.a.	Н.с.-D.r.	Н.с.-O.l.	Н.с.-X.l.	Н.с.-G.g.	Н.с.-M.m.	Н.с.-O.c.
Одношаговые	76,23 ± 2,29	75,06 ± 2,59	74,65 ± 5,51	73,45 ± 2,98	78,26 ± 2,87	73,50 ± 3,28	75,10 ± 3,39	80,00 ± 2,63	66,47 ± 4,22
Двухшаговые	68,26 ± 2,73	71,68 ± 2,33	72,76 ± 2,75	72,79 ± 3,26	71,06 ± 3,42	76,46 ± 2,86	73,70 ± 3,01	60,50 ± 8,55	74,17 ± 3,56
Трехшаговые	50,80 ± 5,49	49,62 ± 5,31	56,70 ± 2,98	58,55 ± 3,98	56,82 ± 3,59	68,63 ± 3,89	57,38 ± 6,04	9,00 ± n/calc	—
Общее	68,12 ± 1,98	67,41 ± 2,09	70,87 ± 2,26	70,74 ± 2,16	70,75 ± 2,25	74,23 ± 1,88	71,75 ± 2,19	73,04 ± 3,91	68,67 ± 3,18

Для всех проведенных попарных сравнений наибольшие значения дистанции Грэнтсема отмечаются для одношаговых замен, меньшие — для двухшаговых и наименьшие — для трехшаговых. Исключениями являются резуль-

таты, полученные при сравнении последовательностей АДГ 3-го класса человека с таковыми лягушки и кролика, где максимальное значение дистанции Грэнтсема характерно для двухшаговых замен.

Значения физико-химической дистанции для одно-, двух- и трехшаговых аминокислотных замен варьируют, но явные тенденции к их увеличению или снижению в процессе эволюции отсутствуют. Общее значение дистанции Грэнтсема для всех типов замен незначительно варьирует от 67,41 для ланцетника до 74,23 для лягушки. Значит, этот показатель является приблизительно постоянной величиной, что обусловлено структурно-функциональными ограничениями, налагаемыми на аминокислотные замены в последовательностях алкогольдегидрогеназ 3-го класса хордовых животных. Это позволяет исключить третий вариант объяснения обнаруженной нами закономерности, а приблизительно постоянные значения всех трех показателей консервативности свидетельствуют о приблизительно постоянном количестве переменных сайтов в изучаемых последовательностях АДГ организмов в широком филогенетическом ряду.

Для определения механизмов специфичности характера аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ и выявления слабых тенденций динамики сопоставим данные изменения количества одно-, двух- и трехшаговых аминокислотных замен с соответствующими средними значениями дистанции Грэнтсема (рис. 6.2).

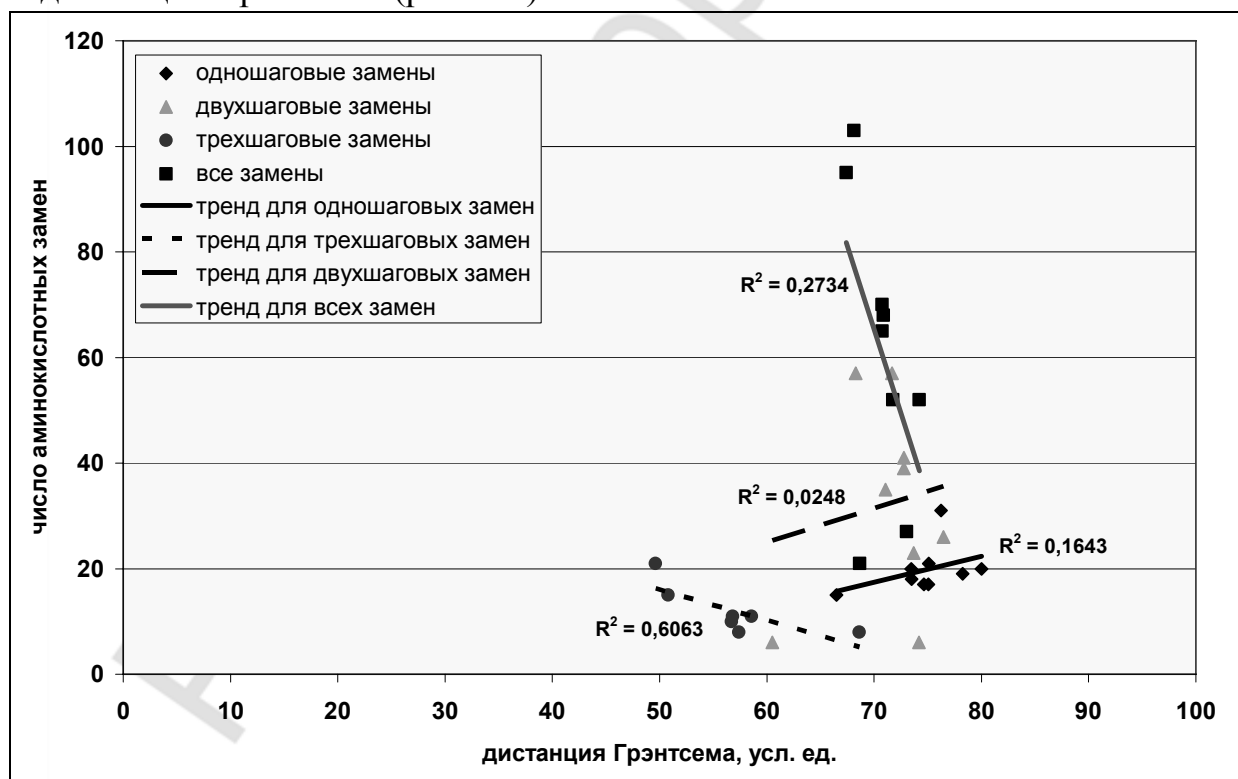


Рис. 6.2. Зависимость между количеством наблюдаемых одно-, двух- и трехшаговых аминокислотных замен и дистанцией Грэнтсема для последовательностей АДГ 3-го класса хордовых животных

На рисунке 6.2 видно, что при уменьшении общего количества аминокислотных замен, наблюдаемого в процессе эволюции, отмечается незначительное увеличение дистанции Грэнтсема, т. е. повышение физико-химического сходства взаимозаменяемых аминокислот. Это, в первую очередь, связано с уменьшением числа трехшаговых замен, что сопровождается значительным ($R^2 = 0,61$) увеличением среднего значения дистанции Грэнтсема для них. В изучаемом филогенетическом ряду АДГ 3-го класса происходит постепенное уменьшение количества трехшаговых замен вплоть до их полного исчезновения, что истощает этот механизм увеличения среднего значения GD для взаимозаменяемых аминокислотных остатков [12].

В процессе эволюции также происходит и уменьшение количества двухшаговых замен, которые не вносят существенного вклада ($R^2 = 0,02$) в изменение дистанции Грэнтсема и, следовательно, могут рассматриваться как селективно эквивалентные. Как было отмечено выше, количество одношаговых замен в изучаемых последовательностях приблизительно постоянно. На рисунке 6.2 видно, что экстраполяция влево тренда для одношаговых замен связана с уменьшением средних значений GD; и этим может быть объяснено отсутствие тенденции к уменьшению числа одношаговых замен в процессе эволюции.

6.4. Выводы

При проведении сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей матричных РНК для всей совокупности несинонимичных и синонимичных замен характерно соотношение $d_3 > d_1 > d_2$, из которого видно, что наибольшая скорость мутационных замен характерна для третьего положения кодонов, меньшая — для первого и наименьшая — для второго. Большие значения d_3 по сравнению со значениями d_1 и d_2 объясняются преобладанием синонимичных замен в третьем положении над общей частотой замен в первом и втором положениях.

