

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.174:599

АДАПТИВНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА *НОМО*

© 2011 г. Б. А. Мальярчук*

Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Магадан, 685000

Поступила в редакцию 12.01.2011 г.

Принята к печати 18.03.2011 г.

Изучена адаптивная эволюция 12 белкокодирующих генов митохондриального генома у представителей рода *Homo* (человека алтайского (*H. sp. Altai*), неандертальцев (*H. neanderthalensis*) и современного человека (*H. sapiens*)). Анализировали характер изменений физико-химических свойств аминокислотных замен в процессе эволюции приматов. У человека молекулярная адаптация (направленный отбор) проявляется в виде 12 радикальных мутаций, ведущих к достоверным изменениям ($P < 0.001$) физико-химических свойств аминокислот, что могло бы иметь функциональные последствия. Эти замены произошли как на стадии общего предка человека (в генах *CO2* и *CytB*), так и позже, при отделении общего предка неандертальцев и современных людей (в генах *CO1* и *ND5*). Радикальные замены найдены, главным образом, в белках цитохром-*c*-оксидазного комплекса IV и комплекса III цитохрома *bc1*, что коррелирует с выявленной ранее тенденцией увеличения скорости несинонимичных замен в генах митохондриальных субъединиц белков комплексов III и IV у антропоидных приматов.

Ключевые слова: митохондриальный геном, молекулярная эволюция, человек, неандерталец, радикальные замены аминокислот.

ADAPTIVE EVOLUTION OF THE *HOMO* MITOCHONDRIAL GENOME, by B. A. Malyarchuk* (Institute of Biological Problems of the North, Far-Eastern Division, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia; *e-mail: malyarchuk@ibpn.ru). Adaptive evolution of 12 protein-coding mitochondrial genes in members of genus *Homo* (Denisova hominin (*H. sp. Altai*), Neandertals (*H. neanderthalensis*) and modern humans (*H. sapiens*)) has been evaluated by assessing the pattern of changes in the physicochemical properties of amino acid replacements during the primate evolution. It has been found that in the *Homo* molecular adaptation (positive destabilizing selection) become apparent in the form of 12 radical amino acid replacements accompanied by statistically significant ($P < 0.001$) changes of physicochemical properties that probably had the functional consequences. These replacements have occurred on the stage of a common ancestor of the *Homo* (in *CO2* and *CytB* genes) as well as with the appearance of the common ancestor of Neandertals and modern humans (in *CO1* and *ND5* genes). Radical amino acid replacements were mainly revealed in the cytochrome *c* oxidase complex IV and cytochrome *bc1* complex III, thus coinciding with general trend of increasing of non-synonymous changes in mtDNA genes coding subunits of complexes III and IV proteins in anthropoid primates.

Keywords: mitochondrial genome, molecular evolution, humans, neandertals, radical amino acid changes.

Митохондриальный геном животных и человека представлен кольцевыми молекулами ДНК небольшого размера (например, 16 569 п.н. у человека), в состав которого включены гены, кодирующие две рРНК, 22 тРНК и 13 субъединиц белков дыхательной цепи [1]. Основные функциональные элементы, необходимые для регуляции экспрессии мтДНК, сосредоточены в главной не кодирующей области [2]. Прогресс в методологии секвенирования ДНК привел к тому, что, вслед за стремительным увеличением объемов баз данных об изменчивости полногеномных последовательностей мтДНК в популяциях человека, растет

число “древних” митохондриальных геномов, секвенированных из останков вымерших представителей рода *Homo* — неандертальцев [3, 4] и алтайского человека [5].

