

## Молекулярная эволюция алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных

Изучены последовательности мРНК алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных. Установлено, что эволюция данных нуклеотидных последовательностей происходила с приблизительно постоянной скоростью, равной  $0,60 \cdot 10^{-9}$  замен на нуклеотидный сайт в год. Времена дивергенции различных таксономических групп хордовых животных, установленные при анализе нуклеотидных последовательностей мРНК алкогольдегидрогеназы первого класса, согласуются с таковыми, общепринятыми в молекулярной эволюции.

**Ключевые слова:** алкогольдегидрогеназа, эволюционная дистанция, скорость молекулярной эволюции, время дивергенции.

A.V.Butvilovsky, E.V.Barkovsky, V.E.Butvilovsky

Molecular evolution of the chordate's class A alcohol dehydrogenase

We studied class I alcohol dehydrogenase mRNA sequences in the chordates. We determined that these sequences evolved with approximately constant rate, equal to  $0,60 \cdot 10^{-9}$  substitutions per site per year. Divergence times for different taxonomic groups in the chordates, that were established using alcohol dehydrogenase mRNA sequences, conform with molecular evolution's data.

Key words: alcohol dehydrogenase, evolutionary distance, evolution's rate, divergence time

Алкогольдегидрогеназа (АДГ) является представителем широко распространенного семейства цинк-содержащих ферментов.

Алкогольдегидрогеназная система является главным метаболическим путем этанола, а также других биологически важных алкоholes и альдегидов (ретинол, 3 $\beta$ -гидроксистероиды,  $\beta$ -гидрокси жирные кислоты, формальдегид и 4-гидроксиноненал) [1, 32]. Алкогольдегидрогеназа является димером, состоящим из двух субъединиц с молекулярной массой 40 кДа. К настоящему времени идентифицированы семь различных генов (АДГ1-АДГ7), кодирующих алкогольдегидрогеназы человека. Гены АДГ1-АДГ5 кодируют  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ -субъединицы, соответственно. Ген АДГ7 кодирует  $\zeta$ -субъединицу, а белок, кодируемый АДГ6 геном, не выделен *in vivo*.

По гомологии нуклеотидных последовательностей мРНК и аминокислотных последовательностей, электрофоретическим и энзиматическим свойствам АДГ человека объединены в 5 классов. Первый класс объединяет три изофермента ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ). Ко второму классу относится  $\delta$ -изофермент, к третьему -  $\epsilon$ , к четвертому -  $\zeta$ , а к пятому классу АДГ6 [12, 16].

Изоферменты алкогольдегидрогеназ возникли в результате дубликаций генов. Установлено, что наиболее филогенетически древней формой является алкогольдегидрогеназа класса III (глутатион-зависимая формальдегид дегидрогеназа), обнаруженная у бактерий, грибов, растений и животных [7, 25]. Первая дубликация гена, кодирующего этот фермент, произошла на уровне костных рыб (405-450 млн. лет назад), что привело к возникновению АДГ класса I (классической печеночной алкогольдегидрогеназы) [7]. Этот факт подтверждается наличием у костных рыб общего структурно-типичного фермента, что позволяет рассматривать АДГ класса III ланцетника в качестве эволюционного предшественника алкогольдегидрогеназ класса

I [7]. Последующие дубликации генов привели к возникновению АДГ второго, четвертого и пятого классов. Возникновение трех типов (? , ? , ?) алкогольдегидрогеназ первого класса также связано с дубликациями генов, произошедших на уровне приматов [25].

Цель исследования: определение эволюционных дистанций и скоростей эволюции нуклеотидных последовательностей мРНК алкогольдегидрогеназы класса I хордовых животных.

#### Материал и методы

Проанализированы нуклеотидные последовательности мРНК алкогольдегидрогеназы класса III ланцетника (*Branchiostoma floridae* - B.f. [5, 6]), являющаяся эволюционным предшественником классических печеночных АДГ, а также алкогольдегидрогеназ класса I земноводных (*Xenopus laevis* - X.l. [14]), птиц (*Gallus gallus* - G.g. [9], *Apteryx australis* - A.a. [13]), грызунов (*Mus musculus* - M.m. [26]), непарнокопытных (*Equus caballus* - E. c. [24]), зайцеобразных (*Oryctolagus cuniculus* - O.c. [15]) и приматов (bb-изофермент *Papio hamadryas* - P.h. [31], bb-изофермент *Pan troglodytes* - P.t. [23] и ??-, bb-, ??-изоферменты *Homo sapiens* [8, 17]-H.s. 1, 2 и 3, соответственно).

Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовалась программа Clustal W [30]. Для определения картины замещений в сравниваемых последовательностях рассчитан индекс несоответствия (index disparity - ID) и использован ID-тест для определения вероятности (P) отклонения нулевой гипотезы о гомогенной картине замещений нуклеотидов на 5%-ном уровне [20, 21]. В случае гомогенной картины замещений эволюционные дистанции (K) рассчитаны по методам Джукса-Кантора [18], Кимура [19], Тадзима-Ней [27], Тамура [28], Тамура-Ней [29]; в случае гетерогенной - по методам Тадзима-Ней [27], Тамура [28], Тамура-Ней [29]. Скорость эволюционных замен оснований на сайт в год вычисляли по формуле:  $k_{\text{нукл.}} = K/2T$ , 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 дерева [2].

