

Сравнительная характеристика матричных РНК аденилатциклаз актиномицетов

В статье представлены результаты сравнительного исследования нуклеотидных последовательностей мРНК аденилатциклаз актиномицетов. Ключевые слова: аденилатциклаза, нуклеотидная последовательность, синонимичные кодоны, молекулярная эволюция, актиномицеты.

The article presents data of the studies of nucleotide sequences mRNA adenylyl cyclases of actinomycetales.

Key words: adenylyl cyclase, nucleotide sequence, synonymous codons, molecular evolution, actinomycetales.

Аденилатциклазы играют значительную роль в метаболизме и патологическом действии актиномицетовых бактерий посредством регуляции уровня цАМФ внутри и за пределами бактериальной клетки. В частности, *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis* нарушают метаболизм макрофагов, которые их поглощают, за счет повышения уровня цАМФ и таким образом персистируют в пораженном организме [9]. У *Streptomyces griseus* аденилатциклаза выполняет функцию регулятора процесса синтеза мицелия и стрептомицина за счет поддержания определенного уровня цАМФ [5]. Таким образом, отсутствие или дефект аденилатциклаз у актиномицетовых бактерий серьезно нарушает их метаболизм и приводит к гибели.

За очень небольшими исключениями, генетический код является одинаковым у всех живых организмов на Земле. Строгое соответствие кодонов мРНК аминокислотам сохраняется как у эукариотических, так и у прокариотических организмов. Число возможных разновидностей кодонов мРНК ($4^3 = 64$) гораздо больше, чем число аминокислот (20). Поэтому все аминокислоты, за исключением метионина и триптофана, кодируются более чем одним кодоном. Частоты использования синонимичных кодонов значительно варьируют и существенно отличаются от их статистического ожидания. По-видимому, данное явление не является случайностью, а возникло в процессе эволюции как следствие отбора наиболее устойчивых генотипов.

Молекула ДНК состоит из двух антипараллельных нуклеотидных цепей, связанных между собой посредством водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями. Аденин и тимин образуют две такие связи, а гуанин и цитозин – три. Соответственно, связь между гуанином и цитозином прочнее, чем между аденином и тимином. Таким образом, насыщенность ДНК гуанином и цитозином является одним из факторов, обеспечивающих ее термодинамическую стабильность.

Во многих случаях содержание гуанина и цитозина в ДНК связывают с филогенией, так как близкородственные виды (в том числе бактерий) имеют сходные показатели этой величины. В систематике микроорганизмов используется «показатель специфичности» (G+C), равный процентному содержанию гуанина и цитозина относительно всех нуклеотидов генома [8].

Мутационная гипотеза, объясняющая разницу в содержании Г + Ц, подразумевает существование неравновероятных мутационных переходов от одного нуклеотида к другому [8]. Согласно этой точке зрения, содержание Г + Ц в геномах бактерий определяется мутационным давлением – балансом между скоростью замен С или G на Т или А и скоростью обратных замен А или Т на G или С. При установлении величины этого мутационного давления обычно рассматривают четырехкратно вырожденные кодоны, замена нуклеотида в третьем положении которых не приводит к замене аминокислоты, соответствующей данному кодону.

Настоящее исследование посвящено сравнительному анализу нуклеотидных последовательностей мРНК с целью установления родственных отношений между аденилатциклазами различных семейств актиномицетов и выяснения закономерностей использования различных кодонов в процессе трансляции фермента.

Материалы и методы

Проанализированы нуклеотидные последовательности кодирующих участков мРНК аденилатциклаз *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Rv1625c /AF017731/ и Rv1264 /BX842576/), *Mycobacterium bovis* (Mb1295 /NC_002945/ и Mb1651c /BX248339/), *Streptomyces coelicolor* (Sco4928 /AL939121/ и Sco394 /X74768/), *Corynebacterium glutamicum* (Cg10306 /NC_003450/ и Cg10311 /AP005274/), *Streptomyces griseus* (Sg394A /AB018557/), *Thermobifida fusca* (Tfus1956 /NZ_AAAQ01000037/) и *Brevibacterium liquefaciens* (Bli394 /X57541/).

