



© П. С. Лощенова<sup>1</sup>, И. Б. Рогозин<sup>1,2</sup>,  
У. Н. Рощкая<sup>1</sup>, Б. А. Малярчук<sup>3</sup>,  
Г. А. Невинский<sup>4</sup>, О. И. Сеницына<sup>1</sup>

## СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ ЦИТОХРОМА В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ГИППОКАМПА КРЫС ЛИНИИ WISTAR

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики  
СО РАН, Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup>Национальный центр биотехно-  
логической информации НБМ,  
Национальные институты здоровья,  
Бесезда, США;

<sup>3</sup>Институт биологических проблем  
Севера, Дальневосточное отделение  
РАН, Магадан, Россия;

<sup>4</sup>Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины  
СО РАН, Новосибирск, Россия

✳ Одним из самых интересных результатов в системной биологии является открытие отрицательной корреляции между скоростью эволюции белков и уровнем экспрессии генов. Природа этой корреляции остается предметом оживленных дискуссий. В последнее время широкое распространение получила гипотеза о том, что ошибки трансляции с последующими ошибками укладки белков являются основным универсальным ограничителем скорости эволюции белков, так как приводят к преждевременной гибели клетки — гипотеза Драммонда–Вилке. Анализ соматических мутаций в митохондриях является перспективным подходом для проверки этой гипотезы. Соматические ткани содержат от нескольких десятков до нескольких тысяч митохондрий, причем на каждую митохондрию приходится достаточно высокое число копий митохондриальной ДНК (мтДНК), и, следовательно, повреждающие мутации не могут приводить к полной потере продукта определенного гена. Мы провели анализ соматических мутаций в гене цитохрома b мтДНК из гиппокампа крыс линии Wistar. Выявленное нами отсутствие очищающего отбора в исследованном кодирующем районе мтДНК не подтверждает гипотезу Драммонда–Вилке о сильном очищающем отборе, элиминирующем ошибки, возникающие в процессе синтеза белков. Этот результат в значительной степени ставит под сомнение реалистичность данной гипотезы.

✳ **Ключевые слова:** митохондриальная ДНК; цитохром b; нуклеотидные замены; очищающий отбор; гиппокамп; линия крыс Wistar.

### ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии — единственные органеллы клеток млекопитающих, которые несут собственный геном — кольцевую молекулу ДНК длиной порядка 16 тысяч пар оснований. Митохондриальная ДНК (мтДНК) кодирует полипептиды комплексов цепи переноса электронов, собственные рРНК и тРНК. Также она имеет многокопийную природу и характеризуется той или иной степенью гетероплазмии (Spelbrink, 2010). Поэтому любая мутация мтДНК существует в митохондриях наряду с исходными копиями мтДНК и должна преодолеть определенный количественный порог прежде, чем проявиться фенотипически (Tuppen et al., 2010).

Мутации в мтДНК могут возникать в результате ошибок митохондриальной ДНК-полимеразы  $\gamma$  (Pol  $\gamma$ ), а также из-за химической модификации оснований в копируемой ДНК или на уровне дезоксирибонуклеотидтрифосфатов как субстратов Pol  $\gamma$ . На внутренней мембране митохондрий в непосредственной близости от мтДНК расположены ферменты цепи переноса электронов, являющейся основным источником активных форм кислорода (АФК). Поэтому предполагается, что мтДНК в большей степени, чем ядерная ДНК, подвержена повреждающему воздействию АФК, способных приводить к возникновению мутаций. Также считается, что с возрастом происходит накопление соматических мутаций мтДНК, что тесно связано с процессом старения организма, а также различными митохондриальными заболеваниями (Larsson, 2010).

Традиционно в области исследования вопросов старения организма и возрастных заболеваний в качестве объектов изучения выступают модельные организмы, в частности различные линии лабораторных мышей и крыс (Bei Chen et al., 2010; Pak et al., 2005; Trifunovic et al., 2004). Для линии крыс Wistar, часто используемой в таких работах в качестве модели физиологического старения, нами было показано ранее, что общая частота соматических мутаций в контрольной области мтДНК увеличивается с возрастом в печени животных (Рощкая и др., 2009). Печень является органом, несущим высокую метаболическую нагрузку, отчасти, способным к регенерации. Кроме того, гепатоциты содержат высокое число митохондрий (Loud, 1968).

Больше возможностей для проявления накопившегося груза соматических мутаций мтДНК могут предоставить клетки центральной нервной системы, как пример постмитотической ткани с очень низкой способностью к делению, в то же время требующей высоких энергетических затрат. В частности нам был интересен гиппокамп, характеризующийся одним из наименьших показателей величины копийности мтДНК в головном мозге (Fuke et al., 2011).