#### Результаты и их обсуждение

Для определения картины замещений в нуклеотидных последовательностях алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных проведены их попарные сравнения, а также определены индекс несоответствия (ID) и вероятность (P) отклонения нулевой гипотезы о гомогенной картине замещений нуклеотидов на 5%-ном уровне (табл. 1).

#### Таблица 1

Значения индекса несоответствия и вероятности отклонения нулевой гипотезы о гомогенной картине замещений нуклеотидов на пятипроцентном уровне для первого класса алкогольдегидрогеназ хордовых животных

Вид	H. s. 1	H. s. 2	H. s. 3	P. t.	P. h.	O. c.	E. c.	M. m	A. a.	G. g.	X. L	B. f.
H. s.1		0,1498	0,0000	0,2553	0,1995	0,0488	0,2270	1,2633	0,0000	2,6748	0,9846	9,0727
H. s. 2	<0,05		0,0488	0,0071	0,0000	0,0000	0,0000	0,5479	0,0000	2,6180	1,5636	6,6578
H. s. 3	>0,05	>0,05		0,1073	0,0656	0,0000	0,0771	1,0975	0,0000	2,5805	1,1228	8,2473
P. t.	<0,05	>0,05	<0,05		0,0000	0,0000	0,0000	0,5142	0,0000	2,6788	1,8302	6,1924
P. h.	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05		0,0000	0,0000	0,6445	0,0000	2,6353	1,5525	6,4938
O. c.	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05		0,0000	0,6525	0,0000	3,0476	1,6685	6,7757
E. c.	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05		0,3608	0,0000	2,7964	2,6611	5,9211
M. m.	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05		0,2234	3,3293	3,0340	4,3395
A. a.	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05		2,4336	1,0512	6,8892
G. g.	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05		3,5073	9,6383
X. L	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05		10,4803
B. f.	<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.

Если величина P больше 0,05, то картину замещений принято считать гомогенной, в обратном случае - гетерогенной. Гомогенная картина замещений наблюдается в 24 из 66 проведенных попарных сравнений (36,36%), а гетерогенная - в 63,64%. Наличие двух картин замещений в нуклеотидных последовательностях алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных свидетельствует о необходимости дифференцированного подхода при определении эволюционных дистанций. В табл. 2 представлены средние эволюционные дистанции по трем положениям нуклеотида в кодоне, полученные различными методами с учетом соответствующих картин замещения, для первого класса алкогольдегидрогеназ хордовых животных.

Таблица 2

Средние эволюционные дистанции в расчете на нуклеотидный сайт и их стандартная ошибка, полученные различными методами с учетом соответствующих картин замещения, для первого класса алкогольдегидрогеназ хордовых животных

Вид	H. s. 1	H. s. 2	H. s. 3	P. t.	P. h.	O. c.	E. c.	M. m	A. a.	G. g.	X. L	B. f.
H. s.1		0,0002	0,0001	0,0002	0,0002	0,0003	0,0008	0,0011	0,0015	0,0026	0,0028	0,0019
H. s. 2	<b>0,0526</b>		0,0001	0,0000	0,0000	0,0004	0,0006	0,0010	0,0013	0,0023	0,0026	0,0018
H. s. 3	<b>0,0642</b>	<b>0,0468</b>		0,0001	0,0001	0,0003	0,0005	0,0009	0,0015	0,0032	0,0025	0,0017
P. t.	<b>0,0536</b>	<b>0,0071</b>	<b>0,0525</b>		0,0000	0,0003	0,0005	0,0010	0,0013	0,0023	0,0025	0,0020
P. h.	<b>0,0671</b>	<b>0,0263</b>	<b>0,0564</b>	<b>0,0281</b>		0,0003	0,0006	0,0011	0,0015	0,0027	0,0027	0,0023
O. c.	<b>0,1302</b>	<b>0,1378</b>	<b>0,1281</b>	<b>0,1346</b>	<b>0,1378</b>		0,0004	0,0008	0,0013	0,0028	0,0017	0,0013
E. c.	<b>0,1486</b>	<b>0,1504</b>	<b>0,1501</b>	<b>0,1493</b>	<b>0,1558</b>	<b>0,1401</b>		0,0010	0,0016	0,0029	0,0026	0,0016
M. m.	<b>0,2179</b>	<b>0,2096</b>	<b>0,2047</b>	<b>0,2121</b>	<b>0,2168</b>	<b>0,2046</b>	<b>0,2109</b>		0,0011	0,0033	0,0037	0,0015
A. a.	<b>0,3755</b>	<b>0,3618</b>	<b>0,3667</b>	<b>0,3573</b>	<b>0,3638</b>	<b>0,3719</b>	<b>0,3596</b>	<b>0,3903</b>		0,0007	0,0025	0,0014
G. g.	<b>0,4045</b>	<b>0,3885</b>	<b>0,4018</b>	<b>0,3884</b>	<b>0,3941</b>	<b>0,4029</b>	<b>0,3927</b>	<b>0,4314</b>	<b>0,1398</b>		0,0033	0,0008
X. L	<b>0,4232</b>	<b>0,4223</b>	<b>0,4290</b>	<b>0,4221</b>	<b>0,4269</b>	<b>0,4298</b>	<b>0,4327</b>	<b>0,4317</b>	<b>0,3907</b>	<b>0,4071</b>		0,0009
B. f.	<b>0,5897</b>	<b>0,5797</b>	<b>0,5918</b>	<b>0,5822</b>	<b>0,5903</b>	<b>0,5923</b>	<b>0,5818</b>	<b>0,5983</b>	<b>0,5923</b>	<b>0,5988</b>	<b>0,5430</b>	

