

А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский

О различиях селективных ограничений, налагаемых на моно- и полисубстратные изоферменты алкогольдегидрогеназ

Белорусский государственный медицинский университет

Нами изучены последовательности мРНК, кодирующие алкогольдегидрогеназы классов 1 и 3 хордовых животных. Установлено, что для мРНК, кодирующей моносубстратный фермент (алкогольдегидрогеназа 3), характерно наличие больших селективных ограничений и меньшая нейтральность замен в первом и втором положениях кодона по сравнению с мРНК, кодирующей полисубстратный фермент (алкогольдегидрогеназа 1). Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, моносубстратный фермент, полисубстратный фермент, нейтральность, селективные ограничения.

В 60-е годы прошлого столетия были сформулированы две фундаментальные теории молекулярной эволюции. Теория направленного мутационного давления была предложена в 1962 году Н. Суеоккой [29], а теория нейтральной эволюции – в 1968 году М. Кимуры [4]. Именно появление двух теорий и ознаменовало новый этап развития молекулярной эволюции в качестве самостоятельной науки. Несмотря на достаточно длительный промежуток времени, прошедший с момента появления этих теорий, не было предприняты попытки объединения и сопоставления их положений.

Основной идеей теории М. Кимуры является то, что в основе большинства эволюционных изменений на молекулярном уровне, выявляемых при сравнительном анализе аминокислотных последовательностей белков и нуклеотидных последовательностей нуклеиновых кислот, лежит не дарвиновский естественный отбор, а случайная фиксация нейтральных или почти нейтральных по отношению к отбору мутаций.

Если это действительно так, то между степенью селективных ограничений, налагаемых на молекулу белка или нуклеиновой кислоты, определяемую в рамках теории направленного мутационного давления и скоростью их молекулярной эволюции, определяемой в рамках теории нейтральной эволюции, должна существовать тесная корреляционная связь. Впервые выполненное установление этой связи на количественном уровне несомненно будет способствовать более глубокому пониманию основных закономерностей молекулярной эволюции генетических макромолекул.

Цель исследования: сравнить селективные ограничения, налагаемые на мРНК, кодирующие моно- и полисубстратные изоферменты алкогольдегидрогеназ (АДГ).

Материал и методы

Изучены аминокислотные последовательности АДГ классов 1 и 3 хордовых животных (класса 1 – лягушки (*Xenopus laevis* – X.l. [10]), петуха (*Gallus gallus* – G.g. [12]), киви (*apteryx australis* – A.a. [9]), мыши (*Mus musculus* – M.m. [18]), кролика (*Oryctolagus caballus* – O.c. [23]), лошади (*Equus caballus* – E.c. [22]), В-изоферменты бабуина (*Papio hamadryas* – P.h. [14]), шимпанзе

(Pan troglodytes – P.t. [21]) и человека (Homo sapiens – H.s. [26]); класса 3 – оболочника (Ciona intestinalis – C.i. [11]), ланцетника (Branchiostoma floridae – B.f. [11]), трех видов костных рыб (Sparus aurata – S.a. [24], Danio rerio – D.r. [16], Oryzias latipes – O.l. [25]), лягушки [30], петуха [30], мыши [8], кролика [27] и человека [13]), а также кодирующие их последовательности мРНК. Выравнивание последовательностей проведено с помощью программы Clustal W [15]. Эволюционные дистанции вычислены методом ЕИМ (Equal input model, модель равных вставок [6]). Степень селективных ограничений и величина нейтральности замен нуклеотидов по первому и второму положениям кодона определена по методу Н. Суеоки [28]. Характер аминокислотных замен определен по физико-химической дистанции Грэнтсема (Grantham distance, GD [21]). Полученные результаты обработаны статистически. Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ №Б06М-060 от 1.04.06 г.

Результаты и обсуждение

Алкогольдегидрогеназам класса 1 свойственно наличие большого количества субстратов (спиртов, альдегидов, хинонов, стероидов, жирных кислот и других соединений), что позволяет отнести их к полисубстратным ферментам. Использование в качестве модели моносубстратного фермента алкогольдегидрогеназы класса 3 связано с тем, что основной ее функцией является глутатион-зависимое окисление формальдегида. Остальные же функции (восстановление S-нитрозоглутатиона и окисление хинонов) выражены в значительно меньшей степени [7].

Определим нейтральность замен по первому и второму положениям кодона мРНК, кодирующих АДГ класса 3 хордовых животных, по зависимости между содержанием ГЦ3 и $(ГЦ1+ГЦ2)/2$ (рис. 1).