Данные об изменчивости мтДНК широко используются в филогеографических исследованиях, хотя, по-прежнему, мало внимания уделяется проблеме молекулярной адаптации белков, кодируемых митохондриальным геномом. Между тем, подобного рода исследования очень актуальны, так как митохондрии — это не только “энергетические станции” клетки; они ответственны также за регуляцию процессов воспроизводства клеток и апоптоза, влияя тем самым на продолжитель-

* Эл. почта: malyarchuk@ibpn.ru

ность жизни [6]. Митохондриальные белки участвуют в функционировании четырех из пяти комплексов окислительного фосфорилирования митохондрий. Это семь субъединиц NADH-дегидрогеназного комплекса I (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 и 6), одна субъединица (цитохром *b*) комплекса III цитохрома *bc1*, три субъединицы цитохром-*c*-оксидазного комплекса IV (CO1, 2 и 3) и две субъединицы АТРазного комплекса V (АТР6 и 8) [7]. Видимо, вследствие их функциональной важности гены, кодирующие компоненты митохондриальной электронно-транспортной цепи, являются эволюционно консервативными. Однако у тех или иных организмов обнаруживается повышение скорости несинонимичной эволюции митохондриальных белков, и это всегда привлекает внимание, поскольку может быть связано с адаптацией видов к различного рода изменениям внешней среды (климатическим, типа питания, среды обитания и т.д.). Ранее было показано, что митохондриальные гены настоящих (антропоидных) приматов – группы, которая наряду со многими вымершими формами объединяет современных узконосых и широконосых обезьян и человека, изменялись под воздействием положительного отбора [8, 9]. Наибольшее увеличение скорости несинонимичных замен выявлено в генах, кодирующих митохондриальные субъединицы комплексов III и IV [8]. Возможно, эти молекулярные изменения маркируют какие-то важные этапы становления антропоидных приматов, как, например, этап увеличения коры больших полушарий головного мозга [8, 9].

Сравнительный анализ адаптивных изменений митохондриального генома у представителей рода *Homo* – современного человека, неандертальца и алтайского человека, ранее не проводился; настоящая работа посвящена исследованию этого вопроса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

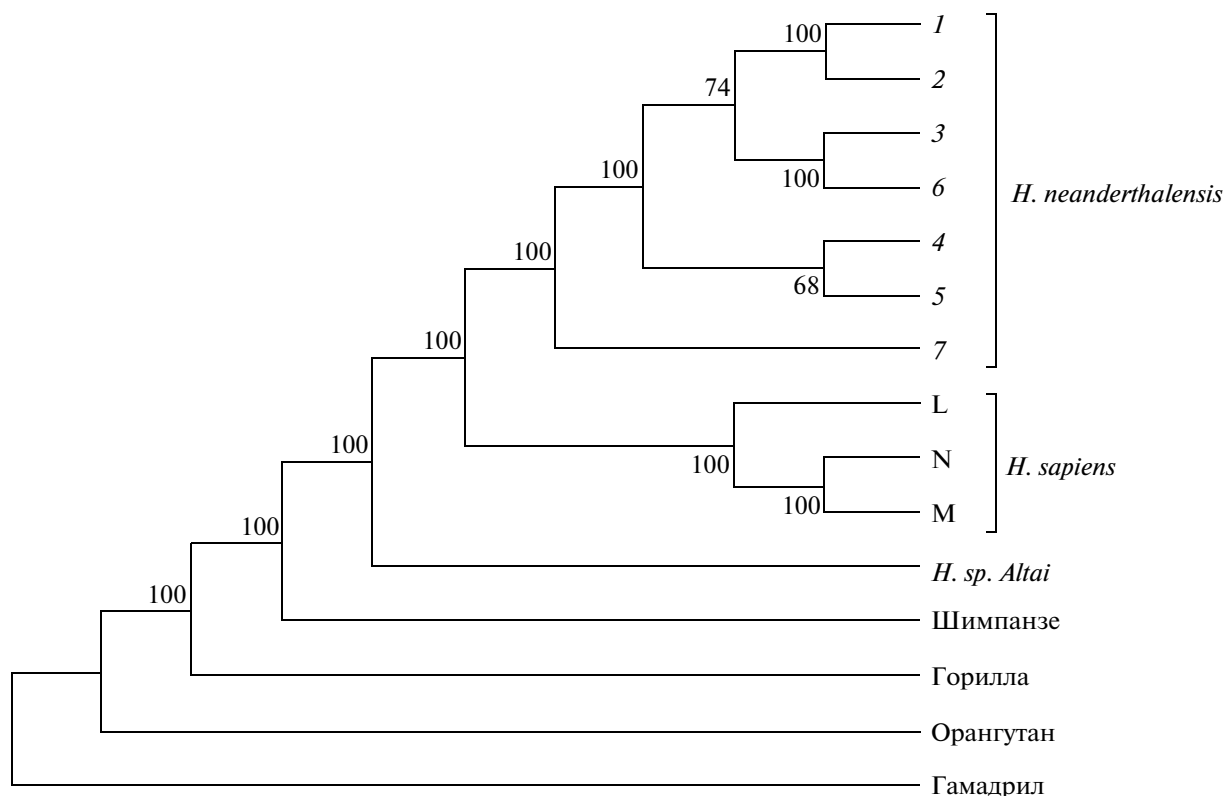
Для филогенетического анализа использовали полноразмерные молекулы мтДНК гоминид: семи неандертальцев (последовательности находятся в базе данных GenBank под номерами AM948965, NC_011137, FM865407-FM865411) [3, 4], трех современных людей (EU200764, EF153807, FJ951564) [10, 11], человека алтайского (*H. sp. Altai*; NC_013993) [5], шимпанзе (X93335) [12], гориллы (NC_001645) [13] и орангутана (NC_001646) [13]. В качестве внешней группы использовали митохондриальный геном гамадрила (NC_001992) [14] – представителя мартышковых обезьян. Мутации учитывали относительно L-цепи кембриджской референтной мтДНК человека [15]. Филогенетический анализ (пакет филогенетических программ MEGA4 [16]) проводили с помощью алгоритма NJ (Neighbour-Joining, метод ближайшего

