

С.В. МЕЖЖЕРИН, О.П. БЕРЕЗОВСКАЯ

Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена
НАН Украины, Киев

ОСОБЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕЩЕНИЙ LDH-A И LDH-B В ЭВОЛЮЦИОННОМ РЯДУ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ



Сравнительный анализ первичной структуры мышечной субъединицы лактатдегидрогеназы (LDH-A) и сердечной (LDH-B) в эволюционном ряду позвоночных от хрящевых рыб до млекопитающих выявил устойчивые различия изоферментов по составу аминокислот, определяющие физико-химические свойства макромолекул. Так, первичная цепь LDH-A короче, чем LDH-B, построена из более тяжелых аминокислот, имеет меньше полярных незаряженных и больше полярных заряженных аминокислот, причем в цепи LDH-A положительно заряженные аминокислоты явно преобладают над отрицательно заряженными. Выявленные различия аминокислотного состава обсуждаются в связи с устойчивыми различиями уровней аллозимной изменчивости сравниваемых изоферментов в ряду позвоночных животных.

© С.В. МЕЖЖЕРИН, О.П. БЕРЕЗОВСКАЯ, 2003

Введение. Открывшиеся в 60–70-е годы возможности анализа изменчивости организмов на уровне первичной структуры макромолекул позволили непосредственно наблюдать динамику генов в пространстве и во времени. Уже первые сравнительные исследования по изменчивости первичной структуры различных белков и последовательностей ДНК [1–3] сформировали направление, названное впоследствии «молекулярной эволюцией» [4, 5]. Дальнейшее совершенствование методологии молекулярно-генетического анализа позволило проводить исследования по самым разным группам генов, а также некодирующим участкам ДНК [6 и др.], что существенно расширило базу сравнительных исследований.

Особый интерес вызывает изменчивость биохимических генных маркеров, проявляющаяся на уровне первичной структуры белков и выявляемая при электрофоретическом анализе. Сейчас в этой области накоплен огромный фактический материал и установлен ряд эмпирических закономерностей, среди которых следует отметить неоднозначность генетической изменчивости групп организмов с разной эволюционной продвинутостью [7–10].

К числу самых изученных биохимических генных маркеров позвоночных, несомненно, относится фермент лактатдегидрогеназа (EC 1.1.1.27), представленный как минимум двумя изозимами: LDH-A, сильно экспрессирующегося в скелетных мышцах, тканях печени, эритроцитах, и LDH-B, активность которого преобладает в миокарде и тканях почек [11]. Эти изоферменты кодируются локусами *Ldh-A* и *Ldh-B*, гомологичное происхождение которых подтверждается более чем 60 % одинаковых аминокислот, что продемонстрировано путем секвенирования [12, 13]. При этом в подавляющем большинстве случаев (исключение составляют некоторые виды рыб и амфибий) при электрофоретической разгонке изофермент LDH-B имеет явно более высокую анодную подвижность [14], что указывает на закономерные отличия аминокислотного состава их цепей. Анализ изменчивости этих ферментов показал [15], что разные классы позвоночных от костных рыб до млекопитающих имеют неодинаковый уровень внутривидовой аллозимной изменчивости, что проявляется не только в разной степени гетерозиготности, но и в четкой смене разных типов электроморф в филетическом ряду [14, 15]. При этом изофермент

LDH-B у всех позвоночных, за исключением класса костных рыб, является более изменчивым, чем LDH-A. Возникает вопрос о природе такого рода разнокачественности изоферментов, а также о причинах неоднозначности уровня гетерозиготности локусов, кодирующих эти ферменты, в филетическом ряду позвоночных животных. При этом для объяснения данного феномена а priori может быть выделено два подхода: первый, через взаимодействие организма со средой, когда уровень и характер изменчивости белков регулируется отбором, и второй, когда изменчивость макромолекул определяется внутренними факторами, например, разной скоростью мутирования генов, которая может быть обусловлена особенностями структуры ДНК. Настоящее исследование проведено с целью определения причин неоднозначности изменчивости первичной структуры изоферментов лактатдегидрогеназы в филетическом ряду позвоночных.