Примечание. Эволюционные дистанции выделены жирным шрифтом.

Для получения средних значений эволюционных дистанций для каждого из организмов необходимо учитывать только эволюционные дистанции, полученные при сравнении последовательности мРНК этого организма с последовательностями мРНК таксономически вышестоящих организмов. Так, при расчете средней эволюционной дистанции для птиц следует учитывать эволюционные дистанции, полученные при сравнении нуклеотидных последовательностей их мРНК алкогольдегидрогеназ класса I с таковыми грызунов, непарнокопытных, зайцеобразных и приматов. Для ланцетника среднее значение  $K=0,5855\pm 0,0049$ , для земноводных  $K=0,4216\pm 0,0044$ , для птиц  $K=0,3845\pm 0,0227$ , для грызунов  $K=0,2109\pm 0,0021$ , для непарнокопытных  $K=0,1491\pm 0,0023$ , для зайцеобразных  $K=0,1337\pm 0,0022$ , для павиана  $K=0,0263\pm 0,0000$ , а для шимпанзе -  $K=0,0071\pm 0,0000$ . Из приведенных данных можно сделать вывод о существовании четкого параллелизма между временем дивергенции и расчетными значениями числа нуклеотидных замен, происшедших в ходе эволюции.

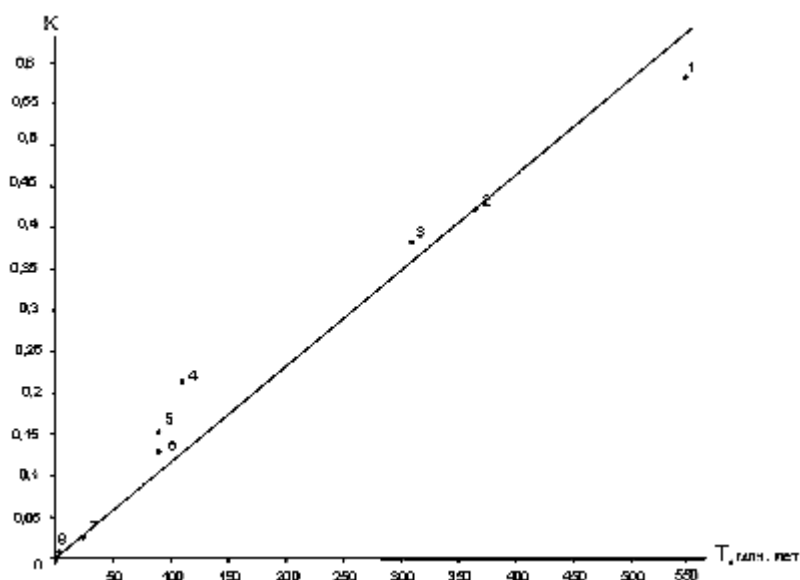


Рисунок 1

Зависимость между значениями эволюционных дистанций и временем дивергенции мРНК алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных

На рис. 1 приведен график, на котором точки соответствуют расчетным значениям числа нуклеотидных замен (K), приуроченным к соответствующим временам дивергенции (T). Так, точка под номером 1 - среднее значение K для ланцетника и предполагаемое время дивергенции (550 млн. лет [3]). Точка 2 - среднее K для земноводных (365 млн. лет), точка 3 - среднее K для птиц (310 млн. лет), точка 4 - среднее K для грызунов (110 млн. лет), точка 5 - среднее K для непарнокопытных (92 млн. лет), точка 6 - среднее K для зайцеобразных (91 млн. лет), точка 7 - среднее K для павиана и точка 8 - среднее K для шимпанзе и bb-изофермента человека (6 млн. лет [10]). Из рис. 1 видно, что все точки, за исключением точек 1 и 4, довольно хорошо ложатся на прямую. Наклон этой прямой равен  $0,0012$ , что дает  $k_{\text{нукл.}} = K/2T \approx 0,60 \cdot 10^{-9}$  замен на нуклеотидный сайт в год. Другими словами, темпы нуклеотидных замен в разных ветвях родословного древа хордовых были примерно одинаковыми. Значительное отклонение наблюдается только при сравнении мыши с другими млекопитающими, что свидетельствует в пользу предположения о более высокой скорости эволюции АДГ грызунов, если, конечно, здесь нет ошибки в определении времени дивергенции. В свою очередь высокая скорость эволюции изучаемой последовательности мРНК АДГ класса I у грызунов может быть объяснена коротким периодом их жизни, высокой активностью метаболических процессов и низким уровнем репарации ДНК [4, 22]. Что же касается точки 1, то ее отклонение от прямой ожидаемо, поскольку она соответствует расчетному значению числа нуклеотидных замен для другого структурно-функционального класса алкогольдегидрогеназ (класса III), эволюционирующих по нашим данным с меньшей скоростью, равной  $0,40 \cdot 10^{-9}$  замен на нуклеотидный сайт в год.