Анализ 138 спонтанных точечных мутаций, наблюдаемых при сравнении нуклеотидных последовательностей кодирующей области мРНК АДГ 4-го класса мыши и человека позволяет прийти к следующему заключению: 1) могут происходить всевозможные замены пар оснований; 2) транзиции более вероятны, чем трансверсии; 3) для несинонимичных замен транзиции $A \leftrightarrow G$ значительно преобладают над транзициями $C \leftrightarrow U$, а для синонимичных замен их частоты приблизительно равны; 4) частоты трансверсий для несинонимичных замен могут быть расположены в ряд $A \leftrightarrow C > G \leftrightarrow C > G \leftrightarrow U > A \leftrightarrow U$, в то время как для синонимичных замен их частоты также приблизительно равны; 5) скорость эволюции нуклеотидных последовательностей приблизительно в 1,5 раза больше таковой для аминокислотных последовательностей.

Рассчитанные вероятности терминальной мутации всех 18 претерминальных кодонов позволили разделить их на 8 классов, располагающихся по степени опасности терминальной мутации следующим образом: **УГГ > ЦАА, ЦГА,**

ЦАГ > УЦА, УАЦ > УУА, УАУ > УЦГ, УГЦ > УУГ, УГУ > ГАА, ГАГ, ГГА > ААА, ААГ, АГА. Вероятность терминальной мутации при замещении нуклеотида в самом «опасном» кодоне УГГ в 9 раз больше, чем в кодонах первого класса.

На основании данных по частотам и характеру аминокислотных замен в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека можно сделать следующие выводы: 1) в аминокислотных последовательностях АДГ мыши и человека 1–4-х классов преобладают одношаговые замены; 2) аминокислотные замены в последовательностях алкогольдегидрогеназ 4-го класса наименее, а классов 1А, 1С и 3 — наиболее консервативны; 3) наибольший процент консервативных замен наблюдается в первом положении кодона, меньший — во втором и наименьший — в третьем; 4) наибольшие значения дистанции Грэнтсема характерны для одношаговых аминокислотных замен, наблюдаемых в последовательностях АДГ 1–4-х классов мыши и человека, меньшие — для двухшаговых, а наименьшие — для трехшаговых; 5) между долей консервативных замен и частотой замен в зависимости от положения нуклеотида в кодоне обнаружена сильная положительная корреляционная связь; именно наличие этой связи обуславливает соотношение $d_1 > d_2 > d_3$, наблюдаемое для несинонимичных замен; 6) между значениями физико-химической дистанции и частотой замен в зависимости от их вида (одно-, двух- или трехшаговые) существуют сильная положительная корреляционная связь.

Анализируя зависимость частоты консервативных замен от вида замещений нуклеотидов, установлено, что наиболее благоприятными являются транзиции А↔Г, а наименее благоприятными — транзиции Ц↔У.

При изучении динамики характера аминокислотных замен в последовательностях АДГ 3-го класса в широком филогенетическом ряду хордовых животных обнаружены 552 аминокислотные замены, причем доля двухшаговых замен ($52,4 \pm 2,1$ %) статистически достоверно выше таковой для одно- ($32,2 \pm 2,0$ %) и трехшаговых ($15,4 \pm 1,5$ %) замен. При сопоставлении числа аминокислотных замен с общепринятыми временами дивергенции показано постепенное уменьшение общего количества аминокислотных замен в процессе эволюции, что обусловлено в большей степени уменьшением количества двухшаговых и в меньшей степени — трехшаговых аминокислотных замен.

При использовании динамического и шагового подходов установлено, что количество аминокислотных замен, связанных одним мутационным шагом, является приблизительно постоянным во всем изученном филогенетическом ряду АДГ 3-го класса хордовых животных. В изучаемом филогенетическом ряду отсутствуют явные тенденции к снижению или повышению средних значений показателей консервативности для одно- и многошаговых замен, а также процента консервативных одношаговых замен. В то же время полученные значения значительно отличаются от таковых для случайных замещений аминокислот.

кислот, что свидетельствует о консервативной природе одношаговых аминокислотных замен в последовательностях АДГ 3-го класса хордовых животных. Приблизительно постоянные значения дистанции Грэнтсема для одно- и многошаговых аминокислотных замен в филогенетическом ряду говорят о структурно-функциональных ограничениях, налагаемых на аминокислотные замены в последовательностях алкогольдегидрогеназ 3-го класса хордовых животных.

Обнаруженная при сопоставлении количества наблюдаемых аминокислотных замен и средних значений дистанции Грэнтсема для них специфика характера аминокислотных замен в изучаемых последовательностях АДГ 3-го класса хордовых животных может быть объяснена следующим образом. При уменьшении общего количества аминокислотных замен, наблюдаемого в процессе эволюции, отмечается незначительное увеличение дистанции Грэнтсема, связанное с уменьшением числа высокорадикальных трехшаговых замен. Двухшаговые замены не вносят существенного вклада в изменение дистанции Грэнтсема, а постоянство количества одношаговых замен связано с тем, что при уменьшении их числа существует вероятность уменьшения значения GD.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании наличия двух закономерностей последовательного количественного распределения гуанина и цитозина в мРНК, кодирующих АДГ человека, расположения изоферментов АДГ по отношению к корню построенных дендрограмм и выполняемых функций можно утверждать, что семейство АДГ человека состоит из двух подсемейств: 1) АДГ, метаболизирующие формальдегид и хиноны (2-й и 3-й классы); 2) АДГ, метаболизирующие спирты (1А, 1В, 1С, 4 и 5-й классы). Результаты проведенного BLAST-анализа свидетельствуют, что эволюционным предшественником АДГ человека и соответствующего ортолога дрозофилы является АДГ 3-го класса нематоды. Согласно полученным дендрограммам, возникновение изоферментов АДГ происходило в последовательности: класс 3 → класс 1 → класс 2 → класс 5 → класс 4 → выделение подклассов класса 1 (А, В, С).

Сравнительный анализ нуклеотидного состава экзонов и интронов генов АДГ человека и определение темпов эволюционных изменений экзонов и интронов генов, кодирующих АДГ 3-го класса мыши и человека, позволили установить особенность экзон-интронной структуры и нуклеотидного состава генов АДГ человека. Данная особенность заключается в их ГЦ-мозаичном строении (чередовании достоверно более ГЦ-насыщенных экзонов с менее ГЦ-насыщенными интронами), что обеспечивается более низкими темпами эволюционных изменений экзонов изучаемых генов. В последовательностях мРНК, кодирующих АДГ1С и 3 человека, существуют два гипервариабельных участка (346–375 и 886–915). Для первого гипервариабельного участка характерно высокое соотношение несинонимичной и синонимичной дистанций (0,88), достоверное преобладание многошаговых аминокислотных замен, наличие трех высокорадикальных замен аминокислот, увеличение гибкости остова основной цепи, сопряженное с изменением объема боковых радикалов. Учитывая, что соответствующие ему аминокислоты (115, 116 и 117) входят в состав активного центра фермента, можно утверждать, что его эволюционные изменения происходили в режиме положительного отбора. Аминокислотные остатки, соответствующие второму гипервариабельному участку, не выполняют значимой функции, а следовательно, его изменения происходили в режиме нейтральной эволюции.

Динамика стратегии кодирования АДГ 3-го класса в мРНК хордовых в процессе эволюции заключается в уменьшении значений RSCU для синонимичных ГЦ3-кодонов, увеличении частоты использования претерминальных кодонов, увеличении содержания аминокислот, кодируемых ГЦ-бедными кодонами (FYMINK), и уменьшении содержания аминокислот, кодируемых ГЦ-богатыми кодонами (GARP), что связано с изменением в процессе эволюции

направленности мутационного давления в экзонах соответствующих генов (с ГЦ на АТ). Основным механизмом изменения направленности мутационного давления являются ЦГ→ТГ-мутации, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина. Часть мутаций в ЦГ-динуклеотидах может происходить по другим механизмам (ЦГ→ЦА и ТГ→ТА), что связано с высокой вероятностью транзиций.