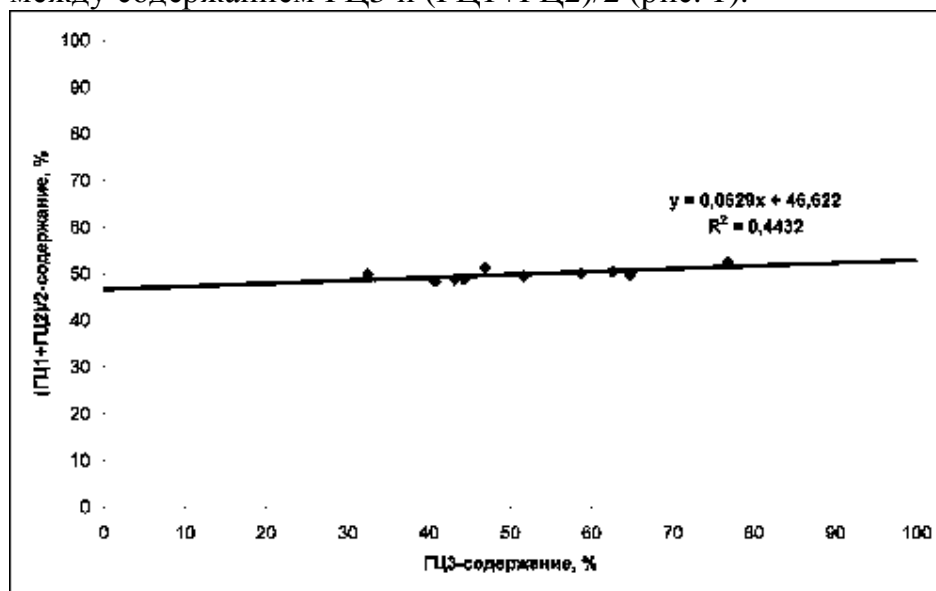


Рис. 1. Зависимость между $(ГЦ1+ГЦ2)/2$ -содержанием и ГЦ3-насыщенностью мРНК, кодирующих АДГ класса 3 хордовых животных. На данном рисунке видно, что наклон линии тренда равен 0,0629. Этот показатель характеризует нейтральность замен нуклеотидов, возможных в

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 класса 1 хордовых (рис. 2).

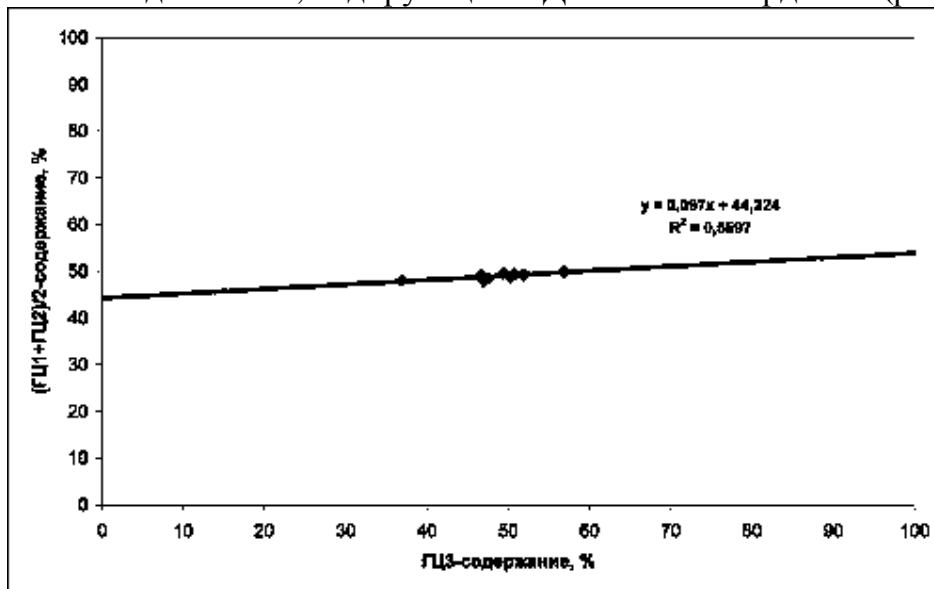


Рис. 2. Зависимость между $(GC1+GC2)/2$ -содержанием и $GC3$ -насыщенностью мРНК, кодирующих АДГ класса 1 хордовых животных. Наклон тренда для мРНК, кодирующих АДГ1, составляет 0,097, а значит нейтральность замен равна 9,7% и степень селективных ограничений составляет 90,3%.

Установленная большая нейтральность замен в мРНК, соответствующих АДГ класса 1 (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 [4]. Следует отметить, качественное отличие полученных данных от таковых полученных другими исследователями. Так Гиллеспи и Лэнгли [19] была предпринята попытка подтвердить эти представления, сравнивая изменчивость моно- и полисубстратных ферментов дрозофилы, мыши и человека. Ими установлено, что субстратспецифичным ферментам свойственна меньшая гетерозиготность по сравнению с субстратнеспецифичными ферментами.