Приведенная величина  $0,60 \cdot 10^{-9}$  в год представляет собой общую скорость замен в расчете на сайт, однако гораздо интереснее оценить скорость эволюции для каждого из трех положений кодонов. Значения эволюционных дистанций в расчете на нуклеотидный сайт по каждому из положений нуклеотида в кодоне приведены в табл. 3-5.

### Таблица 3

Средние эволюционные дистанции в расчете на нуклеотидный сайт по первому положению кодонов и их стандартная ошибка, полученные различными методами с учетом соответствующих картин замещения, для первого класса алкогольдегидрогеназ хордовых животных

Вид	H. s. 1	H. s. 2	H. s. 3	P. t.	P. h.	O. c.	E. c.	M. m	A. a	G. g.	X. l	B. f.
H. s.1		0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0001	0,0000	0,0002	0,0011	0,0010	0,0019	0,0031
H. s. 2	<b>0,0439</b>		0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0008	0,0007	0,0021	0,0029
H. s. 3	<b>0,0410</b>	<b>0,0299</b>		0,0000	0,0000	0,0001	0,0002	0,0001	0,0007	0,0007	0,0018	0,0031
P. t.	<b>0,0468</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,0327</b>		0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0007	0,0007	0,0026	0,0030
P. h.	<b>0,0524</b>	<b>0,0134</b>	<b>0,0383</b>	<b>0,0162</b>		0,0001	0,0001	0,0001	0,0008	0,0007	0,0020	0,0029
O. c.	<b>0,0815</b>	<b>0,0905</b>	<b>0,0757</b>	<b>0,0905</b>	<b>0,1027</b>		0,0001	0,0001	0,0006	0,0008	0,0020	0,0034
E. c.	<b>0,0816</b>	<b>0,0759</b>	<b>0,0789</b>	<b>0,0759</b>	<b>0,0788</b>	<b>0,0875</b>		0,0001	0,0005	0,0008	0,0010	0,0029
M. m.	<b>0,1151</b>	<b>0,1151</b>	<b>0,1059</b>	<b>0,1184</b>	<b>0,1216</b>	<b>0,1151</b>	<b>0,1120</b>		0,0010	0,0007	0,0017	0,0035
A. a.	<b>0,2528</b>	<b>0,2155</b>	<b>0,2191</b>	<b>0,2118</b>	<b>0,2193</b>	<b>0,2295</b>	<b>0,2115</b>	<b>0,2522</b>		0,0001	0,0016	0,0028
G. g.	<b>0,2826</b>	<b>0,2476</b>	<b>0,2476</b>	<b>0,2432</b>	<b>0,2435</b>	<b>0,2741</b>	<b>0,2652</b>	<b>0,2736</b>	<b>0,0872</b>		0,0016	0,0028
X. l	<b>0,3014</b>	<b>0,2897</b>	<b>0,2898</b>	<b>0,2958</b>	<b>0,3012</b>	<b>0,2945</b>	<b>0,3055</b>	<b>0,2827</b>	<b>0,2830</b>	<b>0,3057</b>		0,0019
B. f.	<b>0,4900</b>	<b>0,4753</b>	<b>0,4849</b>	<b>0,4808</b>	<b>0,4862</b>	<b>0,5056</b>	<b>0,4852</b>	<b>0,5060</b>	<b>0,4355</b>	<b>0,4706</b>	<b>0,3795</b>	

Примечание. Эволюционные дистанции выделены жирным шрифтом.

Таблица 4

Средние эволюционные дистанции в расчете на нуклеотидный сайт по второму положению кодонов и их стандартная ошибка, полученные различными методами с учетом соответствующих картин замещения, для первого класса алкогольдегидрогеназ хордовых животных