Сопоставление данных о степени нейтральности мутационных изменений нуклеотидного состава мРНК (в терминах ГЦ-содержания) полисубстратных (АДГ1) и моносубстратных (АДГ3) ферментов в процессе эволюции ($\epsilon = 9,7\%$ для АДГ1, $\epsilon = 6,3\%$ для АДГ3) с темпами эволюционных изменений мРНК ($0,60 \times 10^{-9}$ и $0,40 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год для АДГ 1-го и 3-го соответственно) и аминокислотных последовательностей ($0,55$ По и $0,25$ По для АДГ 1-го и 3-го соответственно) показало существование между ними прямой связи, что находится в полном соответствии с теорией нейтральной эволюции.

В аминокислотных последовательностях алкогольдегидрогеназ мыши и человека 1–4-х классов преобладают одношаговые замены, являющиеся более консервативными по сравнению с двухшаговыми и трехшаговыми заменами. Среди одношаговых аминокислотных замещений наибольшая доля консервативных замен связана с мутациями нуклеотидов в первом положении кодона, меньшая — во втором, наименьшая — в третьем. В аспекте консервативности более благоприятными являются транзиции А ↔ Г, а наименее благоприятными — транзиции Ц ↔ У. В соответствии со значениями коэффициента Снита, показателем функциональной близости аминокислот и физико-химической дистанции Грэнтсема аминокислотные замены в последовательностях алкогольдегидрогеназ 4-го класса наименее, а классов 1А, 1С и 3 наиболее консервативны.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ашмарин, И. П.* Алкогольдегидрогеназа — объект молекулярной медицины / И. П. Ашмарин // *Успехи биологической химии*. 2003. Т. 43. С. 3–18.
2. *Барковский, Е. В.* Мембраносвязанные аденилатциклазы : монография / Е. В. Барковский, О. В. Ачинович; под общ. ред. Е. В. Барковского. Минск: БГМУ, 2005. 134 с.
3. *Барковский, Е. В.* Мутационное давление, предпочтительность использования кодонов и аминокислотный состав полных протеомов двухцепочечных РНК-вирусов / Е. В. Барковский, В. В. Хрусталева // *Актуальные вопросы молекулярной эволюции и биохимии : материалы респ. конф., посвящ. 75-летию со дня основания каф. общей химии БГМУ* / под ред. Е. В. Барковского. Минск: БГМУ. 2006. С. 27–30.
4. *Барковский, Е. В.* Скорость эволюции мембраносвязанной аденилатциклазы 9 типа / Е. В. Барковский, О. В. Ачинович, А. В. Бутвиловский // *Здравоохранение*. Минск, 2002. № 6. С. 12–14.
5. *Барковский, Е. В.* Сравнительная характеристика матричных РНК аденилатциклаз актиномицетов / Е. В. Барковский, В. В. Хрусталева // *Белорус. мед. журн.* 2004. № 3. С. 27–30.
6. *Барковский, Е. В.* Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мРНК алкогольдегидрогеназы класса IV мыши и человека / Е. В. Барковский, А. В. Бутвиловский // *Белорус. мед. журн.* Минск, 2005. № 1. С. 19–22.
7. *Барковский, Е. В.* Темпы эволюционных изменений различных участков мембраносвязанных аденилатциклаз 9 типа / Е. В. Барковский, О. В. Ачинович, А. В. Бутвиловский // *Здравоохранение*. Минск, 2002. № 7. С. 16–19.
8. *Барковский, Е. В.* Эволюция аминокислотных замен в мембраносвязанных аденилатциклазах VI и IX типов / Е. В. Барковский, О. В. Ачинович, А. В. Бутвиловский // *Белорус. мед. журн.* Минск, 2002. № 1. С. 41–43.
9. *Бачинский, А. Г.* Структура и помехоустойчивость генетического кода / А. Г. Бачинский // *Журн. общей биол.* 1976. Т. 37. С. 163–173.
10. *Бокуть, С. Б.* Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации : учеб. пособие / С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин. Минск: Выш. шк., 2005. 463 с.
11. *Бутвиловский, А. В.* Эволюционные дистанции и скорость эволюции в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназы класса IV мыши и человека / А. В. Бутвиловский // *Бел. мед. журн.* Минск, 2005, № 2. С. 30–32.
12. *Бутвиловский, А. В.* Динамика изменений характера аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ в филогенетическом ряду хордовых животных / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский // *Актуальные вопросы молекулярной эволюции и биохимии : материалы респ. конф., посвящ. 75-летию со дня основания каф. общей химии БГМУ* / под ред. Е. В. Барковского. Минск: БГМУ, 2006. С. 37–43.
13. *Бутвиловский, А. В.* Зависимость содержания гуанина и цитозина в каждом из положений кодона от общей ГЦ-насыщенности экзонов ряда генов алкогольдегидрогеназ человека / А. В. Бутвиловский, О. В. Ачинович // *Вестник РГМУ. Период. мед. журн.* М.: ГОУ ВПО РГМУ Росздрава. 2007, № 2 (55). С. 254–255.
14. *Бутвиловский, А. В.* Молекулярная эволюция алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский, В. Э. Бутвиловский // *Мед. журн.* Минск, 2005. № 4. С. 30–33.

15. *Бутвиловский, А. В.* Молекулярная эволюция алкогольдегидрогеназы класса III хордовых животных / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский // *Здравоохранение. Минск, 2005. № 9. С. 11–15.*
16. *Бутвиловский, А. В.* Насыщенность гуанином и цитозином экзонов и интронов генов алкогольдегидрогеназ человека / А. В. Бутвиловский, О. В. Ачинович // *Материалы межрег. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием «Молодежь и наука: итоги и перспективы».* Саратов, 2006. С. 61.
17. *Бутвиловский, А. В.* О виде селекции в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназы классов I–IV мыши и человека / А. В. Бутвиловский // *Наука о человеке : материалы VI съезда молодых ученых и специалистов / под ред. Л. М. Огородовой, Л. В. Капилевича.* Томск: СибГМУ. 2005. С. 70–71.
18. *Бутвиловский, А. В.* О молекулярной эволюции нуклеотидных последовательностей мРНК α -субъединицы S4 гетеротримерного Gs-белка мыши и человека / А. В. Бутвиловский // *Достижения медицинской науки 2003 : сб. науч. студенческих работ лауреатов конкурса БГМУ за 2003 г. / под ред. С. Л. Кабака и А. С. Леонтьюка.* Минск: БГМУ, 2003. С. 14–15.
19. *Бутвиловский, А. В.* О несинонимичных мутациях в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназы класса IV мыши и человека / А. В. Бутвиловский // *Материалы 69-й Республиканской итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых Респ. Башкортостан с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины».* Уфа: Изд-во БГМУ, 2004. С. 40.
20. *Бутвиловский, А. В.* О скорости молекулярной эволюции нуклеотидных и аминокислотных последовательностей мРНК алкогольдегидрогеназы класса IV мыши и человека / А. В. Бутвиловский // *Молодежная наука и современность : Материалы 69-й межвуз. науч. конф. студентов и молодых ученых : в 2 ч.* Курск: КГМУ, 2004. Ч. 2. 110–111.
21. *Бутвиловский, А. В.* О транзициях и трансверсиях в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназы класса IV мыши и человека / А. В. Бутвиловский // *Студенческая медицинская наука 2004 : 52-я итоговая студенческая мед. науч. конф. с международным участием : матер. конф. М., 2004. С. 156.*
22. *Бутвиловский, А. В.* О характере одношаговых аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ классов I–IV мыши и человека // *Вести Национальной Академии Наук Беларуси. Серия мед. наук.* 2005. № 5. С. 5–8.
23. *Бутвиловский, А. В.* Об аминокислотных заменах в последовательностях алкогольдегидрогеназ классов I–IV мыши и человека / А. В. Бутвиловский // *70-я юбилейная итоговая Респуб. науч. конф. студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины».* Уфа, 2005. С. 35.
24. *Бутвиловский, А. В.* Об использовании претерминальных кодонов и кодонов, содержащих гуанин и цитозин в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназ человека 1–7 типов / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский // *Материалы междунар. симпозиума «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки».* Тюмень, 2005. С. 275–277.
25. *Бутвиловский, А. В.* Относительные вероятности замещений, приводящих к терминальным кодонам в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназ классов I–IV мыши и человека / А. В. Бутвиловский // *Молодежная наука и современность : юбилейная межвуз. науч. конф. студентов и молодых ученых, посвящ. 70-летию КГМУ : в 2 ч.* Курск: КГМУ. 2005. Ч. 1. С. 51–52.
26. *Бутвиловский, А. В.* Показатели консервативности одношаговых аминокислотных замен, наблюдаемых в последовательностях алкогольдегидрогеназ классов 1–4 мыши и че-

ловека, в зависимости от вида произошедшей замены нуклеотида / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Международная науч. конф.; 7 съезд Белорус. общественного Объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, 21–23 июня 2006 г. : сб. ст. : в 2 т. / под ред. И. Д. Волотовского [и др.]. Минск: Право и экономика, 2006 г. Т. 1. С. 54–56.

