

*А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, О.В. Ачинович, В.Э. Бутвиловский*  
**Изменения в процессе эволюции мутационного давления в  
последовательностях мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы  
класса 3 хордовых животных**

*Белорусский государственный медицинский университет*

Изучены мРНК, кодирующие алкогольдегидрогеназы класса 3 хордовых животных. Установлено, что в процессе эволюции мутационное давление в них изменяет направление (с ГЦ на АТ) и определено его влияние на стратегию кодирования и аминокислотный состав изученных алкогольдегидрогеназ.

Показано, что основным механизмом изменения направления мутационного давления являются ЦГ®ТГ мутации, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина. Ключевые слова: мутационное давление, алкогольдегидрогеназа, стратегия кодирования, ЦГ®ТГ мутации.

Теория мутационного давления является одной из фундаментальных теорий молекулярной эволюции. Ее первичный вариант был разработан Н. Суеокой в 60-е годы XX века [18]. Данная теория, основанная на эмпирических данных, 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 (ГС-давление), или наоборот (АТ-давление) [17]. Общим проявлением мутационного давления является закономерное снижение или повышение уровня ГС-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.

Цель исследования – установить влияние мутационного давления в последовательностях мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы (АДГ) класса 3 хордовых животных, на стратегию их кодирования и аминокислотный состав соответствующих белков, а также предположить механизм этого влияния.

Материал и методы

Проанализированы аминокислотные последовательности алкогольдегидрогеназ класса 3 (АДГ3) нематоды (*Caenorhabditis elegans* – С.е. [9]), оболочников (*Ciona intestinalis* – С.и. [8]), ланцетника (*Branchiostoma floridae* – В.ф. [8]), костных рыб (*Danio rerio* – D.р. [12], *Sparus aurata*-S.а. [14], *Oryzias latipes* – О.л. [15]), земноводных (*Xenopus laevis* – Х.л. [19]), птиц (*Gallus gallus* – G.г. [19]) и млекопитающих (*Oryctolagus cuniculus* – О.с. [7], *Mus musculus* – М.м. [16], *Homo sapiens* – Н.с. [10]), а также соответствующие им последовательности мРНК и гены АДГ3 мышцы человека. Для выравнивания последовательностей

использовалась программа CLUSTAL W [11]. Нуклеотидный и аминокислотный состав, а также использование кодонов изучены с помощью пакета программ MEGA 3 [13]. На основании этих данных вычислены ГЦ-насыщенность, содержание гуанина и цитозина в третьем положении кодона (ГЦЗ-содержание), частота использования претерминальных кодонов (ПТК). Мутационное давление (mD) вычислено по методу Н. Суеоки [17] с АДГ класса 3 нематоды в качестве контроля. Полученные данные обработаны статистически, достоверность различий определена по критерию Стьюдента. Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ №Б06М-060 от 1.04.2006 г.

#### Результаты и обсуждение

Содержание гуанина и цитозина, величины мутационного давления, а также частота использования ПТК в мРНК, соответствующих АДГ3 хордовых животных, показаны в таблице 1.

Таблица 1

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

Организм / показатель	ГЦ-насыщенность, %	ГЦЗ-содержание, %	$\mu_D$	Содержание ПТК, %
H. s.	45,9	40,8	0,37	33,3
O. c.	47,3	44,3	0,40	32,3
M. m.	50,2	51,7	0,45	30,1
G. g.	49,8	46,9	0,45	29,6
X. l.	46,9	43,2	0,39	30,5
D. r.	53,0	58,7	0,50	27,3
O. l.	54,5	62,6	0,54	29,2
S. a.	54,7	64,7	0,54	30,5
B. f.	60,6	76,8	0,65	26,5
C. i.	44,0	32,5	0,39	31,0