Ранее нами вычислены скорости молекулярной эволюции аминокислотных последовательностей АДГ классов 1 и 3 (равные 0,55 По [3] и 0,25 По [6], соответственно), а также кодирующих их мРНК ($0,60 \times 10^{-9}$ [1] и $0,40 \times 10^{-9}$ замен на сайт в год [2], соответственно). При сопоставлении полученных значений степени налагаемых на молекулы селективных ограничений с приведенными выше скоростями эволюции установлено, что эти показатели связаны друг с другом по 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, 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, коферменты и ионов цинка). В таблицах 1-4 показаны аминокислотные остатки вышеназванных АДГ, участвующие в связывании субстратов, коферментов, каталитических и некаталитических ионов цинка.

Таблица 1

Субстрат-связывающие аминокислотные остатки АДГ3 хордовых

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./D.r.	T	D	E	Y	L	I/V/V	T/T/S	F	M	V	A	F	V	A	F
B.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 2

Субстрат-связывающие аминокислотные остатки АДГ1 хордовых

сайты	48	57	58	93	110	116	117	140	141	294	297	306	309	318	319
H.s.	T/T	M/L/L	V	A/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 3

Аминокислотные остатки АДГ 3 хордовых, участвующие в связывании кофермента, каталитического и некаталитического ионов цинка

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

Аминокислотные остатки АДГ 1 хордовых, участвующие в связывании кофермента, каталитического и некаталитического ионов цинка

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 1 данным, 11 из 15 (73,3±11,82%) аминокислотных сайтов АДГ класса 3 хордовых животных, связывающих субстраты, содержат идентичные аминокислоты. В 116-м положении наблюдаются замены I®T®I®V (средняя GD = 68), в 117-м – S®T (GD = 73), в 140-м – F>Y (GD = 86), а в 297-м положении – R®A®S®A®S®A®S (средняя GD = 52,5). Таким образом, средняя дистанция Грэнтсема по данным 15 сайтам равна 92,0±4,06, что свидетельствует о преобладании высоко консервативных замен аминокислот.

Вместе с тем идентичные аминокислоты содержат лишь 4 (26,7±11,82%) вовлеченных в связывание субстрата сайта АДГ класса 1 хордовых животных, что достоверно (p<0,05) ниже по сравнению с АДГ третьего класса. Замены в остальных 11 сайтах носят более сложный характер. Так, в

48-м положении наблюдается замена S®T (GD = 73), в 57-м – I®L (GD = 95), в 58-м – S®V®A®V (средняя GD = 59), в 110-м – L®F®Y (средняя GD = 86), в 116-м – I®L (GD = 95), в 117-м – G®L®S®G (средняя GD = 47), в 141-м – L®I®L®V®L (средняя GD = 88,5), в 297-м – A®N®D®A (средняя GD = 57,3), в 309-м – F®L (GD = 86), в 318-м – V®I®V (средняя GD = 86) и в 319-м положении – F®Y (GD = 86). Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее низкие значения дистанции Грэтсема наблюдается для замен по 58-му, 117-му и 297-му положениям, то есть 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 класса 3 человека с таковыми кролика EIM-дистанция составила 0,069 замен на сайт, мыши – 0,069, петуха – 0,145, лягушки – 0,145, S.a. – 0,227, O.l. – 0,145, D.r. – 0,227, ланцетника – 0,227, оболочника – 0,3166 замен на сайт. Сопоставляя эти значения с общепринятыми в эволюционной биохимии и молекулярной эволюции временами дивергенции [17] (рис. 3), 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 АДГ 3. 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 класса 3.