Оценку степени гомологии мРНК аденилатциклаз проводили на основании значений индексов сходства сравниваемых нуклеотидных последовательностей, выравненных с помощью программы CLUSTALW [11]. Эти индексы вычисляются как количество точно совпадающих нуклеотидов в выравнивании между двумя последовательностями за вычетом некоторого фиксированного штрафа за каждый вносимый в последовательность пробел (вставку).

Значения индексов сходства нуклеотидных последовательностей использовались программой CLUSTALW для построения дендрограмм сравниваемых мРНК.

Расчет частот встречаемости различных кодонов мРНК, а также показателей GC3 (частота кодонов, содержащих в третьем положении G или C, исключая метионин, триптофан и стоп-кодона) и G+ C (процентное содержание гуанина и цитозина) проводился с помощью оригинальной программы VVK 1.0.

Обработка результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel, 2000.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены значения индекса сходства нуклеотидных последовательностей мРНК аденилатциклаз актиномицетов. Судя по значениями индекса сходства и дендрограммы (рис.1), построенной на основании этих значений, следует, что аденилатциклазы Rv1625c, Mb1651c, Cg10306 и Cg10311 образуют одно из двух подсемейств в семействе аденилатциклаз актиномицетовых бактерий. В этом подсемействе четко выделяются два подподсемейства: Rv1625c/Mb1651c и Cg10306/Cg10311.

Таблица 1

Значения индекса сходства нуклеотидных последовательностей мРНК аденилатциклаз актиномицетовых бактерий

Тип АЦ	Rv 1625c	Rv 1264	Mb 1295	Mb 1651c	Sco 4928	Sco cya	Cg 10306	Cg 10311	Sgr cyaA	Tfus 1956	Bliq cya
Rv 1625c	100	10	10	99	6	6	15	20	5	3	2
Rv1264		100	99	10	25	24	1	1	26	20	19
Mb1295			100	10	25	24	1	1	26	20	8
Mb1651c				100	6	6	16	20	5	3	2
Sco4928					100	100	3	4	82	51	48
Sco cya						100	3	4	81	51	47
Cg 10306							100	100	4	1	1
Cg 10311								100	4	1	2
Sgr cyaA									100	50	46
Tfus 1956										100	52
Bliq cya											100

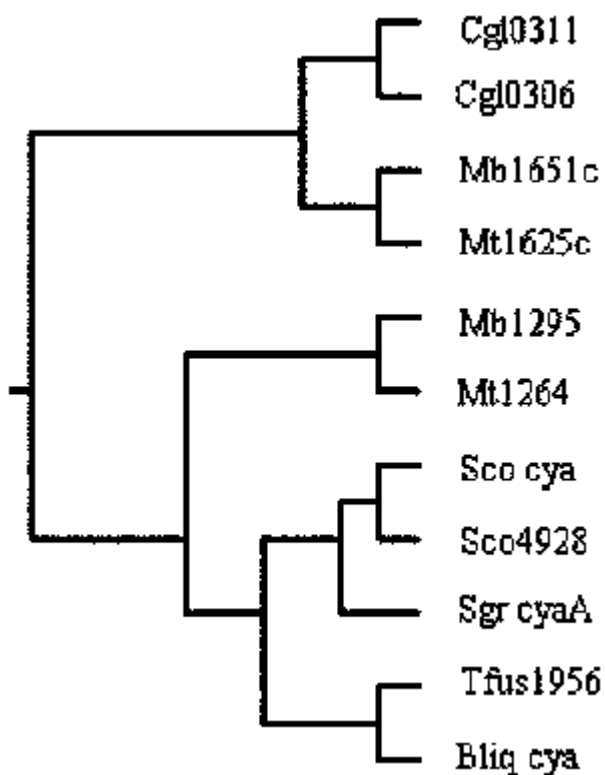


Рис.1. Родственные отношения между аденилатциклазами актиномицетовых бактерий, сгруппированными на основании значений индекса сходства нуклеотидных последовательностей мРНК

Второе подсемейство образуют аденилатциклазы Mb1295, Rv1264, Sco4928, Sco cya, Sgr cyaA, Tfus1956 и Bliq cya.

В этом подсемействе можно выделить три подподсемейства Mb1295/ Rv1264, Sco4928/ Sco cya/ Agr cyaA и Tfus1956/Bliq cya.