27. *Бутвиловский, А. В.* Скорость молекулярной эволюции различных участков α -субъединицы S2 гетеротримерного Gs-белка позвоночных и беспозвоночных животных / А. В. Бутвиловский // Актуальные вопросы современной медицины и фармации : материалы конф. студентов и молодых ученых. Витебск: ВГМУ 2003. С. 19–21.

28. *Бутвиловский, А. В.* Сравнительная характеристика вариантов NCBI BLAST-анализа ряда митохондриальных ферментов различных животных / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский, В. Э. Бутвиловский // Мед. журн. Минск, 2006. № 3. С. 34–36.

29. *Бутвиловский, А. В.* Сравнительный анализ генов алкогольдегидрогеназ человека / А. В. Бутвиловский, Н. С. Климович // Вести Национальной Академии Наук Беларуси. Серия мед. наук. 2006, № 5. С. 40–42.

30. *Бутвиловский, А. В.* Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мРНК α -субъединицы S4 гетеротримерного Gs-белка мыши и человека. / А. В. Бутвиловский // Здоровоохранение. Минск, 2006. № 7. С. 13–16.

31. *Бутвиловский, А. В.* Стратегия кодирования алкогольдегидрогеназ человека / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский, В. Э. Бутвиловский // Вестник ВГМУ. Витебск, 2006. № 3. С. 24–29.

32. *Бутвиловский, А. В.* Темпы эволюционных изменений и насыщенность гуанином и цитозином экзонов и интронов генов алкогольдегидрогеназ 3-го класса мыши и человека / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский, В. Э. Бутвиловский // Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии : III Междунар. симпозиум, посвящ. 100-летию со дня рождения академика Н. Р. Сисакяна (Москва, Дубна, 24–28 января 2007 г.) : аннот. докл. Дубна: ОИЯИ, 2006. С. 31–32.

33. *Бутвиловский, А. В.* Транзиции и трансверсии в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназ классов I–IV мыши и человека / А. В. Бутвиловский, В. В. Хрусталева // Молодежная наука и современность : юбилейная межвуз. науч. конф. студентов и молодых ученых, посвящ. 70-летию КГМУ : в 2 ч. Курск: КГМУ, 2005. Ч. 1. С. 53–54.

34. *Бутвиловский, А. В.* Эволюционные взаимоотношения и структурно-функциональная классификация алкогольдегидрогеназ человека / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский, В. Э. Бутвиловский // Вестник ВГМУ. Витебск, 2006. № 2. С. 22–27.

35. *Бутвиловский, А. В.* Эволюционные дистанции и показатели BLAST-анализа для аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ человека / А. В. Бутвиловский // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф.; 7 съезд Белорусского общественного Объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, 21–23 июня 2006 г. : сб. ст. : в 2 т. / под ред. И. Д. Волотовского [и др.]. Минск: Право и экономика, 2006. Т. 1. С. 51–53.

36. *Бутвиловский, А. В.* Эволюционные дистанции и расчетные соотношения транзиций и трансверсий в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназы человека / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский // Здоровоохранение. Минск, 2005. № 2. С. 49–50.

37. *Бутвиловский, А. В.* Эволюционные дистанции и скорости молекулярной эволюции алкогольдегидрогеназ класса 1 хордовых животных / А. В. Бутвиловский // V Всерос. универ. науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов по медицине : сб. материалов / под общ. ред. проф. В. Г. Сапожникова. Тула, 2006. С. 42–44.

38. Бутвиловский, А. В. Эволюционные дистанции и скорости молекулярной эволюции алкогольдегидрогеназ класса 1–4 мыши и человека / А. В. Бутвиловский // V Всерос. универ. науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов по медицине : сб. материалов / под общ. ред. проф. В. Г. Сапожникова. Тула, 2006. С. 44–45.
39. Бутвиловский, А. В. Эволюционные дистанции и скорости эволюции аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ класса 1 хордовых животных / А. В. Бутвиловский // Труды молодых ученых 2006 : сб. науч. работ / под общ. ред. С. Л. Кабака Минск: БГМУ, 2006. С. 37–40.
40. Гипервариабельные участки алкогольдегидрогеназ классов 1С и 3 человека / А. В. Бутвиловский [и др.] // Медицина. 2007. № 1. С. 38–41.
41. Давыдов, В. В. О виде картин замен в зависимости от положения кодона в последовательностях мРНК М-изоферментов креатинкиназ хордовых животных / В. В. Давыдов, А. В. Бутвиловский // Вестник РГМУ. Период. мед. журн. М.: ГОУ ВПО РГМУ Росздрава. 2006. № 2 (49). С. 358.
42. Изменения в процессе эволюции мутационного давления в последовательностях мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 3-го класса хордовых животных / А. В. Бутвиловский [и др.] // Мед. журн. Минск, 2007. № 1. С. 22–25.
43. Казюлевич, С. Р. Темпы эволюционных изменений аминокислотных последовательностей различных участков препроинсулина / С. Р. Казюлевич, Е. В. Барковский // Актуальные вопросы молекулярной эволюции и биохимии : материалы республ. конф., посвящ. 75-летию со дня основания каф. общей химии БГМУ / под ред. Е. В. Барковского. Минск: БГМУ. 2006. С. 754–79.
44. Кимура, М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности / М. Кимура. М., 1985. 398 с.
45. Козел, А. Р. Сравнительный анализ методов изучения эволюционных изменений аминокислотных последовательностей релаксина 3 / А. Р. Козел, Е. В. Барковский // Актуальные вопросы молекулярной эволюции и биохимии : материалы респ. конф., посвящ. 75-летию со дня основания каф. общей химии БГМУ / под ред. Е. В. Барковского. Минск: БГМУ. 2006. С. 84–88.
46. Малахов, В. В. Происхождение хордовых животных / В. В. Малахов // Соросовский образовательный журнал. 1996. Т. 7. С. 2–9.
47. Матушкин Ю. Г. Неслучайное использование синонимичных кодонов / Ю. Г. Матушкин // Молекулярная эволюция [Электронный ресурс]. 1993. Режим доступа: <http://obi.img.ras.ru/humbio/molevol/000ee25a.htm>. Дата доступа 22.11.2006.
48. Методы изучения эволюционных изменений аминокислотных последовательностей. Сообщение 1. Методы приблизительной и скорректированной оценки эволюционных дистанций / А. В. Бутвиловский [и др.] // Здоровоохранение. Минск, 2006. № 1. С. 42–44.
49. Методы изучения эволюционных изменений аминокислотных последовательностей. Сообщение 2. Методы, основанные на моделях замещения аминокислот / А. В. Бутвиловский [и др.] // Здоровоохранение. Минск, 2006. № 1. С. 45–49.
50. Методы молекулярной эволюции и филогенетики: учеб.-метод. пособие / Е. В. Барковский [и др.]. Минск: БГМУ, 2005. 63 с.
51. О вероятностях трансверсий и транзиций в мРНК мембраносвязанной аденилатциклазы VII типа / Е. В. Барковский [и др.] // Белрус. мед. журн. Минск, 2002. № 2. С. 49–52.
52. Определение вида картины замен в нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Сообщение 1. Теоретические аспекты / В. Э. Бутвиловский [и др.] // Мед. журн. Минск, 2006. № 2. С. 27–29.