соседа) на основе *p*-дистанций между полными последовательностями мтДНК.

Для изучения адаптивных изменений митохондриальных генов анализировали, изменяется ли характер физико-химических свойств аминокислот, замещаемых в ходе эволюции. При этом опирались на топологию филогенетического дерева, используя программу TreeSAAP 3.2 [17], алгоритм которой позволяет определить, коррелирует ли наблюдаемое распределение изменений физико-химических свойств аминокислот (всего анализируется 31 свойство) в филогенетическом дереве мтДНК и ожидаемое распределение, которое основано на предположении о случайном характере аминокислотных замен в условиях селективной нейтральности. Использование χ -теста позволяет оценивать значимость аминокислотных замен в восьми категориях значимости, а также определять тип отбора. В соответствии с моделью, используемой в программе TreeSAAP 3.2, считается, что, если положительный отбор обнаруживается в наиболее радикальных категориях 6, 7 и 8 (при $p < 0.001$), то свойства аминокислот изменились под влиянием направленного отбора [18]. Такой отбор соответствует наиболее радикальным аминокислотным заменам, и поэтому предполагается, что их обнаружение может рассматриваться как свидетельство молекулярной адаптации. Можно полагать, что радикальные замены, поддерживаемые такого рода отбором, изменяют структуру и функции белков в определенном направлении и поэтому обеспечивают лучшую адаптацию всего организма.

Для изучения наиболее радикальных изменений в структуре митохондриальных белков человека и неандертальца в настоящей работе (по аналогии с недавно опубликованной работой по изучению адаптивной эволюции митохондриальных геномов млекопитающих [19]) учитывали только аминокислотные замены, соответствующие категориям 7 и 8 (при $p < 0.001$). Каждый белкокодирующий ген анализировали отдельно.

Влияние естественного отбора на характер межвидовой дивергенции выявляли с помощью статистического теста Макдональда–Крейтмана (McDonald, Kreitman, 1991) (пакет программ DnaSP 5.0 [20]). В соответствии с нулевой гипотезой ожидается, что все несинонимичные замены являются нейтральными, и тогда индекс нейтральности (NI), определяемый соотношением внутривидовых несинонимичных и синонимичных замен (P_A/P_S) к соотношению межвидовых несинонимичных и синонимичных (D_A/D_S), должен быть равен 1. Когда $NI > 1$, то предполагается действие отрицательного отбора вследствие преобладания внутривидового полиморфизма, а когда $NI < 1$ – действие положительного отбора



Филогенетическое дерево полноразмерных молекул мтДНК приматов, построенное на основе p -расстояний с помощью алгоритма NJ. Обозначения и номера в GenBank: 1 – неандерталец AM948965, 2 – неандерталец NC_011137, 3 – неандерталец FM865407, 4 – неандерталец FM865408, 5 – неандерталец FM865409, 6 – неандерталец FM865410, 7 – неандерталец FM865411. L – современный человек EU200764; M – современный человек FJ951564; N – современный человек EF153807; *H. sp. Altai* – алтайский человек NC_013993; шимпанзе X93335; горилла NC_001645; орангутан NC_001646; гамадрил NC_001992. На ветвях приводятся значения бутстрэп-индексов (в %).