Следует отметить, что среднее значение индекса сходства мРНК аденилатциклаз коринебактерий (Cg10306 и Cg10311) с мРНК аденилатциклаз остальных актиномицетовых бактерий является наименьшими (14,5 и 15,7

соответственно). Исходя из этого, можно полагать, что самым древним представителем в семействе аденилатциклаз актиномицетов является аденилатциклаза коринебактерий.

Известно, что эволюция бактерий шла в направлении от грамположительных бактерий с низким содержанием гуанина и цитозина к грамположительным бактериям с высоким содержанием гуанина и цитозина [1].

Нами показано, что процентное содержание гуанина и цитозина (Г + Ц) в мРНК коринебактерий составляет 59,1%, брeвибактерий – 68,9%, микобактерий – 66,9%, бактерий термобифида – 68,9%, стрептомицетов – 73,9%. Если предположить, что содержание Г + Ц в генах аденилатциклаз в какой мере отражает таковое в геномах актиномицетов, то эволюция последних шла в направлении от коринебактерий к стрептомицетам.

Поскольку аденилатциклазы образуют суперсемейство белков, присутствующих у всех одно- и многоклеточных организмов, они являются хорошим объектом для сравнительных исследований их мультигенных семейств с целью оценки филогенетических связей между ними. Рассматривая путь эволюции аденилатциклаз, нужно учитывать следующие обстоятельства. Ввиду наибольшей изученности в указанном плане позвоночных животных наши эволюционные представления базируются в основном на данных, полученных при исследовании этих животных. Между тем, позвоночные проделали свой эволюционный дебют только на последнем – 20%-ном участке жизни нашей планеты [4]. Кроме того, они составляют лишь несколько процентов от всех многоклеточных животных и еще меньшую часть от всех животных форм на Земле. Принимая это во внимание, можно полагать, что сравнительный анализ мРНК аденилатциклаз актиномицетов и человека поможет приблизить нас к пониманию эволюции этого фермента.

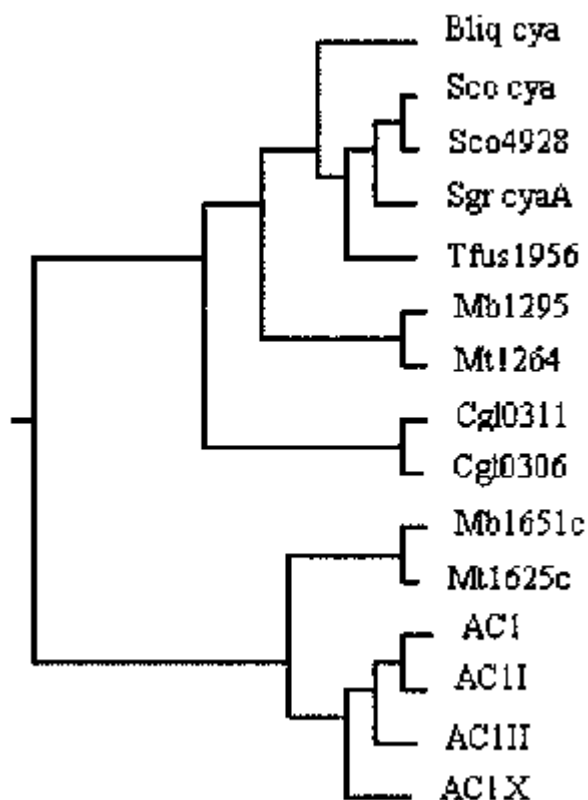


Рис.2. Родственные отношения между аденилатциклазами актиномицетов и человека, сгруппированными на основе значений индекса сходства их нуклеотидных последовательностей.

На рис. 2 представлена дендрограмма, построенная на основе значений индекса сходства нуклеотидных последовательностей рассматриваемых мРНК аденилатциклаз актиномицетов и аденилатциклаз I,II,III и IX типов человека (АС I-III, IX). Видно, что аденилатциклазы Mt1625c и Mb1651c группируются с аденилатциклазами человека на ветви отдельной от других аденилатциклаз актиномицетов. Это неожиданное и такое уникальное сходство мРНК аденилатциклаз бактерий и человека ставит много вопросов об их эволюционных и функциональных взаимоотношениях. Можно полагать, что заякоренные в мембране мономерные микобактериальные аденилатциклазы Mt1625c и Mb1651c являются эволюционными предшественниками псевдогетеродимерных мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих.