Помимо контрольной области — наиболее высоко вариабельного участка (Excoffier et al., 1999) — молекула мтДНК млекопитающих содержит 13 белок-кодирующих генов. Мутации в белок-кодирующих генах мтДНК, меняющие аминокислоту в последовательности кодируемого ими полипептида (значимые), подвергаются воздействию естественного отбора. Он,

Поступила в редакцию 11.10.2012  
Принята к публикации 12.02.2013

в свою очередь, способен работать как в направлении накопления значимых мутаций, так и в сторону их элиминации (очищающий отбор). Очищающий отбор, в частности, был показан в популяционных исследованиях, оценивающих частоту различных мутаций для генов мтДНК, кодирующих белки цепи переноса электронов (Elson et al., 2004). Полиморфизм в гене цитохрома *b* (*cytb*), кодирующем полипептид комплекса III (убихинон-цитохром с-редуктазы) цепи переноса электронов, широко используется в филогенетических работах, а также в исследованиях митохондриальных болезней, поскольку некоторые мутации сопутствуют и, возможно, даже являются причиной ряда нейродегенеративных заболеваний (Irwin et al., 1991; Valnot et al., 1999). Однако на сегодняшний день закономерности накопления точечных мутаций в белок-кодирующих регионах мтДНК остаются неисследованными; в частности это касается клеток центральной нервной системы у млекопитающих.

В рамках данной работы нами были исследованы частота и характер распределения соматических мутаций в гене *cytb* мтДНК, а также направление естественного отбора, действующего на мутации в мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar. Полученные данные сопоставлены с результатами анализа мутационного спектра гена *cytb* у крыс вида *Rattus norvegicus*, к которому относится и линия Wistar, из природных популяций.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на трехмесячных крысах линии Wistar, содержащихся в стандартных условиях лаборатории разведения животных ИЦиГ СО РАН по несколько особей в клетке, со свободным доступом к воде и сбалансированному корму. Для забора биологического материала крыс декапитировали, гиппокамп быстро извлекали и помещали в жидкий азот, а затем на  $-72^{\circ}\text{C}$  до выделения ДНК. Тотальную ДНК гиппокампа выделяли с использованием набора Wizard<sup>®</sup> Plus SV Genomic DNA Purification System («Promega», США). Праймеры для амплификации кодирующего фрагмента мтДНК крысы были подобраны с помощью программы GeneRunner и проверены в базе данных BLAST на специфичность. Прямой праймер (5'-AAGCACCCCAATACATCCAC-3') соответствует участку 13927–13945, обратный праймер (5'-GCTAGTTGGCCAATAATGATAAA-3') — участку 15162–15184 мтДНК. Фрагмент, получаемый в результате сочетания праймеров, состоит из 1257 нуклеотидов и содержит гены, кодирующие *ND6* (13928–14049), *tRNA<sup>Glu</sup>* (14050–14118) и *cytb*, (14124–15184). Для проведения ПЦР была использована высокоточная полимеразы «HF2» («Clontech», США) с корректирующей субъединицей (Advantage<sup>™</sup> — HF2 PCR Kit). Ранее нами было показано, что используемая методология является адекватной и не вносит «эксперимен-

тального шума» в исследуемый процесс соматического мутагенеза (Рощая и др., 2009). Клонирование амплифицированных фрагментов мтДНК в Т-вектор проводили с использованием набора pGemR T-easy Vector Kit («Promega», США). Далее клетки штамма *E.coli* DH5α (*F' endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17* ( $r_K^- m_K^+$ ),  $\lambda^-$ ) трансформировали Т-вектором. Индивидуальные клоны, содержащие вектор со вставкой фрагмента мтДНК, отбирали с использованием бело-голубой селекции. Затем отобранные клоны наращивали в течение ночи при  $37^{\circ}$  в LB-среде (Миллер Д. Г., 1972). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System («Promega», США). Наличие вставки и мутации в них подтверждали секвенированием по Сенгеру. Секвенирование проводили на базе Центра коллективного пользования СО РАН «Геномика».

Полученные последовательности вставок сравнивали с последовательностью мтДНК крыс линии Wistar аннотированной в GenBank (код доступа AC\_000022.2). Сравнение полученных последовательностей и выявление замен нуклеотидов проводили с помощью программы MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet F., 1988). Для анализа использовали участок длиной 1061 нуклеотидов — от 14124 по 15184 нуклеотид мтДНК. Общая частота соматических мутаций в исследованном районе мтДНК подсчитывалась как отношение количества мутаций к длине фрагмента мтДНК, помноженной на число клонов.