Вид	H. s. 1	H. s. 2	H. s. 3	P. t.	P. h.	O. c.	E. c.	M. m	A. a	G. g.	X. l	B. f.
H. s.1		0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002	0,0002	0,0003	0,0008	0,0000
H. s. 2	<b>0,0244</b>		0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002	0,0003	0,0005	0,0000
H. s. 3	<b>0,0244</b>	<b>0,0216</b>		0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0002	0,0003	0,0004	0,0001
P. t.	<b>0,0244</b>	<b>0,0053</b>	<b>0,0216</b>		0,0000	0,0001	0,0001	0,0000	0,0002	0,0003	0,0004	0,0001
P. h.	<b>0,0355</b>	<b>0,0217</b>	<b>0,0272</b>	<b>0,0162</b>		0,0001	0,0001	0,0001	0,0003	0,0004	0,0005	0,0001
O. c.	<b>0,0642</b>	<b>0,0641</b>	<b>0,0468</b>	<b>0,0640</b>	<b>0,0670</b>		0,0001	0,0000	0,0002	0,0002	0,0003	0,0002
E. c.	<b>0,0640</b>	<b>0,0610</b>	<b>0,0438</b>	<b>0,0610</b>	<b>0,0668</b>	<b>0,0611</b>		0,0001	0,0002	0,0003	0,0004	0,0002
M. m.	<b>0,0817</b>	<b>0,0785</b>	<b>0,0610</b>	<b>0,0726</b>	<b>0,0785</b>	<b>0,0726</b>	<b>0,0697</b>		0,0004	0,0003	0,0004	0,0004
A. a.	<b>0,1500</b>	<b>0,1565</b>	<b>0,1435</b>	<b>0,1566</b>	<b>0,1567</b>	<b>0,1403</b>	<b>0,1371</b>	<b>0,1501</b>		0,0001	0,0003	0,0003
G. g.	<b>0,1628</b>	<b>0,1704</b>	<b>0,1590</b>	<b>0,1703</b>	<b>0,1742</b>	<b>0,1478</b>	<b>0,1479</b>	<b>0,1781</b>	<b>0,0536</b>		0,0007	0,0006
X. l	<b>0,1753</b>	<b>0,1797</b>	<b>0,1702</b>	<b>0,1702</b>	<b>0,1797</b>	<b>0,1608</b>	<b>0,1610</b>	<b>0,1612</b>	<b>0,1472</b>	<b>0,1883</b>		0,0002
B. f.	<b>0,2885</b>	<b>0,2924</b>	<b>0,3004</b>	<b>0,3005</b>	<b>0,3085</b>	<b>0,2847</b>	<b>0,3086</b>	<b>0,3009</b>	<b>0,2772</b>	<b>0,2945</b>	<b>0,2269</b>	

Примечание. Эволюционные дистанции выделены жирным шрифтом.

Таблица 5

Средние эволюционные дистанции в расчете на нуклеотидный сайт по третьему положению кодонов и их стандартная ошибка, полученные различными методами с учетом соответствующих картин замещения, для первого класса алкогольдегидрогеназ хордовых животных

Вид	H. s. 1	H. s. 2	H. s. 3	P. t.	P. h.	O. c.	E. c.	M. m	A. a	G. g.	X. l.	B. f.
H. s.1		0,0007	0,0008	0,0007	0,0011	0,0019	0,0067	0,0106	0,0178	0,0621	0,0373	0,0767
H. s. 2	0,0915		0,0003	0,0000	0,0001	0,0025	0,0051	0,0101	0,0180	0,0497	0,0282	0,0786
H. s. 3	0,1329	0,0911		0,0006	0,0003	0,0019	0,0046	0,0093	0,0247	0,0919	0,0523	0,0623
P. t.	0,0914	0,0135	0,1062		0,0002	0,0021	0,0049	0,0115	0,0162	0,0609	0,0307	0,0663
P. h.	0,1165	0,0442	0,1064	0,0529		0,0018	0,0047	0,0100	0,0188	0,0592	0,0333	0,0625
O. c.	0,2640	0,2813	0,2869	0,2686	0,2599		0,0027	0,0090	0,0216	0,0762	0,0470	0,1048
E. c.	0,3351	0,3582	0,3777	0,3532	0,3652	0,2972		0,0135	0,0259	0,0582	0,0278	0,0542
M. m.	0,5458	0,5149	0,5381	0,5325	0,5356	0,5025	0,5480		0,0166	0,0853	0,0632	0,0768
A. a.	0,9808	0,9724	1,0524	0,9482	0,9755	1,0605	1,0454	1,0823		0,0065	0,0301	0,1457
G. g.	1,1028	1,0464	1,2369	1,0726	1,0986	1,1817	1,1098	1,3031	0,3095		0,0350	0,0328
X. l.	1,0936	1,0884	1,2095	1,1056	1,1025	1,2186	1,1677	1,2792	1,0148	0,9549		0,0165
B. f.	1,4390	1,4172	1,4053	1,3706	1,3665	1,4914	1,3168	1,4975	1,8654	1,4959	1,5047	

Примечание. Эволюционные дистанции выделены жирным шрифтом.

Средние значения  $K$  по первому положению нуклеотида в кодоне ( $K_1$ ) рассчитаны описанным выше способом. Так, для ланцетника среднее значение  $K_1=0,4727\pm 0,0115$ , для земноводных  $K_1=0,2949\pm 0,0028$ , для птиц  $K_1=0,2431\pm 0,0235$ , для грызунов  $K_1=0,1147\pm 0,0020$ , для непарнокопытных  $K_1=0,0798\pm 0,0019$ , для зайцеобразных  $K_1=0,0882\pm 0,0051$ , для павиана  $K_1=0,0134\pm 0,0000$ , а для шимпанзе -  $K_1=0,0027\pm 0,0000$ .

