

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
“БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ”

УДК 577.152:613.81

**БУТВИЛОВСКИЙ Александр Валерьевич**

**ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ НУКЛЕОТИДНЫХ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МАТРИЧНЫХ РНК И  
АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ  
АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ В ПРОЦЕССЕ ЭВОЛЮЦИИ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

по специальности 03.00.04 – биохимия

Минск, 2007

Работа выполнена в УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: Барковский Евгений Викторович,  
доктор биологических наук, профессор,  
лауреат Государственной премии Республики Беларусь, заведующий кафедрой общей химии  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: Кухта Виктор Климентьевич,  
доктор медицинских наук, профессор,  
Заслуженный деятель науки Республики Беларусь,  
профессор кафедры биологической химии  
УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Пронько Павел Сергеевич,  
доктор биологических наук, старший научный сотрудник,  
исполняющий обязанности заместителя директора по науке и инновациям ГУ НПЦ «Институт фармакологии и биохимии» НАН Беларуси

Оппонирующая организация: УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится 18 мая 2007 г. в 15.00 часов на заседании совета по защите диссертации Д03.18.02 при УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, пр. Дзержинского, 83, тел. 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2007 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций  
канд. мед. наук, доцент

А.И. Герасимович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Связь работы с крупными научными проектами

Выполнение диссертационной работы начато в рамках НИР кафедры общей химии БГМУ «Структурно-функциональные свойства аденилатциклаз различного происхождения и теоретический анализ их аминокислотных последовательностей» (№ ГР 2001680, сроки выполнения 01.01.2001 г. – 31.12.2005 г.), а затем продолжено в рамках НИР «Молекулярная эволюция генетических макромолекул» (№ ГР 2006234, сроки выполнения 01.01.2006 г. – 31.12.2010 г.), гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований для молодых ученых по теме «Молекулярная эволюция генетических макромолекул» (№ Б06М-060 от 01.04.06 г.).

### Цель и задачи исследования

Цель исследования: установить закономерности изменений последовательностей матричных РНК и первичной структуры алкогольдегидрогеназ (АДГ) в процессе эволюции, характер эволюционных взаимоотношений между ними в широком филогенетическом ряду от низших хордовых до человека.

Поставленная цель предполагает решение следующих задач:

1. Определить родственные отношения между различными классами АДГ человека и на этой основе предложить их структурно-функциональную классификацию, а также установить последовательность возникновения отдельных классов АДГ человека в процессе эволюции.

2. Выявить особенности экзон-интронной структуры и нуклеотидного состава генов АДГ человека.

3. Установить направление и механизмы изменения мутационного давления в экзонах генов АДГ человека в процессе эволюции и оценить его влияние на стратегию кодирования и аминокислотный состав кодируемых белков.

4. Оценить степень нейтральности замен нуклеотидов в последовательностях мРНК, кодирующих моно- и полисубстратные изоферменты АДГ, и определить связь между этим показателем и скоростями эволюции мРНК и соответствующих им белков.

*Объектом* настоящего исследования послужили взятые с сервера NCBI (National Center for Biotechnology information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) аминокислотные последовательности АДГ, выделенных из различных источников животного происхождения, и нуклеотидные последовательности соответствующих им мРНК.

*Предметом* исследования было изучение закономерностей изменения нуклеотидных последовательностей мРНК и аминокислотных последовательностей АДГ в процессе эволюции.

## **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Семейство АДГ человека состоит из двух подсемейств: 1) АДГ, метаболизирующие формальдегид и хиноны (2 и 3-й классы); 2) АДГ, метаболизирующие спирты (1А, 1В, 1С, 4 и 5-й классы). Среди изученных АДГ животных эволюционным предшественником АДГ человека является АДГ 3 нематоды. Возникновение классов и подклассов АДГ происходило в последовательности: класс 3 → класс 1 → класс 2 → класс 5 → класс 4 → подклассы А, В, С класса 1.

2. Особенностью экзон-интронной структуры и нуклеотидного состава генов АДГ человека является их ГЦ-мозаичное строение (чередование более ГЦ-насыщенных экзонов с менее ГЦ-насыщенными интронами), что обеспечивается более низкими темпами эволюционных изменений экзонов изучаемых генов. В последовательностях мРНК, кодирующих АДГ 1С и 3 человека, существуют два гипервариабельных участка (346-375 и 886-915). Эволюционные изменения первого гипервариабельного участка происходили в режиме положительного отбора, а второго – в режиме нейтральной эволюции.

3. Динамика стратегии кодирования АДГ3 в мРНК хордовых животных в процессе эволюции заключается в уменьшении значений RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов, увеличении частоты использования претерминальных кодонов, увеличении содержания аминокислот, кодируемых ГЦ-бедными кодонами (FYMINK), и уменьшении содержания аминокислот, кодируемых ГЦ-богатыми кодонами (GARP), что связано с изменением в процессе эволюции направленности мутационного давления (с ГЦ на АТ) в экзонах соответствующих генов. Основным механизмом изменения направленности мутационного давления являются ЦГ→ТГ мутации, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина.

4. Моноsubstrатные ферменты (АДГ3) хордовых и кодирующие их мРНК характеризуются меньшими темпами эволюционных изменений и нейтральности замен нуклеотидов в соответствующих им мРНК по сравнению с полиsubstrатными ферментами (АДГ1).

## **Личный вклад соискателя**

Приведенные в работе результаты были получены соискателем лично. Проведена статистическая обработка полученных данных, их анализ, подготовка к публикации печатных работ по теме диссертации. Научный руководитель, помимо постановки цели и задач исследования, оказывал консультативную помощь в обсуждении и трактовке полученных результатов.

## **Апробация результатов диссертации**

Полученные в ходе исследования результаты представлены и обсуждены на 56-й итоговой научной конференции студентов и молодых ученых ВГМУ

“Актуальные вопросы современной медицины” (Витебск, 2004), Международной научной конференции студентов и молодых ученых “Актуальные проблемы современной медицины 2004” (Минск, 2004), 52-й итоговой студенческой медицинской научной конференции с международным участием (Москва, 2004), Международной научной конференции студентов и молодых ученых “Актуальные проблемы современной медицины 2005”, посвященной 60-летию Великой Победы в Великой Отечественной войне (Минск, 2005), Научной сессии БГМУ 2005 (Минск, 2005), Международной научной конференции молодых ученых, посвященной Всемирному дню науки во имя мира и развития “Молодежь в науке-2005” (Минск, 2005), Международном симпозиуме “Молекулярные механизмы регуляции функции клетки” (Тюмень, 2005 г.), Юбилейной межвузовской научной конференции студентов и молодых ученых, посвященной 70-летию КГМУ “Молодежная наука и современность” (Курск, 2005), Международной научной конференции “Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем” (Минск, 2006), Международной научной конференции молодых ученых “Молодежь в науке-2006” (Минск, 2006), Научной сессии, посвященной 85-летию БГМУ (Минск, 2006), III-м Международном симпозиуме “Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии”, посвященном 100-летию со дня рождения акад. Н.М. Сисакяна (Москва, Дубна, 2007).

### **Опубликованность результатов**

По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, в том числе статей в рецензируемых журналах – 10, статей в сборниках – 4, учебно-методических пособий – 1, тезисов докладов – 9. Общий объем опубликованных материалов – 7 авторских листов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 139-ти страницах печатного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, заключения и библиографического указателя, включающего список использованных источников и список публикаций соискателя. Диссертационная работа содержит 29 таблиц и 48 рисунков.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Объекты и методы исследования**

Изучены аминокислотные последовательности АДГ класса 1 человека (*Homo sapiens* – H.s, A, B и C изоферменты), шимпанзе (*Pan troglodytes* – P.t., B-изофермент), бабуина (*Papio hamadryas* – P.h., B-изофермент), лошади (*Equus caballus* – E. c.), кролика (*Oryctolagus cuniculus* – O.c.), мыши (*Mus musculus* –

M.m.), петуха (*Gallus gallus* – G.g.), киви (*Apteryx australis* – A.a.), шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* – X.l.) нематоды (*Caenorhabditis elegans* – C.e.); класса 2 человека, мыши и нематоды; класса 3 человека, мыши, кролика, петуха, лягушки, костных рыб (*Danio rerio* – D.r., *Sparus aurata* – S.a., *Oryzias latipes* – O.l.), ланцетника (*Branchiostoma floridae* – B.f.), оболочника (*Ciona intestinalis* – C.i.), дрозофилы (*Drosophila melanogaster* – D.m.), нематоды; класса 4 человека и мыши; класса 5 человека и мыши. Также изучены нуклеотидные последовательности мРНК, кодирующие вышеназванные белки, и гены АДГ человека классов 1 (A, B, C), 2, 3, 4, 5 и мыши класса 3.