Для сравнительного анализа спектров соматических мутаций гена *cytb* и наследуемых мутаций в этом гене мы использовали данные об изменчивости мтДНК, полученной из мышечной ткани, печени или почек, в природных популяциях крыс *R. norvegicus*. Проанализировано 72 последовательности гена *cytb*, представленные в GenBank под номерами GU592997-GU592954, HM031680-HM031676, DQ439844-DQ439839, HQ157799, FJ842279-FJ842269, EU349782, AB033713, AB355902, AB355903 (Bastos et al., 2011; Lin et al., 2012; Rowe et al., 2008; Serizawa et al., 2000; Truong et al., 2009). Реконструкция наследуемых мутаций в митохондриальной ДНК на основе популяционных данных является общепринятой процедурой для исследования спонтанных мутаций (Malyarchuk et al., 2002). Основное методическое отличие между выявлением соматических и наследуемых мутаций заключается в том, что для выявления соматических мутаций использован метод клонирования отдельных молекул мтДНК из внутриклеточного митохондриального пула отдельных животных и дальнейшего их секвенирования, а для выявления наследуемых мутаций, распространенных в природных популяциях, используется секвенирование препаратов мтДНК из разных животных, т. е. при этом внутрииндивидуальная гетерогенность (гетероплазмия) игнорируется.

Таблица 1

Частоты транзиций и транверсий в гене *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar

Транзиции	80,7 % от всех замен	Трансверсии	19,3 % от всех замен
A → G	0,318	A → C	0,004
T → C	0,212	T → G	0,025
G → A	0,140	A → T	0,058
C → T	0,137	T → A	0,045
		G → T	0,021
		C → A	0,031
		G → C	0,000
		C → G	0,009

Частоты переходов были нормализованы (Rotskaya et al., 2010) для того, чтобы учесть нуклеотидный состав исследуемой последовательности

Для исследования влияния отбора на соматические и наследуемые мутации необходимо знать число синонимических и несинонимических сайтов в исследуемой кодирующей последовательности. Оценка числа синонимических и несинонимических сайтов является одним из разделов теории молекулярной эволюции. Проблема заключается в том, что мутация в первой или третьей позиции в некоторых кодонах может приводить или не приводить к изменению кодируемой аминокислоты в зависимости от типа мутационного перехода. Для оценки числа синонимических и несинонимических сайтов разработаны различные теоретические модели, которые основываются на методе парсимонии или на вероятностных моделях (Jordan et al., 2002; Tamura et al., 2011). В данной работе для подсчета числа синонимических и несинонимических сайтов мы использовали вероятностные модели из пакета программ филогенетического анализа MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). Кроме этих теоретических оценок, для оценки числа синонимических и несинонимических сайтов в гене *cytb*, соматические мутации в этом гене распределялись случайным образом (с учетом типа мутационного перехода для каждой мутации) по последовательности (Rogozin et al., 1991). Число синонимических и несинонимических сайтов оценивалось на основе 10 000 случайно сгенерированных выборок мутаций.

Частоту синонимических мутаций (dS) определяли как отношение числа синонимических замен к числу синонимических сайтов. Таким образом, dS отражает частоту нуклеотидных замен, не изменяющих аминокислоту (они возникают, как правило, в третьей позиции кодона). Частоту несинонимических мутаций (dN) определяли как отношение числа несинонимических замен к числу несинонимических сайтов. Поэтому dN учитывает частоту нуклеотидных замен, изменяющих аминокислоту. Отношение dN/dS отражает частоту замены аминокислоты, нормализованную на количество нейтральных замен, и указывает на направление и силу отбора (dN/dS ~ 1 указывает на отсутствие отбора). Различия между dN и dS тестировали с помощью bootstrap-метода, основываясь на сравнении 1000 случайно сгенерирован-

ных выборок мутаций. Для реализации данного подхода использовали Z-тест различий между показателями dN и dS (пакет программ MEGA 5.05). Кроме этого, сравнение числа синонимических и несинонимических сайтов, оцененных методом случайного распределения мутаций (Rogozin et al., 1991), и числа синонимических и несинонимических мутаций проводился с помощью критерия Фишера. Результаты, полученные этими двумя методами, не имеют значимых отличий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были идентифицированы и исследованы соматические мутации в гене *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar (район с 14124 по 15184 нуклеотид). Всего было проанализировано 56 клонов, содержащих плазмиду с инсерцией исследуемого фрагмента мтДНК, и определена нуклеотидная последовательность вставок. Общая частота нуклеотидных замен в гене *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar составляет  $1,34 \cdot 10^{-3}$  замен на основание и согласуется с полученной ранее частотой в контрольном регионе мтДНК для печени животных (Рощкая и др., 2009; Rotskaya et al., 2010).

Основной класс нуклеотидных замен представлен транзициями — они составляют 80,7 % (табл. 1, рис. 1). При этом наибольшая частота замен наблюдается в А Т парах (53 %). Согласно литературным данным, подобный характер распределения мутаций, а именно преобладание транзиций над трансверсиями, наблюдается при работе митохондриальной ДНК-полимеразы  $\gamma$  (Zheng et al., 2006).

