

Мамирова Лейла Абдумажетовна

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОЧИЩАЮЩЕГО ОТБОРА В
ГЕНОМАХ МИТОХОНДРИЙ И ПРОТЕОБАКТЕРИЙ**

03.00.28 – биоинформатика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Гельфанд Михаил Сергеевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Петров Николай Борисович
НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ

кандидат биологических наук
Раменский Василий Евгеньевич
Учреждение Российской академии наук
Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН

Защита диссертации состоится 10 декабря 2009 года в 15⁰⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 002.077.02 при Учреждении Российской академии наук Институте проблем передачи информации им. А.А.Харкевича РАН по адресу: 127994, г. Москва, ГСП-4, Большой Каретный переулок, дом 19, строение 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института проблем передачи информации им. А.А.Харкевича РАН

Автореферат разослан _____ 2009 года

Учёный секретарь диссертационного совета
Доктор биологических наук, профессор

Рожкова Г.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ:

В популяционной и эволюционной генетике принято, что нерекомбинирующие гены и геномы деградируют в связи с неэффективной элиминацией вредных мутаций и меньшей скоростью фиксации благоприятных мутаций из-за таких процессов, как хрупкий Мёллера, фоновый отбор и фиксация слабовредного аллеля в результате его сцепления с благоприятной мутацией (hitch-hiking). Данные процессы привлекаются в качестве объяснения короткой эволюционной истории подавляющего большинства бесполовых видов, деградации Y-хромосомы и митохондриального генома позвоночных животных. Несмотря на то, что деградация нерекомбинирующих генов сейчас воспринимается как неоспоримая истина, существует крайне мало эмпирических работ, в которых было бы убедительно показано быстрое накопление вредных мутаций на нерекомбинирующих генах по сравнению с рекомбинирующими ортологичными генами. Однако, многие эффекты деградации нерекомбинирующих геномов могут быть обусловлены их пониженной эффективной численностью, а не эволюционными минусами отсутствия рекомбинации самой по себе. На данный момент быстрое накопление слабовредных мутаций в малочисленных популяциях очень хорошо изучено эмпирически на разных организмах. Многие нерекомбинирующие гены существуют очень долго и странно полагать, что процесс деградации происходит постоянно и, в конце концов, обязан привести к вымиранию вида, несущего эти бесполовые гены. Широко известный класс коловраток *Bdelloidea*, в бесполом состоянии радиировавший на 360 видов и распространившийся по всему миру, является хорошим примером, показывающим, что отсутствие рекомбинации не обязательно является эволюционным тупиком. Стоит упомянуть и о почти всех эукариотах, у которых помимо полового ядра существуют нерекомбинирующие митохондрии, абсолютно необходимые для существования целого организма. Половая нерекомбинирующая хромосома – ещё один источник нерекомбинирующих генов у многих половых организмов. Получается, что фактически все организмы имеют какую-то долю нерекомбинирующих генов, критичных для жизнедеятельности. И если полагать, что эти гены постоянно деградируют и ведут своих хозяев к вымиранию, то встаёт вопрос, с какой скоростью будут вымирать те или иные виды? Такая постановка задачи, хотя и имеет место (Lynch, Burger et al. 1993), не кажется верной, поскольку и в нерекомбинирующем состоянии возможна адаптивная эволюция. Например, коловратки *Bdelloidea*, видимо, сильно уменьшили свой темп мутирования в начале своего происхождения избавившись, от большинства ретротранспозонов. Интенсивная генная конверсия между палиндромами Y хромосомы, скорее всего, уменьшает мутационный груз (Charlesworth, Ohta 1988). Митохондрии также могут иметь свой уровень защиты, например, основанный на частых и резких уменьшениях

эффективной численности генов (бутылочных горлышек) экспонирующих все аллели под действие отбора. Допущение в моделях компенсаторных мутаций может легко остановить храповик Мёллера. Таким образом, против одних механизмов, уменьшающих приспособленность нерекombинирующих генов, могут работать другие, поддерживающие или компенсирующие эволюционные минусы отсутствия рекомбинации. Для понимания картины мира необходимо проверить на обширных эмпирических данных – деградируют ли нерекombинирующие геномы или нет? И далее, стараться объяснить полученные факты в контексте существующих концепций. Поскольку митохондриальный геном является краеугольным камнем в данной проблеме – с одной стороны он есть у практически всех эукариот, с другой стороны, уровень рекомбинации его сильно ограничен у многоклеточных организмов и равен нулю у позвоночных, то именно этот объект мы будем исследовать в этой работе.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Целью данной работы является оценка эффективности очищающего отбора в белок-кодирующих генах митохондрий млекопитающих и их протеобактериальных ортологов, характеризующихся разной эффективной численностью и частотой рекомбинации.

Перед собой мы поставили следующие задачи:

1. Оценить силу очищающего отбора у млекопитающих с различной популяционной численностью;
2. Оценить силу очищающего отбора у протеобактерий с различным образом жизни (облигатные паразиты и эндосимбионты, свободноживущие);
3. Сравнить силу очищающего отбора в митохондриях млекопитающих и их протеобактериальных ортологах.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА:

Широко принятая гипотеза о деградации митохондриального генома основана как на теоретических (Hoekstra 2000), так и на эмпирических данных (Lynch 1996; Lynch 1997; Lynch & Blanchard 1998). Поскольку митохондрии характеризуются низкой эффективной численностью и отсутствием рекомбинации, молекулярная эволюция митохондриальных генов должна быть ассоциирована с высокой скоростью накопления слабо вредных мутаций. Существует ряд работ, сравнивающих митохондриальные гены тРНК с ядерными генами тРНК и подтверждающих данные предположения (Lynch 1996; Lynch 1997; Lynch & Blanchard 1998). Но подход, применяемый в данных работах, не совсем адекватен, т.к. ядерные и митохондриальные гены тРНК не ортологичны, и поэтому изначально имеют разные функциональные и структурные ограничения. Более того, молекулы транспортных РНК

вообще не имеет смысл сравнивать, поскольку их функциональные ограничения напрямую зависят от эффективности трансляции. В нашей работе мы впервые проводим сравнение ортологичных белок-кодирующих генов, находящихся в нерекombинирующих и рекомбинирующих геномах из популяций с разной эффективной численностью: в митохондриях млекопитающих и в протеобактериях.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ:

Для понимания индивидуальной предрасположенности человека к современным болезням мы должны понимать наше генетическое прошлое, что является целью новой дисциплины – эволюционной медицины (Ruiz-Pesini et al., 2004). Изучение эволюции митохондриального генома и картирование сайтов митохондриального генома, находящихся под разным давлением отбора, поможет выявлять мутации, ассоциированные с болезнями человека.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ:

Отдельные этапы исследования были представлены на следующих конференциях и рабочих семинарах:

1. PARTNER-2. (parthenogenesis network) Origin and spread of asexuals. 16-18 April 2004. Valencia (Spain).
2. PARTNER-4 (parthenogenesis network) 22-24 September 2005. London (Great Britain)
3. Международная школа “Биоинформатика, геномика, протеомика”, 11-18 апреля 2006 г. Алма-Ата, Казахстан.
4. 30-ая конференция молодых учёных и специалистов ИППИ РАН “Информационные технологии и системы” (ИТиС’07), 18-21 сентября 2007, Звенигород, Россия.

СТРУКТУРА И ОБЪЁМ ДИССЕРТАЦИИ:

Диссертационная работа изложена на 90 страницах машинописного текста и включает в себя 5 разделов. Работа содержит 11 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы, приводимый в конце диссертационной работы, содержит 135 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

В геноме каждой клетки каждого организма постоянно возникают новые мутации. Подавляющее большинство новых мутаций, возникающих в линии половых клеток, либо не влияет на приспособленность вообще (абсолютно нейтральные мутации), либо уменьшает

приспособленность будущего организма (вредные и слабовредные мутации). Нейтральные мутации, по определению, никак не влияют на приспособленность организма и поэтому фиксируются случайным образом со скоростью, пропорциональной темпу мутирования (Кимура 1985). Вредные же мутации, сильно понижая приспособленность организма, удаляются из популяции, не оставляя никакого следа в эволюции. Нас будет интересовать промежуточный класс мутаций: слабовредные мутации, которые, незначительно уменьшая приспособленность организма, всё ещё имеют шансы зафиксироваться в популяции в результате случайного генетического дрейфа или эффекта бутылочного горлышка, внося свой вклад в межвидовую дивергенцию.