Материал и методы. Для анализа использованы аминокислотные последовательности изоферментов LDH-A и LDH-B разных видов животных, полученные через Entrez-Query сервер из международных банков данных. К настоящему времени первичная структура фермента изучена у представителей практически всех основных групп позвоночных. Полная аминокислотная последовательность изофермента LDH-A известна у 40 видов, принадлежащих соответственно классам и отрядам: CHONDRIICHTHYES, Elasmobranchia *Squalus acanthias* (U38893), OSTEICHTHYES, Cypriniformes *Danio rerio* (AF067201), *Cyprinus carpio* (AF076528); Mugiliformes *Sphyraena idastes* (U80001), *S. lucasana* (U80002), *S. argentea* (U80000), Perciformes *Lycodichthys dearborni* (AF170710), *Coryphopterus nicholsi* (AF079534), *Gillichthys seta* (AF079533), *G. mirabilis* (AF079460), *Eleginops maclovinus* (AF079825), *Harpagifer antarcticus* (AF079820), *Parachaenichthys charcoti* (AF079821), *Notothenia coriiceps* (AF079822), *N. angustata* (AF170848), *Gobionotothenia gibberifrons* (AF079823), *Paranotothenia magellanica* (AF079826), *Lepidonotothenia nudifrons* (AF 079828), *Pagothenia borchgrevinki* (AF170846), *Patagonotothenia tessellata* (AF079830), *Chaenocephalus aceratus* (AF079819), *Dissotichus eleginoides* (AF170027), *D. mawsoni* (AF079827), *Champscephalus gunnari* (AF 079824), *Trematomus bernacchii* (AF170847), *Chionodraco*

rastrispinosus (AF079829); AMPHIBIA, Caudata *Ambistoma mexicanum* (AF 070998), Anura *Xenopus laevis* (AF070952), *Xenopus laevis* (AF070953), REPTILIA, Testudines *Trachemys scripta* (L79953), Crocodilia *Alligator mississippiensis* (L79951), Squamata *Python regius* (AF072585), *Sceloporus undulatus* (U28410); AVES, Columbiformes *Columba livia* (L76362), Galliformes *Gallus gallus* (X53828), MAMMALIA, Metatheria *Monodelphis domestica* (AF070996); Rodentia *Rattus norvegicus* (P04642), *Mus musculus* (U13687), Artiodactyla *Sus scrofa* (U07178), *Bos taurus* (D90143), Primates *Homo sapiens* (X03077). Первичная структура LDH-B установлена всего у 16 видов, а именно: CHONDRIICHTHYES, Elasmobranchia *Squalus acanthias* (AF059035); OSTEICHTHYES, Anguilliformes *Anguilla rostrata* (U21810), Cyprinodontiformes *Fundulus heteroclitus* (M33969), Cypriniformes *Danio rerio* (AF067202), AMPHIBIA, Anura *Xenopus laevis* (U07176), REPTILIA, Testudines *Trachemys scripta* (L79953), Crocodilia *Alligator mississippiensis* (L79951), Squamata *Sceloporus undulatus* (U28411), AVES, Galliformes *Gallus gallus* (AF069771), Anseriformes *Anas platyrhynchos* (J03869), MAMMALIA, Metatheria *Monodelphis domestica* (AF070996); Rodentia *Rattus norvegicus* (U07181), *Mus musculus* (X51905), Artiodactyla *Sus scrofa* (U07180), *Bos taurus* (AJ401268), Primates *Homo sapiens* (Y00711).

Коррекцию первичных данных по структуре первичной цепи изоферментов проводили путем выравнивания и впоследствии межвидовых сопоставлений, в результате которых была подтверждена гомологичность анализируемых в данном сообщении последовательностей.

На основе анализа аминокислотных последовательностей определены основные физико-химические характеристики белковых молекул, которые могут влиять на их электрофоретическую подвижность, а именно: 1) длина цепи (число аминокислот); 2) молекулярная масса белка; 3) средняя масса аминокислот в цепи; 4) число аминокислот с неполярными R-группами; 5) число аминокислот с полярными R-группами; 6) доля в цепи аминокислот с заряженными R-группами; 7) разность между числом аминокислот, содержащих положительно и отрицательно заряженные R-группы; 8) разнообразие аминокислот, оцененное по формуле Шеннона.