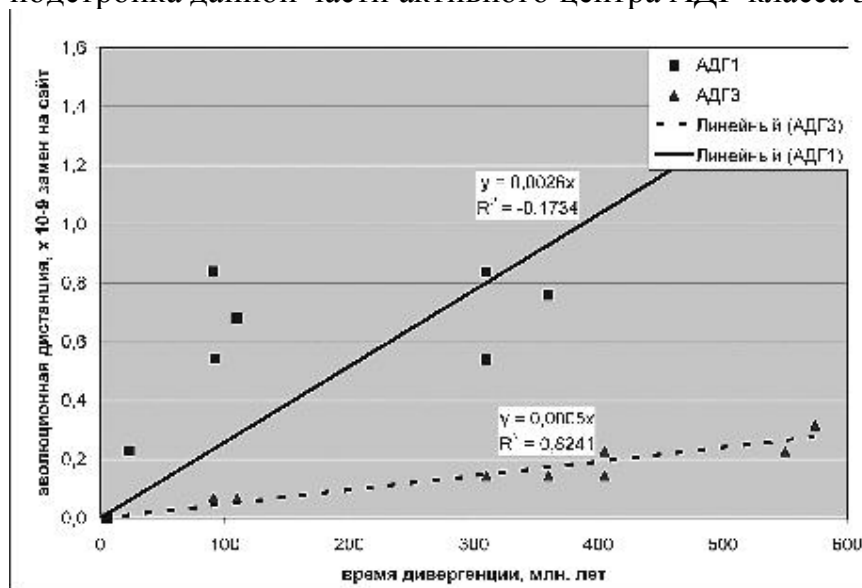


Рис. 3. Зависимость между значениями EIM – дистанций между алкогольдегидрогеназами классов 1 и 3 человека и таковыми хордовых животных, и предполагаемыми временами дивергенции

При попарных сравнениях субстрат-связывающих сайтов В-изофермента первого класса АДГ человека с таковыми шимпанзе EIM-дистанция равна

0,000 замен на сайт (замены аминокислот отсутствуют), бабуина – 0,228, лошади – 0,543, кролика составила 0,840, мыши – 0,680, киви – 0,539, петуха – 0,837, лягушки – 0,760, замен на сайт. При сравнении полученных значений эволюционных дистанций с общепринятыми временами дивергенции, в отличие от АДГ класса 3, точки по АДГ 1 значительно разбросаны от линии тренда (рис. 3). 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 класса 3) означает, что данный участок активного центра АДГ 1 находится в стадии активных эволюционных изменений.

Установлено, что фиксированные замены аминокислотных остатков в последовательностях АДГ классов 1 и 3 хордовых животных, связывающих каталитический и некаталитический ионы цинка, отсутствуют, что говорит об исключительно важной роли Zn^{2+} в акте катализа. В связывающих кофермент сайтах АДГ 3 хордовых животных наблюдается лишь одна аминокислотная замена (фенилаланин на тирозин у оболочника), а в аналогичных сайтах АДГ 1-2 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 классов 1 и 3 хордовых.

Таким образом, среди функционально важных сайтов АДГ классов 1 и 3 хордовых животных 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 класса (по сравнению с АДГ 1 класса) 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.

Выводы

1. Для мРНК, кодирующих полисубстратные ферменты (АДГ1) хордовых животных, характерна большая нейтральность замен по первому и второму положениям кодона (и, соответственно, меньшие селективные ограничения) по сравнению с мРНК, кодирующими моносубстратные ферменты (АДГ3).
2. Среди функционально важных сайтов АДГ классов 1 и 3 хордовых животных наиболее консервативными являются сайты связывания ионов цинка, менее – сайты связывания кофермента, а наименее консервативными – сайты связывания субстратов.
3. Между темпами эволюционных изменений аминокислотных последовательностей АДГ классов 1 и 3, а также кодирующих их мРНК и

селективными ограничениями, налагаемыми на замены в них, существует обратная связь.

Литература

1. Бутвиловский, А.В. Молекулярная эволюция алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский // Медицинский журнал. – Минск, 2005. – №4. – С. 30 – 33.
2. Бутвиловский, А.В. Молекулярная эволюция алкогольдегидрогеназы класса III хордовых животных / А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский // Здравоохранение. – Минск, 2005. – №9. – С. 11 – 15.
3. Бутвиловский, А.В. Эволюционные дистанции и скорости эволюции аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных / А.В. Бутвиловский // Труды молодых ученых 2006: сб. науч. работ / под общ. ред. С.Л. Кабака – Минск: БГМУ, 2006. – С. 37 – 40.
4. Кимура, М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности / М. Кимура – М., 1985. – 398 с.
5. Методы изучения эволюционных изменений аминокислотных последовательностей. Сообщение 1. Методы приблизительной и скорректированной оценки эволюционных дистанций / А.В. Бутвиловский [и др.] // Здравоохранение. – Минск, 2006. – №1. – С. 42 – 44.
6. Методы изучения эволюционных изменений аминокислотных последовательностей. Сообщение 2. Методы, основанные на моделях замещения аминокислот / А.В. Бутвиловский [и др.] // Здравоохранение. – Минск, 2006. – №1. – С. 45 – 49.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Grantham, R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution / R. Grantham // *Science.* – 1974. – Vol. 185 (4154). – P. 862 – 864.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Molecular cloning of fish alcohol dehydrogenase cDNA / B. Funkenstein, S.B. Jakowlew // *Gene* – 1996. – Vol. 174. – P. 159 – 164.
 25. 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.
 26. Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family / G. Duester [et al] // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 58 (3). – P. 389 – 395.
 27. 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.
 28. Sueoka, N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution / N. Sueoka // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – Vol. 85. – P. 2653 – 2657.
 29. 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.

30. 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.