Поскольку стохастичные процессы происходят сильнее в малочисленных популяциях, то именно такие малочисленные популяции должны быть сильнее предрасположены к накоплению слабовредных мутаций. Помимо малочисленности популяции большую роль играет рекомбинация, в результате которой перемешиваются слабовредные мутации, увеличивая эффективность очищающего отбора. В данной работе исследуется влияние этих двух факторов (эффективная численность и частота рекомбинации) на силу очищающего отбора.

Накопление слабовредных мутаций может происходить долгое время незаметно, плавно понижая среднюю приспособленность вида. Однако, в тот момент, когда приспособленность вида опустится до такого порога, когда среднее число потомков от пары организмов, доживших до половой зрелости, опустится ниже двух, данная популяция будет не способна к дальнейшему поддержанию своей численности на прежнем уровне и начнётся процесс мутационного плавления (*mutational meltdown*), ведущего к вымиранию вида (Lynch, Burger et al. 1993). Мутационное плавление происходит в результате существования положительной обратной связи между уменьшением численности популяции и увеличением темпа накопления слабовредных мутаций – если от каждой пары организмов до состояния половой зрелости доживает менее двух потомков, то численность популяции начинает падать, что автоматически увеличивает силу генетического дрейфа, в результате которого фиксируется большая доля слабовредных мутаций. После накопления дополнительных слабовредных мутаций, приспособленность организмов падает ещё сильнее, и количество потомков, доживших до половой зрелости, уменьшается ещё быстрее, приводя к дальнейшему падению численности и увеличению силы генетического дрейфа и т.д. Однако ещё никто не наблюдал процесс вымирания видов из-за мутационного плавления, и пока это лишь математическая абстракция (Lynch, Burger et al. 1993).

Митохондриальный геном, который выбран основным объектом данной работы, является очень интересным и важным с точки зрения отбора против слабовредных мутаций из-за существования трёх принципиальных отличий по сравнению с ядерным геномом. Во-первых,

в митохондриальном геноме из-за отсутствия генетической рекомбинации между геномами, произошедшими от разных родителей, невозможно перераспределение вредных мутаций и, таким образом, мутационный груз (доля потомства, элиминируемая из-за вредных мутаций) митохондриального генома не может быть уменьшен за счёт удаления сразу нескольких мутаций с одной особью. Другими словами, в митохондриальном геноме правило Мёллера «одна мутация – одна генетическая смерть» является неоспоримой истиной. Во-вторых, митохондриальный геном наследуется только по материнской линии, поэтому его гены имеют низкую эффективную численность (такую же, как Y-хромосома), в связи с чем они сильнее подвержены накоплению слабовредных мутаций в результате генетического дрейфа. В-третьих, из-за агрессивной внутренней среды (активные формы кислорода) и большого числа раундов репликации митохондриального генома темп мутирования митохондриальной ДНК (мтДНК) на нуклеотид на поколение увеличен примерно на три порядка и составляет около 1.5×10^{-5} . Все эти причины, несмотря на небольшой размер митохондриального генома, могут приводить к очень высокому мутационному грузу и увеличивать вероятность деградации всего генома. С точки зрения популяционной генетики ожидается, что именно митохондриальный геном (а также нерекombинирующий участок Y-хромосомы) может быть наиболее критичным местом, определяющим приспособленность организма и предрасположенным к накоплению вредных мутаций (Cortopassi 2002). В связи с этим было опубликовано несколько работ, в которых Майкл Линч с коллегами оценивал эффективность удаления слабовредных мутаций из митохондриального генома по сравнению с ядерным (Lynch, Burger et al. 1993; Lynch 1996; Lynch 1997; Lynch and Blanchard 1998). Результат этих исследований подтвердил потенциальную роль митохондрий в падении приспособленности организмов и в последующем вымирании видов (Lynch 1996) (Lynch 1997). В данной работе мы решили проанализировать адекватность выводов, сделанных Линчем, и изучили эффективность отбора, действующего в митохондриальном геноме на большем объеме данных, сравнив силу очищающего отбора не между случайным набором генов из ядра и митохондрий, а между ортологичными генами, выполняющими одни и те же функции у разных видов млекопитающих и протеобактерий. Сравнимые нами выборки организмов отличаются разной эффективной численностью и частотой рекомбинации и, в соответствии с законами популяционной генетики, мы ожидали увидеть более эффективный отбор у видов, обладающих высоким уровнем рекомбинации и высокой эффективной численностью (N_e).

2. НАКОПЛЕНИЕ СЛАБОВРЕДНЫХ МУТАЦИЙ В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛОК-КОДИРУЮЩИХ ГЕНАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Целью данного исследования стала сравнительная оценка эффективности очищающего отбора у млекопитающих с разной популяционной численностью. В качестве оценки эффективной численности популяций изучаемых видов млекопитающих, мы использовали

массу тела половозрелой самки, основываясь на почти универсальной обратной зависимости между массой тела и N_e (Damuth 1993).

МЕТОДЫ

Полностью секвенированные митохондриальные геномы 138 видов млекопитающих, доступные на момент лета 2005 года, были загружены с базы данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/animalabout.html>). Все 13 белок-кодирующих гена были извлечены из каждого генома и транслированы в аминокислотные последовательности. Выравнивания аминокислотных последовательностей были сделаны для каждого гена с использованием ClustalX (Thompson, Gibson et al. 1997), с параметрами по умолчанию, и затем откартированы обратно на геном, чтобы получить нуклеотидные выравнивания, согласованные с белковыми. Выровненные 13 аминокислотных и 13 соответствующих нуклеотидных последовательностей без стоп-кодонов были конкатенированы в одну аминокислотную и соответствующую нуклеотидную последовательность для каждого вида. Филогенетическое дерево млекопитающих было построено по сшитым аминокислотным последовательностям с использованием метода наибольшего правдоподобия, реализованного в программе PHYL (Guindon and Gascuel 2003). Сшитые нуклеотидные последовательности были использованы при изучении нуклеотидных замещений.

В качестве оценок темпа накопления слабавредных мутаций мы проанализировали особенности молекулярной эволюции на внешних ветвях филогенетического дерева (между современным видом и последним реконструированным предком) следующими способами:

- Отношение скоростей фиксации несинонимичных и синонимичных замещений (K_a/K_s) были оценены для каждой ветви филогенетического дерева млекопитающих с помощью программы codeml из пакета PAML (Yang 1997).
- Скорости консервативных (K_c) и радикальных (K_r) несинонимичных замещений были оценены, основываясь на алгоритме Хьюза и соавторов (Hughes, Ota et al. 1990), который был модифицирован для учёта разницы частот транзиций и трансверсий (transition/ transversion bias) (Zhang 2000). Двадцать аминокислот были классифицированы в группы четырьмя разными способами, согласно их физико-химическим характеристикам. Мы использовали классификацию Чжана, согласно которой аминокислоты отличаются по заряду, полярности и полярности-объёму (Zhang 2000). Дополнительно мы использовали классификацию Тейлора, которая классифицирует аминокислоты только по объёму (Taylor 1986). Аминокислотные замещения внутри групп (когда предковая и современная аминокислоты принадлежат одной группе) рассматривались как консервативные, а замещения между группами –

как радикальные.

- Также, чтобы оценить аминокислотное различие, мы вычислили среднее физико-химическое расстояние между современными видами и их наиболее близкими реконструированными предками. Различие между двумя аминокислотами (если произошло несинонимичное замещение) в современном и предковом состоянии оценивалось с использованием матрицы Грантама (Grantham 1974) и усреднялось по всем парам замещений для каждой внешней ветки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для более удобного анализа результатов мы разделили всю выборку на две группы, каждая по 55 видов: мелкие млекопитающие (логарифм массы тела $\ln W < 9.04$) и крупные млекопитающие (логарифм массы тела $\ln W > 9.04$), где 9.04 (8400 гр.) – это медиана логарифма массы тела W (в граммах). Три параметра (Ka/Ks , Kr/Ks по полярности и Kr/Ks по объему) оказались значимо меньше у мелких млекопитающих по сравнению с крупными млекопитающими; параметр Kr/Ks по полярности-объему оказался почти значимо ($P=0.07$) меньше в мелких по сравнению с крупными млекопитающими; Kr/Ks по заряду не показал значимых различий при 5%-ом уровне значимости (t -тест, Рис. 1, А-Е).