Показатели сходства аминокислотных последовательностей ( $S'$ ) и их достоверность (E) определены методом BLAST-анализа 2.2.9 [Altschul et al., 1997]. Выравнивания аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проведены с помощью программ ClustalW [Tompson et al., 1994]. Определение картины замещений выполнено с использованием ID-теста [Kumar, Gadagkar, 2001].

Эволюционные дистанции между аминокислотными последовательностями рассчитаны методами EIM [Nei, Kumar, 2000] и JTT (Джонса-Тейлора-Торнтон) [Jones, Taylor, Thornton, 1992]. Вычисление скорости молекулярной эволюции проведено по методу М. Кимуры [Кимура, 1985].

Эволюционные дистанции между нуклеотидными последовательностями в случае гомогенной картины замещений рассчитаны по методам Джукса-Кантора [Jukes, Cantor, 1969], Кимуры [Kimura, 1980], Тадзимы-Нея [Tajima, Nei, 1984], Тамуры [Tamura, 1992], Тамуры-Нея [Tamura, Nei, 1993], а в случае гетерогенной – по методам Тадзимы-Нея, Тамуры и Тамуры-Нея. Синонимичная ( $p_S$ ) и несинонимичная ( $p_N$ )  $p$ -дистанции вычислены по модифицированному методу Нея-Годжобори [Nei, Gojobori, 1986, Ina, 1995, Zhang et al., 1998].

Для анализа эволюционных взаимоотношений между аминокислотными (нуклеотидными) последовательностями использованы методы связывания ближайших соседей (NJ) попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA) [Saitou, Nei, 1987].

Характер аминокислотных замен определен физико-химической дистанции Грантсема (Grantham distance, GD) [Grantham, 1974]. Для определения конформационной подвижности основной цепи вычисляли среднюю величину энтропии, приходящейся на аминокислотный остаток, по методу В.В. Поройкова и соавт. [Поройков и соавт., 1980]. Содержание нуклеотидов, расчетное соотношение транзиций и трансверсий (R), содержание претерминальных и ГЦЗ-кодонов, а также показатели относительного использования синонимичных кодонов (RSCU) вычислены с помощью пакета программ MEGA3 [Kumar et al., 2004]. Мутационное давление ( $\mu_D$ ) вычислено по методу Н. Суюеки [Sueoka, 1988].

Полученные результаты обработаны статистически с помощью программ Microsoft Excel 2000. Статистическое подтверждение корректности дендрограмм осуществляли методом бутстрэп при 1000 повторов путем вычисления индекса BCL (bootstrap confidence level) [Kumar et al., 2004].

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты BLAST-анализа (таблица 1) и полученные дендрограммы (рисунок 1) для последовательностей мРНК, кодирующих АДГ человека, свидетельствуют о том, что эволюционным предшественником АДГ человека является АДГ3 нематоды. Эволюционный предшественник АДГ человека и соответствующего ортолога дрозофилы существовал уже на ранних этапах формирования биохимических систем беспозвоночных, т. е. около 1 млрд. лет назад.

Таблица 1 - Значения показателей сходства (выделены жирным шрифтом) и их достоверность для аминокислотных последовательностей АДГ человека

| Контроль/класс АДГ человека | 1A                  | 1B                  | 1C                  | 2                   | 3                   | 4                   | 5                   |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| АДГ1 С.е.                   | <b>75</b><br>4e-13  | <b>73</b><br>2e-12  | <b>82</b><br>3e-15  | <b>88</b><br>4e-17  | <b>77</b><br>1e-13  | <b>79</b><br>2e-14  | <b>63</b><br>1e-09  |
| АДГ2 С.е.                   | <b>69</b><br>3e-11  | <b>65</b><br>4e-10  | 76<br>2e-13         | <b>83</b><br>2e-15  | <b>80</b><br>9e-15  | <b>70</b><br>9e-12  | <b>66</b><br>2e-10  |
| АДГ3 С.е.                   | <b>342</b><br>2e-93 | <b>346</b><br>1e-94 | <b>339</b><br>1e-92 | <b>348</b><br>2e-95 | <b>486</b><br>e-137 | <b>322</b><br>2e-87 | <b>306</b><br>1e-82 |
| АДГ3 D.m.                   | <b>391</b><br>e-10  | <b>397</b><br>e-11  | <b>385</b><br>e-10  | <b>407</b><br>e-11  | <b>535</b><br>e-15  | <b>378</b><br>e-10  | <b>360</b><br>6e-9  |

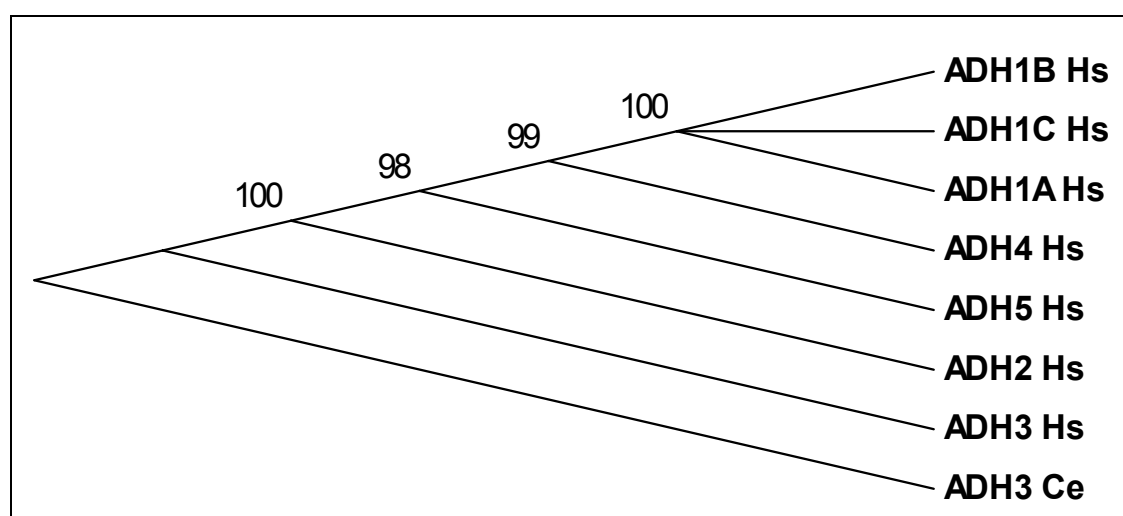


Рисунок 1 - Дендрограмма, обработанная методом бутстрэп, для последовательностей мРНК, кодирующих АДГ человека (над точками ветвления указаны значения BCL)

На рисунке 1 видно, что возникновение отдельных классов АДГ человека достоверно происходило в последовательности (класс 3 → класс 1 → класс 2 → класс 5 → класс 4), а затем в пределах первого класса выделились три подкласса (1А, 1В и 1С). По предложенной нами методике, учитывающей различия скоростей эволюции, установлено время существования общих предшественников АДГ 1 и 3-го классов (422,8 млн. лет).

Полученные данные по содержанию гуанина и цитозина в зависимости от положения кодона позволяют сформулировать следующую закономерность:  $G1+C1 > G3+C3 > G2+C2$ , которая характерна для всех мРНК, кодирующих АДГ человека, за исключением АДГ 2 и 3-го классов, в которых содержание гуанина и цитозина во втором положении больше, чем в третьем ( $G1+C1 > G2+C2 > G3+C3$ ).

На основании этого параметра, полученных дендрограмм для последовательностей мРНК, кодирующих АДГ человека и выполняемых функций все среднепочечные АДГ человека разделены нами на два подсемейства. К первому подсемейству (АДГ, метаболизирующие формальдегид и хиноны) отнесены АДГ третьего и второго классов, а ко второму семейству (АДГ, метаболизирующие спирты) – АДГ 1 (А, В, С), 4 и 5-го классов.

Особенности нуклеотидного состава экзонов и интронов генов АДГ заключаются в том, что экзоны имеют достоверно бóльшую ГЦ-насыщенность по сравнению с интронами (таблица 2).

