

На правах рукописи

ПОПАДЫН
Константин Юрьевич

ЭВОЛЮЦИЯ БЕСПОЛЫХ ЛИНИЙ: ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
МЕХАНИЗМЫ ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ

Специальности: 03.00.16 экология и 03.00.15 генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2005

Работа выполнена на кафедре Общей Экологии Биологического факультета Московского Государственного Университете имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор **А.М. Гиляров**

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук,
В.В. Алёшин
доктор биологических наук,
профессор **В.П. Щербаков**

Ведущая организация:

Институт биологии развития
имени Н.К. Кольцова РАН

Защита состоится 12 мая 2005 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д.501.001.55 при Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, МГУ, Биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 12 апреля 2005 г.

Отзыв в двух экземплярах просим направлять по адресу: 199992, Москва, Воробьёвы горы, МГУ, Биологический факультет, каф. гидробиологии, Диссертационный совет Д.501.001.55.

Факс (095) 939-4309

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Н.В. Карташева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Эволюционная теория в основном развивалась применительно к организмам, размножающимся половым путём, в результате чего многие формулируемые в её рамках представления (например, концепция вида) не могут быть непосредственно распространены на бесполое организмы. Определяя эволюцию как процесс накопления благоприятных мутаций и элиминации вредных, необходимо изучить особенности его протекания в бесполох популяциях и нерекombинирующих участках ДНК: как они накапливают благоприятные мутации, насколько эффективно очищаются от вредных, и каков сам по себе темп мутирования бесполох линий по сравнению с половыми? Ответы на данные вопросы должны объяснить всё ещё нерешённую загадку доминирования полового размножения – а именно, почему большинство эукариотических видов имеет половое, а не бесполое размножение?

Цель и задачи исследования. Цель работы – выявить эколого-генетические особенности, присущие древним бесполом видам и нерекombинирующим участкам ДНК, и рассмотреть их возможный адаптивный смысл. Конкретные задачи сводились к следующему:

1. проанализировать распределение вредных мутаций в бесполох популяциях, произошедших от половой популяции при различных мутационных параметрах (температура мутирования, коэффициент отбора против мутаций, коэффициент эпистаза);
2. выявить эколого-генетические особенности древних бесполох организмов на примере коловраток класса Bdelloidea и пресноводных ракушковых рачков семейства Darwinulidae;
3. выявить особенности строения и молекулярной эволюции Y хромосомы и митохондриального генома млекопитающих.

Научная новизна работы. Проблема эволюции в отсутствие полового размножения достаточно давно и обстоятельно обсуждалась (Maynard Smith, 1978; Bell, 1982; Stearns, 1988), однако, большинство важных экспериментальных данных, относящихся к этой области, появилось лишь в самое последнее время. Поэтому мы получили возможность использовать новые экспериментальные данные в контексте давно известных эволюционных теорий.

На основе анализа литературных данных с применением численных методов была сформулирована гипотеза происхождения бесполох видов, базирующаяся на особенностях распределения вредных мутаций в половых и бесполох популяциях, и объясняющая происхождение высоко приспособленных бесполох видов.

Впервые проведён параллельный анализ древних бесполох видов и древних нерекombинирующих участков ДНК, в результате чего выявлены их общие особенности и возможный адаптивный смысл.

При сравнении протеин-кодирующих генов митохондрий млекопитающих и их ортологов у α -протеобактерий (гомологичных последовательностей ДНК, разошедшихся в результате специализации), получены свидетельства достаточно эффективного удаления слабо-вредных

мутаций из митохондриальных геномов. Также, обнаружена тесная связь экологических (масса тела, включение вида в Красную книгу) и генетических (dN/dS) характеристик млекопитающих, что согласуется с эффективно-нейтральной теорией молекулярной эволюции.

Практическое значение работы. 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). Практический аспект данного исследования связан с изучением характеристик мутационно-селективного равновесия нерекombинирующих участков ДНК человека, таких как митохондриальный геном и специфичный для самцов регион Y хромосомы. Неэффективное удаление или накопление слабо-вредных мутаций на нерекombинирующих участках будет говорить о падении приспособленности и, следовательно, о большом вкладе данных участков в детерминацию болезней человека. Также, в связи с отсутствием рекомбинации и пониженной эффективной численностью именно в митохондриальном геноме и Y хромосоме ожидается повышенная скорость накопления мутаций старения - то есть множества вредных в пострепродуктивный период аллелей, зафиксировавшихся в популяции человека (Cortopassi, 2002). Картирование сайтов митохондриального генома, находящихся под разным давлением отбора, поможет выявлять мутации, ассоциированные с болезнями человека.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 28-ом лимнологическом конгрессе (Melbourne, Australia, 2001), на 1-ом и 2-ом рабочем совещании группы по изучению партеногенеза (PARTNER-1: Wageningen, The Netherlands, 2003; PARTNER-2: Valencia, Spain, 2004), на семинаре МОИП (Москва, 2004) и на научных семинарах Биологического факультета МГУ “Популяционная и системная экология” (Москва, 2002; 2004). По теме диссертации опубликовано 6 работ.

Структура работы. Работа состоит из введения, трёх глав, двух приложений и выводов. Содержание работы изложено на 100 страницах и включает 10 таблиц, 34 рисунка и 4 вставки. Список литературы состоит из 171 названия, в том числе 159 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ЭВОЛЮЦИЯ АПОМИКСИСА И АМФИМИКСИСА

1.1. Формулировка парадокса полового размножения. Под бесполом размножением далее мы будем понимать *апомиксис* – производство потомства путём митоза единственной клетки. При апомиксисе каждая особь имеет лишь одного родителя, все гены которого наследуются неизменным образом, за исключением новых появившихся мутаций. Половое размножение или *амфимиксис* - жизненный цикл с чередованием мейоза, происходящего во время гаметогенеза, и сингамии – слияния гамет при оплодотворении. Благодаря кроссинговеру, независимому расхождению гомологичных хромосом в мейозе и слиянию гамет при оплодотворении происходит рекомбинация генов родителей, которые дают генетически неоднородное потомство.

Ещё Вейсман (Weismann, 1887), сформулировал вопрос – зачем яйцеклетке избавляться от половины ядерной субстанции и создавать тем самым необходимость привноса её сперматозоидом? Ведь у партеногенетических видов нет этих трат времени и энергии на мейоз, производство самцов, поиск партнёра и спаривание. Более того, чтобы произвести какое-то количество потомков, половым видам необходимо вдвое больше родителей, нежели партеногенетическим. Вейсман предположил, что если половое размножение существует то, у образованной в результате оплодотворения ядерной субстанции видимо, должно быть какое-то преимущество, а именно – изменчивое потомство, поставляющее материал для естественного отбора. Тезис Вейсмана настолько широк, что в рамках его лежит большинство современных гипотез, пытающихся объяснить адаптивный смысл изменчивого потомства.

Намного позднее Мэйнард Смит (Maynard Smith, 1971), формализовал парадокс полового размножения, рассмотрев стационарную анизогамную половую популяцию с соотношением полов 1:1 и предположив появление в ней мутации, приводящей к партеногенезу. Самки с такой мутацией производят себе подобных партеногенетических самок, тогда как половые самки половину энергии вкладывают в самцов (отсюда происходит общепринятое название более медленной скорости размножения половых видов – “цена производства самцов” или просто “цена самцов”). Поскольку партеногенетическая линия увеличивает свою численность вдвое за каждое поколение, она должна в итоге вытеснить родительскую половую популяцию. Таким образом, при прочих равных, бесполое размножение обладает двукратным преимуществом по сравнению с половым, и именно его мы ожидаем увидеть в качестве доминирующей или даже единственной формы размножения. Однако, на самом деле для подавляющего большинства эукариот характерно половое размножение (облигатное или факультативное). Именно в этом несоответствии теоретических и фактических данных заключается парадоксальность ситуации.