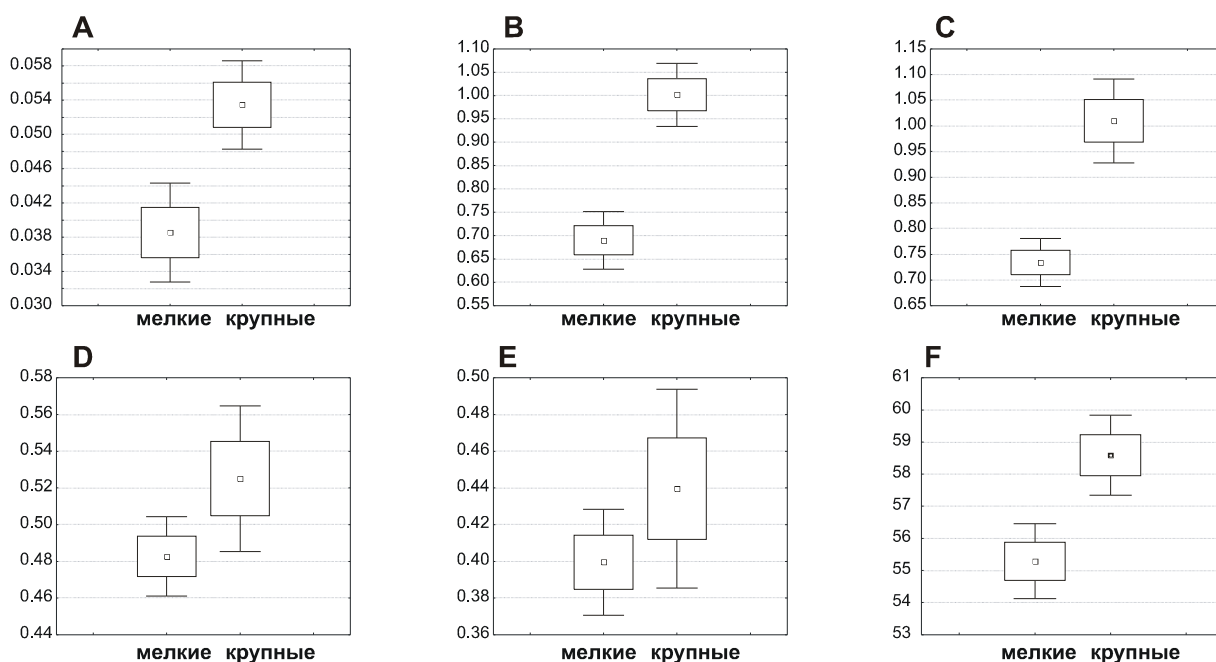


Рис.1. Сравнение шести молекулярных параметров, усредненных по 55 мелким ($\ln W < 9.04$) и 55 крупным ($\ln W > 9.04$) млекопитающим, 9.04 – медиана логарифма массы (в граммах). (A) Ka/Ks , $P = 0.001$. (B) Kr/Ks по полярности, $P = 0.001$. (C) Kr/Ks по объему, $P = 0.001$. (D) Kr/Ks по полярности и объему, $P = 0.069$. (E) Kr/Ks по заряду, $P = 0.20$. (F) расстояние Грантама, $P = 0.001$ (t test). Маленькие квадраты: среднее значение; прямоугольники: $\pm \sigma$ среднеквадратичное отклонение; усы: 95% доверительный интервал.

Анализ стандартных линейных зависимостей (регрессий) показал статистически значимую (на 5% уровне значимости) положительную зависимость Ka/Ks и Kr/Ks от логарифма массы тела (табл. 1), хотя со значительным разбросом ($r^2=0.16, 0.28, 0.32, 0.6$ и 0.07 , Рис. 4 А-Е,

соответственно). Такой разброс связан с влиянием сразу многих факторов на изучаемые параметры, но, тем не менее, тенденция увеличения изучаемых параметров с увеличением массы тела явно подтверждается.

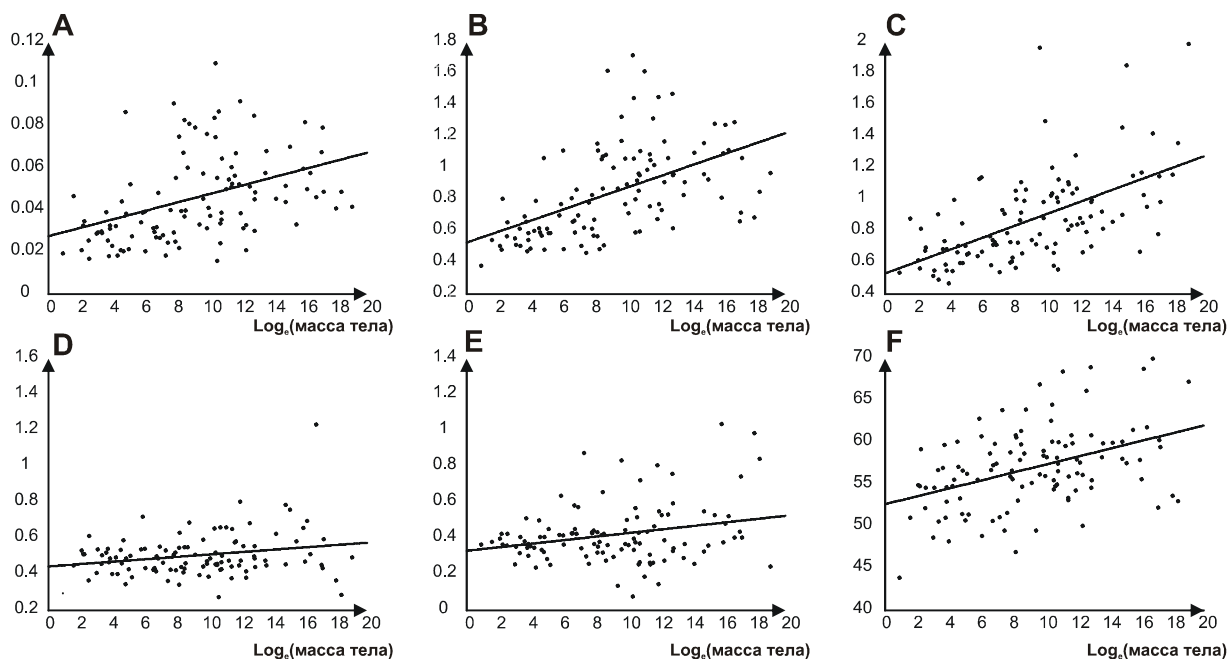


Рис. 2. Стандартные линейные регрессии молекулярных параметров от логарифма массы 110 видов млекопитающих. (A) Ka/Ks . (B) Kr/Kc по полярности. (C) Kr/Kc по объему. (D) Kr/Kc по полярности и объему. (E) Kr/Kc по заряду. (F) расстояние Гранта. Параметры регрессий указаны в табл. 1.

Параметры, которые мы анализируем, возможно, не являются независимыми среди видов, в связи с филогенетической инерцией – наследованием признака от общего предка ко всем потомкам. Филогенетическая инерция может отразиться на межвидовом анализе и скомпрометировать классические статистические методы, работающие с независимыми данными (Fisher and Owens 2004). Чтобы контролировать эффект ненезависимости данных, мы провели регрессионный анализ, используя линейные модели со смешанным эффектом, которые явно учитывают иерархическую (вложенную) и, таким образом, взаимосвязанную (коррелированную) сравнительно-видовую структуру данных. В нашей работе этот метод был применен с использованием функции `lme` в пакете `nlme` в языке R (R Development Core Team 2005). Наши данные были сгруппированы в следующие уровни: виды внутри рода, внутри семейства и внутри отряда. Результаты, которые получены с использованием смешанных линейных моделей, учитывающих зависимость данных, лишь незначительно отличаются от результатов, которые получены для стандартных линейных моделей, за исключением случая с Kr/Kc по заряду (табл. 1).