Перейдем к рассмотрению общих закономерностей кодирования аденилатциклаз матричными РНК актиномицетов. Последовательности 11 мРНК аденилатциклаз сактиномицетовых бактерий содержали 13230 нуклеотидных сайтов, соответствующих 4410 кодомам. В табл. 2 приведены частоты встречаемости различных кодонов в рассматриваемых нуклеотидных последовательностях мРНК аденилатциклаз актиномицетовых бактерий.

Видно, что «кодирующая стратегия» в отношении выбора среди синонимичных кодонов заключается в следующем: чем больше насыщенность кодонов гуанином и цитозином, тем выше частота их встречаемости. Эта закономерность позволяет предположить существование механизма повышения термодинамической устойчивости кодирующих участков генов, ответственных за синтез аденилатциклаз актиномицетовых бактерий, за счет преимущественного использования кодонов, насыщенных гуанином и цитозином.

Таблица 2

кодон	G+C, %	частота 10 ⁻³	кодон	G+C, %	частота 10 ⁻³	кодон	G+C, %	частота 10 ⁻³	кодон	G+C, %	частота 10 ⁻³
Phe			Ser			Tyr			Cys		
UUU	0	5,3±2,0	UCU	33,3	3,6±1,6	UAU	0	2,0±0,4	UGU	33,3	1,1±0,6
UUC	33,3	28,3±3,0	UCC	66,6	15,8±1,7	UAC	33,3	12,6±1,6	UGC	66,6	1,3±0,5
Leu			UCA	33,3	1,1±0,6	Term			Term		
UUA	0	0,6±0,3	UCG	66,6	11,8±2,2	UAA	0	0,4±0,3	UGA	33,3	1,1±0,4
UUG	33,3	12,1±3,1				UAG	33,3	0,9±0,4	Trp		
									UGG	66,6	11,7±0,9
Leu			Pro			His			Arg		
CUU	33,3	6,6±2,0	CCU	66,6	5,0±1,3	CAU	33,3	2,9±1,1	CGU	66,6	11,3±4,2
CUC	66,6	30,8±5,8	CCC	100	16,4±2,0	CAC	66,6	10,7±1,4	CGC	100	35,6±4,0
CUA	33,3	3,1±1,4	CCA	66,6	5,0±1,3	Gln			CGA	66,6	4,7±1,0
CUG	66,6	53,0±3,3	CCG	100	22,9±2,5	CAA	33,3	3,8±1,3	CGG	100	26,1±4,2
						CAG	66,6	26,9±1,9			
Ile			Thr			Asn			Ser		
AUU	0	6,7±3,0	ACU	33,3	4,4±1,4	AAU	0	3,5±1,0	AGU	33,3	1,5±0,7
AUC	33,3	25,0±2,0	ACC	66,6	39,7±5,0	AAC	33,3	12,3±2,8	AGC	66,6	9,9±1,6
AUA	0	1,8±0,6	ACA	33,3	1,3±0,4	Lys			Arg		
Met			ACG	66,6	16,5±2,7	AAA	0	4,7±1,6	AGA	33,3	0,9±0,4
AUG	33,3	23,0±1,2				AAG	33,3	11,8±1,1	AGG	66,6	4,0±1,2
Val			Ala			Asp			Gly		
GUU	33,3	7,8±2,6	GCU	66,6	11,0±3,6	GAU	33,3	15±2,9	GGU	66,6	13,4±2,9
GUC	66,6	43,0±3,8	GCC	100	70,0±7,5	GAC	66,6	45,1±6,3	GGC	100	46,4±3,5
GUA	33,3	3,7±1,8	GCA	66,6	11,9±2,5	Glu			GGA	66,6	7,9±1,4
GUG	66,6	45,3±3,9	GCG	100	48,0±3,2	GAA	33,3	16,1±3,6	GGG	100	16,5±3,5
						GAG	66,6	57,8±8,3			

Примечание. Заштрихованы претерминальные кодоны.

Интересно отметить, что у термофильных бактерий, живущих при высоких температурах, обнаружено предпочтительное использование CG-богатых кодонов [6]. Аналогично, микроорганизмы, обитающие в верхних слоях почвы и подвергающиеся действию ультрафиолетовой радиации, характеризуются более высоким GC-содержанием, чем не подверженные такому воздействию бактерии [10].

