

## О МЕХАНИЗМАХ МУТАЦИОННОГО ДАВЛЕНИЯ В мтДНК ЧЕЛОВЕКА, ТРИХИНЕЛЛЫ И ЦИАНОРАБДИТИС

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

Белорусский государственный медицинский университет

г. Минск, Республика Беларусь

**Введение.** При анализе большого количества последовательностей нуклеиновых кислот различных организмов были выявлены некоторые особенности нуклеотидного состава ДНК, которые сложно было объяснить в рамках теории нейтральной эволюции М. Кимуры [3]. Такими особенностями являются: 1) колебания ГЦ-содержания ДНК различных видов бактерий от 25 до 75%; 2) влияние филогенетических отношений на значение ГЦ-содержания: близкородственные виды имеют схожий состав азотистых оснований ДНК; 3) гетерогенность ГЦ-содержания внутри генома одного вида.

Для объяснений этих закономерностей Н. Суекой была разработана теория направленного мутационного давления. Установлено, что мутационное давление – это фактор молекулярной эволюции, обусловленный повышенной частотой возникновения и фиксации замен аденина и тимина на гуанин и цитозин относительно частоты возникновения и фиксации замен гуанина и цитозина на аденин и тимин (ГЦ-давление), или наоборот (АТ-давление) [1]. Определенной силе мутационного давления соответствует определенный нуклеотидный состав, достигнув которого прекратится фиксация мутаций в данном направлении.

Направленное мутационное давление реализуется благодаря определенным молекулярным механизмам[2]. К настоящему времени накоплена информация о механизмах мутационного давления в ряде ДНК (в основном бактерий и вирусов), однако отсутствуют данные о механизмах мутационного давления в ДНК, кодирующих белки человека и трихинеллы как компонентов системы «паразит-хозяин», формирующейся при трихинеллезе.

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

**Цель работы:** определить молекулярные механизмы мутационного давления в генах, кодирующих белки дыхательной цепи человека и трихинеллы (случай) и человека и цианорабдитис (контроль).

**Методы.** В качестве объектов исследования с сервера NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) взяты последовательности ДНК, кодирующих субъединицы НАДН-дегидрогеназы (1-6 и 4L),

субъединицы 1-3 цитохром-*c*-оксидазы, цитохром *b* человека (*H. sapiens*), трихинеллы (*T. spiralis*, опыт) и свободноживущей нематоды цианорабдитис (*C. elegans*, контроль).

Разбивка ДНК на динуклеотиды, подсчет количества отдельных типов динуклеотидов и их разницы в ДНК человека и трихинеллы, ДНК человека и цианорабдитис произведены в программе Microsoft Excel 2007. Выравнивание последовательностей выполнено с помощью программы ClustalW (на матрице Gonnet при стандартных условиях) в пакете MEGA 4 [5]. Сходство динуклеотидного состава изучаемых ДНК оценено по дистанции динуклеотидного состава [4]. Полученные результаты обработаны методами описательной статистики в программе Microsoft Excel, корреляционный анализ выполнен с помощью коэффициента Пирсона, достоверность различий определена по критериям  $\chi^2$  и Стьюдента.

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

Определение разницы количества отдельных типов динуклеотидов (табл. 1) позволило установить достоверное ( $p < 0,001$ ) снижение содержания АА-динуклеотидов в изучаемых генах человека по сравнению с таковыми трихинеллы на 38,25%, а также ряда аденин-содержащих динуклеотидов: ГА – на 23,24%, АТ – на 14,41%, АЦ – на 12,21% и ЦА – на 10,98%. При этом наблюдается достоверный ( $p < 0,001$ ) рост количества цитозин-содержащих динуклеотидов: ГЦ – на 131,98%, ЦЦ – на 73,06%, ЦТ – на 71,98% и ТЦ – на 51,47%. Полученные данные наводят на мысль о том, что в изучаемых ДНК человека и трихинеллы мутационное давление реализуется путем перехода адениновых динуклеотидов в содержащие цитозин и тимин динуклеотиды. Анализ различий в содержании динуклеотидов в каждой паре изучаемых ДНК человека и трихинеллы (табл. 1) показал наличие достоверных связей ( $p < 0,05$ ) между уменьшением количества динуклеотидов АЦ, ЦА, АА и увеличением числа ТТ, ТЦ, ТГ, ЦТ, ГТ, ГЦ и ГГ динуклеотидов (табл. 2). Связь между разницей числа данных групп динуклеотидов в изучаемых ДНК человека и трихинеллы является обратной и сильной ( $r = -0,98 \pm 0,063$ ) и достоверно ( $p < 0,001$ ) отличается от таковой в изучаемых ДНК человека и цианорабдитис ( $r = -0,31 \pm 0,32$ ). Таким образом, на основании изменений динуклеотидного состава изучаемых ДНК человека и трихинеллы можно предположить, что основным механизмом мутационного давления в них является переход аденина динуклеотидов АА, ЦА, АЦ в цитозин, гуанин и меньшей мере тимин соответствующих динуклеотидов. Изучение выровненных ДНК человека и трихинеллы позволило подтвердить и уточнить выдвинутую гипотезу о переходе А→Ц, Т в некоторых