1.2. Возможные причины доминирования полового размножения. В каких случаях может быть выгодна генетическая рекомбинация, разрушающая родительские генотипы и создающая новые? Если, бесполой организм хорошо приспособлен к стабильной среде и в его геноме не происходит никаких изменений (не появляются новые мутации), то половое размножение невыгодно, поскольку рекомбинация разобьёт удачные, уже проверенные отбором комбинации аллелей. Однако совершенно стабильной среды и стабильного, не подверженного мутациям, генотипа не бывает. И, если допустить достаточно сильную их изменчивость, то в какой-то момент быть бесполом станет невыгодно. Быстрая адаптация к изменяющейся среде и очищение генофонда популяции от вредных мутаций – обе эти цели будут достигнуты при переходе к половому размножению. Поскольку нарушения могут затрагивать как среду обитания, так и геном, то соответствующие гипотезы удобно разделить на экологические и мутационные (Kondrashov, 1993). Основным вопросом при этом становится относительная важность экологических и генетических изменений.

В работе обсуждаемы четыре лидирующие гипотезы поддержания полового размножения, две из которых действуют на коротких временных отрезках (мутационные гипотезы: мутационная детерминистическая и гипотеза Мэннинга), а две - на больших (экологическая гипотеза Чёрной Королевы и мутационная гипотеза – храповик Мёллера).

1.2.1. Мутационная детерминистическая гипотеза. В бесполой популяции действует правило Мёллера (Muller, 1950): одна мутация – одна генетическая смерть. В половой же популяции, в результате рекомбинации аллелей элиминированная особь может иметь несколько вредных мутаций. Таким образом, хотя количество новых вредных мутаций как в бесполой, так и половой популяциях предполагается одинаковым, для удаления их из генофонда половой популяции необходимо элиминировать значительно меньше особей, нежели в случае бесполой (Kimura, Maruyama, 1966). То есть смертность потомков в половых популяциях будет ниже, чем в бесполой, что может компенсировать изначальный проигрыш половых организмов в скорости размножения. В этом и заключается мутационная детерминистическая гипотеза (Kondrashov, 1982, 1988). Из её математического выражения следует, что равенство приспособленностей половой и бесполой популяций достигается при темпе появления новых слабо-вредных мутаций на геном на поколение больше единицы и эпистатического взаимодействия между вредными мутациями.

1.2.2. Гипотеза Мэннинга (Manning, 1984; Agrawal, 2001; Siller, 2001). Анизогамия, увеличивающая в два раза цену полового размножения, также ответственна за существование полового отбора – мощной эволюционной силы, отсутствующей в бесполой популяциях. Конкуренция за спаривание, как правило, касается самцов по причине незначительного вклада их энергии в потомство. В результате пониженного успеха спаривания плохих (с большим количеством мутаций) самцов (Zahavi, 1975) из генофонда популяции удаляются вредные мутации, и средняя приспособленность возрастает.

1.2.3. Гипотеза Чёрной Королевы. Ван Вален (Van Valen, 1973) предположил, что каждое эволюционное приобретение любого вида может расцениваться как ухудшение условий существования других видов. Поэтому необходимо эволюционировать как можно быстрее просто для того, чтобы выжить. Таким образом, скорость эволюции должна иметь решающее значение в процессе вымирания видов. Поскольку половые виды способны к более быстрой эволюции (благодаря возможности комбинирования благоприятных мутаций разных организмов) именно это свойство может обеспечивать половым популяциям эволюционное преимущество. Необходимость в высокой скорости эволюции диктуется быстро изменяющимися факторами среды, в первую очередь биотическими. Гамильтон (Hamilton, 1980) предположил, что наиболее важным биотическим фактором может оказаться пресс паразитов с коротким жизненным циклом: быстроэволюционирующие паразиты вынуждают своих хозяев “убегать” от них, накапливая изменения, делающие их невосприимчивыми к данному типу паразитов. Бесполое виды, из-за неспособности к быстрой эволюции, подвержены более сильному воздействию паразитов, что и уменьшает их первоначальное преимущество в скорости размножения.

Гипотезу Чёрной Королевы косвенно подтверждает явление “географического партеногенеза” – преимущественное распространение партеногенетических организмов в северных широтах, высоко в горах, на островах или в частонарушаемых местообитаниях. Поскольку для таких мест характерно малое число видов (рыхлая упаковка экологических ниш), то отсутствие сильных биотических взаимодействий позволяет существовать бесполом видам именно в такой среде, где нет необходимости в быстрой эволюционной гонке.

1.2.4. Храповик Мёллера. Храповик Мёллера (Muller, 1964) основывается на том, что любая новая слабо-вредная мутация в бесполо передающемся генотипе может быть удалена из популяции только за счёт гибели особей, несущих эту мутацию. Соответственно, число мутаций в бесполом генотипе может либо оставаться постоянным, либо увеличиваться. Отсюда следует, что случайная элиминация “наилучших” генотипов (с минимальным числом вредных мутаций) в бесполой популяции необратима. Со временем происходит постепенное увеличение числа вредных мутаций, приводящее к вымиранию бесполой формы.

Основа храповика – случайная элиминация “наилучших” генотипов (в результате вымирания родителей, отсутствия у них потомства или появления в них новой вредной мутации) – противоположна механизму естественного отбора, элиминирующего наихудшие генотипы. Поэтому храповик может работать только при условии, когда судьба мутантного аллеля определяется генетическим дрейфом, а не отбором. Период движения храповика (за сколько поколений количество мутаций в оптимальном классе особей увеличивается на единицу) сильно зависит от размера популяции (чем меньше численность оптимального класса особей, тем больше вероятность случайного исчезновения этого класса), темпа мутирования и коэффициента отбора вредных мутаций.

Приняв, что бесполое существование неспособно длиться бесконечно долго из-за работы храповика Мёллера, можно решить проблему полового размножения лишь с позиции группового отбора: половое размножение есть признак, который выгоден группе (половой популяции), позволяя ей существовать бесконечно долго, но не каждому конкретному организму. Так, любая самка в половой популяции в случае перехода к партеногенезу сразу же получает преимущество в скорости размножения, но её линия обречена в будущем (возможно, достаточно отдалённом) на вымирание в результате накопления вредных мутаций. Однако, такая отдалённая перспектива не может изменить хода эволюции, движимой за счёт быстро реализуемых преимуществ. Единственная возможность поддержания полового размножения за счёт долгосрочных преимуществ – это крайне редкое появление мутаций “бесплодности” в половых видах.

Ещё одно возражение против храповика - балансовый аргумент Вильямса (Williams, 1971). Вильямс считает, что существование организмов с циклическим партеногенезом не укладывается в рамки долгосрочного преимущества полового размножения и требует привлечения быстрореализуемого преимущества половых стадий их жизненного цикла. Поскольку у циклически-партеногенетических организмов (1) существует

большая вероятность появления клонов в результате элиминации половой стадии их жизненного цикла, то (принимая лишь долгосрочное преимущество полового размножения), эти клоны должны (2) вытеснить своих предков. Однако, этого не наблюдается, следовательно, половое размножение обеспечивает какое-то быстрореализуемое преимущество, не дающее часто-появляющимся дочерним клонам вытеснить родительские популяции.