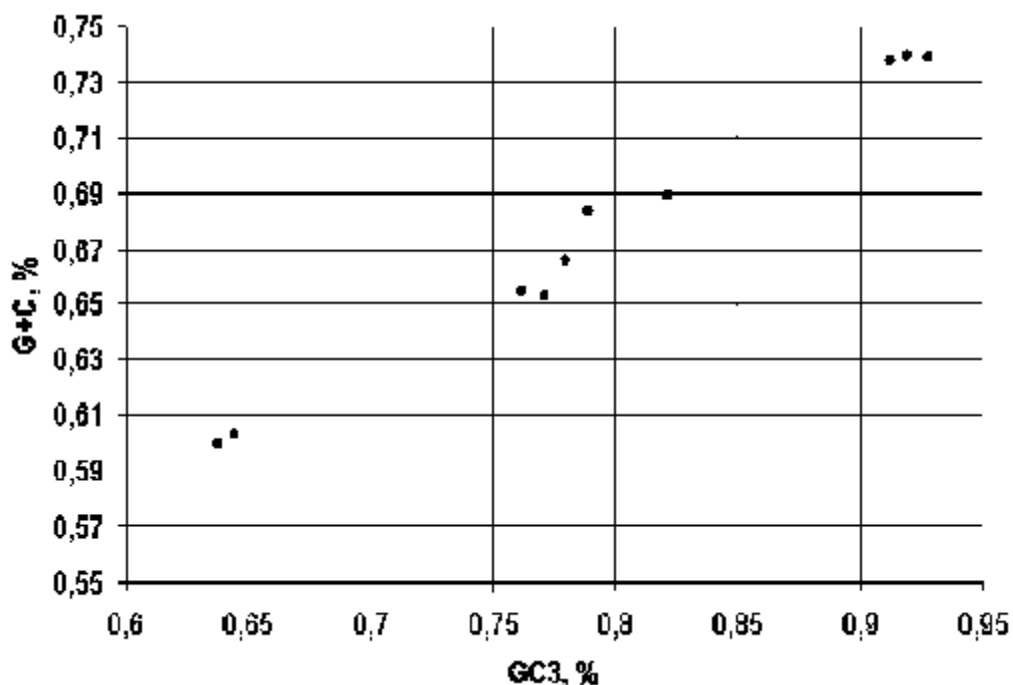


Рис. 3. Зависимость содержания ГЦЗ кодонов (%) в мРНК аденилатциклаз актиномицетов от величины Г + Ц (%)

Проведенные нами расчеты показали, что общая насыщенность исследуемых мРНК аденилатциклаз актиномицетов гуанином и цитозином (Г + Ц) равна $66,7 \pm 1,6\%$. Среднее значение показателя ГЦЗ для этих же мРНК составляет $79,6 \pm 3,1\%$. На рис. 3 представлены данные о зависимости содержания ГЦЗ кодонов в мРНК аденилатциклаз актиномицетов от величины Г + Ц. Величина коэффициента корреляции между этими двумя показателями указывает на их тесную положительную функциональную связь ($r=0,99$). Анализируя эти результаты и данные, приведенные в табл.2, можно прийти к заключению, что в процессе трансляции аденилатциклаз актиномицетов наблюдается преимущественное использование синонимичных кодонов, содержащих в третьем положении гуанин или цитозин.

Экспериментальные данные убедительно свидетельствуют о том, что между частотой использования кодонов и содержанием в клетке соответствующих тРНК существует положительная корреляция [2]. Особенно интересен тот факт, что среди синонимичных кодонов для данной аминокислоты наиболее часто используемый кодон однозначно соответствует наиболее многочисленному виду изоакцептирующих тРНК [3]. Вместе с тем, существует предположение о том, что частота использования кодонов в процессе трансляции в значительной степени определяется их претерминальным характером (способностью мутировать с образованием терминальных кодонов в результате одной нуклеотидной замены). Например, показано, что оба претерминальных кодона, кодирующих сейцин (УУА и УУГ), вообще не используются в нормальных генах α - и (-цепей глобинов [7]. Авторы этой работы утверждают, что организмы стремятся по мере возможности не использовать претерминальные кодоны при выборе «эволюционной стратегии», направленной на изменение частоты мутаций с сильно выраженными эффектами.