вследствие преобладания межвидовой дивергенции над внутривидовым полиморфизмом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов приматов свидетельствуют о том, что из неандертальских линий наиболее древняя – кавказская, представленная митохондриальным геномом FM865411 (Мезмайская-1 [4]) (рисунок). Линия алтайского человека ответвляется от ствола *Homo* раньше, чем линии неандертальцев и современных людей. Филогения макрогрупп мтДНК человека также воспроизвелась правильно и соответствует современным представлениям: более древней является африканская макрогруппа L, от которой отходят сформировавшиеся в Евразии макрогруппы N и M [21]. Эта топология филогенетического дерева согласуется с приведенной ранее [3–5], и поэтому она была использована при дальнейшем анализе изменений физико-химических свойств аминокислот в ходе эволюции. Поскольку все разнообразие митохондриального генофонда человечества сводится лишь к трем предкам,

давшим начало макрогруппам L, N и M, то мы анализировали соответственно только три митохондриальных генома современного человека.

Адаптивную эволюцию генов исследуют, главным образом, с помощью статистических тестов, по которым можно оценивать различия между количеством несинонимичных и синонимичных замен, произошедших соответственно в несинонимичных и синонимичных сайтах. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей белоккодирующих генов у современных людей и неандертальцев, полученные с помощью теста Макдональда–Крейтмана [20], показали, что отбор не влияет на внутривидовой полиморфизм и межвидовую дивергенцию у представителей *Homo* (табл. 1). Эти данные, в целом, согласуются с результатами более раннего исследования [3], за исключением результатов по гену *CO2*, межвидовая дивергенция которого имеет, как предполагалось, адаптивную природу ($NI = 0.08$, $p = 0.021$). Однако анализ большего числа митохондриальных геномов неандертальцев в нашей работе (в работе [3] исследовали лишь один геном) не подтвердил вывод о том, что межвидовые различия

Таблица 1. Полиморфизм и дивергенция по синонимичным и несинонимичным заменам в генах мтДНК между современным человеком и неандертальцем (результаты анализа с помощью теста Макдональда–Крейтмана)

Ген	Позиции	D _A	D _S	P _A	P _S	NI	P
<i>ND1</i>	3307–4262	2	6	2	14	0.429	0.57
<i>ND2</i>	4470–5511	2	7	3	6	1.75	1.0
<i>CO1</i>	5904–7445	0	12	2	12	–	0.48
<i>CO2</i>	7586–8269	3	3	2	5	0.4	0.59
<i>ATP8</i>	8366–8572	1	4	0	1	0	1.0
<i>ATP6</i>	8527–9207	3	3	3	1	3.0	0.57
<i>CO3</i>	9207–9990	2	4	0	2	0	1.0
<i>ND3</i>	10059–10404	1	6	1	1	6.0	0.42
<i>ND4L</i>	10470–10766	1	2	0	3	0	1.0
<i>ND4</i>	10760–12137	0	9	2	6	–	0.21
<i>ND5</i>	12337–14148	7	10	4	9	0.635	0.71
<i>CytB</i>	14747–15887	4	10	4	7	1.429	1.0

Достоверность различий (*P*) определяли с помощью точного теста Фишера.