Направление, а также сила естественного отбора, действующего на ген, могут быть определены путем сравнения частот синонимических и несинонимических замен (Jordan et al., 2002). С помощью метода случайного распределения мутаций, учитывающего отличия в частотах мутационных переходов (табл. 1), нами было определено число синонимических и несинонимических сайтов в гене *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar. Оцененные частоты синонимических (dS) и несиноними-

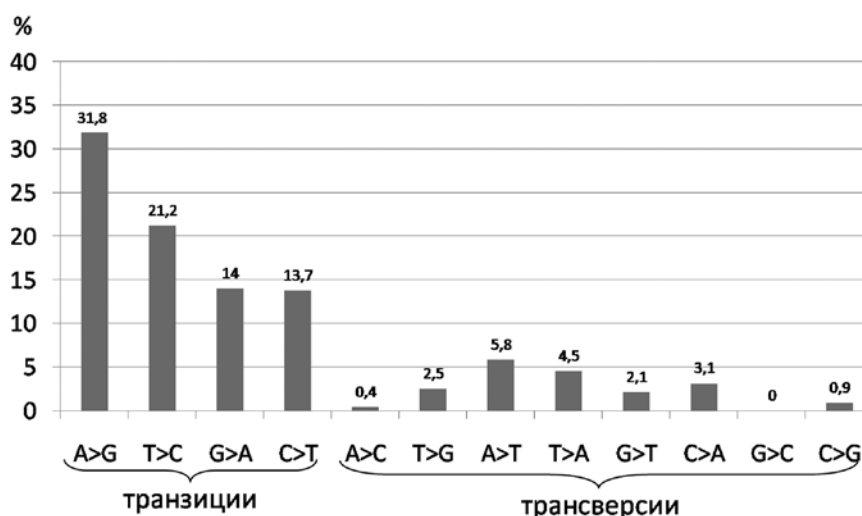


Рис. 1. Спектр нуклеотидных замен в гене *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar

ческих (dN) мутаций приведены в таблице 2. Полученное отношение dN/dS составляет 0,986 (нет значимого отличия от 1 по критерию Фишера), что свидетельствует об отсутствии селекции мутаций в гене *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar.

Между тем известно, что особенностью эволюции мтДНК животных (рыб, птиц, млекопитающих) являются весьма низкие величины соотношений dN/dS, что свидетельствует о влиянии очищающего отбора, который не благоприятствует заменам аминокислот из-за высокой функциональной значимости белков, кодируемых митохондриальным геномом (Shen et al., 2009; Soares et al., 2009; Sun et al., 2011; Youle and van der Blik, 2012). Кроме этого, считается, что чем выше энергетические потребности у видов животных, тем меньше значения dN/dS в генах мтДНК, и, соответственно, накоплению несинонимических замен в митохондриальных геномах также может способствовать уменьшение скорости метаболизма (Bjornerfeldt et al., 2006; Sun et al., 2011).

Однако следует отметить, что выводы о влиянии очищающего отбора на митохондриальный геном следуют из результатов анализа изменчивости мтДНК в природных популяциях животных. При этом выявляемый полиморфизм отражает отличия между гаплотипами мтДНК отдельных индивидуумов. Внутрииндивидуальная изменчивость мтДНК может быть выявлена только при наличии гетероплазмии, однако при использовании метода прямого секвенирования ДНК по Сэнгеру (без клонирования отдельных продуктов ПЦР) случаи гете-

роплазмии регистрируются очень редко, поскольку все минорные варианты полиморфизма остаются незамеченными на фореграммах. Поэтому оценки dN/dS для популяционных данных основаны на сравнении индивидуальных гаплотипов мтДНК, каждый из которых представляет собой «мажорный» гаплотип. С помощью клонирования продуктов ПЦР, как это предпринято в настоящей работе, можно оценить внутриклеточное разнообразие мутаций мтДНК. В данном случае это тоже будет результат исследования популяции, но не отдельных индивидуумов, а отдельных молекул внутриклеточного митохондриального пула. Следует отметить, что работ по выявлению соматических мутаций мтДНК с использованием клонирования или с помощью технологий геномного секвенирования (так называемого секвенирования следующего поколения) пока очень мало, и в основном они проводились для изучения мутационных спектров мтДНК раковых опухолей (например, He et al., 2010). Как правило, поиск патологических мутаций проводится при сравнении спектров соматических мутаций в опухолях и в соседних неповрежденных тканях со спектрами наследуемых мутаций, выявляемых в природных популяциях. Причем, считается, что последние являются неким эталонным мутационным процессом, так как были унаследованы по материнской линии и прошли через все стадии естественного отбора.