В качестве оценки относительной эффективности очищающего отбора в крупных по сравнению с мелкими млекопитающими мы сравнили Ka/Ks и Kr/Kc в животных разного размера. $\log_{10}$ массы тела типичного мелкого млекопитающего приняли за 5.62 (что

соответствует 275 граммам), а типичного крупного млекопитающего – за 12.82 (что соответствует 369500 граммам), данные величины – это средние Log_e массы тела среди 55 мелких и 55 крупных млекопитающих из нашей выборки. Ka/Ks оказался на 45% выше у крупных по сравнению с мелкими млекопитающими, тогда как Kr/Ks – на 8-40% выше, в зависимости от типа используемой аминокислотной классификации (табл. 2). Эти результаты очень близки для стандартной линейной модели и смешанной линейной модели (табл. 2).

Табл. 1. Средние, среднеквадратичные отклонения, параметры и значения P стандартных линейных моделей и моделей смешанных эффектов для регрессий каждого изучаемого параметра от логарифма массы тела. (SE) – стандартная ошибка.

Параметр	Среднее (SE)	Стандартные линейные модели			Модели смешанных эффектов		
		точка пересечения с осью Y	Наклон	P	точка пересечения с осью Y	Наклон	P
Ka/Ks	0.046 (0.002)	0.028	0.0020	<0.001	0.023	0.0024	0.010
Kr/Ks по полярности	0.846 (0.028)	0.525	0.0348	<0.001	0.475	0.0369	0.002
Kr/Ks по объему	0.872 (0.027)	0.528	0.0373	<0.001	0.547	0.0337	0.001
Kr/Ks по полярности и объему	0.504 (0.012)	0.443	0.0066	0.013	0.449	0.0057	0.061
Kr/Ks по заряду	0.420 (0.016)	0.330	0.0097	0.007	0.353	0.0066	0.157
Расстояние Грантама	56.940 (0.462)	52.614	0.4692	<0.001	52.314	0.4784	0.001

Табл. 2. Отношения скоростей несинонимичных к синонимичным (Ka/Ks) и радикальных к консервативным (Kr/Ks) замещениям, и аминокислотное расстояние (расстояние Грантама) между современными видами и их наиболее близкими реконструированными предками. Величины слева соответствуют крупным (средняя масса тела - 369.5 кг), величины справа – мелким (средняя масса тела - 275 г) млекопитающим. Величины были получены из стандартных линейных моделей (OLM) и моделей смешанных эффектов (MEM).

модель	Ka/Ks	Kr/Ks				
		по полярности	по объему	по полярности и объему	по заряду	Расстояние Грантама
OLM	0.054/0.039	0.97/0.72	1.01/0.74	0.53/0.48	0.45/0.38	58.63/55.25
MEM	0.054/0.036	0.95/0.68	0.98/0.74	0.52/0.48	0.44/0.39	58.45/55.00

Поскольку, как было показано выше, очищающий отбор действует на большинство несинонимичных замещений в противоположность молчащим замещениям, и менее эффективен в крупных млекопитающих, мы ожидаем, что крупные млекопитающие накопили больше вредных мутаций и, таким образом, эволюционировали дальше от своих наиболее современных предков. Анализ расстояния Грантама поддерживает данное предположение: оно больше у крупных млекопитающих в случае средних (рис. 1F), стандартных линейных моделей (рис. 2F) и смешанных линейных моделей (табл. 1). Количественно, аминокислотные различия между современными и предковыми последовательностями на 6% выше у крупных по сравнению с мелкими млекопитающими (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наш анализ показывает, что в большинстве случаев митохондриальные белок-кодирующие гены крупных млекопитающих имеют более высокую скорость накопления несинонимичных замещений по отношению к синонимичным, а среди несинонимичных замещений – более высокую скорость накопления радикальных замещений по отношению к консервативным. Поскольку несинонимичные замещения должны быть более вредными, чем синонимичные, а радикальные должны быть более вредными, чем консервативные, это подразумевает, что крупные млекопитающие подвержены менее эффективному очищающему отбору, чем мелкие млекопитающие. Следовательно, крупные млекопитающие накапливают более вредные мутации, что приводит к более сильному аминокислотному различию между современными видами и их наиболее близкими реконструированными предками, что и наблюдалось в данном исследовании.

K_A/K_S по заряду – это единственный параметр, который не показал значимого различия между крупными и мелкими млекопитающими в случае средних и в случае смешанной линейной модели (хотя различается в случае стандартной линейной модели). Мы заметили, что среди четырех параметров K_A/K_S , K_A/K_S по заряду имеет наименьшее среднее значение (табл. 1), что свидетельствует о действии сильного очищающего отбора на замещения, связанные с изменением заряда, в исследуемых белках. Коэффициент отбора $s < 0$ так велик по абсолютному значению, что не только мелкие млекопитающие (с высоким N_e), но и крупные млекопитающие (с низким N_e) испытывают сильный очищающий отбор, $s < -1/N_{e, \text{крупные}} < -1/N_{e, \text{мелкие}}$, и поэтому освобождаются от таких мутаций. В противоположность этому, очищающий отбор, который действует на замещения, ведущие к изменению по полярности или объему – относительно слабый (значения соответствующих параметров K_A/K_S максимальные, табл. 1), и коэффициент отбора находится в эффективно-нейтральной зоне в случае крупных млекопитающих, но ниже ее в случае мелких млекопитающих, то есть $-1/N_{e, \text{крупные}} < s < -1/N_{e, \text{мелкие}}$. Следовательно, радикальные замещения, ведущие к изменениям в полярности и объеме, закрепляются у крупных млекопитающих, как консервативные. Заметим, что для крупных млекопитающих значения K_A/K_S по полярности и объему лежат около единицы (рис. 1 В и С), но такие аминокислотные замещения подвержены элиминации у мелких млекопитающих. Слабовредные мутации с таким промежуточным коэффициентом отбора s будут накапливаться в основном у крупных млекопитающих.

Различие между мелкими и крупными современными млекопитающими, проанализированное в данной работе, может быть рассмотрено с точки зрения долговременной эволюционной перспективы, учитывая общий эволюционный тренд в сторону увеличения массы тела, известный, как правило Копа. Хотя существуют исключения, данный тренд детально описан для млекопитающих (Alroy 1998) (Van Valkenburgh, Wang et al. 2004):

достаточно того примера, что все предковые формы млекопитающих были маленькими существами размером с землеройку, тогда как современные млекопитающие включают в себя таких гигантов, как голубой кит и африканский слон. Мы предполагаем на основании современных данных, что эволюция млекопитающих в сторону увеличения массы тела сопровождалась накоплением слабовредных мутаций, что в свою очередь уменьшает приспособленность и увеличивает вероятность вымирания крупных млекопитающих. Одно косвенное свидетельство подтверждает данную гипотезу – крупные животные, включая млекопитающих (Purvis, Gittleman et al. 2000; Polishchuk 2002; Cardillo, Mace et al. 2005) более подвержены вымиранию. Бесспорно, необходимы дополнительные исследования, чтобы оценить роль менее эффективного очищающего отбора в увеличении риска вымирания крупных млекопитающих.

3. ОЧИЩАЮЩИЙ ОТБОР В МИТОХОНДРИЯХ СВОБОДНОЖИВУЩИХ И ОБЛИГАТНЫХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БАКТЕРИЯХ

В предыдущей главе мы показали, что удаление слабовредных мутаций должно быть эффективнее в видах с высокой эффективной популяционной численностью (N_e) (Wright 1931) в связи со слабым дрейфом генов. Также, согласно теории, мейотическая сегрегация и рекомбинация обеспечивают независимое смешивание аллелей и, таким образом, обеспечивают более эффективное удаление слабовредных мутаций (Kimura and Maruyama 1966) и остановку храповика Мёллера (Muller 1964; Felsenstein 1974). Таким образом, и популяционная численность, и уровень рекомбинации определяют эффективность очищающего отбора.