Таблица 2 - Среднее ГЦ-содержание в экзонах и интронах генов АДГ классов 1-5 человека (в %)

| Класс АДГ | 1А        | 1В        | 1С        | 2         | 3         | 4         | 5         |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Эзоны     | 45,4±2,37 | 47,7±2,31 | 46,5±2,33 | 45,7±1,98 | 45,8±3,35 | 46,1±1,49 | 45,3±1,89 |
| Интроны   | 35,9±2,02 | 35,0±2,07 | 36,3±1,91 | 35,1±2,02 | 38,1±1,43 | 34,4±1,89 | 34,1±2,41 |
| p         | <0,01     | <0,001    | <0,001    | <0,001    | <0,05     | <0,001    | <0,001    |

Чередование экзонов и интронов, то есть участков соответственно с большим и меньшим содержанием гуанина и цитозина, служит основой ГЦ-мозаичного строения генов АДГ человека. Такое строение за счет различия в содержании водородных связей будет обеспечивать чередование более термодинамически стабильных участков молекулы ДНК (соответствующих экзонам) и менее стабильных (соответствующих интронам).

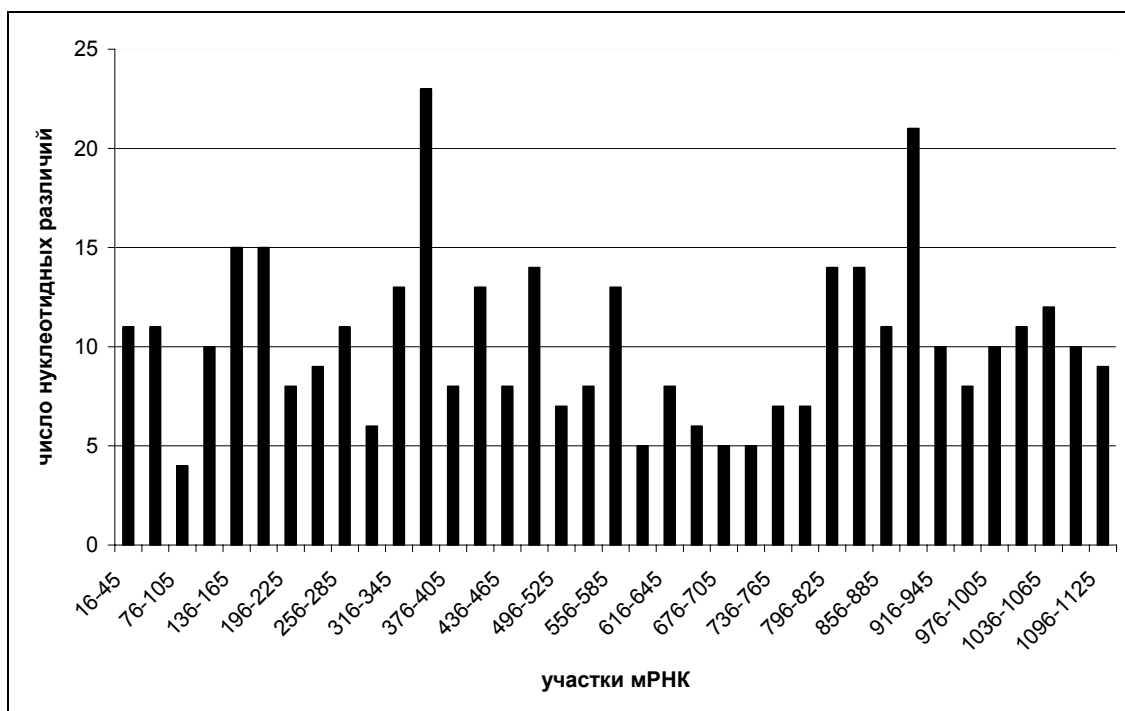
Данное строение, по-видимому, обеспечивается более низкими (по сравнению с интронами) темпами эволюционных изменений экзонов изучаемых генов (рисунок 2).





**Рисунок 2 - Скорости эволюции экзонов и интронов гена АДГ3 человека и мыши**

При сравнении последовательностей мРНК, кодирующих АДГ 1С и 3 человека, обнаружены два участка с высокой частотой мутаций (рисунок 3). Первый варибельный участок (346–375) соответствует части пятого экзона, а второй (886–915) – седьмого экзона.



**Рисунок 3 – Число мутаций в соответствующих декапептидам участка мРНК, кодирующих АДГ классов 1С и 3 человека**

Построенные профили ГЦ-содержания (рисунок 4) и ГЦЗ-содержания (рисунок 5) в экзонах генов АДГ классов 1С и 3 человека отличаются, но достоверные отличия по ГЦ-насыщенности обнаруживаются лишь при сравнении их пятых экзонов ( $p < 0,01$ ).

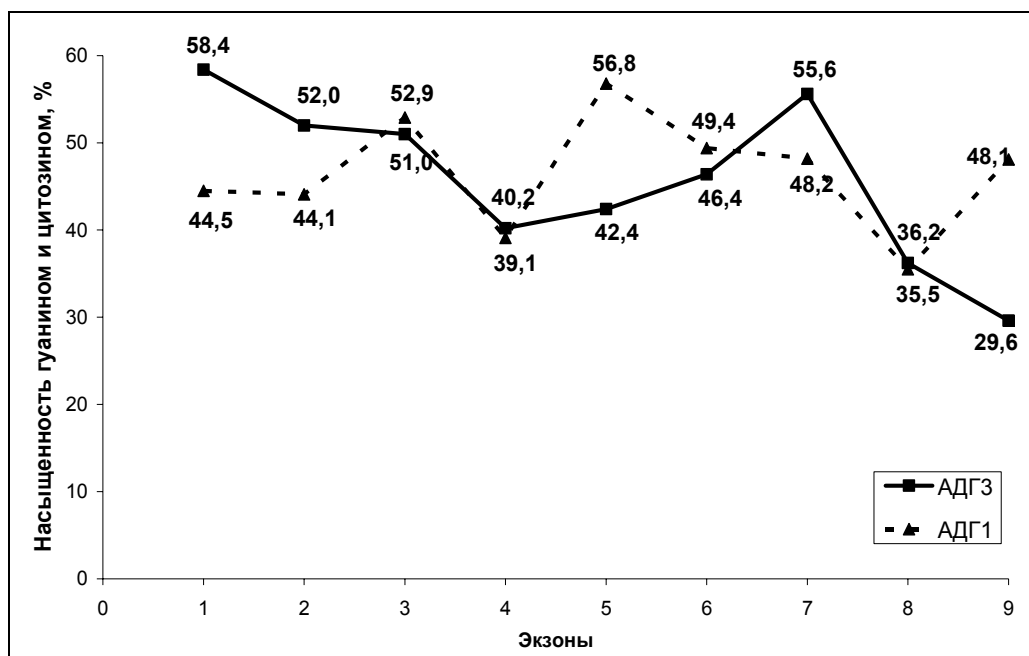


Рисунок 4 - Общая ГЦ-насыщенность экзонов генов АДГ классов 1С и 3 человека

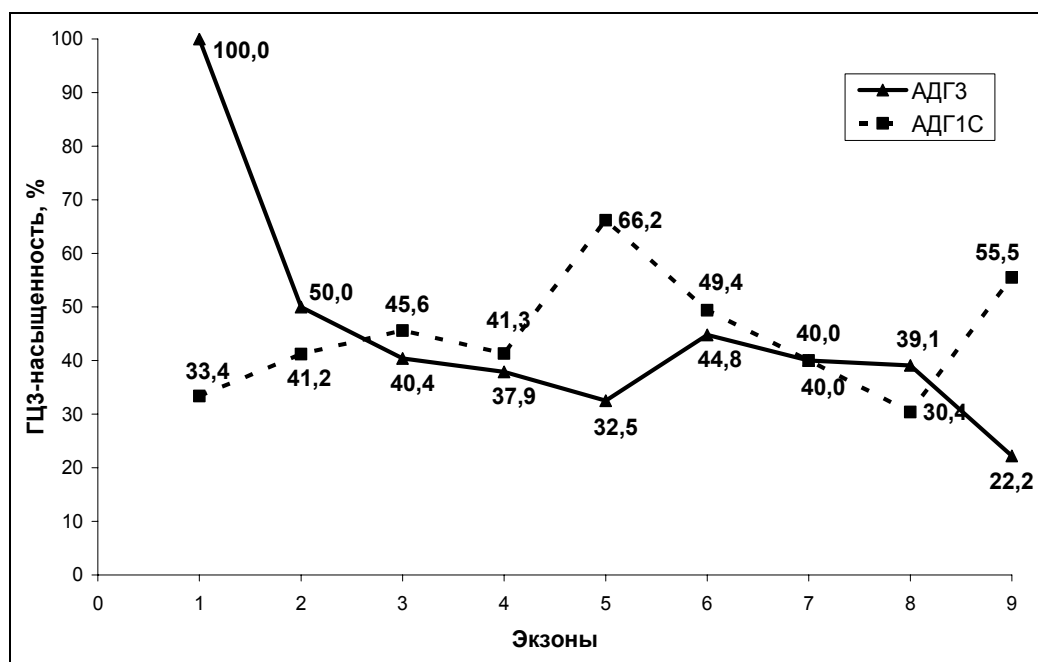


Рисунок 5 - Насыщенность гуанином и цитозином третьего положения кодонов в экзонах генов АДГ классов 1С и 3 человека

Вторичная структура участков аминокислотных последовательностей АДГ, соответствующих пятому экзону, различается: в области N-конца участка АДГ класса 3 имеется  $\alpha$ -спиральный фрагмент, который отсутствует в АДГ класса 1С.