53. *Основные* методы анализа эволюционных отношений между последовательностями генетических макромолекул / В. В. Хрусталеv [и др.] // *Здравоохранение*. Минск, 2005. № 8. С. 11–13.
54. *Поройков, В. В.* Особенности распределения триплетов аминокислот в первичной структуре глобулярных белков в связи с их конформационными свойствами / В. В. Поройков, Н. Г. Есипова, В. Г. Туманян // *Биофизика*. 1980. Т. 25 (4). С. 730–732.
55. *Перспективы* внедрения раздела «Молекулярная эволюция и филогенетика» в программу подготовки студентов I курса / В. Э. Бутвиловский [и др.] // *Мед. журн.* Минск, 2006. № 2. С. 120–121.
56. *Пронько, П. С.* Роль ацетальдегида в механизмах метаболической адаптации организма к алкогольной интоксикации : автореф. ... дис. докт. биол. наук: 03.00.04; 14.00.45 / П. С. Пронько; Нац. Акад. Наук Беларуси. Гомель, 2005. 46 с.
57. *Селекционные* тесты для анализа эволюции нуклеотидных последовательностей мРНК алкогольдегидрогеназ / А. В. Бутвиловский [и др.] // *Здравоохранение*. Минск, 2005. № 12. С. 31–35.
58. *Справочник* терминов молекулярной эволюции и филогенетики : учеб.-метод. пособие / В. Э. Бутвиловский [и др.]. Минск: БГМУ, 2006. 40 с.
59. *Сравнительный* анализ современных методов изучения синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замещений. Сообщение 1. Методы, основанные на эволюционных путях / А. В. Бутвиловский [и др.] // *Здравоохранение*. Минск, 2005. № 6. С. 37–39.
60. *Таганович, А. Д.* Классификация, номенклатура, структура, механизм действия, регуляция и функции алкогольдегидрогеназ : учеб.-метод. пособие / А. Д. Таганович, А. В. Бутвиловский. Минск: БГМУ, 2006. 32 с.
61. *Филиппович Ю. Б.* Основы биохимии: учеб. для хим. и биол. спец. пед. ун-тов и ин-тов / Ю. Б. Филиппович. М.: Агар, 1999. 512 с.
62. *Характеристика* методов определения эволюционных расстояний между нуклеотидными последовательностями генетических макромолекул / Е. В. Барковский [и др.] // *Здравоохранение*. Минск, 2005. № 5. С. 37–43.
63. *Хрусталеv, В. В.* Влияние мутационного давления на использование претерминальных кодонов в мРНК алкогольдегидрогеназ III класса хордовых животных / В. В. Хрусталеv, А. В. Бутвиловский // *Молодежная наука и современность : юбилейная межвуз. науч. конф. студентов и молодых ученых, посвящ. 70-летию КГМУ : в 2-х ч.* Курск: КГМУ, 2005. Ч. 1. С. 81–82.
64. *Хрусталеv, В. В.* Модель совместного влияния естественного отбора и мутационного давления на аминокислотный состав белков и использование кодонов в мРНК у бактерий / В. В. Хрусталеv, Е. В. Барковский // *Мед. журн.* 2006. № 1. С. 101–105.
65. *Хрусталеv, В. В.* Частота использования претерминальных кодонов в матричных РНК бактериальных аденилатциклаз / В. В. Хрусталеv, Е. В. Барковский // *Здравоохранение*. 2006. № 2. С. 17–20.
66. *Эволюционные* расстояния и скорости эволюции креатинкиназ хордовых животных / Бутвиловский В. Э. [и др.] // *Мед. журн.* Минск, 2005. № 3. С. 43–46.
67. A double residue substitution in the coenzyme-binding site accounts for the different kinetic properties between yeast and human formaldehyde dehydrogenases / M.R. Fernandez [et al] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 53. P. 37869–37875.
68. *Svensson, S.* A novel subtype of class II alcohol dehydrogenase in rodents. Unique Pro (47) and Ser (182) modulates hydride transfer in the mouse enzyme / S. Svensson, P. Stromberg, J. O. Hoog // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274 (42). P. 29712–29719.

69. Hoog, J. O. A single-residue exchange gives human recombinant $\beta\beta$ alcohol dehydrogenase $\gamma\gamma$ isozyme properties / J. O. Hoog, H. Eklund, H. Jornvall // *Eur. J. Biochem.* 1992. Vol. 205. P. 519–526.
70. *Activities* of human alcohol dehydrogenases in the metabolic pathways of ethanol and serotonin / S. Svensson [et al] // *Eur. J. Biochem.* 1999. Vol. 262. P. 324–329.
71. *Alcohol* and aldehyde dehydrogenases: structures of the human liver enzymes, functional properties and evolutionary aspects / H. Jornvall [et al] // *Alcohol Alcohol.* 1987. Vol. 1. P. 13–23.
72. *Alcohol* and cancer / H. K. Seitz [et al] // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2001. Vol. 25. P. 137–143.
73. *Alcohol* dehydrogenase gene expression and cloning of the mouse-chi-like ADH / H. J. Edenberg [et al] // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991. Vol. 284. P. 253–262.
74. *Alcohol* dehydrogenase of class I: kiwi liver enzyme, parallel evolution in separate vertebrate lines, and correlation with 12S rRNA patterns / L. Hjelmqvist [et al] // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 367 (3). P. 306–310.
75. *Alcohol* dehydrogenase of class IV (sigma sigma-ADH) from human stomach. cDNA sequence and structure/function relationships / J. Farres [et al] // *Eur. J. Biochem.* 1994. Vol. 224(2). P. 549–557.
76. Hoffmann, I. Alcohol dehydrogenases in *Xenopus* development: conserved expression of ADH1 and ADH4 in epithelial retinoid target tissues / I. Hoffmann, H. L. Ang, G. Duester // *Dev. Dyn.* 1998. Vol. 213 (3). P. 261–270.
77. *Amphioxus* alcohol dehydrogenase is class 3 form of single type and of structural conservation but with unique developmental expression / C. Canestro [et al] // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. P. 6511–6518.
78. *Ascidian* and amphioxus Adh genes correlate functional and molecular features of the ADH family expansion during vertebrate evolution / C. Canestro [et al] // *J. Mol. Evol.* 2002. Vol. 54 (1). P. 81–89.
79. *Avian* alcohol dehydrogenase: the chicken liver enzyme. Primary structure, cDNA-cloning, and relationships to other alcohol dehydrogenases / M. Estonius [et al] // *Eur. J. Biochem.* 1990. Vol. 194 (2). P. 593–602.
80. *Binding* of substrate in a ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase / H. Eklund [et al] // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. № 53. P. 14349–14358.
81. Bromham, L. Molecular clocks in reptiles: life history influences rate of molecular evolution / L. Bromham // *Mol. Biol. Evol.* 2002. Vol. 19. P. 302–309.
82. Glasner, J. D. *Caenorhabditis elegans* contains genes encoding two new members of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family / J. D. Glasner, T. D. Kocher, J. J. Collins // *J. Mol. Evol.* 1995. Vol. 41(1). P.46–53.
83. *Class III* human liver alcohol dehydrogenase: a novel structural type equidistantly related to the class I and class II enzymes / R. Kaiser [et al] // *Biochemistry.* 1988. Vol. 27. P. 1132–1140.
84. *Cloning* and sequencing of cDNA encoding baboon liver alcohol dehydrogenase: evidence for a common ancestral lineage with the human alcohol dehydrogenase beta subunit and for class I ADH gene duplications predating primate radiation / A. E. Trezise [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86 (14). P. 5454–5458.
85. *Cloning* of the mouse class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) cDNA and tissue-specific expression patterns of the murine ADH gene family / M. Zgombic-Knight [et al] // *J. Biol. Chem. USA.* 1995. Vol. 270. №. 18. P. 10868–10877.