аденин-содержащих динуклеотидах. Доля мутировавших динуклеотидов АА, в которых наблюдаются замены в соответствии с описываемой моделью, равна  $54,97 \pm 1,48\%$  и достоверно больше мутаций в них, происходящих по другим механизмам ( $p < 0,001$ ). Так,  $9,50 \pm 0,87\%$  и  $9,15 \pm 0,86\%$  от общего количества мутировавших АА фрагментов переходят соответственно в АТ и ТА посредством мутации  $A \rightarrow T$ , большее число динуклеотидов АА переходят в цитозин содержащие ЦЦ ( $12,43 \pm 0,98\%$ ), ЦА ( $13,50 \pm 1,02\%$ ), АЦ ( $10,39 \pm 0,91\%$ ). Переход динуклеотидов АЦ  $\rightarrow$  ЦЦ и ЦА  $\rightarrow$  ЦЦ в результате трансверсии  $A \rightarrow C$  составляет  $17,63 \pm 1,34\%$  и  $16,55 \pm 1,25\%$ , соответственно. Подтверждением действия предложенного механизма мутационного давления является сильная отрицательная достоверная связь ( $r = -0,79 \pm 0,20$ ,  $p < 0,01$ ) между разностью количества динуклеотидов  $\Delta AA + \Delta AC + \Delta CA + \Delta TA + \Delta AT$  и  $\Delta TT + \Delta TC + \Delta CT$  в изучаемых ДНК человека и трихинеллы.

Установлено, что в изученных мтДНК трихинеллы и человека, достоверно преобладают трансверсии  $A \rightarrow C$  ( $21,55 \pm 0,56\%$ ), благодаря которым и происходят большая часть ( $77,78\%$ ) трансформаций динуклеотидов, несколько реже наблюдается трансверсия  $A \rightarrow T$  ( $14,12 \pm 0,48\%$ ).

При статистической обработке данных разницы содержания динуклеотидов в ДНК человека и цианорабдитис (табл. 1) выявлена зависимость между уменьшением числа ТТ динуклеотидов и возрастанием числа динуклеотидов ТЦ, ЦТ и ЦЦ. Данная связь характеризуется как сильная обратная ( $r = -0,98 \pm 0,06$ ) и достоверно ( $p < 0,001$ ) отличается от аналогичной в паре человек-трихинелла ( $r = 0,71 \pm 0,24$ ). Уравнение регрессионного анализа для данных показателей в ДНК человека и цианорабдитис имеет вид:  $y = -1,467x - 16,9$ , где  $x = \Delta TC + \Delta CT + \Delta CC$  и  $y = \Delta TT$ , а высокий  $R^2 = 0,96$ , является доказательством перехода  $T \rightarrow C$ , как одного из механизмов мутационного давления в изучаемых ДНК человека и цианорабдитис.

Таблица 1  
Разница числа динуклеотидов в исследуемых ДНК человека и цианорабдитис(1), человека и трихинеллы(2)

Динуклеотид	1		2		1		2		1		2		1		2		1		2		1		2		1		2	
	НАДН-ДГ1		НАДН-ДГ2		НАДН-ДГ3		НАДН-ДГ4		НАДН-ДГ4L		НАДН-ДГ5		НАДН-ДГ6		Цит b		ЦО1		ЦО2		ЦО3		Общее					
АТ	-33	15	-23	11	-16	12	-67	11	-4	11	-42	3	4	23	-35	36	-55	50	38	18	-34	22	-343	140				
АЦ	69	2	69	37	25	5	116	-24	22	-14	120	-45	49	19	62	3	51	-10	41	-5	38	-27	662	-133				
АГ	-9	-15	5	5	-10	1	-19	-11	3	8	-19	22	-3	7	-27	-20	-12	1	18	-13	-5	-4	-114	-19				
АА	-4	38	9	85	0	2	22	-140	-3	38	28	-137	45	17	-5	-18	-6	32	-6	25	0	50	80	544				