Наблюдаемые различия вторичной структуры, безусловно, сопряжены с изменениями третичной структуры и функции изучаемых ферментов. Действительно, рентгеноструктурным анализом было показано, что аминокислотные остатки, соответствующие пятому экзону, участвуют в связывании субстратов [Hurley, et al., 1991, Engeland, et al., 1993]. Остатки, занимающие 116, 117, 140, 141-е положения, входят в состав субстрат-связывающего пакета, а остаток Арг-115 АДГ класса 3 связывает глутатион и омега-гидроксижирные кислоты.

Таким образом, нами предложен оригинальный способ определения по профилям содержания ГЦ и ГЦЗ функционально отличающихся участков эволюционно родственных белков.

В пользу предположения о существовании положительного отбора свидетельствует и то, что в десяти выровненных N-концевых кодонах участков мРНК, соответствующих пятому экзону генов АДГ классов 1С и 3 человека, достоверно преобладают многошаговые мутации ( $80,0 \pm 13,33\%$ ,  $p < 0,01$ ).

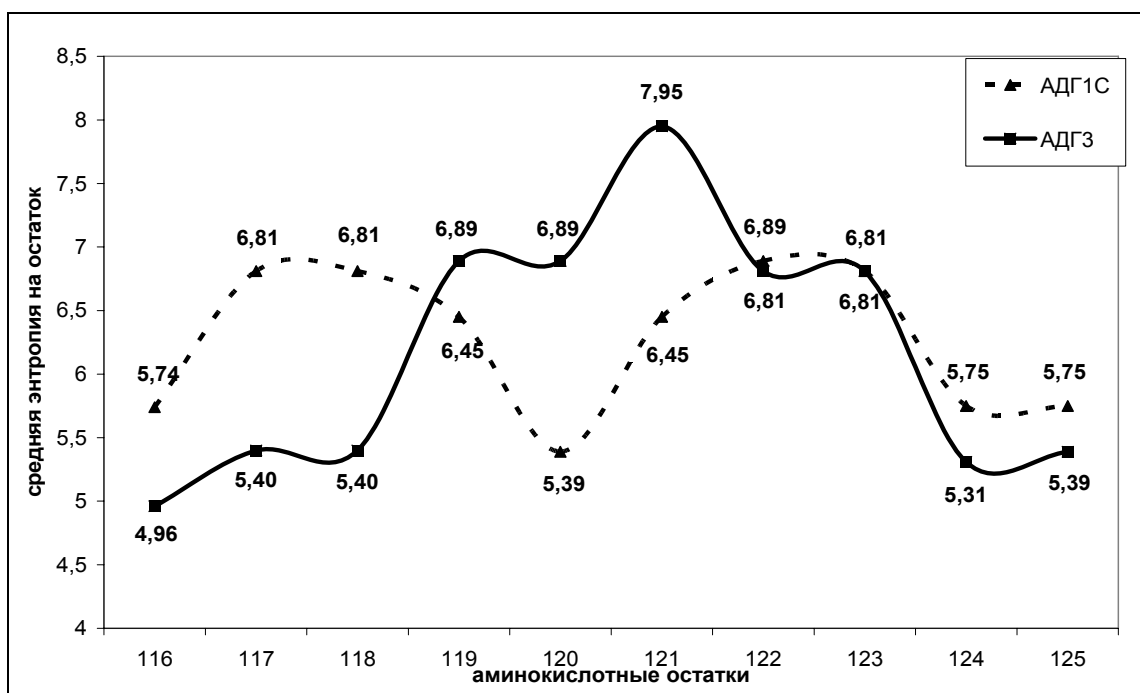
По средней физико-химической дистанции между 10-ю данными аминокислотными сайтами ( $75,8 \pm 5,04$ ) достаточно сложно оценить характер замен (степень их консервативности и радикальности). Однако такие радикальные замены в данном функционально важном участке, как аргинина на аспарагиновую кислоту (в 116-положении; нумерация по АДГ1С), треонина на лейцин (в 123-м положении) и пролина на глутамин (в 125-м положении), безусловно, могли закрепиться только в результате положительного отбора.

Установлено, что замены аминокислот в положениях 116-118 последовательности АДГ1С привели к увеличению гибкости остова основной цепи (рисунок 6).

Появление остатка лейцина в 116-м положении (в результате замены Вал→Лей) позволило дифференцировать доступ и ретенцию различных по размеру субстратов в активный центр АДГ. Вместе с тем для компенсации увеличения объема бокового радикала 116-го остатка произошли замены на аминокислоты с меньшим объемом боковых радикалов в 115-м (Арг→Асп) и 117-м положениях (Тре→Гли). Общей целью фиксации замен в участке АДГ1С 116-125, вероятно, была подстройка субстрат-связывающего пакета для улучшения взаимодействия и более эффективного окисления спиртов и стероидов.

Высокое соотношение несинонимичной и синонимичной р-дистанций (0,88), достоверное преобладание многошаговых аминокислотных замен, наличие трех высокорадикальных замен аминокислот, увеличение гибкости остова

основной цепи, сопряженное с изменением объемов боковых радикалов цепи, на N-конце соответствующего пятому экзону участка АДГ 1С и 3 человека свидетельствуют о наличии положительного отбора мутаций.



**Рисунок 6 – Средняя энтропия в расчете на аминокислотный остаток для 116-125 участков последовательностей АДГ 1С и 3 человека**

Аминокислоты, соответствующие второму варибельному участку (886-915), не выполняют какой-либо важной функции [Niederhut, et al., 2001]. Следовательно, большинство возможных аминокислотных замен являются приемлемыми и селективно нейтральными. Поэтому замены нуклеотидов (и, соответственно, аминокислот) в данном участке, по-видимому, происходили в режиме нейтральной эволюции.

С определенной степенью осторожности мы полагаем, что положительный отбор мутаций в первом гиперварибельном участке мРНК, кодирующих АДГ 1С и 3, может быть связан с возникновением уникальной свойственной АДГ1С каталитической активности – способности окислять не только этанол, но и ацетальдегид. Известно, что при алкоголизме наблюдается дисбаланс между активностью ферментов наработки и окисления ацетальдегида, что приводит к повышению содержания в крови токсичного ацетальдегида. В связи с этим для диагностики алкоголизма было предложено определение активности альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы [Пронько, 2004].

Необходимо отметить, что в доступной нам литературе отсутствует информация об активности АДГ1С при алкоголизме. Способность АДГ1С в отличие от остальных изоферментов алкогольдегидрогеназ катализировать два эта-

па окисления этанола, а также полученные данные о высокой вероятности положительного отбора мутаций в этом изоферменте позволяют предположить, что определение активности АДГ1С может выступать в качестве более чувствительного и специфичного маркера для лабораторной диагностики алкоголизма. На основании вышеизложенных фактов предполагается разработка метода определения активности АДГ1С для диагностики, определения степени тяжести и оценки эффективности проводимого лечения алкоголизма.

Скорости аминокислотных замен в последовательностях АДГ классов 1 и 3 хордовых равны 0,55 По и 0,25 По, соответственно. Темпы эволюции последовательностей мРНК, кодирующих АДГ 1 и 3-го классов, являются разными, но приблизительно постоянными и составляют  $0,60 \times 10^{-9}$  и  $0,40 \times 10^{-9}$  замен на сайт в год, соответственно.