Аналогично получены средние эволюционные дистанции по второму положению нуклеотида в кодоне ( $K_2$ ). Для ланцетника среднее значение  $K_2=0,2894\pm 0,0072$ , для земноводных  $K_2=0,1694\pm 0,0040$ , для птиц  $K_2=0,1564\pm 0,0105$ , для грызунов  $K_2=0,0735\pm 0,0028$ , для непарнокопытных  $K_2=0,0596\pm 0,0036$ , для зайцеобразных  $K_2=0,0612\pm 0,0041$ , для павиана  $K_2=0,0217\pm 0,0000$ , а для шимпанзе -  $K_2=0,0053\pm 0,0000$ .

Наибольший интерес представляет определение средних эволюционных дистанций по третьему положению нуклеотида в кодоне ( $K_3$ ). Замены в третьих позициях кодонов в основном не подвержены действию отбора и эволюционируют в нейтральном режиме, т.е. соответствуют гипотезе молекулярных часов. Типичным примером нейтральных мутаций являются синонимичные замены в третьих положениях кодонов, которые изменяют нуклеотидные последовательности генов, но не меняют смысла кодируемых аминокислот, т.е. не подвержены действию отбора на уровне белков. Для ланцетника среднее значение  $K_3=1,4700\pm 0,0460$ , для земноводных  $K_3=1,1235\pm 0,0325$ , для птиц  $K_3=1,0794\pm 0,0914$ , для грызунов  $K_3=0,5311\pm 0,0068$ , для непарнокопытных  $K_3=0,3478\pm 0,0127$ , для зайцеобразных  $K_3=0,2721\pm 0,0058$ , для павиана  $K_3=0,0442\pm 0,0001$ , а для шимпанзе -  $K_3=0,0135\pm 0,0000$ .

Из приведенных данных следует, что для всех рассмотренных случаев, за исключением сравнения последовательности мРНК АДГ класса Ib человека с таковыми шимпанзе и павиана, справедливо соотношение  $K_2$

Сопоставим описанным выше способом средние значения эволюционных дистанций по третьему положению нуклеотида в кодоне с предполагаемыми

временами дивергенции различных организмов (рис. 2). Обозначенные точки также хорошо ложатся на прямую, что свидетельствует о приблизительно постоянной скорости нуклеотидных замещений по третьему положению кодонов. Наклон этой прямой равен 0,0031, что дает  $k_{\text{нукл.}} = 1,55 \cdot 10^{-9}$  замен на нуклеотидный сайт в год. Отклонение точек 1 и 4 от прямой обусловлено причинами, описанными выше.

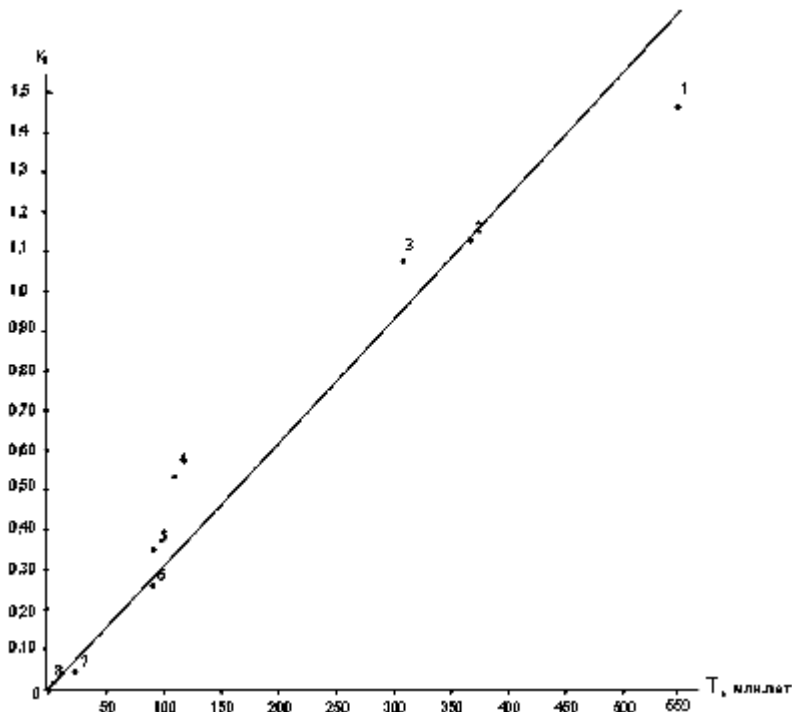


Рисунок 2

Зависимость между значениями эволюционных дистанций по третьим положениям кодонов и временем дивергенции мРНК алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных

На рис. 3 представлена дендрограмма, отражающая родственные отношения между алкогольдегидрогеназами класса I хордовых животных, сгруппированных методом UPGMA на основании значений эволюционных дистанций между последовательностями их мРНК, рассчитанных методом Кимуры по первому и второму положениям кодонов. Такой подход позволяет получить более точные времена дивергенции [11].