Сопоставление мутационных спектров гена *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar и природных популяций крыс вида *R. norvegicus* показало, что спектры

Таблица 2

**Частоты синонимических и несинонимических мутаций в гене *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar**

Число несинонимических сайтов (N) 714	Число синонимических сайтов (S) 345
Наблюдаемое число несинонимических мутаций (n) 98	Наблюдаемое число синонимических мутаций (s) 48
<b>dN = 0.137</b>	<b>dS = 0.139</b>

Таблица 3

Частоты нуклеотидных замен и точечных делеций в гене *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar и в природных популяциях крыс *R. norvegicus*

Нуклеотидные замены	Частота замен мтДНК	
	в клетках гиппокампа	в природных популяциях крыс
Транзиции	75,14	82,75
A → G	13,28	10,26
T → C	16,69	24,89
C → T	14,28	22,60
G → A	30,89	25,0
Трансверсии	24,86	17,25
A → T	3,29	2,35
A → C	3,84	2,59
T → A	3,71	2,6
T → G	1,59	1,07
C → A	3,71	2,6
C → G	1,59	1,07
G → T	3,29	2,35
G → C	3,84	2,59
Делеции нуклеотидов	7,5	0
Сдвиги рамок считывания	7,5	0
Стоп-кодоны	1,25	0
dN < dS (Z-тест селекции)	P = 0,15 (dS-dN = 1,05)	P = 0 (dS-dN = 6,95)

*Примечание.* В таблице приведены ML-оценки частот нуклеотидных замен (в процентах), полученные с помощью модели Таму-га-Неи (1993) с учетом нуклеотидного состава гена *cytb*, а также филогении нуклеотидных последовательностей (пакет программ MEGA 5.05).

мутаций существенно различаются (табл. 3). В спектре соматических мутаций наблюдается больше трансверсий; около 10 % мутаций приводят к появлению стоп-кодонов и к сдвигам рамок считывания, что, в свою очередь, приводит к преждевременной терминации синтеза белка. Еще одно важнейшее отличие — это отсутствие влияния очищающего отбора в спектре соматических мутаций гена *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar, в то время как для наследуемых мутаций, выявленных в природных популяциях крысы, воздействие очищающего отбора подтверждается на высоко достоверном уровне (табл. 3).

Следует отметить, что в недавнем исследовании изменчивости митохондриальных геномов в популяциях человека с помощью технологии секвенирования следующего поколения было выявлено большое количество нуклеотидных позиций, характеризующихся гетероплазмией. Анализ показал, что мутационный спектр гетероплазмий отличается от спектра наследуемых мутаций, реконструированного на основании данных об изменчивости мтДНК в популяциях человека, выраженным избытком несинонимичных замен, что приводит к ослаблению очищающего отбора (Li et al., 2010). Таким образом, это исследование показало, что широко распространенное мнение о влиянии на митохондриальный геном очищающего отбора следует, на самом деле, из результатов

анализа лишь «мажорной» фракции гаплотипов, представленной наследуемыми вариантами полиморфизма. Если же учесть все разнообразие мутаций, сопутствующих «мажорным» гаплотипам мтДНК, то статистическая значимость очищающего отбора может существенно понизиться. Вероятно, для подтверждения идеи о воздействии очищающего отбора на митохондриальный геном необходимо исследовать спектры мутаций, возникающих в генеративных тканях на разных стадиях оогенеза и эмбриогенеза. Это позволит понять, насколько гомогенна популяция молекул ДНК в митохондриях яйцеклеток при оплодотворении и какова дальнейшая динамика силы отбора в ходе эмбриогенеза.

В системной биологии за последние 15 лет одним из самых интересных результатов является открытие отрицательной корреляция между скоростью эволюции белков и уровнем экспрессии генов. Такая корреляция устойчиво наблюдается в различных организмах (Pal et al., 2001; Krylov et al., 2003), однако ее природа остается предметом оживленных дискуссий (Krylov et al., 2003; Managadze et al., 2011). В последнее время широко распространение получила гипотеза о том, что ошибки трансляции с последующими ошибками укладки белков являются основным универсальным ограничителем скорости эволюции белков, так как приводят к преждевременной гибели клетки — гипотеза Драммонда–Вил-

ке (Drummond and Wilke, 2008; Drummond and Wilke, 2009). По мнению авторов, гидрофобные остатки, в норме расположенные внутри белка, взаимодействуя друг с другом, приводят к агрегации ошибочно свернутых белков между собой. Давление отбора, направленное на уменьшение «платы» за ошибочный синтез и сворачивание белков, будет сильнее действовать на гены с высоким уровнем экспрессии, а также на гены, экспрессирующиеся в нервной ткани. Это может объяснить наблюдаемую отрицательную корреляцию между скоростью эволюции белков и уровнем экспрессии генов (Pal et al., 2001; Krylov et al., 2003).