Относительная эффективность очищающего отбора была оценена как скорость фиксации несинонимичных замещений и радикальных аминокислотных замещений в семи ортологичных генах, кодирующих субъединицы белкового комплекса из дыхательной цепи (NADH:убихинон-оксидоредуктаза или Комплекс I) бактериальных и митохондриальных геномов. Эти гены кодируют субъединицы одного полисубъединичного белкового комплекса и представляют большую часть от всех белок-кодирующих генов митохондрий. Ортологичные гены, кодирующие субъединицы Комплекса I, присутствуют во всех аэробных бактериях.

Во-первых, мы сравнили митохондрии млекопитающих и бактерий. Поскольку митохондрии произошли от древних эндосимбиотических протеобактерий, интересно сравнить очищающий отбор в ортологичных митохондриальных и протеобактериальных генах, учитывая различия в их экологии. Митохондрии позвоночных наследуются строго по материнской линии, и поэтому бесполоы и имеют низкую эффективную численность (Birky 1995). Напротив, бактерии, особенно свободноживущие, характеризуются ненулевым уровнем рекомбинации и высокой эффективной численностью. Поэтому, мы ожидаем, что митохондрии должны быть подвержены более слабому очищающему отбору.

Во-вторых, мы оценили уровень очищающего отбора в различных группах

протеобактерий, учитывая особенности их экологии. С этой точки зрения, проанализированная выборка бактерий состоит из двух основных групп: облигатные внутриклеточные виды (паразиты и эндосимбионты) и свободноживущие виды, способные жить вне клетки-хозяина. Свободно живущие протеобактерии характеризуются более высокой эффективной численностью и уровнем рекомбинации, поэтому следует ожидать, что они подвержены более эффективному очищающему отбору по сравнению с облигатными внутриклеточными протеобактериями (Woolfit and Bromham 2003).

В-третьих, мы сравнили уровень очищающего отбора у облигатных внутриклеточных симбионтов (гамма-протеобактерии) и облигатных внутриклеточных паразитов (альфа-протеобактерии). Широко принято, что среди облигатных внутриклеточных бактерий симбионты со строгим внутриклеточным наследованием (*Buchnera* и *Blochmannia spp.*, которые нуждаются в питательных веществах, поступающих от клетки-хозяина) характеризуются более низким уровнем рекомбинации по сравнению с паразитами (патоген человека *Rickettsia* и репродуктивный паразит членистоногих и некоторых других беспозвоночных *Wolbachia*), которые способны переходить из одного хозяина в другого, и, таким образом, контактировать и рекомбинировать с новым геномным пулом (Bordenstein and Reznikoff 2005). Мы протестировали, могут ли различия в передаче облигатных внутриклеточных бактерий, определяемые различными особенностями их экологии, влиять на эффективность очищающего отбора посредством частоты рекомбинации.

В-четвертых, мы проанализировали взаимосвязь силы очищающего отбора с плотностью мобильных элементов в бактериальных геномах. Мы ожидали, что плотность мобильных элементов должна положительно коррелировать с уровнем рекомбинации, поскольку эти факторы взаимно усиливают друг друга. Уровень внутригеномной рекомбинации у бактерий в основном определяется активностью мобильных элементов, которые способны осуществлять конъюгацию (конъюгативные плазмиды и конъюгативные элементы) или трансдукцию (профаги или умеренные фаги) (Thomas and Nielsen 2005). Другие мобильные элементы бактерий и эукариот (Hickey 1982) (Arkhipova and Meselson 2000) (Schon and Martens 2000) (Sullender and Crease 2001), неспособные индуцировать рекомбинацию, эволюционно поддерживаются в геноме в соответствии с существующим уровнем рекомбинации: чем чаще рекомбинация, тем больше мобильных элементов (Bordenstein and Reznikoff 2005). Таким образом, мы использовали плотность всех мобильных элементов как приблизительную оценку рекомбинационной активности в бактериальных геномах.

МЕТОДЫ:

Последовательности семи ортологичных генов (митохондриальные: ND1-6 и ND4L; бактериальные: *nuoA*, *nuoH*, *nuoJ*, *nuoK*, *nuoL*, *nuoM* и *nuoN*) из альфа-, бета- и гамма-протеобактерий и из митохондрий приматов и грызунов (*Rodentia* и *Lagomorpha*), были

загружены с базы данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/animalabout.html>) с использованием blastp (Altschul 1990) с генами из *E.coli K12* в качестве генов-запросов. В результате, мы получили данные по 83 видам бактерий и по митохондриям 34 видов млекопитающих. Затем эти гены были транслированы *in silico* в аминокислотные последовательности. Аминокислотные последовательности, для каждого гена отдельно, были выровнены с использованием модели E-INS-i-MAFFT (Katoh, Kuma et al. 2005) и затем откартированы обратно на геном, чтобы получить нуклеотидные выравнивания, согласованные с белковыми. Нуклеотидные либо аминокислотные выравнивания были сшиты в одну нуклеотидную (соответственно, аминокислотную) последовательность для каждого вида. Сшитые аминокислотные последовательности были использованы для построения филогенетического дерева для каждой монофилетичной группы (альфа-, бета- и гамма-протеобактерии, грызуны и приматы) с использованием PHYML (Guindon, Lethiec et al. 2005). Гомологичные кодонные позиции, которые были только у бактерий (или митохондрий), и соответственно, отсутствовали у всех митохондрий (или бактерий), были удалены из всех последовательностей. Сшитые нуклеотидные последовательности были использованы для изучения нуклеотидных замещений на внутренних узлах дерева. Темп накопления несинонимичных мутаций относительно синонимичных на внешних ветвях древа был оценен с помощью нескольких моделей метода максимального правдоподобия (Yang 1997).

Для бактериальных видов с полностью секвенированным геномом было определено число генов с функциями мобильной ДНК. Для этого мы использовали автоматическую аннотацию из Comprehensive Microbial Resource of the Institute of Genomic Research (TIGR). Согласно этой аннотации гены классифицируются на 19 функциональных категорий, среди которых есть категория мобильной ДНК, различающая внутри себя гены плазмид, профагов и транспозирующих элементов (Peterson, Umayam et al. 2001). Мы использовали число генов данной категории, деленное на размер генома в миллионах пар оснований, как оценку плотности мобильных элементов в каждом виде. Все статистические исследования были выполнены в языке R (R Development Core Team 2005) (<http://www.R-project.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ:

Сила очищающего отбора ($1-Ka/Ks$), оцененная для каждой группы сравниваемых организмов графически представлена на рисунке 3.



Рис. 3. Различия в силе очищающего отбора ($1-Ka/Ks$) в изученных организмах,. $P < 0.05$ – если овалы расположены раздельно, $0.05 < P \leq 0.08$, если овалы соприкасаются, $P > 0.08$, если овалы перекрываются.

Значения Ka/Ks отрицательно коррелируют с плотностью мобильных элементов (плотность мобильных элементов – это количество плазмид, профагов и транспозирующих элементов на один миллион пар нуклеотидов генома; Kendall tau = -0.305 ; $P = 0.0014$; $N = 46$) (рис. 7). После удаления из выборки двух видов с нулевым числом мобильных элементов (*Buchnera aphidicola* APS и *Buchnera aphidicola* Sg) мы построили линейную регрессию $\ln(\text{плотность мобильных элементов})$ от $\ln(Ka/Ks)$, которая подтвердила наблюдаемый тренд $\ln(Ka/Ks) = -1.297 - 0.363 \times \ln(\text{плотность мобильных элементов})$, $r^2 = 0.138$, $P = 0.013$. Мы также учли зависимость анализируемых данных, используя линейную модель смешанных эффектов, и всё равно наблюдали значимую отрицательную регрессию ($\ln(Ka/Ks) = -0.670 - 0.619 \times \ln(\text{плотность мобильных элементов})$, $P = 0.0012$). Плотности плазмид, профагов и транспозирующих элементов по отдельности также демонстрировали значимую ранговую корреляцию с Ka/Ks . Плотность мобильных элементов, определенная как число мобильных генов, деленное на число всех генов в геноме, также демонстрировала отрицательную взаимосвязь с Ka/Ks (Kendall rank корреляция: tau = -0.329 , $P < 0.001$, $N = 46$; стандартная линейная регрессия: $\ln(Ka/Ks) = -3.891 - 0.396 \times \ln(\text{плотность мобильных элементов})$, $P = 0.008$, $N = 44$).