Различия темпов эволюционных изменений аминокислотных последовательностей двух классов изучаемых ферментов, а также кодирующих их мРНК связаны с разным количеством субстратов (чем больше число лигандов, тем выше скорость эволюции). Данная закономерность подтверждена и на примере доменов АДГ 1. Так, скорость эволюционных изменений аминокислотных последовательностей каталитического домена (множество лигандов – спирты, альдегиды, стероиды, жирные кислоты и др.) АДГ класса 1 составляет 0,60 По, а кофермент-связывающего (один лиганд – НАД<sup>+</sup>) – 0,50 По. Равные скорости эволюции двух доменов АДГ 3 (0,25 По) легко объяснить приблизительно одинаковым количеством лигандов для НАД<sup>+</sup>-связывающего и каталитического доменов (формальдегид, глутатион, S-нитрозоглутатион).

При анализе последовательностей мРНК, кодирующих АДГ класса 3 хордовых, установлено, что значения показателей  $\mu_D$  (таблица 3) связаны достоверной обратной сильной корреляционной связью с содержанием претерминальных кодонов ( $r = -0,81 \pm 0,207$ ,  $p < 0,001$ ).

Таблица 3 – Мутационное давление и содержание претерминальных кодонов в мРНК, соответствующих АДГ класса 3 хордовых

| Показатель / организм | H. s. | O. c. | M. m. | G. g. | X. l. | D. r. | O. l. | S. a. | B. f. |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\mu_D$               | 0,37  | 0,40  | 0,45  | 0,45  | 0,39  | 0,50  | 0,54  | 0,54  | 0,65  |
| Содержание ПТК, %     | 33,3  | 32,3  | 30,1  | 29,6  | 30,5  | 27,3  | 29,2  | 30,5  | 26,5  |

Из данных, приведенных в таблице 3, следует, что нуклеотидные последовательности мРНК, кодирующих АДГ3 B.f., S.a., O.l. находятся под влиянием направленного ГЦ-давления ( $\mu_D > 0,5$ ), а ГЦ-состав мРНК D.r. находится в равновесии с мутационным давлением ( $\mu_D = 0,5$ ). Наоборот, нуклеотидные после-

довательности мРНК, соответствующие АДГЗ земноводных, птиц и млекопитающих, находятся под влиянием АУ-давления ( $\mu_D < 0,5$ ). Иными словами, в процессе эволюции мРНК, кодирующих АДГ класса 3 хордовых, наблюдается изменение направленности мутационного давления.

С целью установления возможного биохимического механизма этого явления нами проведено исследование, связанное с изучением характера мутационных превращений гипермутабельных ЦГ-динуклеотидов в экзонах генов АДГ 3 мышцы и человека.

При анализе точечных мутаций обнаружено, что из 19-ти мутировавших ЦГ-динуклеотидов 13 ( $68,4 \pm 10,96\%$ ) превратились в ТГ-, ТА- и ЦА-динуклеотиды. Среди последних в 11-ти динуклеотидах ( $84,6 \pm 10,42\%$ ) 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 молекулярным механизмом изменения направления мутационного давления в изучаемых нуклеотидных последовательностях экзонов генов, являются ЦГ→ТГ мутации, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина. Нами показано, что часть мутаций в ЦГ-динуклеотидах может происходить по другим механизмам (ЦГ→ЦА и ЦГ→ТГ→ТА), что связано с высокой вероятностью транзиций.

Оценим влияние изменения направленности мутационного давления в процессе эволюции мРНК, кодирующих АДГ класса 3 хордовых, на использование синонимичных ГЦЗ-кодонов (таблица 4).

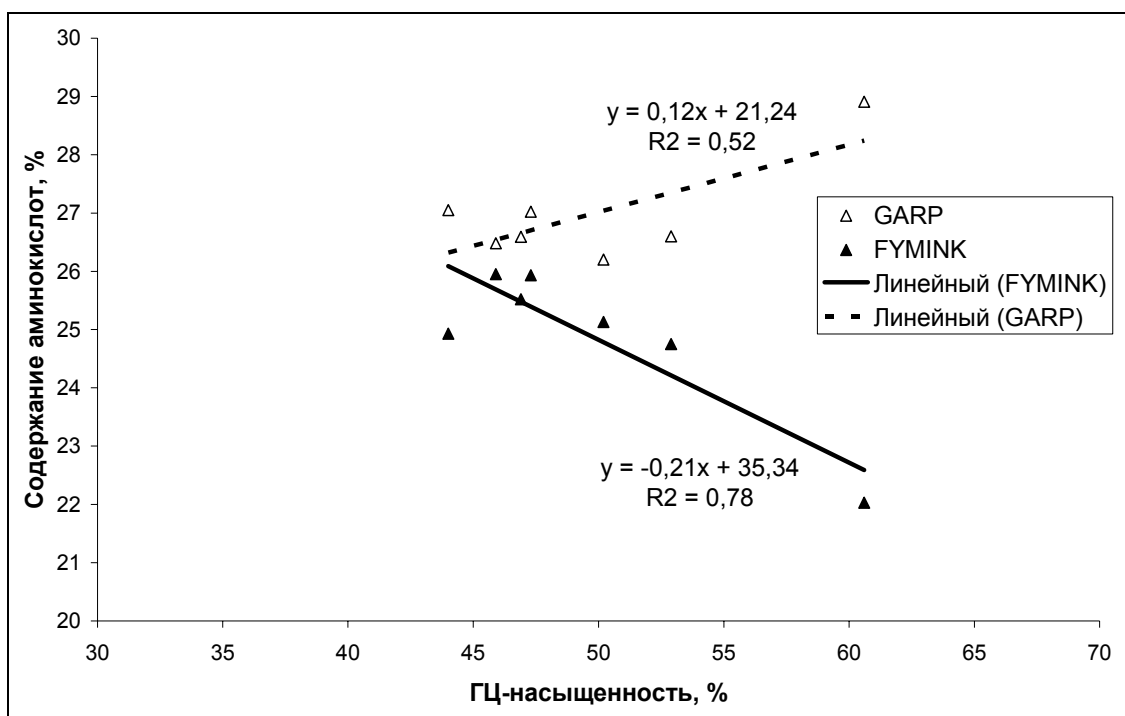
Таблица 4 – Показатели корреляции между значениями мутационного давления и RSCU для ГЦЗ-кодонов в последовательностях мРНК, кодирующих АДГ класса 3 хордовых

| ГЦЗ-кодоны<br>(аминокислота) | УУЦ<br>(Фен)    | ГУЦ<br>ГУГ<br>(Вал) | ЦГЦ<br>ЦГГ<br>АГГ<br>(Арг) | УУГ<br>ЦУЦ<br>ЦУГ<br>(Лей) | УЦЦ<br>УЦГ<br>АГЦ<br>(Сер) | ЦЦЦ<br>ЦЦГ<br>(Про) | АЦЦ<br>АЦГ<br>(Тре) | ГЦЦ<br>ГЦГ<br>(Ала) | ГГЦ<br>ГГГ<br>(Гли) |
|------------------------------|-----------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| $r \pm m$ для $\mu_D$ и RSCU | 0,86±<br>0,180* | 0,82±<br>0,202*     | 0,64±<br>0,272*            | 0,65±<br>0,268*            | 0,71±<br>0,250*            | 0,86±<br>0,181*     | 0,84±<br>0,190*     | 0,59±<br>0,285*     | 0,91±<br>0,144*     |
| ГЦЗ-кодоны<br>(аминокислота) | ААГ<br>(Лиз)    | ААЦ<br>(Асн)        | ЦАГ<br>(Глн)               | ГАЦ<br>(Асп)               | ЦАЦ<br>(Гис)               | ГАГ<br>(Глу)        | АУЦ<br>(Иле)        | УГЦ<br>(Цис)        | УАЦ<br>(Тир)        |
| $r \pm m$ для $\mu_D$ и RSCU | 0,87±<br>0,176* | 0,72±<br>0,244*     | 0,54±<br>0,298             | 0,87±<br>0,172*            | 0,76±<br>0,228*            | 0,85±<br>0,189*     | 0,86±<br>0,182*     | 0,83±<br>0,199*     | 0,85±<br>0,184*     |

Примечание - Достоверные корреляционные связи ( $p < 0,05$ ) обозначены знаком \*

Установлено, что между значениями мутационного давления в изучаемых последовательностях мРНК и значениями RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов существуют достоверные прямые сильные корреляционные связи (за исключением кодонов, соответствующих глутамину). По причине существования таких связей значения RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов будут уменьшаться вместе с уменьшением значений  $\mu_D$ , которое наблюдается в ряду от ланцетника до человека (таблица 3).