86. *Tompson, J. D.* 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.
87. *Codon* catalog usage and the genome hypothesis / R. Grantham [et al] // *Nucl. Acids Res.* 1980. Vol. 8. P. 49–62.
88. *Codon* usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity / P. M. Sharp [et. al] // *Nucl. Acids Res.* 1988. Vol. 16. P. 8207–8211.
89. *Yang, Z.* Codon-substitution models for detecting molecular adaptation at individual sites along specific lineages / Z. Yang, R. Nielsen // *Mol. Biol. Evol.* 2002. Vol. 19. P. 908–917.
90. *Comparative* evolution at the levels of molecules, organisms and populations / G.L. Stebins, R.C. Levontin // In *Proc. of the Sixth Berkley Symp. on Math. Stat. and Prob.* vol V: Darwinian, Neo-Darwinian, and Non-Darwinian Evolution, leCam L.M., Neyman J. and Scott E. L., eds. University of California Press, 1972. P. 23–42.
91. *Comparison* of the genomes of human and mouse lays the foundation of genome zoology / R.D. Emes [et al] // *Human Mol. Gen.* 2003. Vol. 12 (7). P. 701–709.
92. *Feng, D.-F.* Determining divergence times with a protein clock: Update and reevaluation / D.-F. Feng, G. Cho, R. F. Doolittle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 13028–13033.
93. *Developmental* expression of alcohol dehydrogenase (ADH3) in zebrafish (*Danio rerio*) / A. K. Dasmahapatra [et al] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. Vol. 286. P. 1082–1086.
94. *Kumar, S.* Disparity index: a simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences / S. Kumar, S. R. Gadagkar // *Genetics* 2001. Vol. 158. P. 1321–1327.
95. *Kumar, S.* Disparity index: a simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences / S. Kumar, S. R. Gadagkar // *Genetics* 2001. Vol. 158. P. 1321–1327.
96. *Distribution* of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain / D. Galter [et al] // *Eur. J. Biochem.* 2003. Vol. 270. P. 1316–1326.
97. *Duester, G.* Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function / G. Duester // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. P. 4315–4324.
98. *Edenberg, H. J.* Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase / H. J. Edenberg // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2000. Vol. 64. P. 295–341.
99. *Kvassman, J.* Effect of pH on the binding of decanoate and trifluoroethanol to liver alcohol dehydrogenase / J. Kvassman, G. Pettersson // *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 103. P. 557–564.
100. *Kvassman, J.* Effect of pH on the process of ternary-complex interconversion in the liver-alcohol-dehydrogenase reaction / J. Kvassman, G. Pettersson // *Eur. J. Biochem.* 1978. Vol. 87. P. 417–427.
101. *Effects* of various concomitant medications on gastric alcohol dehydrogenase and the first-pass metabolism of ethanol / R. H. Palmer [et al] // *Amer. J. Gastroent.* 1991. Vol. 86. P. 1749–1755.
102. *Potter J. J.* Endotoxin enhances liver alcohol dehydrogenase by action through upstream stimulatory factor but not by nuclear factor-kB / J. J. Potter, L. Rennie-Tankersley, E. Mezey // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. № 6. P. 4353–4357.
103. *Danielsson, O.* Enzymogenesis: classical liver alcohol dehydrogenase origin from the glutation-dependent formaldehyde dehydrogenase line / O. Danielsson, H. Jornvall // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 9247–9251.

104. *Epstein, C. J.* Non-randomness of amino-acid changes in the evolution of homologous proteins / C. J. Epstein // *Nature, Lond.* 1967. Vol. 215. P. 355–359.
105. *Glazko, G. V.* Estimation of divergence times for major lineages of primate species / G. V. Glazko, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* 2003. Vol. 20 (3). P. 424–434.
106. *Tajima, F.* Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences / F. Tajima, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* 1984. Vol. 1. P. 269–285.
107. *Tamura, K.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* 1993. Vol. 10. P. 512–526.
108. *Evolution of the amino acid substitution in the mammalian myoglobin gene* / R. A. Bogardt [et al] // *J. Mol. Evol.* 1980. Vol. 15. P. 197–218.
109. *Tamura, K.* Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages / K. Tamura, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* 2002. Vol. 19. P. 1727–1736.
110. *Expression of alcohol dehydrogenase 3 in tissue and cultured cells from human oral mucosa* / J. J. Hedberg [et al] // *Amer. J. Paibol.* 2000. Vol. 157. P. 1745–1755.
111. *Expression, localization and potential physiological significance of alcohol dehydrogenase in the gastrointestinal tract* / J. Vaglenova [et al] // *Eur. J. Biochem.* 2003. Vol. 270. P. 2652–2662.
112. *Venkataramaiah, T. H.* Formamides mimic aldehydes and inhibit liver alcohol dehydrogenases and ethanol metabolism / T. H. Venkataramaiah, B. V. Plapp // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 38. P. 36669–36706.
113. *Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes* / O. Danielsson [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 4980–4984
114. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs* / S. F. Altschul [et al] // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25 (17). P. 3389–3402.
115. *Gastric alcohol dehydrogenase activity in man: influence of gender, age, alcohol consumption and smoking in a Caucasian population* / A. Parlesak [et al] // *Alcohol Alcohol.* 2002. Vol. 37. № 4. P. 388–393.
116. *Generation and initial analysis of more than 15000 full-length human and mouse cDNA sequences* / R. L. Strausberg [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99 (26). P. 16899–16903.
117. *Zgombic-Knight, M.* Genomic structure and expression of the ADH7 gene encoding human class IV alcohol dehydrogenase, the form most efficient for retinol metabolism in vitro / M. Zgombic-Knight, M. H. Foglio, G. Duester // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. № 9. P. 4305–4311.
118. *Gillespie, J. H.* A general model to account for enzyme variation in natural populations / J. H. Gillespie, C. H. Langley // *Genetics.* 1974. Vol. 76. P. 837–848.
119. *Grantham, R.* Amino acid difference formula to help explain protein evolution / R. Grantham // *Science.* 1974. Vol. 185 (4154). P. 862–864.
120. *Sanghani, P. C.* Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structural changes associated with ternary complex formation / P. C. Sanghani, W. F. Bosron, T. D. Hurley // *Biochem.* 2002. Vol. 41 (51). P. 15189–15194.
121. *Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary and inhibitory ternary complexes* / P. C. Sanghani [et al] // *Biochem.* 2002. Vol. 41. P. 10778–10786.
122. *Ina, Y.* New methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions / Y. Ina // *Mol. Biol. Evol.* 1995. Vol. 40. P. 190–226.
123. *Osada, N.* Inferring the mode of speciation from genomic data: a study of the great apes / N. Osada, C. I. Wu // *Genetics.* 2005. Vol. 169 (1). P. 259–264.