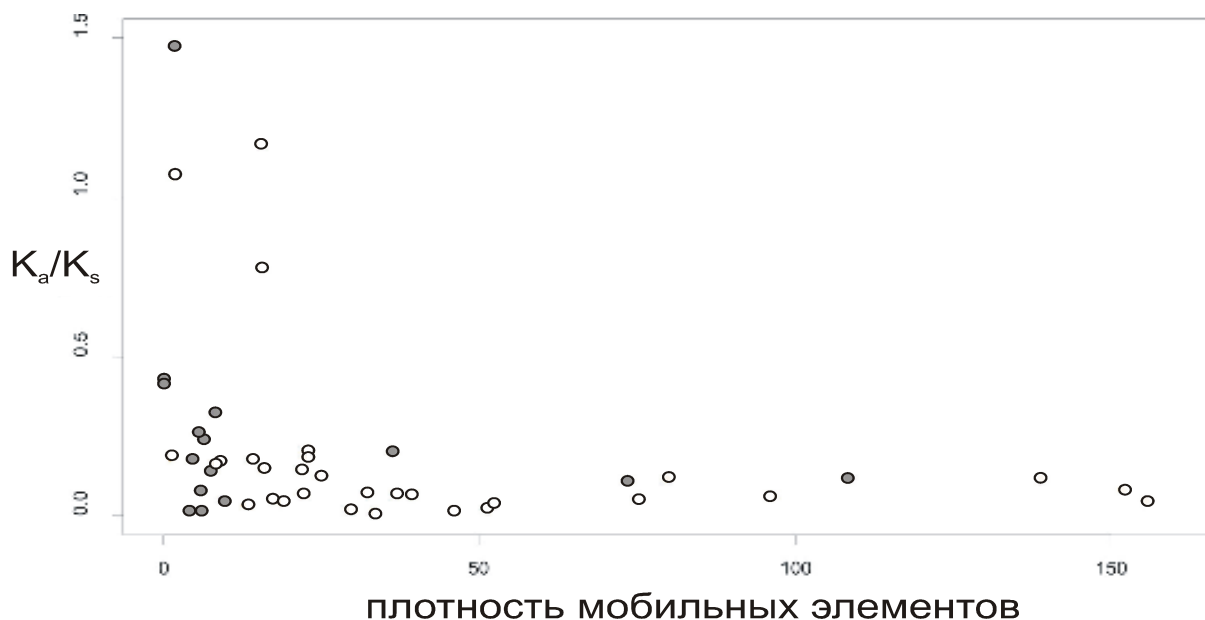


Рис.7. Связь K_a/K_s и плотности мобильных элементов для 46 бактериальных геномов. Плотность мобильных элементов была оценена как число мобильных элементов на миллион пар оснований бактериального генома. 31 вид свободноживущих бактерий (белые кружки) и 15 видов облигатных внутриклеточных бактерий (серые кружки).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ:

Начнём обсуждение результатов, слева направо двигаясь по рисунку 3. Неожиданным оказалось, что митохондриальные гены, несмотря на низкую эффективную популяционную численность и отсутствие рекомбинации, эффективнее удаляют слабовредные мутации по сравнению с ортологичными генами из облигатных внутриклеточных и даже свободноживущих протеобактерий, имеющих огромные эффективные популяционные численности и ненулевой уровень рекомбинации (левая колонка рисунка 3).

Более того, в дополнительных анализах мы показали, что этот результат не может быть объяснен положительным отбором в бактериях, эффектом насыщения синонимичных сайтов на длинных ветках или стохастических ошибок на слишком коротких ветках, неравномерностью использования кодонов, влиянием полиморфных мутаций,

Скорее всего, хотя митохондриальные гены выполняют те же функции, что и их бактериальные ортологи, они испытывают более сильные эволюционные ограничения, чему может быть несколько причин. Во-первых, Комплекс I в митохондриях млекопитающих содержит большее число субъединиц (45 в митохондриях против 14 в бактериях (Yagi 1993)), что приводит к большему числу белок-белковых взаимодействий, и соответственно, к более медленной белковой эволюции. Во-вторых, ранее высказывалось мнение, что эффективное удаление слабовредных мутаций из мтДНК во время атрезии яйцеклеток у самок млекопитающих достигается за счет апоптоза яйцеклеток с дефектной мтДНК (Kraakauer and Mira 1999) (Perez, Trbovich et al. 2000) (Bergstrom and Pritchard 1998). В-третьих, такие

дополнительные факторы, как важность белка или уровень экспрессии могут усиливать эволюционные ограничения, действующие на митохондриальные гены (Hirsh and Fraser 2001) (Pal, Rapp et al. 2001). Хотя логично предположить, что важность белка и уровень экспрессии должны быть выше в случае митохондриальных генов по сравнению с их бактериальными ортологами, мы не знаем работ, которые подтверждали бы эти предположения. Поэтому дальнейшие исследования помогут в определении причин повышенной эволюционной стабильности митохондриальных белок-кодирующих генов по сравнению с их бактериальными ортологами. Хотя наша работа полностью не опровергает гипотезу о необратимом накоплении слабавредных мутаций в нерекombинирующих генах митохондрий, мы по крайней мере утверждаем, что скорость хrapовика Мёллера в современных митохондриальных генах, медленнее, чем в их экологических эквивалентах, облигатных внутриклеточных эндосимбионтах.

Более высокие значения Ka/Ks у облигатных внутриклеточных бактерий по сравнению со свободноживущими (средняя колонка рисунка 3) согласуются с теоретическими данными. Эти результаты объясняются низкой эффективной численностью и отсутствием рекомбинации у облигатных внутриклеточных протеобактерий.

Также мы обнаружили более высокую эффективность очищающего отбора в облигатных внутриклеточных альфа-протеобактериальных паразитах по сравнению с облигатными внутриклеточными гамма-протеобактериальными симбионтами (правая колонка рисунка 3). Поскольку обе группы проходят через так называемое бутылочное горлышко в связи с внутриклеточным облигатным образом жизни, разница в эффективности очищающего отбора вряд ли связана с разной эффективной численностью популяций. Ранее предполагалось, что поскольку облигатные паразитические бактерии чаще меняют своих хозяев, чем облигатные эндосимбионты, наследуемые строго вертикально в линии хозяина, то после горизонтального переноса паразитические колонии могут рекомбинировать (Bordenstein and Reznikoff 2005). Таким образом, наиболее правдоподобным объяснением наблюдаемой разницы в эффективности очищающего отбора может служить наличие более высокого уровня рекомбинации у облигатных внутриклеточных паразитических альфа-протеобактерий.

Отрицательная зависимость между плотностью мобильных элементов и Ka/Ks служит хорошим эмпирическим доказательством того, что более высокий уровень рекомбинации приводит к более эффективному удалению слабавредных мутаций. Однако причинно-следственная связь между силой очищающего отбора и различными типами мобильных элементов может быть разной. (i) Так, отрицательная зависимость плотности транспозонов и Ka/Ks , скорее всего, объясняется влиянием уровня рекомбинации на оба параметра. Рекомбинация увеличивает как плотность транспозонов, так и эффективность очищающего отбора (то есть $1-Ka/Ks$). Это может означать, что между плотностью транспозонов и силой

очищающего отбора нет прямой причинно-следственной связи. (ii) Но всё же, другие мобильные элементы, плазмиды и умеренные фаги, определяют число событий рекомбинации, и поэтому с увеличением их числа происходит усиление эффективности очищающего отбора. Поэтому мобильные элементы, индуцируя рекомбинацию в бактериальных геномах, выполняют адаптивную роль, увеличивая эффективность очищающего отбора, благотворно влияя на эволюцию хозяйской ДНК (Kidwell and Lisch 2000).

5. ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование наглядно демонстрирует, что, сравнивая характер молекулярной эволюции экологически различных групп, можно выявить генетические последствия различного образа жизни. Крупные млекопитающие быстрее накапливают слабовредные мутации, чем мелкие, что связано с низкой численностью их популяций. При сравнении силы очищающего отбора в различных протеобактериях, характеризующихся разным образом жизни, мы получили теоретически ожидаемые результаты. Низкие значения эффективной численности популяции и уровня рекомбинации в облигатных внутриклеточных протеобактериях приводят к менее эффективному удалению слабовредных мутаций по сравнению со свободноживущими родственными видами. Редкие горизонтальные переносы, т.е. эффективно нулевой уровень рекомбинации в симбиотических облигатных внутриклеточных протеобактериях, приводит к менее эффективному очищающему отбору, чем в паразитических облигатных внутриклеточных протеобактериях, где более высокая частота рекомбинации, связанная с высокой плотностью мобильных элементов, приводит к более эффективному удалению слабовредных мутаций.

Однако, в то же время, более эффективный очищающий отбор, который мы наблюдали в относительно маленьких популяциях бесполой митохондрии по сравнению с огромными популяциями свободноживущих протеобактерий, был неожиданным, поскольку противоречит общепринятой теории. Получается, что в данной работе мы получили два, на первый взгляд, противоречащих друг другу результата: (i) более быстрое накопление слабовредных мутаций в митохондриальном геноме крупных млекопитающих (Popadin, Polishchuk et al. 2007) и (ii) более эффективный (или, по крайней мере, не менее эффективный) отбор в митохондриальных генах млекопитающих по сравнению с отбором в генах ортологов протеобактерий (Mamirova, Popadin et al. 2007). Если первый результат говорит о более быстрой деградации митохондриальных геномов крупных млекопитающих по сравнению с мелкими млекопитающими, то второй результат показывает нам, что вся эта деградация происходит с такой же или даже меньшей скоростью, чем накопление мутаций у протеобактерий. Поскольку протеобактерии имеют огромные рекомбинирующие популяции и не показывают никаких признаков деградации и потенциального вымирания, то совокупность этих результатов парадоксальна с точки зрения популяционной генетики. Необходимо привлечь какие-то

дополнительные факторы, которые влияют на силу очищающего отбора в митохондриях или бактериях и которые нарушают предположение о всех прочих равных, принятое в начале работы. По-видимому, существуют какие-то причины, такие как большое число белок-белковых взаимодействий или атрезия яйцеклеток у самок, поддерживающие эффективный очищающий отбор в митохондриях. Например, гены дыхательного комплекса бактерий могут быть менее ограничены эволюционно из-за меньшего уровня экспрессии этих генов, а также в связи с наличием нескольких альтернативных путей синтеза АТФ. В этом случае повышенная скорость накопления аминокислотных замен у бактерий может быть следствием меньших эволюционных ограничений, накладываемых на гены дыхательной цепи бактерий. Таким образом, получается, что отбор у крупных млекопитающих достаточно эффективен (по сравнению с бактериями), и немного повышенные скорости фиксации слабовредных мутаций (по сравнению с мелкими млекопитающими) являются лишь отражением более низкой эффективной численности крупных млекопитающих.

Может ли повышенная скорость накопления вредных мутаций у крупных млекопитающих представлять собой процесс, потенциально грозящий вымиранием крупных млекопитающих? Попробуем ответить или, по крайней мере, найти подходы к ответу на данный вопрос.

Следует помнить, что в этой работе мы оценивали лишь скорости накопления слабовредных мутаций относительно скоростей накопления нейтральных и никак не оценивали качество генома самого по себе. Мы поняли, что скорость накопления слабовредных мутаций относительно нейтральных у крупных млекопитающих выше, чем у мелких, однако мы также знаем, что темп мутирования на геном на единицу времени, и, соответственно, скорость нейтральной эволюции, выше у мелких млекопитающих в связи с бóльшим числом поколений, и, следовательно, раундов репликации ДНК клеток половой линии на единицу времени (generation-time hypothesis (Nikolaev, Montoya-Burgos et al. 2007; Nabholz, Glemin et al. 2008)). Однако остаётся открытым вопрос об общем числе вредных мутаций в геноме, и, соответственно, о приспособленности разных организмов (Kondrashov 1995). Каков будет общий результат? Какой геном будет хуже – тот, в котором образуется много мутаций в единицу времени, из которых фиксируется небольшая доля (мелкие млекопитающие), или тот, в котором образуется мало мутаций в единицу времени, но фиксируется бóльшая доля от них (крупные млекопитающие)? Или в результате скорость аминокислотной эволюции окажется примерно одинаковой? Единственная мера, не нормированная на нейтральную скорость эволюции в наших методах – это расстояние Грантама, однако даже в этой мере косвенно присутствует нормировка на уровень дивергенции, поскольку расстояние Грантама усреднялась только по различающимся аминокислотным позициям, а число это, естественно, зависит от уровня дивергенции.

Чтобы перейти от усреднённой вредности каждой аминокислотной замены к тотальной, мы повторили анализ с расстоянием Гранта на 110 видах млекопитающих, проведённый в главе 2, однако на этот раз мы не усредняли расстояние Гранта по всем аминокислотным заменам, а складывали её, получая тотальную меру физико-химического различия между белками современного млекопитающего и его последним реконструированным предком. Оказалось, что общее физико-химическое различие на внешних ветвях филогенетического древа оказалось значимо больше для мелких по сравнению с крупными млекопитающими (суммарное расстояние Гранта = $17411.0 - 743.5 \times \text{LnW}$, $P < 0.001$, $R^2 = 0.146$).

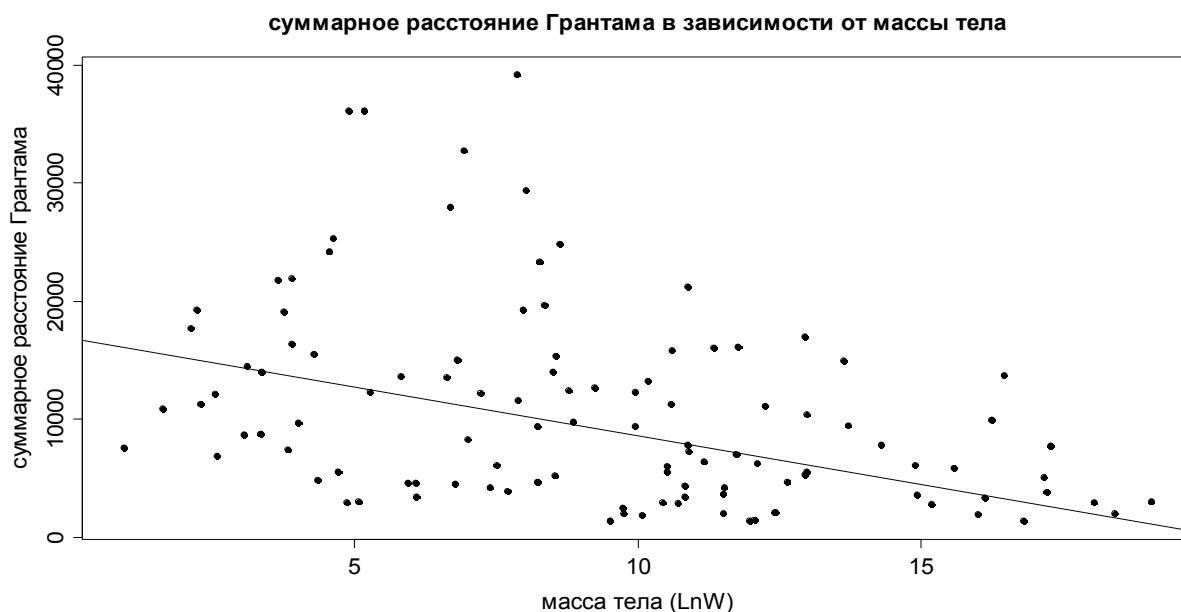


Рисунок 5. Зависимость суммарного расстояния Гранта, оцененного между современным видом и его последним реконструированным предком, от массы тела вида, соответствующего данной ветви филогенетического древа.