Для выявления эволюционных тенденций в изменении первичной структуры LDH-A и

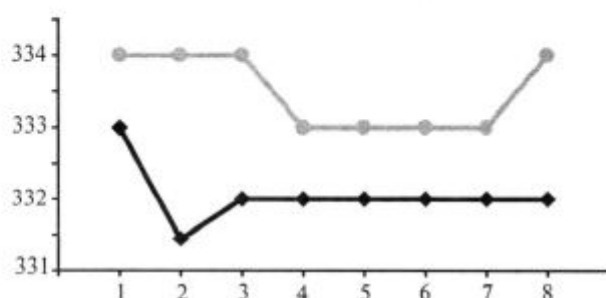


Рис. 1. Среднее число аминокислот (по вертикали) в полипептидных цепях LDH-A и LDH-B в основных систематических выделениях позвоночных животных: 1 — класс Хрящевые рыбы, 2 — класс Костные рыбы, 3 — отряд Бесхвостые, 4 — отряд Черепахи, 5 — отряд Крокодилы, 6 — отряд Чешуйчатые, 7 — класс Птицы, 8 — класс Млекопитающие. Ромбиками обозначены средние значения LDH-A, кружками — LDH-B

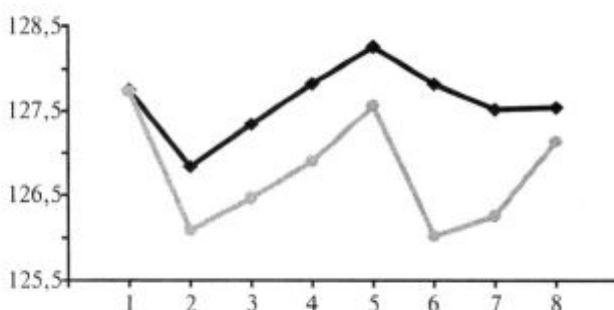


Рис. 2. Средняя масса аминокислот (по вертикали) в полипептидных цепях LDH-A и LDH-B в основных систематических выделениях позвоночных животных. Обозначения те же, что и на рис. 1

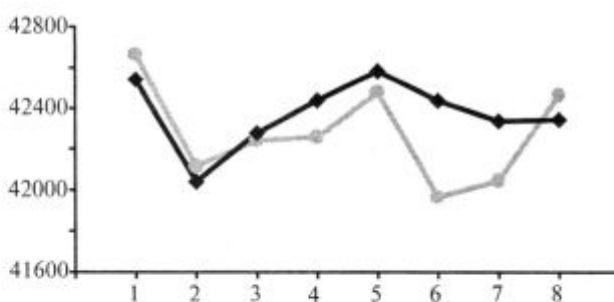


Рис. 3. Средняя масса молекул (по вертикали) LDH-A и LDH-B в ряду позвоночных животных. Обозначения те же, что и на рис. 1

LDH-B использовали среднегрупповые значения перечисленных показателей, подсчитанные для хрящевых рыб (*Chondrichthyes*), костных рыб (*Osteichthyes*), бесхвостых амфибий (*Anura*), черепах (*Testudines*), крокодилов (*Crocodylia*), чешуйчатых рептилий (*Squamata*), птиц (*Aves*) и млекопитающих (*Mammalia*).

Результаты исследований и их обсуждение.
Длина полипептидной цепи. Число звеньев в полипептидной цепи LDH-A и LDH-B является достаточно стабильным показателем, свойственным конкретному классу позвоночных. Число аминокислот в цепи колеблется от 331 до 334 (рис. 1). При этом в среднем цепь LDH-A короче цепи LDH-B более чем на одну аминокислоту (таблица), разница статистически достоверна ($t = 4,3$; $n = 16$; $p < 0,001$).

Масса аминокислот. Достоверные различия между изоферментами наблюдаются и по средней массе аминокислот, образующих полипептидную цепь (таблица). При этом цепь LDH-A построена из аминокислот с большей молекулярной массой, чем LDH-B ($t = 2,86$; $n = 16$; $p < 0,01$). Эта тенденция отчетливо проявляется при сопоставлении средней массы аминокислот видов, изученных по двум изоферментам одновременно, и составляет $0,56 \pm 0,15$ ($t = 3,72$; $n = 13$; $p < 0,01$) (рис. 2).