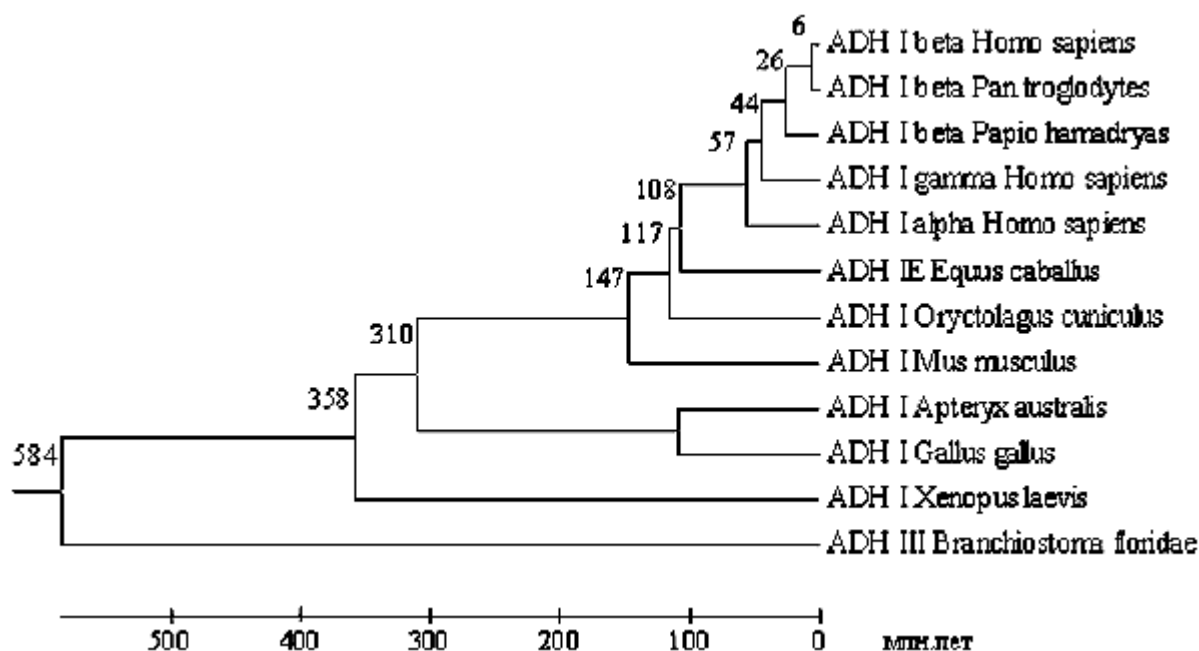


Рисунок 3

Родственные отношения между алкогольдегидрогеназами класса I хордовых животных

Примечание: ADH I beta Homo sapiens - б-изофермент алкогольдегидрогеназы класса I человека, ADH I beta Pan troglodytes - б-изофермент алкогольдегидрогеназы класса I шимпанзе, ADH I beta Papio hamadryas - б-изофермент алкогольдегидрогеназы класса I павиана, ADH I gamma Homo sapiens - ?-изофермент алкогольдегидрогеназы класса I человека, ADH I alpha Homo sapiens - ?-изофермент алкогольдегидрогеназы класса I человека, ADH IE Equus caballus - этанол-активный изофермент алкогольдегидрогеназы класса I лошади, ADH I Oryctolagus cuniculus - алкогольдегидрогеназа класса I кролика, ADH I Mus musculus - алкогольдегидрогеназа класса I мыши, ADH I Apteryx australis - алкогольдегидрогеназа класса I киви, ADH I Gallus gallus - алкогольдегидрогеназа класса I курицы, ADH I Xenopus laevis - алкогольдегидрогеназа класса I шпорцевой лягушки, ADH III Branchiostoma floridae - алкогольдегидрогеназа класса III ланцетника. Цифрами обозначены полученные времена дивергенции.

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 алкогольдегидрогеназ класса Ib Homo sapiens и Pan troglodytes произошла 6 млн. лет назад, Papio hamadryas - 26 млн. лет назад, класса I? Homo sapiens - 44 млн. лет назад, класса I? Homo sapiens - 57 млн. лет назад. В соответствии с дендрограммой дивергенция алкогольдегидрогеназ класса I Oryctolagus cuniculus и таксономически вышестоящих организмов произошла 117 млн. лет назад, Equus caballus - 108 млн. лет назад, Mus musculus - 147 млн. лет назад, Xenopus laevis - 358 млн. лет назад и, наконец, Branchiostoma floridae - 584 млн. лет назад. Полученные данные для Pan troglodytes, Papio hamadryas, Oryctolagus cuniculus, Equus caballus, Xenopus laevis и Branchiostoma floridae согласуются с таковыми, принятыми в эволюционной биохимии и молекулярной эволюции (6, 25, 92, 91, 365, 550 млн. лет, соответственно [3, 10]). Единственным несовпадающим с общепринятым значением времени дивергенции (110 млн. лет назад) является время дивергенции Mus

musculus (147 млн. лет назад), что может быть объяснено вышеназванными причинами.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно придти к следующему заключению: 1) сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мРНК алкогольдегидрогеназы класса I хордовых животных выявил две картины замещений нуклеотидов: гомогенную и гетерогенную; 2) в большинстве проведенных сравнений наибольшая эволюционная дистанция характерна для третьего положения кодонов, меньшая - для первого и наименьшая - для второго; 3) эволюция нуклеотидных последовательностей мРНК АДГ класса I хордовых животных происходила с приблизительно постоянной скоростью, равной  $0,60 \cdot 10^{-9}$  замен на нуклеотидный сайт в год; 4) времена дивергенции различных таксономических групп хордовых животных, установленные при сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей мРНК алкогольдегидрогеназы первого класса, согласуются с таковыми, общепринятыми в эволюционной биохимии и молекулярной эволюции.