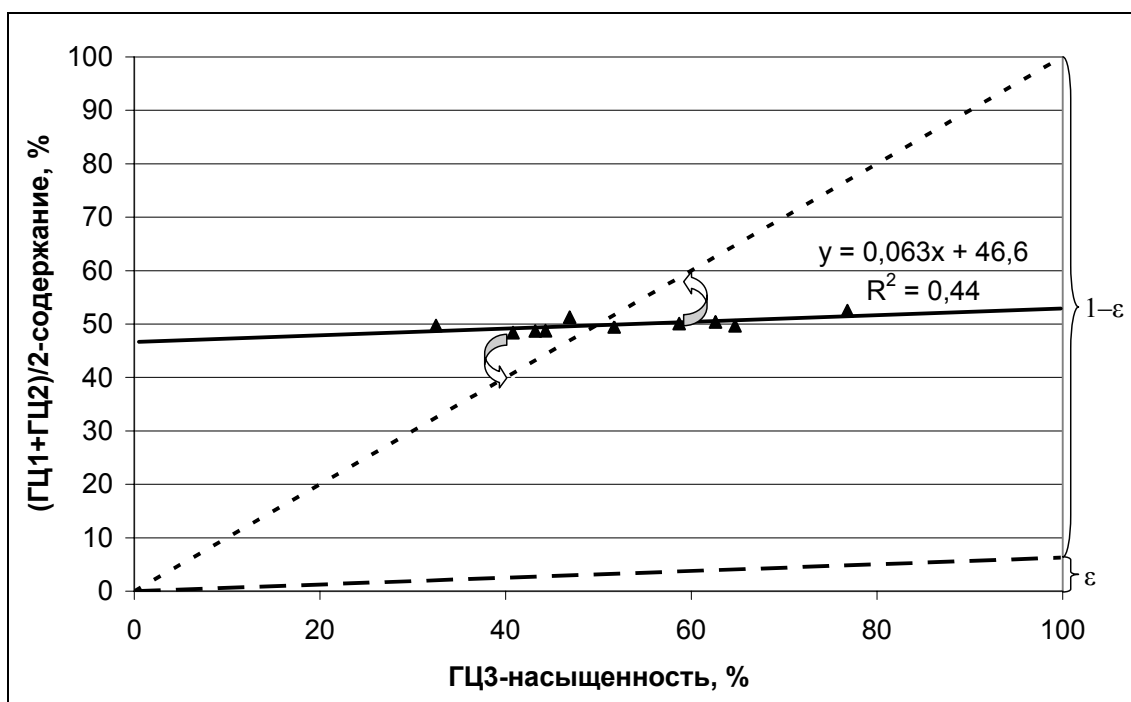
Перейдем к определению влияния на аминокислотный состав АДГЗ хордовых (ционы, ланцетника, данио, лягушки, мыши, кролика и человека) ГЦ-насыщенности кодирующих их мРНК. Сопоставим суммарное содержание аминокислот, кодируемых ГЦ-богатыми кодовами (GARP - глицин, аланин, аргинин и пролин) и ГЦ-бедными кодовами (FYMINK - фенилаланин, тирозин, метионин, изолейцин, аспарагин и лизин) в последовательностях АДГЗ с содержанием гуанина и цитозина в соответствующих мРНК (рисунок 7).



**Рисунок 7 – Зависимость содержания GARP и FYMINK в АДГ 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 FYMINK ( $r = -0,88 \pm 0,211$ ,  $p < 0,001$ ). Таким образом, можно сделать вывод о том, что АУ-богатые мРНК кодируют белки с высоким содержанием FYMINK, а ГЦ-богатые мРНК – белки с высоким содержанием GARP.

На основании зависимости между  $(ГЦ1 + ГЦ2)/2$ -содержанием и ГЦ3-насыщенностью мРНК, кодирующих АДГ классов 1 и 3 хордовых (рисунок 8), установлены степени нейтральности замен нуклеотидов в них.



**Рисунок 8 – Графическое представление степени нейтральности ( $\epsilon$ ) и степени селективных ограничений ( $1-\epsilon$ ), налагаемых на молекулу мРНК АДГ3 хордовых**

Для мРНК, кодирующих полисубстратные ферменты (АДГ1) хордовых, характерна бóльшая степень нейтральности замен в первом и втором положениях кодона ( $\epsilon = 9,7\%$ ) по сравнению с мРНК, кодирующими моносубстратные ферменты (АДГ3,  $\epsilon = 6,3\%$ ).

Мы полагаем, что определенная степень нейтральности замен А или Т на Г или Ц в первом и втором положениях кодонов под влиянием направленного ГЦ-давления, является отражением степени нейтральности замен в молекуле в целом. Таким образом, между темпами эволюционных изменений аминокислотных последовательностей АДГ классов 1 и 3, а также кодирующих их мРНК и степенью нейтральности замен нуклеотидов данных мРНК существует прямая связь.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. На основании наличия двух закономерностей последовательного количественного распределения гуанина и цитозина в мРНК, кодирующих АДГ человека, расположения изоферментов АДГ по отношению к корню построенных дендрограмм и выполняемых функций можно утверждать, что семейство АДГ человека состоит из двух подсемейств: 1) АДГ, метаболизирующие формальдегид и хиноны (2 и 3-й классы); 2) АДГ, метаболизирующие спирты (1А, 1В, 1С, 4 и 5-й классы). Результаты проведенного BLAST-анализа свидетельствуют, что эволюционным предшественником АДГ человека и соответствующего ортолога дрозофилы является АДГ класса 3 нематоды. Согласно полученным дендрограммам, возникновение изоферментов АДГ происходило в последовательности: класс 3 → класс 1 → класс 2 → класс 5 → класс 4 → выделение подклассов класса 1 (А, В, С) [5, 6, 12, 13].

2. Сравнительный анализ нуклеотидного состава экзонов и интронов генов АДГ человека и определение темпов эволюционных изменений экзонов и интронов генов, кодирующих АДГ класса 3 мыши и человека, позволили установить особенность экзон-интронной структуры и нуклеотидного состава генов АДГ человека. Данная особенность заключается в их ГЦ-мозаичном строении (чередовании достоверно более ГЦ-насыщенных экзонов с менее ГЦ-насыщенными интронами), что обеспечивается более низкими темпами эволюционных изменений экзонов изучаемых генов. В последовательностях мРНК, кодирующих АДГ 1С и 3 человека, существуют два гипервариабельных участка (346-375 и 886-915). Для первого гипервариабельного участка характерно высокое соотношение несинонимичной и синонимичной дистанций (0,88), достоверное преобладание многошаговых аминокислотных замен, наличие трех высокорадикальных замен аминокислот, увеличение гибкости остова основной цепи, сопряженное с изменением объема боковых радикалов. Учитывая, что соответствующие ему аминокислоты (115, 116 и 117) входят в состав активного центра фермента, можно утверждать, что его эволюционные изменения происходили в режиме положительного отбора. Аминокислотные остатки, соответствующие второму гипервариабельному участку не выполняют значимой функции, а следовательно, его изменения происходили в режиме нейтральной эволюции [8, 9, 22, 23].

3. Динамика стратегии кодирования АДГ класса 3 в мРНК хордовых в процессе эволюции заключается в уменьшении значений RSCU для синонимичных ГЦЗ-кодонов, увеличении частоты использования претерминальных кодонов, увеличении содержания аминокислот, кодируемых ГЦ-бедными кодонами

(FYMINK), и уменьшении содержания аминокислот, кодируемых ГЦ-богатыми кодонами (GARP), что связано с изменением в процессе эволюции направленности мутационного давления в экзонах соответствующих генов (с ГЦ на АТ). Основным механизмом изменения направленности мутационного давления являются ЦГ→ТГ мутации, осуществляемые посредством метилирования цитозина с последующим дезаминированием 5-метилцитозина. Часть мутаций в ЦГ-динуклеотидах может происходить по другим механизмам (ЦГ→ЦА и ТГ→ТА), что связано с высокой вероятностью транзиций [10, 19].