Сопоставление показателей первичной структуры LDH-A и LDH-B у позвоночных (от хрящевых рыб до млекопитающих)

Показатель	LDH-A	LDH-B	t-критерий
Средняя длина цепи	$332,1 \pm 0,24$	$333,5 \pm 0,18$	4,33***
Средняя масса цепи	$42389 \pm 63,1$	$42376 \pm 59,3$	0,15
Средняя масса аминокислот	$127,6 \pm 0,14$	$126,9 \pm 0,20$	2,87**
Среднее число неполярных аминокислот	$146,6 \pm 0,38$	$147,1 \pm 0,97$	0,48
Среднее число полярных аминокислот	$97,5 \pm 1,84$	$109,4 \pm 1,2$	5,41***
Средняя доля заряженных аминокислот (%)	$26,4 \pm 0,58$	$23,2 \pm 0,26$	5,03***
Средняя разность в числе «+» и «-» заряженных аминокислот	$+14,3 \pm 1,0$	$+5,9 \pm 0,73$	6,87***
Показатель разнообразия	$5,69 \pm 0,01$	$5,66 \pm 0,009$	2,23*

Примечание. Различия достоверны с вероятностью: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Различия средней массы цепи LDH-A и LDH-B хотя в отдельных классах значительны, в целом по ряду позвоночных статистически недостоверны (таблица, рис. 3). Это вызвано тем, что в состав более длинной цепи LDH-B входят аминокислоты с меньшей молекулярной массой.

Полярность. Достоверными оказываются различия цепей LDH-A и LDH-B по количеству аминокислот с полярными незаряженными R-группами (таблица), относительное число которых достоверно выше в цепи LDH-B ($t = 5,2$; $p < 0,001$) (рис. 4), тогда как число аминокислот с неполярными R-группами одинаково у двух изоферментов.

Статистически значимо различаются изоферменты LDH и по доле аминокислот, имеющих полярно заряженные R-группы (таблица), представленность которых в цепи LDH-A выше, чем в LDH-B ($t = 5,0$; $n = 16$; $p < 0,001$). Также статистически достоверны различия между изоферментами по соотношению положительно и отрицательно заряженных аминокислот ($t = 6,77$; $n = 16$; $p < 0,001$). Как в LDH-A, так и в LDH-B преобладают аминокислоты с положительно заряженными R-группами (таблица), причем в цепи LDH-B имеется тенденция к выравниванию количества аминокислот с положительно и отрицательно заряженными R-группами. Представленность полярных аминокислот с заряженными R-группами неодинакова в разных классах (подклассах) позвоночных (рис. 5). При этом разность в числе положительно и отрицательно заряженных аминокислот в цепях LDH-A и LDH-B изменяется синхронно (рис. 6), а доля заряженных аминокислот, наоборот, как бы изменяется в противофазе.

Различия в разнообразии аминокислотного состава изоферментов, оцененного по показателю Шеннона, практически не выражены и находятся на грани достоверности (таблица).

Таким образом, различия в первичной структуре изоферментов лактатдегидрогеназы в ряду позвоночных касаются практически всех основных физико-химических параметров — размерно-весовых показателей, полярности и заряженности. Изофермент LDH-A построен из меньшего числа аминокислот, чем LDH-B, однако составляющие его аминокислоты массивней, в его цепи меньше полярных незаряженных и больше полярных заряженных аминокислот.

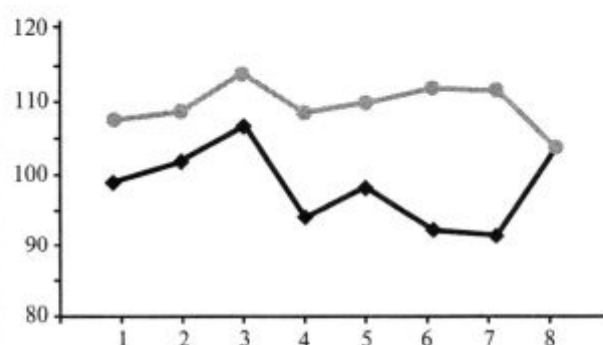


Рис. 4. Число полярных аминокислот (по вертикали) в полипептидных цепях LDH-A и LDH-B в ряду позвоночных животных. Обозначения те же, что и на рис. 1