Однако, мы не можем утверждать, что частота появления мутаций “бесплодности” (на один вид на поколение) намного больше у циклически-партеногенетических организмов, поскольку у них, как и у облигатно-половых организмов, существует множество ограничений, препятствующих появлению бесполой линии. Например, у тлей образование покоящихся яиц, способных переносить зиму, неразрывно связано с половым размножением, в связи с чем, в холодном климате не известны облигатно-бесполое популяции тлей (Simon et al., 2002). Важно отметить, что в тёплом климате, где нет необходимости в производстве покоящихся яиц, в некоторых популяциях тлей половое размножение исчезает (Delmotte et al., 2001; Simon et al., 2002) что подтверждает долгосрочное преимущество рекомбинации генов: когда переход к бесполому размножению возможен - он осуществляется. Более сложным оказывается вопрос вытеснения факультативно-половых популяций своими дочерними клонами. Возможно, более изменчивая экологическая ниша родительской популяции позволяет избежать сильной конкуренции с бесполой дочерней популяцией.

Тот факт, что большинство существующих бесполой видов имеют факультативно-половых предков (Hebert, 1988), может иметь два объяснения. Первое: мутации “бесплодности” у факультативно-половых популяций происходят чаще, а вымирают все бесполое линии равномерно, вне зависимости от способа размножения своего предка. Второе: мутации “бесплодности” происходят более-менее равномерно во всех таксонах с разными формами размножения, однако, срок жизни бесполой популяций различен: он оказывается значимо большим в случае происхождения от факультативно-полового предка (смотрите главу 2).

Важная роль храповика была показана в эволюции РНК-содержащих вирусов (Chao, 1997). Широко известно, что нерекombинирующие участки ДНК, такие как Y-хромосома (Charlesworth, Charlesworth, 2000) и геном митохондрий млекопитающих (Lynch, 1996, 1997; Saccone et al., 2000), ранее подвергались деградации, в результате чего количество функциональных генов в них сильно уменьшилось. Вопросы современной деградации нерекombинирующих участков ДНК обсуждаются в главе 3.

Один из основных эмпирических аргументов в пользу храповика Мёллера – это характер распределения бесполой таксонов (Maynard Smith, 1978): большинство бесполой линий расположено на концевых ветвях филогенетических деревьев, то есть облигатно бесполое таксоны никогда не бывают крупными (чаще всего это виды и роды) и существуют весьма короткий срок. Единственное крупное и хорошо изученное исключение из этого правила – это коловратки *Bdelloidea* (Mark Welch, Meselson, 2000).

1.3. Происхождение рекомбинации, амфимиксиса и анизогамии.

Большинство авторов (Kondrashov, 1993; Maynard Smith, 1978; Barton, Charlesworth, 1999) рассматривает вопросы происхождения и поддержания полового размножения отдельно, однако, мы полагаем, что особенности возникновения любого признака могут сказываться на механизмах его поддержания. В связи с этим, мы анализируем ступенчатое происхождение полового размножения эукариот и возможные адаптивные преимущества каждого шага.

1.3.1. Происхождение рекомбинации. Первая живая РНК-молекула (рибозим), по-видимому была способна к рекомбинации с другими такими же молекулами за счёт механизма автосплайсинга (Thomas Cech, 2004). Генетическая рекомбинация посредством трансформации, конъюгации и трансдукции - важный фактор эволюции большинства бактерий (Maynard Smith, 1993; Guttman, Dykhuizen 1994; Doolittle, 2003). Однако, все три варианта рекомбинации у бактерий могли появиться как побочный результат других процессов, не направленных на производство генетически изменчивого потомства. Вектор-обусловленная конъюгация и трансдукция приводят к распространению плазмид и фагов, но при этом побочным образом происходит и генетический обмен. Трансформация же, помимо рекомбинантной роли, может играть важную роль в репарации двуцепочечных разрывов (Michod, 1988) и использовании ДНК в качестве источника питательных веществ. Хорошие экспериментальные данные существуют для самой последней функции трансформации – переваривания ДНК (Redfield, 1993). Таким образом, представляется сомнительным, что генетическая рекомбинация бактерий возникла из-за краткосрочного преимущества рекомбинантного потомства.

1.3.2. Происхождение факультативного амфимиксиса. Поддержание генетического обмена у эукариот теми прямыми и простыми способами как это происходит у прокариот, скорее всего, невозможно из-за более сложного уровня компарментализации ДНК. В результате, должен был появиться такой более специализированный процесс, как мейоз. Возможно, что инициализировать появление древнего мейоза могли мобильные генетические элементы (Hickey 1982; Hickey, Rose 1988; Hickey 1993; Bell, 1993), сходным образом, как F-плазида детерминирует конъюгацию *E. coli*. Таким образом, появление амфимиксиса эукариот также могло быть индуцировано мобильными элементами, которым для заражения новых геномов необходим процесс генетической рекомбинации.

Происхождение генетической рекомбинации бактерий и амфимиксиса эукариот за счёт факторов, напрямую не связанных с повышенной адаптацией рекомбинантного потомства делает более вероятным нынешнее поддержание этих процессов за счёт долгосрочного преимущества (Попадьин, 2003). В классической работе Мэйнард Смита (Maynard Smith, 1964) показано, что наиболее сложный этап в фиксации признака, выгодного группе - это образование изолированной группы особей, обладающих “социальным” геном (который выгоден группе но не организму). Такая группа особей может образоваться только за счёт генетического дрейфа, к тому же она не устойчива

к проникновению “анти-социальных” организмов. Однако, если ген “социальности” имеет способность к инфекционно-подобному распространению, то картина меняется. Поскольку F-плазида активно распространяется сама и “анти-социальные” особи (бесполое организмы без F-плазмиды), после заражения F-плазмидой становятся “социальными”, то существование группы “социальных” особей не является маловероятным.

1.3.3. Происхождение облигатного амфимиксиса. Первые половые эукариоты, по-видимому, были факультативно половыми, как большинство современных протист, а дальнейшее появление облигатного полового размножения хорошо коррелирует с происхождением многоклеточности (Dack, Roger, 1999). Таким образом, на протяжении последующей эволюции эукариот, половое размножение становилось всё более регулярным и облигатным, что можно связать с повышением общего уровня организации и сложностью комбинирования двух альтернативных способов размножения в одном жизненном цикле так, как это происходит у редких таксонов циклически-партеногенетических организмов (Hebert, 1988).

1.3.4. Происхождение анизогамии. С последним эволюционным приобретением эукариот – анизогамией, возникла проблема “цены самцов” и “парадокс полового размножения”. “Цена самцов” – цена анизогамии, а не полового размножения, поэтому, вероятнее всего, компенсировать эту цену в эволюции должен был процесс, появившийся одновременно с анизогамией (Hickey, 2000) – а именно, половой отбор. Таким образом, мы считаем, что “цена самцов” должна полностью компенсироваться преимуществом самцов, обусловленным мощным половым отбором (смотрите гипотезу Мэннинга), а не чем-то другим.

Таким образом, следует отказаться от тезиса о двукратном преимуществе бесполого размножения и стараться объяснить универсальность генетической рекомбинации и амфимиксиса.

ГЛАВА 2. ПРОИСХОЖДЕНИЕ БЕСПОЛЫХ ВИДОВ

В данной главе рассматриваются причины и следствия пониженного темпа мутирования бесполой видов, а также формулируется гипотеза, объясняющая происхождение высоко приспособленных бесполой популяций.