Из данных, представленных в табл.2, следует, что частота встречаемости претерминальных кодонов в мРНК аденилатциклаз актиномицетов равна $18,9 \pm 0,4\%$, то есть в 1,5 раза меньше теоретически ожидаемой величины (29,5%).

В табл. 3 приведены данные о частотах встречаемости претерминальных кодонов среди шестикратно и четырехкратно вырожденных кодонов мРНК аденилатциклаз актиномицетов. Видно, что частота встречаемости претерминальных кодонов в большинстве случаев значительно меньше теоретически ожидаемой величины. Единственным исключением является кодон УЦГ, кодирующий серин. Высокую частоту встречаемости этого кодона можно объяснить высокой степенью насыщенности гуанином и цитозином, а также наличием в третьем положении кодона гуанина.

Таблица 3

Частота встречаемости претерминальных кодонов, кодирующих лейцин, серин, аргинин и глицин, в мРНК аденилатциклаз актиномицетов

Аминокислота	Претерминальный кодон	Частота использования (относительно всех триплетов, кодирующих данную аминокислоту), %	
		Теоретическая	Реальная
Лей	УУА	16,7	0,6
	УУГ	16,7	11,4
Сер	УЦА	16,7	2,5
	УЦГ	16,7	27,0
Арг	АГА	16,7	1,1
	ЦГА	16,7	5,6
Гли	ГГА	25,0	9,4

В таблице генетического кода содержится 15 претерминальных кодонов, способных стать терминальными при единственной замене нуклеотида, в то время как кодоны УУА, УЦА и УГГ могут стать терминальными в результате двух мутаций. Таким образом, последние три кодона являются наиболее «опасными» с точки зрения вероятности мутаций, приводящих к терминальным кодонам. Учитывая это, значительный интерес представляют данные о частотах встречаемости претерминальных кодонов УУА и УЦА в сравнении с частотами соответствующих синонимичных претерминальных кодонов УУГ и УЦГ. Как и следовало ожидать (табл.2), частота встречаемости кодона УУА почти в 20 раз меньше таковой для кодона УУГ, а частота встречаемости кодона УЦА более чем в 10 раз меньше таковой для кодона УЦГ.

Таким образом, частота использования кодонов в процессе трансляции аденилатциклаз актиномицетов определяется их насыщенностью гуанином и цитозином, наличием в третьем положении гуанина или цитозина, претерминальностью и величиной вероятности мутаций, приводящих к терминальным кодонам.

Литература

1. Gupta R.S. The phylogeny of proteobacteria:relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes//FEMS Microbiol.Rev.–2000.–Vol.24.– P.367-402.
2. Ikemura T. Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence// J.Mol.Biol.–1981.–Vol.146.–P.1-21.
3. Ikemura T. Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codon in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E.coli translation system// J.Mol.Biol.–1981.–Vol.151.–P.389-409.
4. Intracellular communication:An attempt at a unifying hypothesis. Roth J., Le Roith D., Shiloach J., Rubinovitz C.//Clin. Res.–1983.–Vol.31.–P.354-363.
5. Kang D-K, Li X-M., Ochi K. Possible involvement of cAMP in aerial mycelium formation and secondary metabolism in Streptomyces griseus//Microbiology.–1999.– Vol.145.–P.1162-1172.
6. Kushiro A., Shimuzu M., Tomita K-J. Molecular cloning and sequence determination of the tuf gene coding for the elongation Tu of Thermus thermophilus HB8//Eur.J.Biochem.–1987.–Vol.170.– P.93-98.
7. Modiano G., Baffistuzzi G., Motulsky A.G. Nonrandom patterns of codon usage and of nucleotide substitutions in human α - and β -globin genes: an evolutionary strategy reducing the rate of mutations with drastic effects?//Proc.Natl.Acad.Sci.USA.–1981.–Vol.78.–P.1110-1114.
8. Muto A., Osawa S. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.–1987.– Vol.84.–P.166-169.
9. Reddy S.K., Kamireddy M., Dhanireddy K. Eukaryotic-like adenylyl cyclases in Mycobacterium tuberculosis H37Rv, cloning and characterization//J.Biol.Chem.– 2001.–Vol.276, N37.–P.35141-35149.
10. Singer C.E., Ames B.N. Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios// Science.–1970.–Vol.170.–P.822-826.
11. Tompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice//Nucl.Acids.Res.–1994.– Vol.22.–P.4673-4680.