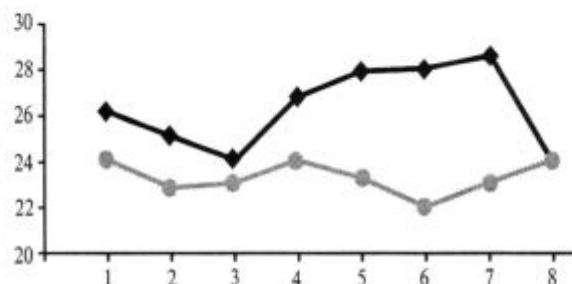


Рис. 5. Доля заряженных аминокислот, % (по вертикали) в полипептидных цепях LDH-A и LDH-B в основных систематических выделах позвоночных животных. Обозначения те же, что и на рис. 1

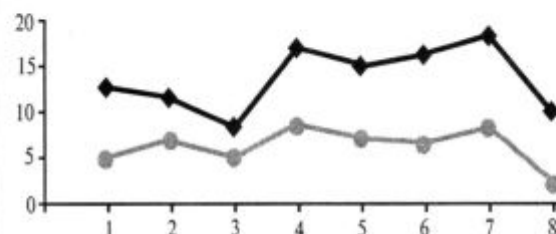


Рис. 6. Разность в числе положительно и отрицательно заряженных аминокислот, % (по вертикали) в полипептидных цепях LDH-A и LDH-B в основных систематических выделах позвоночных животных. Обозначения те же, что и на рис. 1

Кроме того, в цепи LDH-A наблюдается явное преобладание положительно заряженных аминокислот, тогда как в цепи LDH-B пропорция аминокислот, имеющих положительно и отрицательно заряженные R-группы, приблизительно одинакова.

Важно подчеркнуть, что характер различий изоферментов в общем совпадает с тенденциями эволюционной специализации этих макромолекул в ряду позвоночных животных. Анализируя

эволюционные ряды позвоночных от хрящевых рыб до млекопитающих, можно выделить следующие генеральные направления эволюции первичной структуры изоферментов. Так, происходит увеличение средней массы аминокислот и цепи в целом (рис. 1 и 2), уменьшается доля полярных незаряженных (рис. 4) и увеличивается доля полярных заряженных аминокислот (рис. 5). Этой эволюционной тенденции в общем соответствует и характер различий первичной структуры LDH-A и LDH-B. Изофермент LDH-A, несмотря на то, что в филогенезе позвоночных появляется раньше, чем LDH-B [11], по особенностям первичной структуры выглядит эволюционно более продвинутым. Он состоит в среднем из более массивных аминокислот, в нем меньше содержится полярных незаряженных и выше доля аминокислот с заряженными R-группами, что свойственно высшим позвоночным (таблица).

Различия в первичной структуре изоферментов лактатдегидрогеназы, связанные с физико-химическими свойствами молекул, сами по себе могут определять различия в изменчивости, выявляемой методом электрофореза. При этом возможны два варианта. Первый, неоднозначность изменчивости изоферментов объективно имеет место, что и находит свое отражение при электрофоретическом анализе. Второй, аллозимная изменчивость изоферментов на самом деле одинакова, но особенности первичной структуры таковы, что при электрофоретическом разделении по каждому изоферменту она проявляется дифференцированно.

К первой группе факторов, определяющих разную изменчивость изоферментов, можно отнести, во-первых, увеличение числа элементов в цепи LDH-B по сравнению с LDH-A, что уже само по себе повышает число потенциально мутирующих сайтов; во-вторых, изофермент LDH-A по сравнению с Ldh-B состоит из более тяжелых аминокислот и содержит больше аминокислот с заряженными R-группами. Такие особенности структуры разных изоферментов не являются прямым доказательством внутреннего консерватизма макромолекулы, но очень симптоматичны, если учесть, что у генетически самых стабильных позвоночных — млекопитающих [7–10] в цепи обоих изоферментов лактатдегидрогеназы нарастает именно средняя масса и доля заряженных аминокислот.

Вполне вероятными выглядят причины опосредованного характера, т.е. на самом деле изменчивость изоферментов одинакова, но при электрофоретическом анализе она по-разному выявляется. Причиной неодинаковой разрешающей способности метода по отношению к разным изоферментам может быть, например, иное соотношение аминокислот, содержащих положительно и отрицательно заряженные R-группы. В частности, выравнивание числа разнозаряженных аминокислот, наблюдающееся в цепи LDH-B, должно приводить к уменьшению положительного заряда цепи и, как следствие, к большей анодной подвижности, что и наблюдается у большинства видов позвоночных [14]. Это в свою очередь может привести к тому, что при более длительной электрофоретической разгонке Ldh-B повышается разрешающая способность метода.