Ранее рядом исследователей предпринимались попытки проверить эту гипотезу (Cherry, 2010; Plata et al., 2010; Managadze et al., 2011), однако в силу ряда методических причин не удалось осуществить строгую проверку на больших объемах данных. Мы провели исследование мутационных спектров гена *cytb* мтДНК гиппокампа крыс линии Wistar и в природных популяциях крыс *R. norvegicus*. При анализе наследуемых мутаций гена *cytb* в природных популяциях крыс наблюдается сильный очищающий отбор. Это свидетельствует о том, что «вредные» мутации (например, большинство несинонимических замен и делеции отдельных нуклеотидов), которые возникают в различных тканях животных (включая, возможно, и генеративные), не наследуются в природных популяциях. Такой результат ожидаем и наблюдался ранее как при межвидовых, так и при внутривидовых исследованиях разнообразия замен в генах митохондрий (Shen et al., 2009; Soares et al., 2009; Sun et al., 2011; Youle and van der Bliek, 2012). Однако это наблюдение не может поддержать или опровергнуть гипотезу Драммонда–Вилке, поскольку, как обсуждалось выше, мы не знаем закономерностей и механизмов фиксации мутаций в мтДНК в популяциях млекопитающих.

Необходимо подчеркнуть, что для проверки гипотезы Драммонда–Вилке именно соматические мутации в митохондриях являются идеальным инструментом. Гены митохондрий встречаются в достаточно высоком числе копий в соматических тканях, которые, в свою очередь, несут от нескольких десятков до нескольких тысяч митохондрий на клетку. А значит, повреждающие мутации не могут приводить к полной потере продукта определенного гена. Вместе с тем, так как количество поврежденных белков в клетке довольно значительно и ошибочная сборка этих белков должна приводить к нарушениям работы белковых комплексов (в соответствии с гипотезой Драммонда–Вилке), то такие мутации должны элиминироваться. На уровне нуклеотидных последовательностей такого рода процессы выражаются в сильном очищающем отборе ( $dN/dS \ll 1$ ). Однако выявленное нами с помощью разных подходов (табл. 2 и 3) отсутствие выраженного очищающего отбора ( $dN/dS \sim 1$ ) в исследованном кодирующем районе мтДНК не подтверждает гипотезу Драммонда–Вилке о сильном очищающем

отборе, элиминирующем ошибки, возникающие в процессе синтеза белков. Этот результат в значительной степени ставит под сомнение реалистичность гипотезы Драммонда–Вилке.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12–04–01495-а и междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 59. Работа ИБР частично поддерживалась Национальными институтами здоровья США.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Bastos A.D., Nair D., Taylor P.J.* et al., 2011 Genetic monitoring detects an overlooked cryptic species and reveals the diversity and distribution of three invasive *Rattus* congeners in south Africa // BMC Genet. Vol. 12. P. 26.
2. *Bjornerfeldt S., Webster M.T., Vila C.*, 2006. Relaxation of selective constraint on dog mitochondrial DNA following domestication // Genome Res. Vol. 16. P. 990–994.
3. *Cherry J.L.*, 2010. Expression level, evolutionary rate, and the cost of expression // Genome Biol Evol. Vol. 2. P. 757–769.
4. *Corpet F.*, 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering // Nucleic Acids Res. Vol. 16. P. 10881–10890.
5. *Detmer S.A., Chan D.C.*, 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Vol. 8. P. 870–879.
6. *Drummond, D.A., Wilke C.O.*, 2008. Mistranslation-induced protein misfolding as a dominant constraint on coding-sequence evolution // Cell. Vol. 134. P. 341–352.
7. *Drummond, D.A., Wilke C.O.*, 2009. The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis // Nat. Rev. Genet. Vol. 10. P. 715–724.
8. *Elson J.L., Turnbull D.M., Howell N.*, 2004. Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: Assessing the effects of selection // Am. J. Hum. Genet. Vol. 74. P. 239–248.
9. *Excoffier L., Yang Z.*, 1999. Substitution rate variation among sites in mitochondrial hypervariable region I of humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. Vol. 16. P. 1357–1368.
10. *Fuke S., Kubota-Sakashita M., Kasahara T.* et al., 2011. Regional variation in mitochondrial DNA copy number in mouse brain // Biochim Biophys Acta. Vol. 1807. P. 270–274.
11. *He Y., Wu J., Dressman D.C.* et al., 2010. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells // Nature. Vol. 464. P. 610–614.
12. *Hoppins S., Lackner L., Nunnari J.*, 2007. The machines that divide and fuse mitochondria // Annu. Rev. Biochem. Vol. 76. P. 751–780.

13. Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals // *J. Mol. Evol.* Vol. 32. P. 128–44.
14. Jordan I.K., Rogozin I.B., Wolf Y.I., Koonin E.V., 2002. Microevolutionary genomics of bacteria // *Theoretical Population Biology.* Vol. 61. P. 435–447.
15. Krylov D.M., Wolf Y.I., Rogozin I.B., Koonin E.V., 2003. Gene loss, protein sequence divergence, gene dispensability, expression level, and interactivity are correlated in eukaryotic evolution // *Genome Res.* Vol. 13. P. 2229–2235.
16. Larsson N.-G., 2010. Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging // *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 79. P. 683–706.
17. Li M., Schonberg A., Schaefer M. et al., 2010. Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes // *Am. J. Hum. Genet.* Vol. 87. P. 237–249.
18. Lin X.D., Guo W.P., Wang W. et al., 2012. Migration of Norway rats resulted in the worldwide distribution of Seoul hantavirus today // *J. Virol.* Vol. 86. P. 972–981.
19. Loud A.V., 1968. A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells // *J. Cell. Biol.* Vol. 37. P. 27–46.
20. Malyarchuk B.A., Rogozin I.B., Berikov V.B. et al., 2002. Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region // *Hum Genet.* Vol. 111, P. 46–53.
21. Managadze D., Rogozin I.B., Chernikova D. et al., 2011. Negative correlation between expression level and evolutionary rate of long intergenic noncoding RNAs // *Genome Biol. Evol.* Vol. 3. P. 1390–1404.
22. Pak J.W., Vang F., Johnson C. et al., 2005. MtDNA point mutations are associated with deletion mutations in aged rat // *Experimental Gerontology.* Vol. 40. P. 209–218.
23. Pal C., Papp B., Hurst L.D., 2001. Highly expressed genes in yeast evolve slowly // *Genetics.* Vol. 158. P. 927–931.
24. Plata G., Gottesman M.E., Vitkup D., 2010. The rate of the molecular clock and the cost of gratuitous protein synthesis // *Genome Biol.* Vol. 11. P. 98.
25. Rogozin I.B., Solovyov V.V., Kolchanov N.A., 1991. Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. I. Correlation between somatic mutations and repeats. Somatic mutation properties and clonal selection. // *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1089. P. 175–182.
26. Rotskaya U.N., Rogozin I.B., Vasyunina E.A., et al., 2010. High frequency of somatic mutations in rat liver mitochondrial DNA // *Mutat. Res.* Vol. 685. P. 97–102.
27. Rowe K.C., Reno M.L., Richmond D.M. et al. 2008. Pliocene colonization and adaptive radiations in Australia and New Guinea (Sahul): multilocus systematics of the old endemic rodents (Muroidea: Murinae) // *Mol. Phylogenet. Evol.* Vol. 47. P. 84–101.
28. Serizawa K., Suzuki H., Tsuchiya K., 2000. A phylogenetic view on species radiation in Apodemus inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes // *Biochem. Genet.* Vol. 38. P. 27–40.
29. Shen Y.Y., Shi P., Sun Y.B., Zhang Y.P., 2009. Relaxation of selective constraints on avian mitochondrial DNA following the degeneration of flight ability // *Genome Res.* Vol. 19. P. 1760–1765.
30. Soares P., Ermini L., Thomson N. et al., 2009. Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock // *Am. J. Hum. Genet.* Vol. 84. P. 740–759.
31. Spelbrink J.N., 2010. Functional Organization of Mammalian Mitochondrial DNA in Nucleoids: History, Recent Developments, and Future Challenges // *IUBMB Life.* Vol. 62. P. 19–32.
32. Sun Y.B., Shen Y.Y., Irwin D.M., Zhang Y.P., 2011. Evaluating the roles of energetic functional constraints on teleost mitochondrial-encoded protein evolution // *Mol. Biol. Evol.* Vol. 28. P. 39–44.
33. Tamura K., Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Mol. Biol. Evol.* Vol. 10. P. 512–526.
34. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Mol. Biol. Evol.* Vol. 28. P. 2731–2739.
35. Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M. et al., 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase // *Nature.* Vol. 429. P. 417–423.
36. Truong T.T., Yoshimatsu K., Araki K. et al., 2009. Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in northern Vietnam // *J. Vet. Med. Sci.* Vol. 71. P. 1357–1363.
37. Tuppen A.L., Blakely E.L., Turnbull D.M. et al., 2010. Mitochondrial DNA mutations and human disease // *Biochimica et Biophysica Acta.* Vol. 1797. P. 113–128.
38. Valnot I., Kassis J., Chretien D. et al., 1999. A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency // *Hum Genet.* Vol. 104. P. 460–466.
39. Youle R.J., van der Bliek A.M., 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress // *Science.* Vol. 337. P. 1062–1065.
40. Zheng W., Khrapko K., Coller H.A. et al., 2006. Origins of human mitochondrial point mutations as DNA polymerase  $\gamma$ -mediated errors // *Mutat. Res.* Vol. 599. P. 11–20.
41. Миллер Д.Г., 1972. Эксперименты в молекулярной генетике / под. ред. Алиханяна С.И. Москва: Мир. 395 с.