2.1. Темп мутирования бесполой видов. Существует три возможные причины более низкого темпа мутирования бесполой и факультативно-половых организмов по сравнению с облигатно-половыми.

2.1.1. Повышенная мутагенность самцов (male-driven evolution) хорошо доказана для приматов, птиц и грызунов (Li et al., 2002; Hurst, Ellegren, 1998; Lander et al., 2001). У приматов, например, темп мутирования самцов в 4-6 раз выше темпа мутирования самок. Причины повышенной мутагенности самцов связываются с большим количеством митотических делений гамет самцов по сравнению с самками. Причём, отношение числа клеточных делений половых клеток самцов и самок примерно совпадает с обнаруженным соотношением числа новых мутаций у самцов и самок (Li et al., 2002).

2.1.2. Мутагенность генетической рекомбинации. При сравнении геномов человека и мыши обнаружена положительная корреляция между частотой

рекомбинации определённого участка ДНК и полиморфизма нуклеотидов на нём (Leurcher, Hurst, 2002). Также при анализе небольшого по размеру, но подверженного интенсивной рекомбинации, псевдоаутосомного региона Y хромосомы обнаружен избыточный полиморфизм нуклеотидов (Filatov, Gerrard, 2003; Filatov, 2004). Оба эти факта косвенно свидетельствуют о мутагенности рекомбинации – то есть там, где выше частота рекомбинации, чаще появляются новые точечные мутации. Причина мутагенности рекомбинации может заключаться в неточной репарации двуцепочечных разрывов ДНК, которые инициируют процесс рекомбинации.

2.1.3. Инактивация вредных, вертикально распространяющихся мобильных элементов в бесполом линиях. Хорошо известно, что транспозоны благодаря своей способности к внутригеномной репликации достаточно быстро могут распространяться (заражать новые геномы) в половой популяции (Hickey, 1982). Однако их эволюционная динамика после распространения, то есть после того, как каждый индивидуум будет нести в своём генотипе мобильные элементы, менее понятна (Charlesworth et al., 1994) и, скорее всего, она зависит от формы размножения хозяйской популяции (половое или бесполое).

При бесполом размножении, когда количество транспозонов в геноме сильнее контролируется внутренними причинами (скоростью размножения уже имеющихся транспозонов) а не внешними (заражением новыми транспозонами) адаптивным становится появление саморегулирующих механизмов скорости транспозиции мобильных элементов (Charlesworth, Langley, 1986). Саморегуляция появляется поскольку мобильные элементы не могут заразить новый геном, и их приспособленность уравнивается с приспособленностью обычных менделирующих генов. В результате, преимущество получают те транспозоны, которые инактивируются и не вызывают падения приспособленности хозяина. Таким образом, у бесполом организмов количество транспозонов должно стремиться к нулю. Это утверждение не относится к тем элементам, которые имеют высокую частоту горизонтального переноса (например, *matiner-like* элементы), поскольку ими будут заражаться даже бесполое геномы.

Экспериментальное подтверждение инактивации вредных мобильных элементов в бесполом геномах было получено на древних бесполом коловратках *Vdelloidea* (Arkhipova, Meselson, 2000), и на большей части симбиотической ДНК в эукариотическом геноме (Zeyl, Bell, 1996; Burt, Trivers, 1998). Поскольку при перемещении мобильные элементы индуцируют появление точечных мутаций, отсутствие элементов или их неактивное состояние будет уменьшать темп мутирования примерно в 2 раза (Nuzhdin, 1996).

Таким образом, все три рассмотренные выше причины должны приводить к значительному снижению темпа мутирования бесполом линий (в 10-30 раз). В факультативно-половых популяциях темп мутирования также будет снижаться: редкое половое размножение (один раз в сезон, как, например, у циклически-партеногенетических *Daphnia*) автоматически приводит, к уменьшению вклада в потомство мутантных генов самцов и

мутаций, появляющихся при мейозе. Также, во время бесполой фаз жизненного цикла действуют регулирующие механизмы (Ribeiro-dos-Santos et al., 1997, Zeyl et al., 1994; Sullender, Crease, 2001), направленные на инактивацию мобильных элементов.

Следует подчеркнуть, что все причины повышенного темпа мутирования половых организмов заключаются в половом размножении самом по себе: транспозоны распространяются только в половых популяциях, самцы и мейоз существуют только в половых популяциях. Таким образом, сомнительным становится утверждение о том, что половое размножение возникло, из-за необходимости эффективной борьбы с вредными мутациями.

2.2. Гипотеза подвижного мутационно-селективного равновесия.

Возникает вопрос – каким образом, пониженный темп мутирования бесполой и факультативно-половых организмов может влиять на происхождение бесполой видов, то есть на переход от полового размножения к бесполому?

Распределение слабо-вредных мутаций в популяции зависит от темпа мутирования (количества новых мутаций на геном на поколение U), формы размножения (половое или бесполое) и функции приспособленности. Приспособленность организма определяется как функция вредных мутаций, содержащихся в нём:

$$f_i = \exp^{(-i\alpha - i^2\beta)}$$

где i - количество слабо-вредных мутаций,

α - коэффициент отбора против новой слабо-вредной мутации,

β – коэффициент эпистатического взаимодействия между мутациями.

Если $\beta=0$, то функция приспособленности считается аддитивной, поскольку приспособленность падает линейно с увеличением числа мутаций; если $\beta>0$ - эпистатической, поскольку приспособленность организма падает быстрее чем линейно, в связи с положительным эпистазом между вредными мутациями.

Зная все, перечисленные выше параметры (форма размножения, темп мутирования и функция приспособленности), можно определить значение мутационного груза (L) - средней доли потомства, погибаемой в результате элиминации новых мутаций (Crow, 1958) и, как следствие, среднюю приспособленность популяции $\bar{W} = 1 - L$.

При положительном эпистазе ($\beta>0$) в половой популяции существует возможность элиминации сразу нескольких мутаций гибелью одной особи (Kimura, Maruyama, 1966). В бесполой популяции эпистатический отбор не приводит к снижению мутационного груза, поскольку без рекомбинации мутантные гены должны быть элиминированы в тех же комбинациях, как они и произошли. Это различие половых и бесполой популяций, при прочих равных, обеспечивает повышение приспособленности половой популяции (Kondrashov, 1982, 1988).

Однако, обсуждаемый нами выше пониженный темп мутирования бесполой линий, является серьёзным нарушением предположения о “всех прочих равных”. Редфилд (Redfield, 1994) показала, что увеличение приспособленности бесполой популяции из-за пониженного темпа мутирования может быть таким же или даже более сильным чем увеличение

приспособленности половой популяции, обусловленное эпистатическим взаимодействием вредных мутаций. Таким образом, пониженный темп мутирования бесполой линии приводит к ослаблению мутационной детерминистической гипотезы.

В своих моделях Редфилд полагала, что количество мутаций в геноме первого бесполого организма равно нулю. Однако, насколько реально это предположение? Ниже мы количественно оценим причины и последствия ненулевого числа вредных мутаций в первом бесполом организме и сформулируем гипотезу подвижного мутационно-селективного равновесия.

Если средний коэффициент отбора достаточно мал ($\alpha < 0.002$, Keightley, 1999), темп мутирования высок ($U > 1$), а функция приспособленности аддитивна ($\beta \rightarrow 0$, Elena, Lenski, 1997; Lenski et al., 1999), то в геноме полового организма, в среднем, будет содержаться большое число мутаций и даже в “наилучшем” (наименее отягощённым вредными мутациями) варианте число мутаций может быть не нулевым.