### **Литература**

1. Ашмарин И.П. // Успехи биологической химии. - 2003. - т. 43.- С. 3-18.
2. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. - 1985. - М.: Мир. - С. 323.
3. Малахов В.В. // Соросовский образовательный журнал. - 1996. - т. 7. - С. 2-9.
4. Bromham L. // Mol. Biol. Evol.. - 2002. - Vol. 19. - P. 302-309.
5. Canestro C., Albalat R., Hjelmqvist L., Godoy L., Jornvall H., Gonzalez-Duarte R. // J. Mol. Evol.. - 2002. - Vol. 54 (1). - P. 81-89.
6. Canestro C., Hjelmqvist L., Albalat R., Garcia-Fernandez J., Gonzales-Duarte R., Jornvall H. // Eur. J. Biochem.. - 2000. - Vol. 267. - P. 6511-6518.
7. Danielsson O., Jornvall H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1992. - Vol. 89. - P. 9247-9251.
8. Duester G., Farres J., Felder M.R., Holmes R.S., Hoog J.O., Pares X., Plapp B.V., Yin S.J., Jornvall H. // Biochem. Pharmacol.. - 1999. Vol. 58 (3). - P. 389-395.
9. Estonius M., Karlsson C., Fox E.A., Hoog J.O., Holmquist B., Vallee B.L., Davidson W.S., Jornvall H. // Eur. J. Biochem.. - 1990. - Vol. 194 (2). - P. 593-602.
10. Feng D.-F., Cho G., Doolittle R.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997. - Vol. 94. - P. 13028-13033.
11. Glazko G.V., Nei M. // Mol. Biol. Evol.. - 2003. - Vol. 20 (3). - P. 424-434.
12. Jornvall H., Hempel J., Bahr-Lindstrom H., Hoog J.O., Vallee B.L. // Alcohol Alcohol.. - 1987. - Vol. 1. - P. 13-23.
13. Hjelmqvist L., Metsis M., Persson H., Hoog J.O., McLennan J., Jornvall H. // FEBS Lett.. - 1995. - Vol. 367 (3). - P. 306-310.
14. Hoffmann I., Ang H.L., Duester G. // Dev. Dyn.. - 1998. - Vol. 213 (3). - P. 261-270.
15. Hoog J.O., Vagelopoulos N., Yip P.K., Keung W.M., Jornvall H. // Eur. J. Biochem.. - 1993. - Vol. 213 (1). - P. 31-38.
16. Hurley T.D., Bosron W.F., Stone C.L., Amzel L.M. // J. Mol. Biol.. - 1994. - Vol. 239(3). - P. 415-429.
17. Ikuta T., Szeto S., Yoshida A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1986. - Vol. 83 (3). - P. 634-638.
18. Jukes T.H., Cantor C.R. // Academic Press, N.Y.. - 1969. - P. 121-132.

19. Kimura M. // J. Mol. Evol.. - 1980. - Vol. 16. - P. 111-120.
20. Kumar S., Gadagkar S.R. // Genetics. - 2001. - Vol. 158. - P. 1321-1327.
21. Kumar S., Tamura K., Nei M. // Brief. Bioinform.. - 2004. - Vol. 5. - P. 150-163.
22. Li W., Gouy M., Sharp P.M., O'Neil C., Yang Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1990. - Vol. 87. - P. 6703-6707.
23. Osada N., Wu C.I. // Genetics. - 2005. - Vol. 169 (1). - P. 259-264.
24. Park D.H., Plapp B.V. // J. Biol. Chem.. - 1991. - Vol. 266 (20). - P. 13296-13302.
25. Shafiqat J., El-Ahmad M., Danielsson O., Martnez M. C., Persson B., Pariz X., Jurnvall H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1996. - Vol. 93. - P. 5595-5599.
26. Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2002. - Vol. 99 (26). - P. 16899-16903.
27. Tajima F., Nei M. // Mol. Biol. Evol.. - 1984. - Vol. 1. - P. 269-285.
28. Tamura K. // Mol. Biol. Evol.. - 1992. - Vol. 9. - P. 678-687.
29. Tamura K., Nei M. // Mol. Biol. Evol.. - 1993. - Vol. 10. - P. 512-526.
30. Tompkins J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // Nucl. Acids Res.. - 1994. - Vol. 22. - P. 4673-4680.
31. Trezise A.E., Godfrey E.A., Holmes R.S., Beacham I.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1989. - Vol. 86 (14). - P. 5454-5458.
32. Xie P., Parsons S.H., Speckhard D.C., Bosron W.F., Hurley T.D. // J. Biol. Chem.. - 1997. - Vol. 272. - P. 18558-18563