42. Роцкая У.Н., Rogozin И.Б., Васюнина Е.А. и др., 2009. Анализ спектров соматических мутаций митохондриальной ДНК крыс линий Wistar и OXYS // Биохимия, Т. 74. С. 532–541.

#### ASSOCIATION OF VITAMIN D RECEPTOR GENE WITH ANTHROPOMETRIC MEASURES IN KOMI ETHNIC GROUP

Loshchenova P.S., Rogozin I.B., Rotskaya U.N., Malyarchuk B.A., Nevinsky G.A., Sinitsyna O.I.

✿ **SUMMARY:** One of the most interesting findings in Systems biology is the discovery of negative correlation between gene expression levels and evolutionary rates of genes. Biological explanations of this correlation are still debated. Recently the hypothesis of Drummond and Wilke became increasingly popular. The hypothesis suggests that errors of translation

with subsequent misfolding of proteins are the universal factor limiting the rate of protein evolution because this misfolding causes premature cell death. The mitochondrial somatic mutations are the promising tool to examine this hypothesis: damaging mutations in a gene cannot cause the complete lack of the corresponding protein product because animal mitochondria contain many copies of chromosomes (5–15 copies per mitochondria) in somatic tissues. We analyzed somatic mutations in the mitochondrial *cytb* gene from hippocampus of Wistar rats. We did not find any indication of purifying selection in the *cytb* gene. Absence of selection does not support the Drummond-Wilke hypothesis which postulates strong purifying selection eliminating errors that cause protein misfolding. This result questions applicability of the Drummond-Wilke hypothesis to mitochondrial proteins.

✿ **KEY WORDS:** mitochondrial DNA; cytochrome b; nucleotide substitution; purifying selection; hippocampus; Wistar rats.

#### ✿ Информация об авторах

**Лощенова Полина Сергеевна** — инженер I категории. Сектор мутагенеза и репарации. Институт цитологии и генетики СО РАН. 630090, Новосибирск, Лаврентьева пр-т, д. 10. E-mail: polilos@bionet.nsc.ru.

**Рогозин Игорь Борисович** — к.б.н., старший научный сотрудник. Сектор мутагенеза и репарации. Институт цитологии и генетики СО РАН. 630090, Новосибирск, Лаврентьева пр-т, д. 10. E-mail: rogozin@bionet.nsc.ru.

**Роцкая Ульяна Николаевна** — младший научный сотрудник. Сектор мутагенеза и репарации. Институт цитологии и генетики СО РАН. 630090, Новосибирск, Лаврентьева пр-т, д. 10. E-mail: uyanar@mail.ru.

**Малярчук Борис Аркадьевич** — д.б.н., заведующий лабораторией. Лаборатория генетики. Институт Биологических проблем Севера, Дальневосточное отделение РАН. 685000, Магадан, Портовая ул., д. 18. E-mail: malyar@ibpn.ru.

**Невинский Георгий Александрович** — д.х.н., заведующий лабораторией. Лаборатория ферментов репарации. Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. 630090, Новосибирск, Лаврентьева пр-т, д. 8. E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru.

**Синицына Ольга Ивановна** — к.б.н., заведующая сектором. Сектор мутагенеза и репарации. Институт цитологии и генетики СО РАН. 630090, Новосибирск, Лаврентьева пр-т, д. 10. E-mail: sinitsyna@bionet.nsc.ru.

**Loshchenova Polina Sergeyevna** — engineer. Sector of mutagenesis and repair. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences. 630090, Novosibirsk, Lavrentyeva prospect, 10. Russia. E-mail: polilos@bionet.nsc.ru.

**Rogozin Igor Borisovich** — senior research scientist, Ph.D. Sector of mutagenesis and repair. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences. 630090, Novosibirsk, Lavrentyeva prospect, 10. Russia. E-mail: rogozin@bionet.nsc.ru.

**Rotskaya Uliana Nicolayevna** — researcher. Sector of mutagenesis and repair. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences. 630090, Novosibirsk, Lavrentyeva prospect, 10. Russia. uyanar@mail.ru.

**Malyarchuk Boris Arkadievich** — Ph.D. Laboratory of Genetics. Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Division of the Russian Academy of Sciences. 685000, Magadan, Portovaya St., 18. Russia. malyar@ibpn.ru.

**Nevinskiy Georgiy Aleksandrovich** — Head of Laboratory, Ph.D. Laboratory of Repair Enzymes. Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences. 630090, Novosibirsk, Lavrentyeva prospect, 8. Russia. E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru.

**Sinitsyna Olga Ivanovna** — Head of Sector, Ph.D.. Sector of mutagenesis and repair. Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences. 630090, Novosibirsk, Lavrentyeva prospect, 10. Russia. E-mail: sinitsyna@bionet.nsc.ru.