Для того, чтобы оценить – с каким минимальным числом мутаций в родительской половой популяции может появиться бесполой организм, мы обратились к аппроксимациям Чарльзуорса (уравнение 3 и 11, Charlesworth, 1990), позволившим по данным α , β и U , найти среднее число вредных мутаций n и их дисперсию V . Численно получая среднее и дисперсию распределения вредных мутаций, мы определяли число мутаций у “наилучшего” организма, как среднее минус три стандартных отклонения, что по правилу трёх сигм для нормально распределённой случайной величины означает вероятность 0.00135.

Выбирая наименее отягощённый мутациями организм в качестве родоначальника бесполой популяции, мы находили оптимальную стратегию бесполой популяции, которой должен благоприятствовать естественный отбор. Число мутаций у “наилучшего” организма в половой популяции при разных параметрах функции приспособленности представлены в таблице 1.

Таблица 1. Количество мутаций у “наилучшего” организма из половой популяции в зависимости от темпа мутирования (U), коэффициента отбора (α) и силы эпистаза (β).

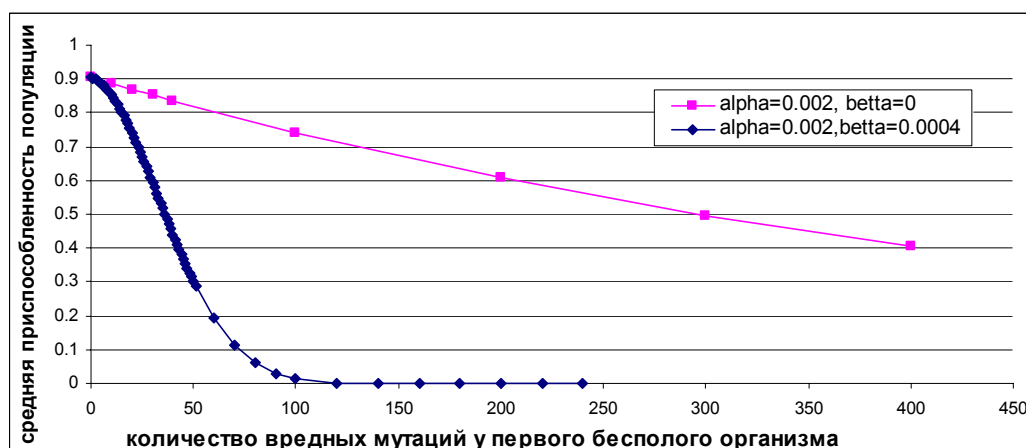
$\alpha / \beta \backslash U$	0.1	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5
0.002/0.004	0	0	2	4	5	7	8	9
0.002/0.0004	1	10	17	24	29	35	39	44
0.002/0	29	203	433	668	905	1144	1384	1625

Из таблицы видно, что “наилучшие” организмы популяции содержат 0 мутаций только при очень низком темпе мутирования ($U = 0.1 - 0.5$) и сильном положительном эпистазе ($\beta = 0.004$). Во всех остальных случаях, наилучший организм содержит десятки или даже сотни мутаций.

Из этого следует, что если бесполой популяция берёт начало от “наилучшего” организма из половой популяции с темпом мутирования $U > 1$, то такой родоначальник уже имеет ненулевой запас вредных мутаций. Очевидно, это должно влиять на среднюю приспособленность бесполой популяции: чем

большее число мутаций имеет родоначальник, тем меньше будет средняя приспособленность популяции. Для того, чтобы оценить количественно, как влияет число мутаций в первом бесполом организме на среднюю приспособленность бесполой популяции, мы итерировали формулу 3.1 Кимуры и Маруямы (Kimura, Maruyama, 1966) начиная с разного числа мутаций у первого организма. Полученные зависимости, представлены на рисунке 1.

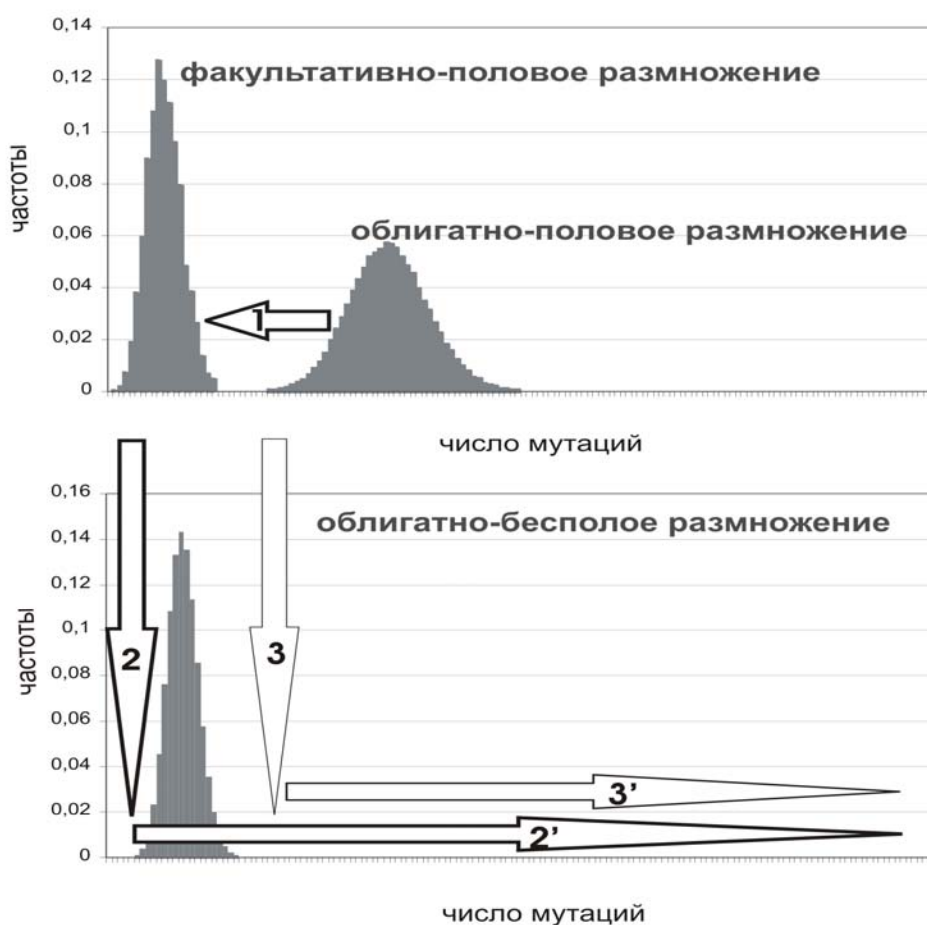
Рисунок 1. Средняя приспособленность бесполой популяции в зависимости от количества вредных мутаций у первого бесполого организма. $U = 0.1$.



Как и ожидалось, средняя приспособленность уменьшается с увеличением числа мутаций у первого организма: линейно в мультипликативном случае, и нелинейно при эпистатической функции приспособленности. Бесполой популяция, произошедшая от наименее отягощенного мутациями организма, будет иметь большую среднюю приспособленность и, соответственно, отбор будет благоприятствовать ей. То есть, отбор благоприятствует тем бесполой популяциям, которые ведут начало от половых популяций с низким темпом мутирования, то есть, от факультативно-половых популяций (смотрите пункт 2.1). Факультативно-половая популяция обладает подвижным мутационно-селективным равновесием: редкое половое размножение позволяет сдвигать распределение вредных мутаций ближе к нулю (рис. 2, стрелка 1). Именно от такой факультативно-половой популяции могут произойти высоко-приспособленные бесполой популяции (рис. 2, стрелка 2).