4. Сопоставление данных о степени нейтральности мутационных изменений нуклеотидного состава мРНК (в терминах ГЦ-содержания) полисубстратных (АДГ1) и моносубстратных (АДГ3) ферментов в процессе эволюции ( $\epsilon = 9,7\%$  для АДГ1,  $\epsilon = 6,3\%$  для АДГ3) с темпами эволюционных изменений мРНК ( $0,60 \times 10^{-9}$  и  $0,40 \times 10^{-9}$  замен на сайт в год для АДГ 1 и 3 соответственно) и аминокислотных последовательностей ( $0,55$  По и  $0,25$  По для АДГ 1 и 3 соответственно) показало существование между ними прямой связи, что находится в полном соответствии с теорией нейтральной эволюции [2, 3, 7, 14, 20].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Предложенный подход для анализа генов, основанный на построении профилей ГЦ- и ГЦЗ-содержания в экзонах гомологичных генов, может быть использован для выявления в них участков, потенциально эволюционирующих в режиме положительного отбора.

2. Обнаруженная взаимосвязь между скоростью молекулярной эволюции и степенью селективных ограничений, налагаемых на различные АДГ, открывает путь к разработке независимого метода определения времен дивергенции различных групп организмов, что имеет огромное медико-биологическое значение для таксономии вирусов и бактерий.

3. Полученные данные о высокой вероятности положительного отбора мутаций в АДГ1С и функциональные особенности данного изофермента позволяют разработать метод определения активности АДГ1С для оценки степени тяжести алкоголизма и эффективности проводимого лечения.

4. Полученные данные и подготовленные с их использованием учебно-методические пособия используются при преподавании биологии в медицинских ВУЗах Республики Беларусь.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах

1. Барковский, Е.В. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мРНК алкогольдегидрогеназы класса IV мыши и человека / Е.В. Барковский, **А.В. Бутвиловский** // Белорусский медицинский журнал. – Минск, 2005. – №1. – С. 19–22.
2. **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.
3. **Бутвиловский, А.В.** Молекулярная эволюция алкогольдегидрогеназы класса III хордовых животных / **А.В. Бутвиловский**, Е.В. Барковский // Здравоохранение. – Минск, 2005. – №9. – С. 11–15.
4. **Бутвиловский, А.В.** Стратегия кодирования алкогольдегидрогеназ человека / **А.В. Бутвиловский**, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский // Вестник ВГМУ. – Витебск, 2006. – №3. – С. 24–29.
5. **Бутвиловский, А.В.** Эволюционные взаимоотношения и структурно-функциональная классификация алкогольдегидрогеназ человека / **А.В. Бутвиловский**, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский. // Вестник ВГМУ. – Витебск, 2006. – №2. – С. 22–27.
6. **Бутвиловский, А.В.** Эволюционные дистанции и расчетные соотношения транзиций и трансверсий в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназы человека. / **А.В. Бутвиловский**, Е.В. Барковский // Здравоохранение. – Минск, 2005. – №2. – С. 49–50.
7. Методы изучения эволюционных изменений аминокислотных последовательностей. Сообщение 2. Методы, основанные на моделях замещения аминокислот / **А.В. Бутвиловский**, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский, В.В. Давыдов // Здравоохранение. – Минск, 2006. – №1. – С. 45–49.
8. **Бутвиловский, А.В.** Сравнительный анализ генов алкогольдегидрогеназ человека / **А.В. Бутвиловский**, Н.С. Климович // Вести Национальной Академии Наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2006, №5. – С. 40–42.
9. Гипервариабельные участки алкогольдегидрогеназ классов 1С и 3 человека / **А.В. Бутвиловский**, Е.В. Барковский, О.В. Ачинович, В.Э. Бутвиловский // Медицина. – 2007, №1. – С. 38–41.
10. Изменения в процессе эволюции мутационного давления в последовательностях мРНК, кодирующих алкогольдегидрогеназы класса 3 хордовых животных / **А.В. Бутвиловский**, Е.В. Барковский, О.В. Ачинович, В.Э. Бутвиловский // Медицинский журнал. – Минск, 2007. – №1. – С. 22–25.

### Статьи в сборниках

11. **Бутвиловский, А.В.** О виде селекции в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназы классов I-IV мыши и человека / **А.В. Бутвиловский** // Науки о человеке: материалы VI съезда молодых ученых и специалистов; под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ. – 2005. – С. 70–71.

12. **Бутвиловский, А.В.** Об использовании претерминальных кодонов и кодонов, содержащих гуанин и цитозин в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназ человека 1-7 типов. / **А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский** // Материалы междунар. симпозиума “Молекулярные механизмы регуляции функции клетки”, Тюмень, 2005 г. / Тюмень, 2005. – С. 275–277.

13. **Бутвиловский, А.В.** Эволюционные дистанции и показатели BLAST-анализа для аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ человека / **А.В. Бутвиловский** // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Международная научная конференция; Седьмой съезд Белорусского общественного Объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 21-23 июня 2006 г.: Сборник статей в 2-х томах. Том I. / под ред. И.Д. Волоотовского, С.Н. Черенкевича и др. – Мн.: Право и экономика, 2006 г. – С.51–53.

14. **Бутвиловский, А.В.** Эволюционные дистанции и скорости эволюции аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ класса 1 хордовых животных / **А.В. Бутвиловский** // Труды молодых ученых 2006: сб. науч. работ / под общ. ред. С.Л. Кабака – Минск: БГМУ, 2006. – С. 37–40.

### Учебно-методические пособия

15. Таганович, А.Д. Классификация, номенклатура, структура, механизм действия, регуляция и функции алкогольдегидрогеназ: учеб.-метод. пособие / А.Д. Таганович, **А.В. Бутвиловский**. – Мн.: БГМУ, 2006. – 32 с.

### Тезисы докладов

16. **Бутвиловский, А.В.** О транзициях и трансверсиях в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназы класса IV мыши и человека / **А.В. Бутвиловский** // Студенческая медицинская наука 2004. 52-я итоговая студенческая медицинская научная конференция (с международным участием): материалы конференции. – Москва, 2004. – С. 156.

17. **Бутвиловский, А.В.** О скорости молекулярной эволюции нуклеотидных и аминокислотных последовательностей мРНК алкогольдегидрогеназы класса IV мыши и человека / **А.В. Бутвиловский** // Молодежная наука и со-

временность. Материалы 69-й межвузовской научной конференции студентов и молодых ученых. В 2-х частях. Часть II. – Курск: КГМУ, 2004. – С. 110–111.

18. **Бутвиловский, А.В.** Транзиции и трансверсии в нуклеотидных последовательностях мРНК алкогольдегидрогеназ классов I-IV мыши и человека / **А.В. Бутвиловский, В.В. Хрусталева** // Молодежная наука и современность. Юбилейная межвузовская научная конференция студентов и молодых ученых, посвященная 70-летию КГМУ. В 2-х частях. Часть I. – Курск: КГМУ, 2005. – С. 53–54.

19. Хрусталева, В.В. Влияние мутационного давления на использование претерминальных кодонов в мРНК алкогольдегидрогеназ III класса хордовых животных / В.В. Хрусталева, **А.В. Бутвиловский** // Молодежная наука и современность: юбилейная межвузовская науч. конф. студентов и молодых ученых, посвящ. 70-летию КГМУ. В 2-х частях. Часть I. – Курск: КГМУ, 2005. – С. 81–82.

20. **Бутвиловский, А.В.** Эволюционные дистанции и скорости молекулярной эволюции алкогольдегидрогеназ класса I хордовых животных / **А.В. Бутвиловский** // V Всероссийская университетская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов по медицине: сборник материалов / Под общ. Ред. проф. В.Г. Сапожникова. – Тула, 2006. – С. 42–44.

21. **Бутвиловский, А.В.** Эволюционные дистанции и скорости молекулярной эволюции алкогольдегидрогеназ класса 1-4 мыши и человека / **А.В. Бутвиловский** // V Всероссийская университетская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов по медицине: сборник материалов. Под общ. ред. проф. В.Г. Сапожникова. – Тула, 2006. – С. 44–45.

22. **Бутвиловский, А.В.** Темпы эволюционных изменений и насыщенность гуанином и цитозином экзонов и интронов генов алкогольдегидрогеназ класса 3 мыши и человека / **А.В. Бутвиловский, Е.В. Барковский, В.Э. Бутвиловский** // Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии: III Международный симпозиум, посвященный 100-летию со дня рождения академика Н.Р. Сисакяна (Москва, Дубна, 24-28 января 2007 г.): Аннот. докл. – Дубна: ОИЯИ, 2006. – С. 31–32.