Итак, суммировав физико-химические расстояния всех аминокислотных замещений, мы получили картину, противоположную рисунку 2F, в котором мы использовали усреднённую дистанцию. Как можно объяснить оба рисунка – 2F и 5? Скорее всего, мелкие млекопитающие накапливают много мутаций со слабым эффектом, тогда как крупные накапливают мало мутаций, но с более сильным эффектом (более далёкие по физико-химическим свойствам аминокислотные замещения). В этом случае ожидается, что число аминокислотных замещений на внешних ветвях мелких млекопитающих будет значимо больше по сравнению с крупными, а тотальная мера физико-химического расстояния пропорциональна числу аминокислотных замещений. Действительно, оба эти предположения оказались верными: (i) количество аминокислотных замещений на внешней ветви филогенетического древа млекопитающих оказалось значимо большим для ветвей, соответствующих мелким млекопитающим (число аминокислотных замещений = $317.940 - 14.267 \times \text{LnW}$, $P < 0.001$, $R^2 = 0.18$). (ii) суммарное расстояние Гранта оказалось прямо пропорционально числу аминокислотных замещений на

внешних ветвях филогенетического дерева (суммарное расстояние Грантама = $-6.638 + 56.667 \times (\text{число аминокислотных замещений})$, $P < 0.001$, $R^2 = 0.99$). Когда мы построили линии регрессии отдельно для крупных и мелких млекопитающих (относительно медианы 8400 грамм), мы получили две почти параллельные линии: суммарное расстояние Грантама = $-494.7887 + 57.7550 \times (\text{число аминокислотных замещений})$, $P < 0.001$, $R^2 = 0.99$ для мелких млекопитающих и суммарное расстояние Грантама = $166.1356 + 56.9787 \times (\text{число аминокислотных замещений})$, $P < 0.001$, $R^2 = 0.99$ для крупных млекопитающих. Расстояние между двумя линиями (660) соответствует трём – четырём далёким аминокислотным заменам.

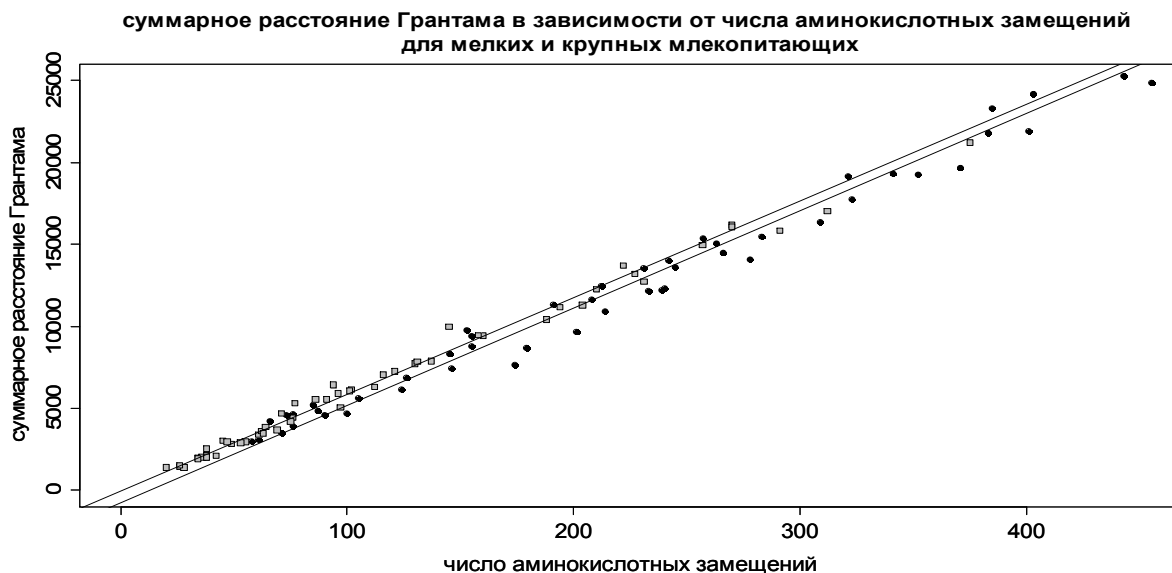


Рисунок 6. Зависимость суммарного расстояния Грантама от длины внешней ветви, выраженной в числе аминокислотных замещений между современным видом и его последним реконструированным предком. Серые квадраты и верхняя линия соответствуют крупным млекопитающим, черные точки и нижняя линия – мелким млекопитающим. Семь точек с суммарным расстоянием Грантама выше 25000 не показаны на графике, однако они были учтены во всех статистических анализах.

Итак, получается, что мелкие млекопитающие благодаря высокому темпу мутирования накапливают много мутаций в единицу времени, однако благодаря высокой эффективной численности, доля накапливаемых слабовредных мутаций низка. Крупные же млекопитающие имеют низкий темп мутирования на геном на единицу времени и, соответственно, накапливают мало мутаций в единицу времени, однако среди них доля слабовредных мутаций достаточно высокая. В итоге, как показали наши исследования (рисунок 5), высокий темп мутирования мелких млекопитающих всё же оказывается важнее и приводит к быстрому удалению мелких млекопитающих в физико-химическом пространстве от своего последнего предка. Эти результаты являются аргументом против гипотезы мутационного плавления крупных млекопитающих, однако всё же они не опровергают эту гипотезу полностью. Предположим, что приспособленность организма зависит лишь от нескольких важных аминокислотных позиций и от того, какие аминокислоты находятся в них, зависит вероятность вымирания. В

этом случае общая статистика аминокислотных замен даст нам мало информации, а вот вредность мутаций в некоторых ключевых аминокислотных позициях будет определять приспособленность. Таким образом, дополнительные исследования необходимы для выявления генетической компоненты приспособленности в сравнительно-видовом масштабе.

ВЫВОДЫ

1. Сравнение параметров молекулярной эволюции крупных и мелких млекопитающих, а также облигатных внутриклеточных и свободноживущих протеобактерий показало повышенную скорость накопления слабовредных мутаций в малочисленных популяциях.
2. Сравнение параметров молекулярной эволюции эндосимбиотических и паразитических бактерий, а также плотности мобильных элементов у всех протеобактерий показало повышенную эффективность очищающего отбора в геномах с более высоким уровнем рекомбинации.
3. Сравнение эволюционно далеких митохондриальных и протеобактериальных геномов, показало более эффективный или, по крайней мере, не менее эффективный отбор в малочисленных и нерекombинирующих митохондриальных геномах по сравнению с более многочисленными и рекомбинирующими геномами протеобактерий. Это ставит под сомнение существующие теории о постоянной и необратимой деградации митохондриального генома млекопитающих, приводящей к мутационному плавлению видов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Публикации в научных журналах

1. Popadin KY, Mamirova LA, Kondrashov FA. A manually curated database of tetrapod mitochondrially encoded tRNA sequences and secondary structures. *BMC Bioinformatics*. 2007, 8(1):441
2. Popadin K, Polishchuk LV, Mamirova L, Knorre D, Gunbin K. Accumulation of slightly deleterious mutations in mitochondrial protein-coding genes of large versus small mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104(33):13390-5.
3. Mamirova L, Popadin K, Gelfand MS. Purifying selection in mitochondria, free-living and obligate intracellular proteobacteria. *BMC Evol Biol*. 2007, 7(1):17.
4. Попадьян К., Мамирова Л. 2004. История одинокой хромосомы. *Природа* 9: 11-16.

Публикации в сборниках трудов конференций

1. Мамирова Л.А. Радикальные и консервативные аминокислотные замещения в эволюции // Материалы международной школы “Биоинформатика, геномика, протеомика”. 2006. С. 56-58.
2. Mamirova, L., Popadin, K. Adaptive evolution of mitochondrially encoded proteins in mammalian lineages // Сборник трудов конференции молодых ученых «ИТиС’07». 2007. С. 278-280.
3. Popadin, K., Mamirova, L. Kondrashov, P. Co-evolution of tRNAs free energy and amino acid abundance of mitochondrial encoded proteins // Сборник трудов конференции молодых ученых «ИТиС’07». 2007. С. 299-301.

БЛАГОДАРНОСТИ:

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю Михаилу Сергеевичу Гельфанду за чуткое научное руководство.