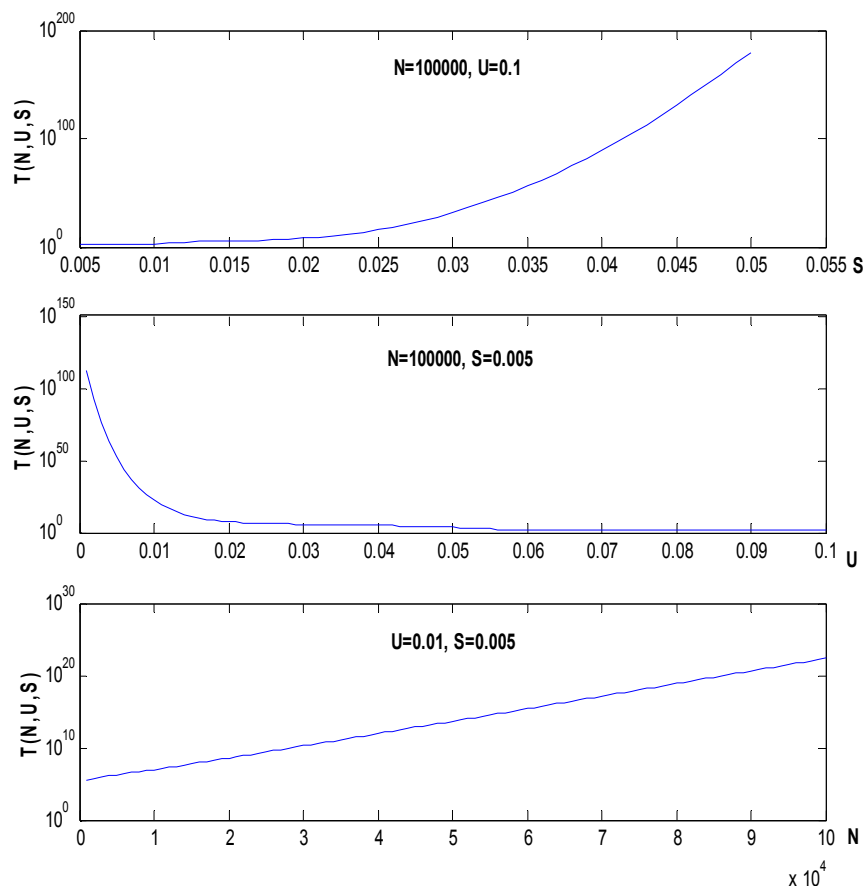
Рисунок 2. Гипотеза подвижного мутационно-селективного равновесия.

Облигатно-половая популяция отличается высокой частотой мутирования и большим количеством вредных мутаций. Произшедшая от неё факультативно-половая популяция уменьшает темп мутирования и распределение вредных мутаций сдвигается ближе к нулю [1]. Бесполой мутант, возникший в факультативно-половой популяции, даст начало высоко приспособленной бесполой популяции [2], тогда как бесполой мутант, возникший в облигатно-половой популяции даст начало бесполой популяции с меньшей средней приспособленностью [3]. Распределение вредных мутаций бесполой популяций будет плавно сдвигаться вправо [2', 3'], что обусловлено в основном накоплением слабо вредных мутаций (Храповик Мёллера) и увеличивающимся со временем прессом паразитов (гипотеза Чёрной Королевы). Максимальным эволюционным потенциалом обладает бесполой популяция, произошедшая от факультативно-полового предка (длина стрелки 2' > длины стрелки 3').



В возникшей бесполой популяции, её средняя приспособленность, как правило, плавно уменьшается, за счёт накопления слабо вредных мутаций и / или усиливающегося пресса паразитов (Howard, Lively, 1994). Хотя период движения храповика (число поколений, за которое количество вредных мутаций у наилучшего организма популяции увеличивается на один, $T_{(N,U,S)}$) остаётся предметом дискуссий, его можно вывести (Gordo, Charlesworth 2000a; 2000b) исходя из данных по численности популяции (N), темпу мутирования (U) и коэффициенту оборота мутации ($S=\alpha$). Формулы были численно проинтегрированы и результаты представлены на рис. 3.

Рис. 3. Период движения храповика (T) в зависимости от эффективной численности популяции - N (нижний график), темпа мутирования - U (график в центре) и среднего коэффициента отбора против мутаций - S (верхний график).



Из рисунка 3 видно, что частота движения храповика ($1/T$) зависит от обсуждаемых параметров: она сильно замедляется с

увеличением среднего коэффициента отбора мутаций (s), а также при уменьшении темпа мутирования и увеличении численности популяции.

Оценим, насколько увеличивается эволюционный потенциал бесполой популяции **A**, произошедшей от факультативно-полового предка (ноль мутаций у основателя, рис. 2 стрелка 2'), по сравнению с потенциалом бесполой популяции **B**, произошедшей напрямую от облигатно-половой популяции (число мутаций у основателя равно числу мутаций у "наилучшего" организма половой популяции, рис. 2 стрелка 3'). Эта разница может быть определена как число поколений популяции **A**, в течение которых она накопит столько мутаций, сколько изначально было в популяции **B**. Сравнение двух гипотетических ситуаций (табл. 2) показывает, что разница между эволюционными потенциалами популяций **A** и **B** зависит как от числа мутаций у основателей популяций ($N_{\min B} - N_{\min A}$), так и от частоты движения храповика ($1/T_{(N, U, S)}$). Если в первой строке ($S=0.002$), больший вклад вносит разница в числе мутаций ($N_{\min B} - N_{\min A} = 905$), и храповик двигается достаточно быстро (за одно поколение накапливается $1/T=0.002$ мутации), то во второй строке ($S=0.02$), небольшая разница в числе мутаций ($N_{\min B} - N_{\min A} = 70$) на фоне очень низкой частоты движения храповика (за одно поколение накапливается $1/T=1.3 \cdot 10^{-8}$ мутации) приводит к огромной разнице в эволюционном потенциале между популяцией **A** и **B**. Это колоссальное различие обусловлено увеличением коэффициента отбора S в 10 раз.

Таблица 2. Параметры бесполой популяции, произошедших непосредственно от облигатно-половой популяции (В) или факультативно-половой популяции (А). Во всех случаях предполагается отсутствие эпистаза ($\beta=0$). Коэффициент отбора S эквивалентен используемому ранее коэффициенту α . $T_{(N,U,S)}$ =количество поколений, необходимое для одного поворота храповика (период движения храповика).