Обнаружена тенденция к росту в процессе эволюции содержания ПТК и снижению величины mD, ГЦ-насыщенности, а также содержания гуанина и цитозина в третьем положении кодона в мРНК, кодирующих изучаемые алкогольдегидрогеназы. Значения показателей мутационного давления связаны (рис. 1) с ГЦ-насыщенностью ( $r = 0,98 \pm 0,062$ ,  $p < 0,001$ ) и ГЦЗ-содержанием ( $r = 0,97 \pm 0,093$ ,  $p < 0,001$ ). Это подтверждает утверждение Н. Суеоки о том, что ГЦЗ-содержание может рассматриваться как показатель эквивалентный мутационному давлению [17]. Тогда значениям mD, равным 0 и 1 должно соответствовать содержание гуанина и цитозина в третьем положении нуклеотида в кодоне 0% и 100%, соответственно. Однако на рисунке 1 видно, что экстраполяция тренда не приведет к соблюдению данного условия, что, вероятно, связано с малым количеством точек, используемых для построения тренда.

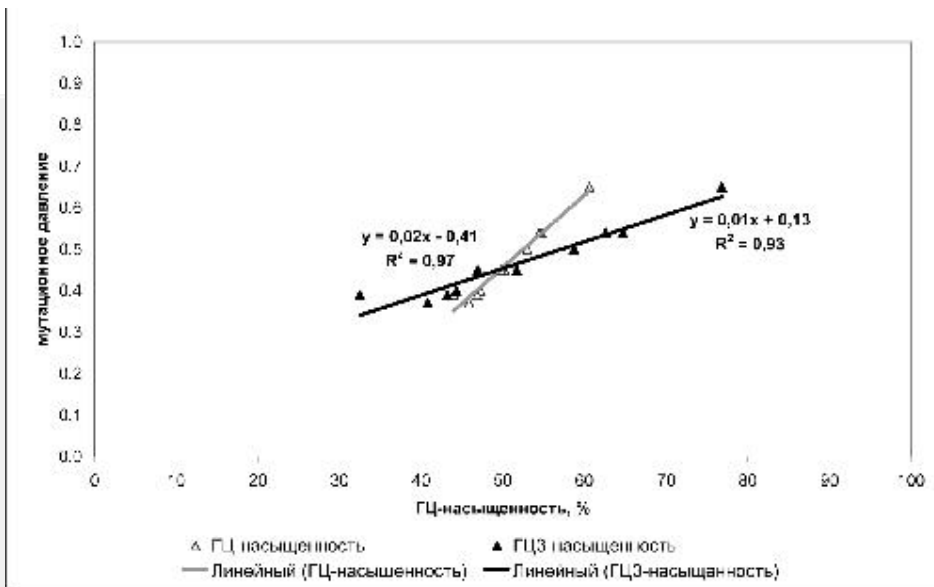


Рис. 1. Зависимость между значениями мутационного давления и ГЦ-насыщенностью, а также содержанием гуанина и цитозина в третьем положении кодона мРНК, кодирующих АДГ класса 3 хордовых животных

В свете приведенных данных становится понятно, что снижение величины  $mD$  связано с изменением направления мутационного давления с ГЦ на АТ. Мы предположили, что наиболее вероятной причиной появления мутационного АТ-давления в процессе эволюции экзонов генов, кодирующих алкогольдегидрогеназы (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 класса 3 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). Ясно, 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 2 показана зависимость между изменением количества ЦГ по сравнению с изменением количества ЦА и ТГ-динуклеотидов в последовательностях экзонов генов, кодирующих АДГ класса 3 мыши и человека.