Таблица 2. Радикальные аминокислотные замены, возникшие под воздействием направленного отбора в процессе видообразования *Homo*

Ген	Нуклеотидные позиции	Радикальные аминокислотные замены (аминокислотные позиции)				
		<i>Homo</i>	<i>H. sp. A</i>	<i>H. s'H. n</i>	<i>H. s</i>	<i>H. n</i>
<i>ND1</i>	3307–4262	–	–	–	–	–
<i>ND2</i>	4470–5511	–	–	–	–	–
<i>CO1</i>	5904–7445	–	Val83Ile	Ile155Val	–	–
<i>CO2</i>	7586–8269	Val150Ile	–	–	Val146Ile	–
<i>ATP8</i>	8366–8572	–	–	–	–	–
<i>ATP6</i>	8527–9207	–	–	–	–	–
<i>CO3</i>	9207–9990	–	Val254Ile	–	–	Ile84Val
<i>ND3</i>	10059–10404	–	–	–	–	–
<i>ND4L</i>	10470–10766	–	–	–	–	–
<i>ND4</i>	10760–12137	–	–	–	–	–
<i>ND5</i>	12337–14148	–	–	Tyr4His	–	–
<i>CytB</i>	14747–15887	Thr349Ile, Ile368Thr, Ala369Ile	Ile348Thr	–	Ile348Thr	–

H. sp. A – *H. sp. Altai*, *H. s'H. n* – филогенетический узел, объединяющий ветви *H. sapiens* (*H. s*) и *H. neanderthalensis* (*H. n*).

между современным человеком и неандертальцем имеют адаптивную природу.

Известно, что молекулярная адаптация митохондриального генома может проявляться в виде небольшого числа аминокислотных замен в тех участках митохондриальных белков, которые имеют большое значение для функционирования системы окислительного фосфорилирования, как это было показано в случае млекопитающих [19]. Поскольку таких изменений мало, то они, как правило, не могут быть выявлены с помощью стандартных подходов (по определению величин

K_A/K_S , например). Поэтому для поиска аминокислотных позиций, находившихся под воздействием положительного отбора, необходимо использовать специальные подходы, совмещающие филогенетический анализ ДНК с анализом изменений свойств аминокислотных замен в процессе эволюции – например, модель MM01 программы TreeSAAP 3.2 [17].

Мы показали, что адаптивный процесс все же имел место в ходе дивергенции представителей *Homo* – алтайского человека, неандертальца и современного человека (табл. 2). Было обнаружено

12 радикальных аминокислотных замен, которые сопровождалось достоверным изменением физико-химических свойств аминокислот; эти изменения могли, возможно, влиять на функционирование митохондриальных белков. Из них четыре замены произошли на стадии общего предка *Homo* (в генах *CO2* и *CytB*), две замены — в процессе выделения общего предка неандертальцев и современного человека (в генах *CO1* и *ND5*), две замены — в ветви *H. sapiens* (в генах *CO2* и *CytB*), одна — в ветви *H. neanderthalensis* (в гене *CO3*) и три — в ветви *H. sp. altai* (в генах *CO1*, *CO2* и *CytB*). Как видно, радикальные замены обнаружены, главным образом, в белках цитохром-*c*-оксидазного комплекса IV и комплекса III цитохрома *bc1*, что согласуется с выявленной ранее тенденцией увеличения скорости несинонимичных замен в генах митохондриальных субъединиц белков комплексов III и IV у антропоидных приматов [8].

Что касается предполагаемых функциональных последствий радикальных аминокислотных замен, произошедших у представителей рода *Homo*, то оценить их без специальных биохимических исследований пока невозможно. Все замены в цитохроме *b* локализованы в Н-спирали трансмембранного домена, и они не уникальны для приматов, так как были обнаружены ранее при исследовании мтДНК млекопитающих [19]. Однако мутационные спектры цитохрома *b* у представителей *Homo* довольно необычны, так как аминокислотные замены расположены подряд (368 и 369 у всех *Homo*, 348 и 349 у *H. sapiens* и *H. sp. altai*) (табл. 2). Вполне возможно, что это обстоятельство могло способствовать усилению биохимических эффектов. Относительно цитохром-*c*-оксидазного комплекса IV известно, что он непосредственно вовлечен в финальные этапы процесса переноса электронов к кислороду [7], и поэтому вполне вероятно, что выявленные у представителей *Homo* аминокислотные замены могли повышать эффективность работы дыхательной цепи. Следует отметить, что ранее Грин (Green) и соавт. [3] предположили, что четыре аминокислотные позиции субъединицы *CO2* (22, 54, 95 и 146) у современного человека находились под влиянием положительного отбора. Более того, позиции 22 и 146 расположены в области контакта между субъединицами, которые кодируются митохондриальным и ядерным генами (*CO2* и *CObc* соответственно), что дополнительно свидетельствует в пользу функциональной значимости этих позиций. Между тем, результаты настоящей работы показали, что только замена в позиции 146 строго радикальна, и это позволяет предполагать, что она поддерживалась направленным отбором в процессе формирования филогенетической ветви *H. sapiens*.