половая популяция $U=2$	популяция В $U=0.1; N=100000;$	популяция А $U=0.1; N=100000;$
$S=0.002$, “наилучший” организм имеет 905 мутаций.	$S=0.002$, основатель популяции имеет 905 мутаций.	$S=0.002$, основатель популяции имеет 0 мутаций; $T_{(N,U,S)}=484 \rightarrow$ распределение вредных мутаций популяции А и В сравняется через $905 \cdot 484=438\,020$ поколений.
$S=0.02$, “наилучший” организм имеет 70 мутаций	$S=0.02$, основатель популяции имеет 70 мутаций.	$S=0.02$, основатель популяции имеет 0 мутаций; $T_{(N,U,S)}=77496548 \rightarrow$ распределение вредных мутаций популяции А и В сравняется через $70 \cdot 77496548=5\,424\,758\,360$ поколений

Итак, принимая гипотезу подвижного мутационно-селективного равновесия, мы получаем, что бесполое популяции, произошедшие от факультативно-полового предка, имеют больший эволюционный потенциал. Если в ближайшее время, мы научимся достаточно точно определять возраст прекращения мейоза в любой бесполой популяции, то будет возможна эмпирическая проверка этой гипотезы: бесполое потомки факультативно-половых популяций должны иметь больший возраст. На данный момент два древних бесполой таксона, время потери мейоза у которых датировано с помощью генетических (Mark Welch, Meselson, 2000) и палеонтологических (Martens et al., 2003) методов, подтверждают эту гипотезу: оба эти таксона имеют близких родственников, с циклическим партеногенезом (Monogononta – родственники Bdelloidea, Mark Welch, Meselson, 2001) или смешанным размножением (Cypridoidea – родственники Darwinulioidea, Schon et al. 2003) и, вероятнее всего, предок древних бесполой таксонов в обоих случаях был факультативно-половым.

ГЛАВА 3. ПОДДЕРЖАНИЕ БЕСПОЛЫХ ЛИНИЙ: ПРИЧИНЫ ЭВОЛЮЦИОННОГО УСПЕХА ДРЕВНИХ БЕСПОЛЫХ ЛИНИЙ

Для бесполой организмов, на которые приходится не более 1% от общего числа видов эукариот, характерна короткая эволюционная история и отсутствие дочерних бесполой таксонов (Maynard Smith, 1978). Именно поэтому переход полового размножения к бесполому ранее считался эволюционным тупиком.

Однако, недавно появились достаточно убедительные данные, доказывающие, что успешно существующие Bdelloidea и Darwinulidae потеряли половое размножение много миллионов лет назад. Соответственно, отсутствие полового размножения не обязательно приводит к раннему вымиранию, и иногда бесполое виды оказываются весьма успешными. Каковы условия этого успеха? Ответить на этот вопрос можно, перебирая все особенности древних бесполой организмов. Помимо недавно открытых древних бесполой организмов, широко известны древние нерекombинирующие участки ДНК, такие как Y хромосома и митохондриальный геном.

Для поиска универсальных адаптивных механизмов “бесполой” эволюции ниже мы перечислим экологические и генетические особенности древних бесполок видов, и нерекombинирующих участков ДНК.

Bdelloidea

1. Не менее 360 бесполок видов, радирировавших от бесполого предка, огромная численность популяций, космополитизм (Wallace, Ricci, 2002).
2. Способность к ангидробиозу – полному обезвоживанию на любой стадии жизненного цикла, после которого повышается приспособленность коловраток (Ricci et al., 2003; Ricci, 2004), возможно из-за избавления их от паразитов (Meselson, 2004). Таким образом, ангидробиоз можно воспринимать, как защиту коловраток от пресса паразитов способом, альтернативным быстрому темпу эволюции.
3. “Эффект Меселсона” – большая степень дивергенции бывших аллелей (Birky, 1996; Mark Welch, Meselson, 2000), способная увеличивать приспособленность коловраток путём гетерозиса, а также приводить к появлению генов с новой функцией и, таким образом объяснять разнообразие экологических ниш Bdelloidea.
4. Повышенное число копий генов белка теплового шока hsp82 (Mark Welch, Meselson, 2000), которые могут маскировать эффект вредных мутаций, накопленных в протеин-кодирующих генах (Fares et al., 2002).
5. Полное отсутствие активных LTR и non-LTR ретротранспозонов (Arkhipova, Meselson, 2000) и необычно низкое количество копий (1-2 на геном) PLE (Penelope-Like Element) ретротранспозонов (Arkhipova et al., 2003) должно приводить к пониженному темпу мутирования.

Darwinulidae (*Darwinula stevensoni*)

1. Низкий уровень гетерозиготности, который может объясняться крайне низким темпом мутирования, либо митотической генной конверсией, способной сдерживать накопление вредных мутаций и даже имитировать генетическую рекомбинацию (Gandolfi et al., 2001a).
2. Крайне низкая внутривидовая генетическая изменчивость (Schoen, Martens, 2003), обычно объясняемую очень низким темпом фиксации новых мутаций.
3. Низкая генетическая изменчивость между африканскими и европейскими популяциями *D. stevensoni* объясняется в 10 раз более медленным темпом молекулярной эволюции ядерных генов *D. stevensoni* по сравнению с другими беспозвоночными (Schoen et al., 2003). Авторы полагают, что *D. stevensoni* демонстрирует GPG (General-Purpose Genotype) стратегию (Lynch, 1984): то есть *D. stevensoni* обладает широкой нормой реакции, позволяющей ему успешно существовать в большом диапазоне условий. Залогом эволюционного и экологического успеха было его сохранение в неизменном состоянии, что могло достигаться снижением темпа фиксации новых мутаций за счёт низкого темпа мутирования и митотической генной конверсии.
4. Широкая толерантность этого вида к солёности и температуре (Van Doninck et al., 2002; Van Doninck et al., 2003a) объясняет космополитическое распространение этого вида (он обитает на всех

континентах кроме Антарктики) и подтверждает существование GPG у *D. stevensoni*.

Y хромосома

1. X и Y хромосомы млекопитающих произошли от аутомсомной пары гомологичных хромосом не ранее чем 300 миллионов лет назад. За это время Y хромосома потеряла около 1470 генов, т.е. примерно 5 генов за каждый миллион лет.
2. Специфичный для самцов участок Y хромосомы человека и шимпанзе содержит множественные повторы девяти присутствующих там генов, большинство из которых собраны в палиндромы (последовательности, которые читаются одинаково на обеих комплементарных цепочках ДНК). Медленный темп молекулярной эволюции этих генов и большая степень схожести между копиями генов внутри одного палиндрома (более чем 99.9%) обусловлены интенсивной генной конверсией между копиями генов внутри Y хромосомы.

Митохондриальный геном

1. Митохондриальный геном всех эукариот является реликтом генома древней свободноживущей α протеобактерии, наиболее близким современным представителем которой является *Rickettsia prowasekii* (Andersson et al., 1998). Большинство генов прото-митохондрии мигрировало в эукариотическое ядро, где они заменяли или дополняли резидентные гены архейного происхождения (Doolittle 1998; Rivera, Lake, 2004). В результате этой геномной редукции сейчас в митохондриях содержится от 37 генов у человека (22тРНК, 2рРНК, 13 протеин-кодирующих генов дыхательной цепи) до 97 генов (<2% от генома *E.coli*) у пресноводного протиста *Reclinomonas americana* (Lang et al. 1997).
2. Недавно Линг и Шибата (Ling, Shibata, 2004) обнаружили белок, который обеспечивает наследование только одной молекулы митохондриальной ДНК из всех содержащихся в эукариотической клетке. Последующая репликация данной молекулы приводит к быстрому восстановлению гомоплазии, то есть идентичности всех митохондриальных геномов внутри организма.
3. В раннем эмбриональном развитии млекопитающих существует апоптоз яйцеклеток, которому подвергаются, в основном, яйцеклетки с мутантными митохондриями (Krakauer, Mira, 1999; Perez et al., 2000). Таким образом, адаптивной ролью апоптоза может быть остановка деградации митохондрий.