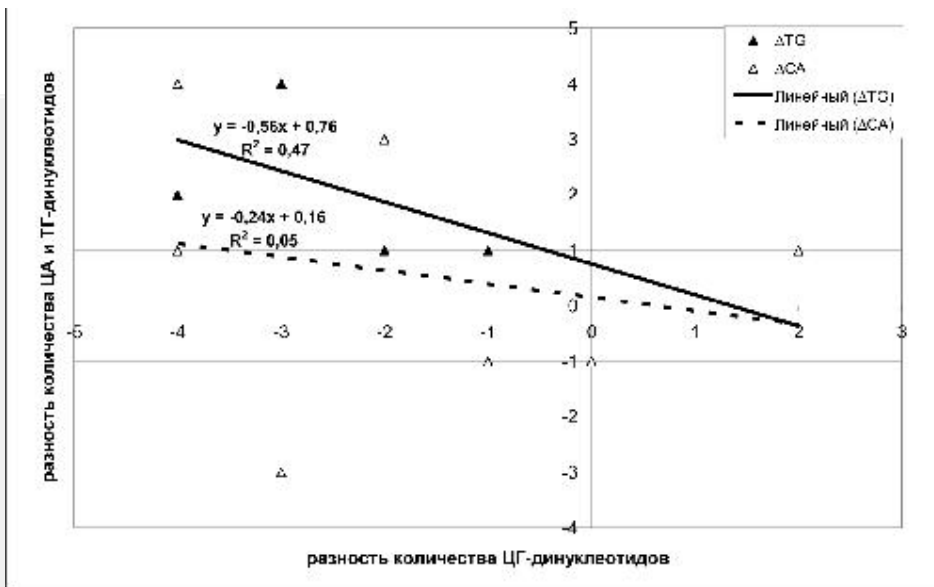


Рис. 2. Зависимость между изменением количества ЦГ-динуклеотидов и изменением количества ЦА и ТГ-динуклеотидов в последовательностях экзонов генов, кодирующих АДГ класса 3 мыши и человека

На данном рисунке видно, что тренд, построенный по значениям DЦГ и DЦА, характеризуется низким значением  $R^2$  (0,05). Это означает, что замены ЦГ@ЦА не являются основным направлением изменения ЦГ-динуклеотидов, что также подтверждается наличием слабой обратной корреляционной связи между данными показателями ( $r = -0,22 \pm 0,436$ ,  $p > 0,05$ ). Тренду по значениям DЦГ и DTГ, 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.

Биохимический механизм данной мутации детально изучен [5]. Как известно, первоначально с помощью метилазы осуществляется метилирование цитозина. Возникающий 5-метилцитозин при спонтанном или индуцированном дезаминировании легко превращается в тимин, который не в состоянии образовать 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 DЦГ и DTГ с осями в точках  $y=0,76$  и  $x=1,36$  (рис. 2) говорит о том, что одна-две мутации в динуклеotide ЦГ могут происходить и по другим механизмам. Среди них, с нашей точки зрения, наиболее вероятными являются замены ЦГ@ЦА и ТГ@ТА, что связано с высокой вероятностью транзиций. Для подтверждения этого предположения мы вычислили коэффициент корреляции между значениями DЦГ и DTГ+DTА+DЦА ( $r = -0,73 \pm 0,306$ ,  $p < 0,05$ ), 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, ТА 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, ТА и ЦА-динуклеотидах.

Таким образом, основным механизмом появления мутационного АТ-давления в генах, кодирующих алкогольдегидрогеназы хордовых животных, являются ЦГ®ТГ мутации, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина.

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 полученными ранее данными [4]. 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. 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, кодирующих аденилатциклазы различных бактерий (спирохет, актиномицетов и др.) [6]. 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 [1].