Таким образом, на основании полученных в настоящей работе данных можно предполагать,

что в процессе видообразования адаптивные изменения митохондриального генома у представителей *Homo* проявляются в виде небольшого числа аминокислотных замен в электронно-транспортных комплексах III и IV. Однако насколько велика роль этих изменений в функционировании дыхательной цепи и адаптации наших предков к изменявшимся условиям природной среды остается пока неясным.

Работа получила финансовую поддержку Дальневосточного отделения Российской академии наук (09-3-А-06-221).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. **290**, 457–465.
2. Clayton D.A. 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 453–478.
3. Green R.E., Malaspina A.S., Krause J., et al. 2008. A complete neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell*. **134**, 416–426.
4. Briggs A.W., Good J.M., Green R.E., et al. 2009. Targeted retrieval and analysis of five Neandertal mtDNA genomes. *Science*. **325**, 318–321.
5. Krause J., Fu Q., Good J.M., Viola B., Shunkov M.V., Derevianko A.P., Pääbo S. 2010. The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature* **464**, 894–897.
6. Perez G.I., Trbovich A.M., Gosden R.G., Tilly J.L. 2000. Mitochondria and the death of oocytes. *Nature*. **403**, 500–501.
7. Saraste M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*. **283**, 1488–1493.
8. Grossman L.I., Wildman D.E., Schmidt T.R., Goodman M. 2004. Accelerated evolution of the electron transport chain in anthropoid primates. *Trends Genet.* **20**, 578–585.
9. Schmidt T.R., Wildman D.E., Uddin M., Opazo J.C., Goodman M., Grossman L.I. 2005. Rapid electrostatic evolution at the binding site for cytochrome *c* on cytochrome *c* oxidase in anthropoid primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 6379–6384.
10. Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Perkova M.A., Grzybowski T., Vanecek T., Lazur J. 2008. Reconstructing the phylogeny of African mitochondrial DNA lineages in Slavs. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**, 1091–1096.
11. Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T., Denisova G.A., Dambueva I., Perkova M., Dorzhu C., Luzina F., Vanecek T., Villems R., Zakharov I. 2007. Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in North Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 1025–1041.
12. Arnason U., Xu X., Gullberg A. 1996. Comparison between the complete mitochondrial DNA sequences of *Homo* and the common chimpanzee based on nonchimeric sequences. *J. Mol. Evol.* **42**, 145–152.

13. Horai S., Hayasaka K., Kondo R., Tsugane K., Takahata N. 1995. Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 532–536.
14. Arnason U., Gullberg A., Janke A. 1998. Molecular timing of primate divergences as estimated by two non-primate calibration points. *J. Mol. Evol.* **47**, 718–727.
15. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genet.* **23**, 147.
16. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.
17. Woolley S., Johnson J., Smith M.J., Crandall K.A., McClellan D.A. 2003. Tree-SAAP: selection on amino acid properties using phylogenetic trees. *Bioinformatics*. **19**, 671–672.
18. McClellan D.A., Palfreyman E.J., Smith M.J., Moss J.L., Christensen R.G., Sailsbery J.K. 2005. Physicochemical evolution and molecular adaptation of the cetacean and artiodactyl cytochrome *b* proteins. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 437–455.
19. Da Fonseca R.R., Johnson W.E., O'Brien S.J., Ramos M.J., Antunes A. 2008. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics*. **9**, e119.
20. McDonald J.H., Kreitman M. 1991. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*. **351**, 652–654.
21. Macaulay V., Hill C., Achilli A., et al. 2005. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science*. **308**, 1034–1036.