124. *Flitman, R.* Inhibition of hepatic alcohol dehydrogenase by bilirubin / R. Flitman, M. H. Worth // *J. Biol. Chem.* 1966. Vol. 241. № 3. P. 669–672.
125. *Gilleland, M. J.* Inhibition of horse liver alcohol dehydrogenase by L-3, 3', 5-triiodo-thyronine / M. J. Gilleland, J. D. Shore // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244. № 19. P. 5357–5360.
126. *Schindler, J. F.* Inhibition of human alcohol dehydrogenase by formamides / J. F. Schindler, K. B. Berst, B. V. Plapp // *J. Med. Chem.* 1998. Vol. 41. P. 1696–1701.
127. *Park, D. H.* Isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase active on ethanol and steroids. cDNA cloning, expression, and comparison of active sites / D. H. Park, B. V. Plapp // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266 (20). P. 13296–13302.
128. *α -Isoenzyme* of alcohol dehydrogenase from monkey liver / D. R. Light [et al] // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. № 18. P. 12592–12599.
129. *Isozyme* developments in mammalian class I alcohol dehydrogenase. cDNA cloning, functional correlations, and lack of evidence for genetic isozymes in rabbit / J. O. Hoog [et al] // *Eur. J. Biochem.* 1993. Vol. 213 (1). P. 31–38.
130. *Vallee, B. L.* Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase / B. L. Vallee, T. J. Bazzone // *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* 1983. Vol. 8. P. 219–244.
131. *Jukes, T. H.* Evolution of protein molecules / T. H. Jukes, C. R. Cantor // *Mammalian protein metabolism*; ed. H. N. Munro. Academic Press, New York, 1969. P. 21–132.
132. *Kimura, M.* A simple method for estimating evolutionary rate et base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // *J. Mol. Evol.* 1980. Vol. 16. P. 111–120.
133. *Klinman, J. P.* Probes of mechanism and transition-state structure in the alcohol dehydrogenase reaction / J. P. Klinman // *Crit. Rev. Biochem.* 1981. Vol. 10. P. 39–78.
134. *Mammalian* alcohol dehydrogenases of separate classes: intermediates between different enzymes and intraclass isozymes / H. Jornvall [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987. Vol. 84. P. 2580–2584.
135. *Mammalian* class IV alcohol dehydrogenase (stomach alcohol dehydrogenase): structure, origin, and correlation with enzymology / X. Pares [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. Vol. 91. P. 1893–1897.
136. *Maskos Z.* Mechanism of p-nitrosophenol reduction catalyzed by horse liver and human π -alcohol dehydrogenase (ADH) / Z. Maskos, G. W. Winston // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. № 50. P. 31579–31584.
137. *Kumar, S.* MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment / S. Kumar, K. Tamura, M. Nei // *Brief. Bioinform.* 2004. Vol. 5. P. 150–163.
138. *Molecular* basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenase / B. Crosas [et al] // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 25180–25187.
139. *Molecular* cloning of fish alcohol dehydrogenase cDNA / B. Funkenstein, S. B. Jakowlew // *Gene* 1996. Vol. 174. P. 159–164.
140. *Molecular* phylogeny and evolutionary rates of alcohol dehydrogenases in vertebrates and plants / S. Yokoyama, D. E. Harry // *Mol. Biol. Evol.* 1993. Vol. 10 (6). P. 1215–1226.
141. *Molecular* phylogeny of rodentia, lagomorpha, primates, artiodactyla and carnivora and molecular clocks / W. Li [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. P. 6703–6707.
142. *Monomers* of human $\beta_1\beta_1$ alcohol dehydrogenase exhibits activity that differs from the dimer / T. Ehrig [et al] // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. № 16. P. 11721–11726.
143. *Mutation* and evolution at the molecular level / M. Kimura, T. Ohta // *Genetics.* 1973. Vol. 73. P. 19–35.

144. *Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation* / K. Engeland [et al] // Proc. Natl. Acad. Sci. 1993. Vol. 90. P. 2491–2494.
145. *National Center for Biotechnology Information [Electronic resource] / National Library of Medicine, B. 38A, Bethesda, MD 20894. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=63504604&itemID=3&view=gpwithparts>. Date of access: 18.11.2006.*
146. *National Center for Biotechnology Information [Electronic resource] / National Library of Medicine, B. 38A, Bethesda, MD 20894. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=42412380>. Date of access: 18.11.2006.*
147. *Nei, M. Molecular Evolution and Phylogenetics* / M. Nei, S. Kumar. Oxford University Press, New York, 2000. 333 p.
148. *Jornvall H. Nomenclature of alcohol dehydrogenases* / H. Jornvall, J. O. Hoog // Alcohol. Alcohol. 1995. Vol. 30. P. 153–161.
149. *Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit β in Escherichia coli* / L. E. Post [et al] // Proc. Nat. Acad. Sci. 1979. Vol. 76. P. 1697–1701.
150. *Parallel evolution of drug resistance in HIV: failure of nonsynonymous/synonymous substitution rate ratio to detect selection* / K. A. Crandall [et al] // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16 (3). P. 372–382.
151. *Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P)* / J. Shafqat [et al] // Proc. Natl. Acad. Sci. 1996. Vol. 93. P. 5595–5599.
152. *Okuda, A. Physiological function and kinetic mechanism of human liver alcohol dehydrogenase as 5 β -cholestane-3 α , 7 α , 12 α , 26-tetrol dehydrogenase* / A. Okuda, K. Okuda // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. № 5. P. 2899–2905.
153. *Zhang, J. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes* / J. Zhang, H. F. Rosenberg, M. Nei // Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. Vol. 95. P. 3708–3713.
154. *Li, W. H. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution* / W. H. Li, T. Gojobori, M. Nei // Nature (London). 1981. Vol. 292. P. 237–239.
155. *Moreno, A. Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach* / A. Moreno, X. Pares // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 1128–1133.
156. *Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family* / G. Duester [et al] // Biochem. Pharmacol. 1999. Vol. 58 (3). P. 389–395.
157. *Handler, J. A. Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver* / J. A. Handler, R. G. Thurman // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. P. 1510–1515.
158. *Reduction of S-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry* / J. J. Hedberg [et al] // Eur. J. Biochem. 2003. Vol. 270. P. 1249–1256.
159. *Harding, P. P. Retinoic acid activation and thyroid hormone repression of the human alcohol dehydrogenase gene ADH3* / P. P. Harding, G. Duester // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. № 20. P. 14145–14150.
160. *Molotkov, A. Retinol/ethanol drug interaction during acute alcohol intoxication in mice involves inhibition of retinol metabolism to retinoic acid by alcohol dehydrogenase* / A. Molotkov, G. Duester // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 25. P. 22553–22557.

161. *Sigman, D. S.* Interactions of substrates, inhibitors, and coenzymes at the active site of horse liver alcohol dehydrogenase / D. S. Sigman // *J. Biol. Chem.* 1967. Vol. 242. № 17. P. 3815–3824.
162. *Nei, M.* Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions / M. Nei, T. Gojobori // *Mol. Biol. Evol.* 1986. Vol. 3. P. 418–426.
163. *Shilton, B. H.* Sites of glycation of human and horse liver alcohol dehydrogenase in vivo / B. H. Shilton, D. J. Walton // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. № 9. P. 5587–5592.
164. *Sneath, P. H. A.* Relations between chemical structure and biological activity in peptides / P. H. A. Sneath // *J. Theoret. Biol.* 1966. Vol. 12. № 2. P. 157 – 195.
165. *Cho, H.* Specificity of alcohol dehydrogenases for sulfoxides / H. Cho, B. V. Plapp // *Biochem.* 1998. Vol. 37(13). P. 4482–4489.
166. *Stone, C. L.* Stereospecific oxidation of secondary alcohols by human alcohol dehydrogenases / C. L. Stone, T. K. Li, W. F. Bosron // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 11112–11116.
167. *Structural* and enzymatic properties of a gastric NADP (H)-dependent and retinal-active alcohol dehydrogenase / J. M. Peralba [et al] // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 26021–26026.
168. *Svensson, S.* Structural and functional divergence of class II alcohol dehydrogenase — cloning and characterization of rabbit liver isoforms of the enzyme / S. Svensson, J. J. Hedberg, J. O. Hoog // *Eur. J. Biochem.* 1998. Vol. 251. P. 236–243.
169. *Structure* of human $\beta_1\beta_1$ alcohol dehydrogenase: catalytic effects of non-active-site substitutions / T. D. Hurley [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991. Vol. 88. P. 8149–8153.
170. *Yang, Z. N.* Structure of human $\chi\chi$ alcohol dehydrogenase / Z. N. Yang, W. F. Bosron, T. D. Hurley // *J. Mol. Evol.* 1997. Vol. 265. P. 330–343.
171. *Structure-function* relationships in human class III alcohol dehydrogenase (formaldehyde dehydrogenase) / P.C. Sanghani [et al] // *Chem. Biol. Interact.* 2003. Vol. 143–144. P. 195–200.
172. *Structure-function* relationships in human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Role of Glu-67 and Arg-368 in the catalytic mechanism / P. C. Sanghani [et al] // *Biochem.* 2006. Vol. 45 (15). P. 4819–4830.
173. *Structures* of three human β alcohol dehydrogenase variants: correlations with their functional differences / T. D. Hurley [et al] // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 239. P. 415–429.
174. *Kvassman, J.* Substituent effects on the ionization step regulating desorption and catalytic oxidation of alcohols bound to liver alcohol dehydrogenase / J. Kvassman, A. Larsson, G. Pettersson // *Eur. J. Biochem.* 1981. Vol. 114. P. 555–563.
175. *Sueoka, N.* Correlation between base composition of deoxyribonucleic acid and amino acid composition of protein / N. Sueoka // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1961. Vol. 47. P. 1141–1149.
176. *Sueoka, N.* Directional mutation pressure and neutral molecular evolution / N. Sueoka // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 2653–2657.
177. *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.
178. *Tamura, K.* Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C – content biases / K. Tamura // *Mol. Biol. Evol.* 1992. Vol. 9. P. 678–687.
179. *The adaptive* evolution database (TAED) / C. Roth [et al] // *Nucl. Acids Res.* 2005. Vol. 33. P. 495–497.
180. *The adaptive* evolution database (TAED) / D. A. Liberles [et al] // *Genome Biol.* 2001. Vol. 2 (8). P. 1–11.