ТА	-28	23	-14	30	-5	-6	-62	28	5	20	-66	29	15	20	-64	39	-75	46	36	-9	-36	31	-396	-67
ТТ	177	26	183	38	54	19	222	50	58	6	287	57	98	32	183	20	213	30	99	-4	109	20	1683	40
ТЦ	46	27	63	46	12	-8	73	77	16	11	117	86	24	0	82	19	74	16	31	11	30	15	568	300
ТГ	-19	8	-20	12	-9	-3	-20	21	-4	9	-17	21	12	-4	-37	-1	-44	16	21	3	-21	11	-224	93
ЦА	59	11	76	37	10	2	98	-39	20	17	138	-46	59	23	70	6	64	-3	29	15	45	-8	668	123
ЦТ	63	28	81	72	30	1	102	106	31	24	129	115	19	1	71	23	68	25	36	20	34	9	664	424
ЦЦ	110	72	113	56	40	28	131	8	27	0	191	63	73	57	114	76	114	60	62	30	77	49	1052	499
ЦГ	21	13	15	8	6	3	26	16	5	4	32	15	7	3	26	20	37	15	25	16	12	10	212	123
ГА	-4	-16	-13	-15	-7	-3	-8	-14	-3	2	-12	-3	6	0	-7	-20	-5	-10	-9	13	-11	-14	-73	106
ГТ	-31	-1	-27	5	-15	-5	-41	9	10	4	-54	17	25	-1	-54	-7	-58	11	24	3	-26	9	-365	44
ГЦ	28	23	40	35	9	9	37	31	18	15	62	44	11	7	23	27	44	31	18	15	23	23	313	260
ГГ	-11	6	2	10	-6	0	-8	13	-2	6	-26	14	-3	0	-12	6	-19	3	-3	10	-4	17	-92	85

Таблица 2

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

Динуклеотиды	ΔТТ	ΔТЦ	ΔТГ	ΔЦТ	ΔГТ	ΔГЦ	ΔГГ
ΔАЦ	-0,90±0,14	-0,76±0,22	-0,83±0,19	-0,77±0,21	-0,80±0,20	-0,80±0,20	-0,80±0,20
ΔЦА	-0,93±0,12	-0,81±0,19	-0,78±0,21	-0,86±0,17	-0,71±0,24	-0,70±0,24	-0,70±0,24
ΔАА	-0,91±0,14	-0,97±0,09	-0,89±0,15	-0,96±0,09	-0,74±0,23	-0,82±0,19	-0,75±0,22

Подтверждением выдвинутого предположения является существование зависимости содержания динуклеотидов ЦТ и ТЦ от количества ТТ динуклеотидов ( $r = -0,97 \pm 0,083$ ;  $p < 0,001$ ), а также рост количества ЦЦ динуклеотидов при уменьшении числа ТТ ( $r = -0,97 \pm 0,068$ ;  $p < 0,001$ ). Доля динуклеотидов ТТ, в которых наблюдаются мутации в соответствии с описанным механизмом, равна  $81,74 \pm 0,94\%$ , что достоверно больше мутаций протекающих в других направлениях ( $p < 0,001$ ). Установлено, что в изученных мтДНК трихинеллы и человека, достоверно преобладают транзиции Т→Ц ( $26,45 \pm 0,61\%$ ,  $p < 0,001$ ), благодаря которым и происходят большая часть ( $77,78\%$ ) трансформаций динуклеотидов, несколько реже наблюдается трансверсия Т→А ( $18,18 \pm 0,53\%$ ), которая определяет переходы динуклеотидов ТТ в ТА и АТ.

При сравнения предложенных молекулярных механизмов мутационного давления в ДНК опыта и контроля обнаружено, что они отличаются по преимущественно используемым субстратам (соответственно АА и ТТ) и преобладающему виду мутаций (соответственно трансверсии А→Ц, Т; транзиция Т→Ц + трансверсия Т→А). Наиболее вероятной причиной этих отличий, с нашей точки зрения, является коэволюция человека и трихинеллы как компонентов системы “паразит-хозяин”, формирующейся при трихинеллезе.

#### Выводы:

1. Дистанция динуклеотидного состава для изученных генов человека и трихинеллы достоверно меньше таковой для генов человека и цианорабдитис.

2. В основе механизма мутационного давления в паре человек-цианорабдитис лежат транзиция Т→Ц и трансверсия Т→А, приводящие к преимущественному образованию динуклеотидов ЦЦ, ЦА и АЦ.

3. В основе механизма мутационного давления в паре человек-трихинелла лежат трансверсии А→Ц и А→Т, приводящие к преимущественному образованию динуклеотидов ЦЦ, ЦТ и ТЦ.

#### **Литература:**

1. Бутвиловский, А. В. Основные методы молекулярной эволюции: монография / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский, В.В. Давыдов, Е.А. Черноус, В.В. Хрусталеv; под общ. ред. Е. В. Барковского. – Мн.: Белпринт, 2009. – 216 с.

2. Бутвиловский, А. В. Алкогольдегидрогеназы хордовых животных : монография / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский; под общ. ред. Е. В. Барковского. – Мн.: БГМУ, 2007. – 144 с.

3. Кимура, М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности / М. Кимура – М., 1985. – 398 с.

4. Новый метод определения эволюционных дистанций между последовательностями нуклеиновых кислот / А.В. Бутвиловский [и др.] // Современные информационные и телемедицинские технологии для здравоохранения (АИТТН`2008): материалы II Международной конференции (1-3 октября, 2008, Минск, Беларусь). – Минск: Объединенный институт проблем информатики Национальной академии Наук Беларуси, 2008. – С. 140-144.

5. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. / Kumar S. Tamura K., Dudley J., Nei M. // Mol. Biol. Evol. – 2007 – Vol. 24 – P. 1596–1599.