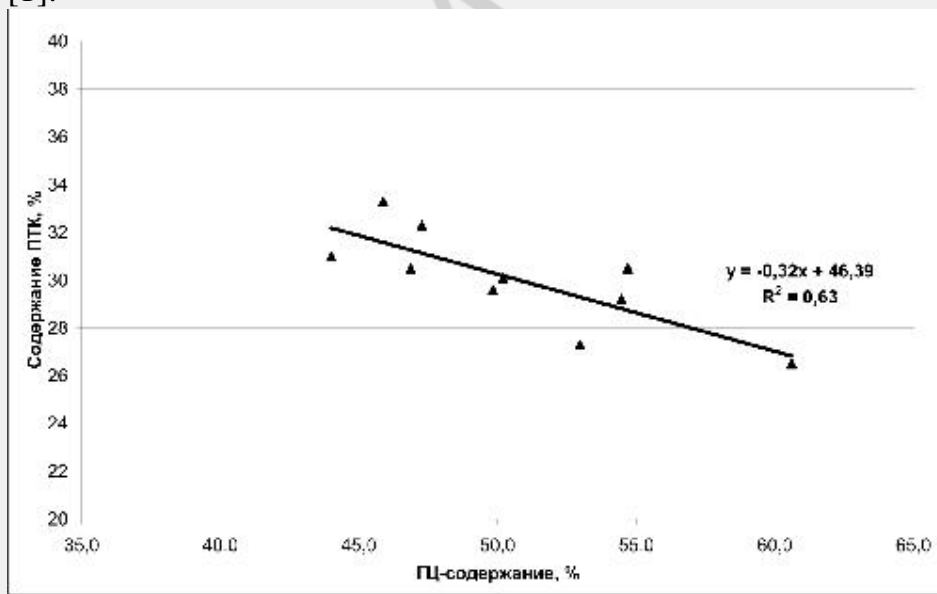


Рис. 3. Зависимость между ГЦ-насыщенностью и содержанием претерминальных кодонов в мРНК, кодирующих АДГ класса 3 хордовых

Анализ собственных и литературных данных 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, изменения данного показателя преимущественно обусловлены изменением ГЦ-насыщенности.

Первоначально определим влияние мутационного давления, а также содержания гуанина и цитозина на значения RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов в мРНК, кодирующих АДГ класса 3 хордовых животных (табл. 2).

Таблица 2

Показатели корреляции между значениями мутационного давления, а также содержанием гуанина и цитозина и значениями RSCU для ГЦЗ-кодонов в последовательностях мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы класса 3 хордовых

Аминокислота	Фен	Вал	Арг	Лей	Сер	Про	Тре	Ала	Гли
ГЦЗ-кодон	УУЦ	ГУЦ ГУ	ЦГЦ ЦГГ АГГ	УУГ ЦУЦ ЦУГ	УЦЦ УЦГ АГЦ	ЦЦЦ ЦЦ	АЦЦ АЦ	ГЦЦ ГЦ	ГГЦ ГГ
r <sub>pm</sub> для *D и RSCU	0,86+ 0,190*	0,82+ 0,202*	0,64+ 0,272*	0,65- 0,268*	0,71+ 0,250*	0,86+ 0,181*	0,84+ 0,190*	0,59+ 0,285*	0,91+ 0,144*
r <sub>pm</sub> для GC и RSCU	0,82+ 0,204*	0,82+ 0,203*	0,72+ 0,247*	0,74- 0,238*	0,76+ 0,231*	0,84+ 0,191*	0,87+ 0,173*	0,63+ 0,273*	0,92+ 0,136*
аминокислота	Лиз	Аль	Гли	Асп	Гис	Глу	Иле	Цис	Тир
ГЦЗ-кодон	ААГ	ААЦ	ЦАГ	ГАЦ	ЦАЦ	ГАГ	АУЦ	УГЦ	УАЦ
r <sub>pm</sub> для *D и RSCU	0,871 0,176*	0,721 0,244*	0,541 0,298	0,871 0,172*	0,761 0,228*	0,851 0,189*	0,861 0,182*	0,831 0,199*	0,831 0,184*
r <sub>pm</sub> для GC и RSCU	0,901 0,153*	0,711 0,245*	0,521 0,301	0,891 0,162*	0,791 0,218*	0,871 0,174*	0,881 0,165*	0,791 0,217*	0,831 0,199*

Примечание. Достоверные корреляционные связи ( $p < 0,05$ ) обозначены знаком \*. Установлено, что между значениями мутационного давления, а также ГЦ-насыщенностью изучаемых последовательностей мРНК и значениями RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов существуют достоверные прямые корреляционные связи (за исключением кодонов, соответствующих глутамину). Понятно, 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 АТ-давлении значения RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов будут уменьшаться, поскольку уменьшается содержание гуанина и цитозина.

Перейдем к определению влияния на аминокислотный состав алкогольдегидрогеназ класса 3 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 АДГЗ с содержанием гуанина и цитозина в соответствующих мРНК (рис. 4).