181. *McCarthy, K.* The mechanism of inhibition of horse liver alcohol dehydrogenase by thioxine and related compounds / K. McCarthy, W. Lovenberg, A. Sjoerdsma // *J. Biol. Chem.* 1968. Vol. 243, № 10. P. 2754–2760.
182. *Young, J. M.* The nature of binding of competitive inhibitors to alcohol dehydrogenases / J. M. Young, J. H. Wang // *J. Biol. Chem.* 1971. Vol. 246. № 9. P. 2815–2821.
183. *Saitou, N.* The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree / N. Saitou, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* 1987. Vol. 4. P. 406–425.
184. *The phylogenetic* relationship of tetrapod, coelacanth, and lungfish revealed by the sequences of forty four nuclear genes / N. Takezaki [et al] // *Mol. Biol. Evol.* 2004. Vol. 21. P. 1512–1524.
185. *Jones, D. T.* The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences / D. T. Jones, W. R. Taylor, J. M. Thornton // *Comput. Appl. Biosci.* 1992. Vol. 8 (3). P. 275–282.
186. *Hjelmqvist, L.* The vertebrate alcohol dehydrogenase system: variable class II type form elucidates separate stages of enzymogenesis / L. Hjelmqvist, M. Estonius, H. Jornvall // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. Vol. 92. P. 10904–10908.
187. *Ikuta, T.* Three human alcohol dehydrogenase subunits: cDNA structure and molecular and evolutionary divergence / T. Ikuta, S. Szeto, A. Yoshida // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. Vol. 83 (3). P. 634–638.
188. *Three-dimensional* structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2–4 Å resolution / H. Eklund [et al] // *J. Mol. Biol.* 1976. Vol. 102. P. 27–59.
189. *Three-dimensional* structures of three human class I alcohol dehydrogenases / M. S. Niederhut [et al] // *Protein Sci.* 2001. Vol. 10. P. 697–706.
190. *Zhi, X.* Tissue-specific regulatory elements in the human alcohol dehydrogenase 6 gene / X. Zhi, E. M. Chan, H. J. Edenberg // *J. DNA Cell Biol.* 2000. Vol. 19(8). P. 487–497.
191. *Wu, C. I.* Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man / C. I. Wu, W. H. Li // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. Vol. 82. P. 1741–1745.
192. *X-ray* structure of human class IV $\alpha\alpha$ alcohol dehydrogenase / P. Xie [et al] // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 18558–18563.
193. *X-ray* structure of human $\beta_3\beta_3$ alcohol dehydrogenase / G. J. Davis [et al] // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. № 29. P. 17057–17061.
194. *Zuckermandl, E.* On the molecular evolutionary clock / E. Zuckermandl // *J. Mol. Evol.* 1987. Vol. 26(1–2). P. 34–46.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КЛАССИФИКАЦИИ, НОМЕНКЛАТУРЕ, МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ, РЕГУЛЯЦИИ И ФУНКЦИЯХ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ ХОРДОВЫХ <i>(А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский)</i>	5
1.1. Классификация и номенклатура алкогольдегидрогеназ	5
1.2. Структура, механизм действия и тканевая специфичность алкогольдегидрогеназ	9
1.3. Регуляция активности алкогольдегидрогеназ	21
1.4. Общие и специфические функции алкогольдегидрогеназ	23
1.5. Нерешенные проблемы	30
Глава 2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МАТЕРИАЛАХ И МЕТОДИКАХ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ <i>(Е. В. Барковский, А. В. Бутвиловский)</i>	32
2.1. Анализ аминокислотных последовательностей	32
2.2. Анализ нуклеотидных последовательностей	35
2.3. Статистическая обработка полученных результатов	39
Глава 3. ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ, СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ И СТРАТЕГИЯ КОДИРОВАНИЯ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ ЧЕЛОВЕКА <i>(А. В. Бутвиловский, В. Э. Бутвиловский)</i>	41
3.1. Показатели сходства аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ человека, эволюционные дистанции и расчетные соотношения транзиций и трансверсий для кодирующих их последовательностей матричных РНК	42
3.2. Стратегия кодирования и структурно-функциональная классификация алкогольдегидрогеназ человека	47
3.3. Особенности экзон-интронной структуры и нуклеотидного состава генов алкогольдегидрогеназ человека	54
3.4. Выводы	68
Глава 4. ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ ХОРДОВЫХ И КОДИРУЮЩИХ ИХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МАТРИЧНЫХ РНК <i>(А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский)</i>	73
4.1. Темпы эволюционных изменений аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ 1-го и 3-го классов хордовых	74

4.2. Эволюционные изменения различных в функциональном отношении сайтов алкогольдегидрогеназ 1-го и 3-го классов хордовых	83
4.3. Эволюционные дистанции, скорости эволюции и времена дивергенции нуклеотидных последовательностей матричных РНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 1-го и 3-го классов хордовых	87
4.4. Выводы	94
Глава 5. СТРАТЕГИЯ КОДИРОВАНИЯ И НЕЙТРАЛЬНОСТЬ ЗАМЕН НУКЛЕОТИДОВ В мРНК, КОДИРУЮЩИХ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ 3-го КЛАССА ХОРДОВЫХ (А. В. Бутвиловский, В. Э. Бутвиловский)	96
5.1. Мутационное давление, насыщенность гуанином и цитозином и содержание претерминальных кодонов в матричных РНК, соответствующих алкогольдегидрогеназам 3-го класса хордовых	96
5.2. Влияние мутационного давления и насыщенности гуанином и цитозином матричных РНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 3-го класса хордовых, на использование кодонов и аминокислотный состав.....	102
5.3. Взаимосвязь нейтральности замен нуклеотидов в первом и втором положениях кодона матричных РНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 3-го класса хордовых, с темпами их эволюционных изменений	104
5.4. Выводы	106
Глава 6. ТРАНЗИЦИИ И ТРАНСВЕРСИИ В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ мРНК, А ТАКЖЕ ХАРАКТЕР АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ 1–4-х КЛАССОВ ХОРДОВЫХ (А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский)	108
6.1. Несинонимичные и синонимичные мутации, транзиции и трансверсии в нуклеотидных последовательностях матричных РНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы 4-го класса мыши и человека.....	109
6.2. Характеристика одно- и многошаговых аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ 1–4-х классов мыши и человека	114
6.3. О динамике изменений характера аминокислотных замен в последовательностях алкогольдегидрогеназ в филогенетическом ряду	119
6.4. Выводы	125
Заключение	129
Литература	130

Научное издание

Бутвиловский Александр Валерьевич
Барковский Евгений Викторович
Бутвиловский Валерий Эдуардович

АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ХОРДОВЫХ ЖИВОТНЫХ

Монография

Под общей редакцией Е. В. Барковского

Ответственный за выпуск А.В. Бутвиловский
Редактор А. И. Кизик
Корректор Ю. В. Киселёва
Компьютерная верстка О. Н. Быховцевой

Подписано в печать 16.03.07. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 8,37. Уч.-изд. л. 8,48. Тираж 100 экз. Заказ 459.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусский государственный медицинский университет

ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.

220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 6.