23. **Бутвиловский, А.В.** Насыщенность гуанином и цитозином экзонов и интронов генов алкогольдегидрогеназ человека / **А.В. Бутвиловский, О.В. Ачинович** // Материалы межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием “Молодежь и наука: итоги и перспективы” – Саратов, 2006. – С. 61.

24. **Бутвиловский, А.В.** Зависимость содержания гуанина и цитозина в каждом из положений кодона от общей ГЦ-насыщенности экзонов ряда генов алкогольдегидрогеназ человека / **А.В. Бутвиловский, О.В. Ачинович** // Вестник РГМУ. Периодический медицинский журнал. – М.: ГОУ ВПО РГМУ Росздрава. – 2007, №2 (55). – С. 254–255.

## РЭЗІЮМЭ

**Бутвілоўскі Аляксандр Валер'евіч**

**Динаміка змен нуклеатыдных паслядоўнасцей матрычных РНК і амінакіслотных паслядоўнасцей алкагольдэгідрагеназ у працэсе эвалюцыі**

*Ключавыя словы:* алкагольдэгідрагеназа, мутацыі, эвалюцыйныя змены, стратэгія кадзіравання.

*Аб'екты даследавання:* нуклеатыдныя паслядоўнасці мРНК і амінакіслотныя паслядоўнасці алкагольдэгідрагеназ розных жывёл.

*Прадмет работы:* вывучэнне заканамернасцей змянення нуклеатыдных паслядоўнасцей мРНК і амінакіслотных паслядоўнасцей алкагольдэгідрагеназ у працэсе эвалюцыі.

*Мэта даследавання:* вызначыць асноўныя заканамернасці змянення паслядоўнасцей мРНК і першаснай структуры алкагольдэгідрагеназ у працэсе эвалюцыі, характар эвалюцыйных узаемаадносін паміж імі ў шырокім філагенетычным радзе ад ніжэйшых хордавых да чалавека.

*Метады даследавання:* комплекс метадаў эвалюцыйнай біяхіміі, малекулярнай эвалюцыі, біяфізікі і статыстыкі.

*Атрыманыя вынікі і іх навізна.* Упершыню прапанавана структурна-функцыянальная класіфікацыя алкагольдэгідрагеназ чалавека. Выяўлена ГЦ-мазаічная будова генаў алкагольдэгідрагеназ чалавека, якая забяспечваецца больш нізкімі тэмпамі эвалюцыйных змен іх экзонаў. Выяўлена дынаміка стратэгіі кадзіравання алкагольдэгідрагеназ класа 3 у мРНК хордавых, якая заключаецца ў памяншэнні мутацыйнага ціску і зменах яго кірунку з ГЦ на АТ (асноўным механізмам дадзенага працэсу з'яўляюцца ЦГ→ТГ мутацыі), што прыводзіць да змен у амінакіслотным саставе кадзіруемых бялкоў (павелічэння амінакіслот групы FYMINK і памяншэння амінакіслот групы GARP). Упершыню выяўлена, што нейтральнасць замен па першым і другім палажэнням кадона і тэмпы эвалюцыйных змен полісубстратных ферментаў (алкагольдэгідрагеназа клас 1) вышэйшыя за монасубстратныя (алкагольдэгідрагеназа клас 3).

*Рэкамендацыі па выкарыстанню:* вызначаныя ў рабоце заканамернасці могуць быць выкарыстаны для аналізу генаў і выяўлення ў іх участкаў, якія патэнцыйна эвалюцыяніруюць у рэжыме станоўчага адбору, для распрацоўкі незалежнага метаду вызначэння перыядаў дывергенцыі розных груп арганізмаў, а таксама маркераў вызначэння ступені цяжкасці алкагалізма і ацэнкі эфектыўнасці праводнага лячэння.

*Галіна прымянення:* біяхімія, эвалюцыйная біяхімія, малекулярная біялогія, генная інжынерія.

## РЕЗЮМЕ

**Бутвиловский Александр Валерьевич**

### **Динамика изменений нуклеотидных последовательностей матричных РНК и аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ в процессе эволюции**

*Ключевые слова:* алкогольдегидрогеназа, мутации, эволюционные изменения, стратегия кодирования.

*Объекты исследования:* нуклеотидные последовательности мРНК и аминокислотные последовательности алкогольдегидрогеназ различных животных.

*Предмет работы:* изучение закономерностей изменения нуклеотидных последовательностей мРНК и аминокислотных последовательностей алкогольдегидрогеназ в процессе эволюции.

*Цель исследования:* установить основные закономерности изменения последовательностей мРНК и первичной структуры алкогольдегидрогеназ в процессе эволюции, характер эволюционных взаимоотношений между ними в широком филогенетическом ряду от низших хордовых до человека.

*Методы исследования:* комплекс методов эволюционной биохимии, молекулярной эволюции, биофизики и статистики.

*Полученные результаты и их новизна.* Впервые предложена структурно-функциональная классификация алкогольдегидрогеназ человека. Установлено ГЦ-мозаичное строение генов алкогольдегидрогеназ человека, обеспечивающееся более низкими темпами эволюционных изменений их экзонов. Установлена динамика стратегии кодирования алкогольдегидрогеназ класса 3 в мРНК хордовых, заключающаяся в уменьшении мутационного давления и изменении его направления с ГЦ на АТ (основным механизмом данного процесса являются ЦГ→ТГ мутации), что приводит к изменению аминокислотного состава кодируемых белков (увеличению аминокислот группы FYMINK и уменьшению аминокислот группы GARP). Впервые показано, что нейтральность замен по первому и второму положениям кодона и темпы эволюционные изменений полисубстратных ферментов (алкогольдегидрогеназа класс 1) выше, чем моносубстратных (алкогольдегидрогеназа класс 3).

*Рекомендации по использованию:* обнаруженные в работе закономерности могут быть использованы для анализа генов и выявления в них участков, потенциально эволюционирующих в режиме положительного отбора, для разработки независимого метода определения времен дивергенции различных групп организмов, а также маркеров определения степени тяжести алкоголизма и оценке эффективности проводимого лечения.

*Область применения:* биохимия, эволюционная биохимия, молекулярная биология, геновая инженерия.

## SUMMARY

**Alexander Butvilovsky**

### **Dynamics of changes of mRNA nucleotide sequences and amino acid sequences of alcoholdehydrogenases during evolution**

*Keywords:* alcoholdehydrogenase, mutations, evolutionary changes, coding strategy.

*Research objects:* mRNA nucleotide sequences and amino acid sequences of alcoholdehydrogenases of various animals.

*Research subject:* study of changes of mRNA nucleotide sequences and amino acid sequences of alcoholdehydrogenases during evolution.

*Objective:* to determine the main pattern of changes of mRNA sequences and primary structure of alcoholdehydrogenases during evolution, the character of evolutionary mutual relation between them in a wide phylogenetic number from the lowest chord animals up to the man.

*Research methods:* complex of methods of evolutionary biochemistry, molecular evolution, biophysics and statistics.

*Obtained results and their novelty.* Structure-functional classification of human alcoholdehydrogenases has been offered for the first time. We determined GC-mosaic structure of human alcoholdehydrogenases genes; it is provided by lower rates of evolutionary changes of their exons. Dynamics of class 3 alcoholdehydrogenases coding strategy in mRNA of the chord animals has been detected. It involves the decrease of mutation pressure and change of its direction from GC to AT (the main mechanism of the given process is GC→TG mutation) that results in changing of the amino acid composition of encoded protein (increase of amino acids of FYMINK group and decrease of amino acids of GARP group). For the first time it has been shown that the neutrality of replacements in the first and second codon's positions and rates of evolutionary changes of polysubstrate enzymes (alcoholdehydrogenase class 1) are higher than those of the monosubstrate enzyme (alcoholdehydrogenase class 3).

*Suggested usage:* the patterns discovered in the research can be applied for gene's analysis and for detection the sites potentially evolving in the mode of positive selection, for the development of an independent method defining divergence times of various groups of organisms as well as the development of a marker defining degree of alcoholism and estimating efficiency of spent treatment.

*Fields of application:* biochemistry, evolutionary biochemistry, molecular biology, genetic engineering.