SUMMARY. Structure of lactate dehydrogenase LDH-A (muscle) and LDH-B (heart) subunits is compared in the evolutionary line of vertebrates from Chondrosteous fishes to Mammals. It is revealed persistent differences between them in the amino acid set determining the physical and chemical characteristics of macromolecules. The polypeptide chain of LDH-A is shorter than that of LDH-B but it contains amino acids with higher molecular weight. In LDH-A polarized amino acids are less in number but charged amino acids are more numerous, positive charged amino acids prevail over negative charged ones. The features of polypeptide structure are discussed in connection with differences in the level of intraspecific variability of allozymes in the evolutionary line of vertebrates.

РЕЗЮМЕ. Порівняльний аналіз первинної структури м'язової субодиниці лактатдегідрогенази (LDH-A) та серцевої (LDH-B) в еволюційному ряду хребетних від хрящових риб до ссавців виявив стійкі відмінності ізоферментів за складом амінокислот. Ці відмінності визначають фізико-хімічні властивості макромолекул. Так первинний ланцюг LDH-A коротше за LDH-B, яка побудована з більш важких амінокислот, має менше полярних незаряджених та більше полярних заряджених амінокислот, причому в ланцюгу LDH-A позитивно заряджені амінокислоти мають явну перевагу над негативно зарядженими. Виявлено відмінності рівнів алозимної мінливості порівнюваних ізоферментів у ряду хребетних тварин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Atlas of protein sequence and structure* / Ed. M.O. Dayhoff. V.4. National Biomedical Research Foundation. — Md.: Silver Spring, 1969. — 148 p.

2. Ingram V.M. The haemoglobins in genetics and evolution. — New York : Columbia Univ. press., 1963. — 166 p.
3. King J.L., Jukes T.H. Non-Darwinian evolution // Science. — 1969. — **164**. — P. 788–798.
4. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. — М: Мир, 1985. — 398 с.
5. Nei M. Molecular evolutionary genetics. — New York : Columbia Univ. press., 1987. — 512 p.
6. Huynen M.A., Bork P. Measuring gene evolution // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1998. — **95**. — P. 5849–5856.
7. Nevo E. Genetic diversity in nature: patterns and theory // Evol. Biol. — 1988. — **23**. — P. 217–247.
8. Nevo E. Evolutionary significance of genetic diversity in nature: environmental stress, pattern and theory // Isozymes : 7th Intern. Cong. on Isozymes. — Novosibirsk, 1992). — 1994. — P. 267–296.
9. Межжерин С.В. Гетерозиготность популяций позвоночных животных: оценка по гомологичным локусам, кодирующим ферменты // Докл. АН УССР. — 1991. — № 1. — С. 134–137.
10. Межжерин С.В. Сравнительный анализ аллозимной изменчивости позвоночных животных // Журн. общ. биологии. — 1992. — **53**, № 4. — С. 549–556.
11. Holmes R.S. Evolution of lactate dehydrogenase genes // FEBS Lett. — 1972. — **28**. — P. 51–53.
12. Hiraoka B.Y., Sharif F.S., Yang Y.-W., Li W.-H., Li S.S.-L. The cDNA and protein sequences of mouse lactate dehydrogenase B. Molecular evolution of vertebrate lactate dehydrogenase genes A (muscle), B (heart) and C (testis) // Eur. J. Biochem. — 1990. — **189**. — P. 215–220.
13. Stock D.W., Whitt G.S. Evolutionary implications of the cDNA sequence of the single lactate dehydrogenase of a lamprey // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1992. — **89**. — P. 1799–1803.
14. Межжерин С.В. Единицы мутаций локусов, кодирующих лактатдегидрогеназу, и их направленные изменения в филогенетическом ряду позвоночных животных // Изв. РАН. Сер. биол. — 1997. — № 1. — С. 27–34.
15. Межжерин С.В. Характер аллозимной изменчивости лактатдегидрогеназы (EC 1.1.1.27) в ряду позвоночных животных // Генетика. — 1998. — **34**, № 10. — С. 1396–1404.

Поступила 22.03.02