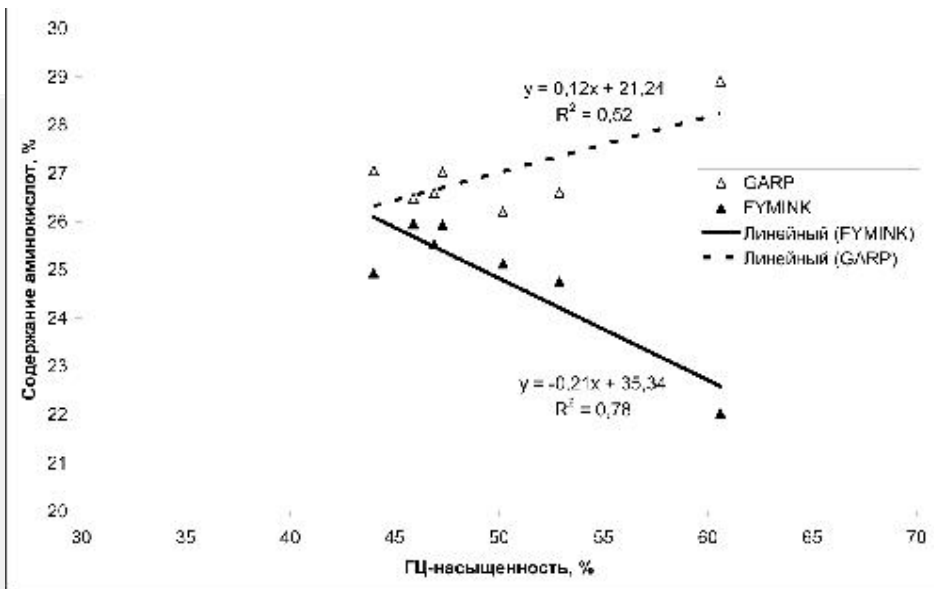


Рис. 4. Зависимость содержания GARP и FYMINK в алкогольдегидрогеназах класса 3 хордовых от ГЦ-насыщенности кодирующих их мРНК

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 [2, 3].

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 АТ-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 АТ-давления данные кодоны будут использоваться чаще, что повлечет увеличение содержания фенилаланина, тирозина, метионина, изолейцина, аспарагина и лизина.

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

#### Выводы

1. Динамика стратегии кодирования алкогольдегидрогеназ класса 3 в мРНК хордовых животных заключается в уменьшении величины mD и изменении направления мутационного давления (с ГЦ на АТ), что приводит к снижению ГЦ-насыщенности, ГЦ3-содержания, увеличению содержания ПТК, уменьшению значений RSCU для синонимичных ГЦ3-кодонов, увеличению содержания аминокислот группы FYMINK и уменьшению содержания аминокислот группы GARP.

2. Основным молекулярным механизмом изменения направления мутационного давления в изучаемых мРНК, являются ЦГ®ТГ мутации, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина.

#### Литература

1. Барковский, Е.В. Мембраносвязанные аденилатциклазы: монография / Е.В. Барковский, О.В. Ачинович; под общ. ред. Е.В. Барковского. – Минск.: БГМУ, 2005. – 134 с.
2. 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 республ. конф., посвящ. 75-летию со дня основания каф. общей химии БГМУ / под ред. Е.В. Барковского. – Минск: БГМУ. – 2006. – С. 27 – 30.
3. Барковский, Е.В. Сравнительная характеристика матричных РНК аденилатциклаз актиномицетов / Е.В. Барковский, В.В. Хрусталева // Бел. мед. журнал. – 2004. – №3. – С. 27 – 30.
4. Барковский, Е.В. Сравнительная характеристика матричных РНК аденилатциклаз актиномицетов / Е.В. Барковский, В.В. Хрусталева // Бел. мед. журнал. – 2004. – №3. – С. 27 – 30.
5. 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.
6. Хрусталева, В.В. Частота использования претерминальных кодонов в матричных РНК бактериальных аденилатциклаз / В.В. Хрусталева, Е.В. Барковский // здравоохранение. – 2006. – №2. – С. 17 – 20.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.



13. 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.
14. Molecular cloning of fish alcohol dehydrogenase cDNA / B. Funkenstein, S.B. Jakowlew // *Gene* – 1996. – Vol. 174. – P. 159 – 164.
15. 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.
16. 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.
17. Sueoka, N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution / N. Sueoka // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – Vol. 85. – P. 2653 – 2657.
18. 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.
19. 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.