Среди специфических характеристик древних бесполок линий, важное место занимают механизмы, понижающие темп появления и фиксации слабостремных мутаций. Митотическая конверсия генов у *Darwinula stevensoni*, внутривхромосомная конверсия на палиндромах Y хромосомы и восстановление гомоплазии митохондрии за счёт репликации одной молекулы ДНК приводят к одинаковым последствиям: если аллель дикого типа заместит мутантный, то эта ситуация будет эквивалентна обратной мутации, восстанавливающей нормальную функцию гена; если же амплифицируется мутантный аллель, то в результате сильного падения приспособленности данный организм (хромосома)

с большей вероятностью элиминируется отбором. Таким образом, возрастание дисперсии числа слабо-вредных мутаций в популяциях бесполок линий увеличивает эффективность отбора (Ohta, 1988) и может останавливать накопление вредных мутаций (Charlesworth, 2003; Попадьян, Мамирова, 2004).

Происхождение всех этих механизмов не может быть связано с остановкой накопления слабо-вредных мутаций из-за долгосрочности их эффекта, однако тот факт что большинство древних бесполок линий имеют эти механизмы свидетельствует о прошедшем отборе (вымерли все бесполое виды, не имеющие эффективные механизмы защиты от накопления вредных мутаций) и говорит о важности низкого темпа фиксации новых мутаций для существования древних бесполок линий.

Надо отметить, что хотя вопрос о накоплении вредных мутаций в митохондриальном геноме и Y хромосоме (Gerrard, Filatov, 2005) остаётся открытым, молодые_нерекомбинирующие участки ДНК, демонстрируют явные признаки деградации. Так, при образовании около двух миллионов лет назад нео-Y хромосомы *Drosophila miranda* путём слияния аутосомы с Y хромосомой, “аутосомные” гены стали наследоваться вместе с генами Y хромосомы, т.е. “бесполо”, и нео-Y хромосома начала терять функциональные гены и накапливать слабо-вредные мутации (Bachtrog, Charlesworth, 2002). Аналогично, процесс накопления вредных мутаций был обнаружен в нескольких видах эндосимбиотических (Moran, 1996) и паразитических (Andersson et al., 1998) бактерий (Wernegreen, 2002), которые в связи с внутриклеточным образом жизни, так же как и митохондрии, имеют цитоплазматическое материнское наследование и небольшой эффективный размер популяции внутри клетки.

3.2.1 Сравнение силы очищающего отбора в генах митохондрий и α -протеобактерий. Возникает вопрос – насколько эффективно описанные выше механизмы, увеличивающие дисперсию числа вредных мутаций в популяциях бесполок линий, работают против накопления вредных мутаций?

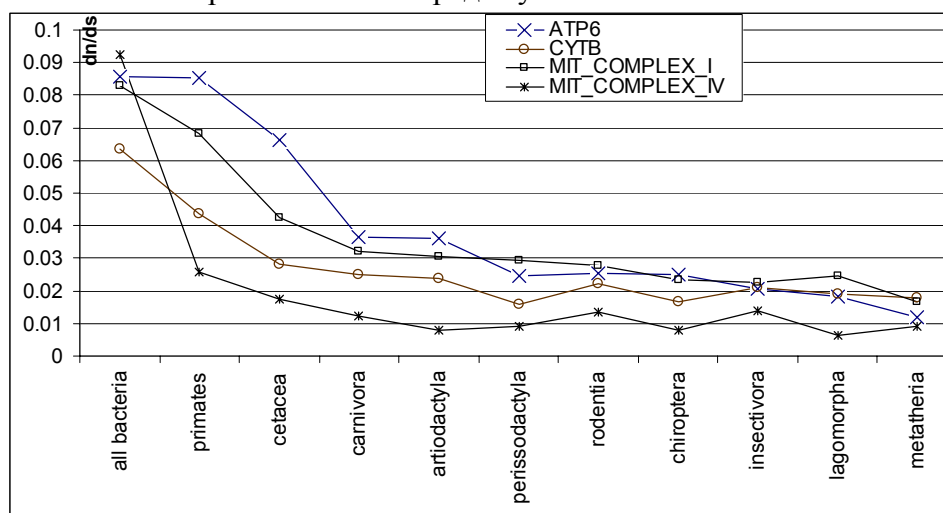
Для выяснения особенностей эволюции нерекомбинирующих участков ДНК удобно сравнивать гомологичные участки, которые в силу определённых причин в одних организмах подвергаются гомологичной рекомбинации, а в других не подвергаются. Идеальными с этой точки зрения являются гены окислительного фосфорилирования, кодирующие белковые комплексы (комплекс I – комплекс V) дыхательной цепи - у прокариот они подвергаются генетической рекомбинации, а в митохондриях млекопитающих - клонально. Поскольку свободноживущие бактерии (которых большинство среди всех анализируемых нами α -протеобактерий) способны к обмену генетическим материалом, мы *a priori* не ожидаем увидеть у них накопление слабо-вредных мутаций. Ниже мы сравниваем *in silico* гены-ортологи дыхательной цепи прокариот и митохондрий млекопитающих.

Методика. На данный момент секвенировано более 100 митохондриальных геномов млекопитающих и более двадцати полных геномов α -протеобактерий. Каждый митохондриальный геном млекопитающих содержит 13 протеин-кодирующих генов, семь из которых (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) кодируют субъединицы комплекса I дыхательной цепи

(NADH: убихинон-оксидоредуктаза), один (CYTB) – субъединицу комплекса III дыхательной цепи (убихинон: цитохром С – оксидоредуктаза), три (COX1, COX2, COX3) - субъединицы комплекса IV дыхательной цепи (цитохром С – оксидаза) и два (ATP6, ATP8) - субъединицы комплекса V дыхательной цепи (АТФаза). Для 11 из этих 13 генов (все кроме ND6 и ATP8) были найдены ортологи среди всех α -протеобактерий с помощью программы p-BLAST (Altschul et al., 1997) как двунаправленные лучшие совпадения между тремя геномами (Tatusov et al., 1997). Белки-ортологи α -протеобактерий и митохондрий были выравнены с помощью программы CLUSTEL.X (Thompson et al., 1994). На основе выравненных аминокислотных последовательностей были получены выравнивания соответствующих последовательностей ДНК. Далее все гены, кодирующие субъединицы одного и того же комплекса, были сшиты в одну последовательность, в результате чего получилось четыре последовательности для каждого вида (I = ND1+ND2+ND3+ND4L+ND4+ND5; III=CYTB; IV=COX1+COX2+COX3; V=ATP6).

В пределах группы α -протеобактерий и для отдельных отрядов млекопитающих были получены все возможные парные комбинации видов (то есть из n видов получается $\frac{n!}{2(n-2)!}$ разных сочетаний по два вида). Полагая, что нуклеотидные замещения, ведущие к замене аминокислот (dN - несинонимичные замещения) более вредны, чем нуклеотидные замещения, не ведущие к замене аминокислот (dS - синонимичные замещения), мерой очищающего отбора мы считаем отношение числа несинонимичных мутаций к числу синонимичных (dN/dS), накопившихся с момента дивергенции последовательностей ДНК сравниваемых видов. С помощью программы codeml пакета PAML (Yang, 1997) для каждой пары видов был подсчитан dN/dS и длина дерева. При анализе результатов использовались только те пары видов, степень дивергенции которых не превышала 7, поскольку именно в этом диапазоне уместилось большинство пар видов. Средние значения dN/dS для каждого комплекса представлены на рис. 4.

Рисунок 4. Средние значения dN/dS для α -протеобактерий и основных отрядов млекопитающих для 4-х комплексов дыхательной цепи. Отряды млекопитающих располагаются на оси X справа налево в порядке уменьшения их dN/dS.



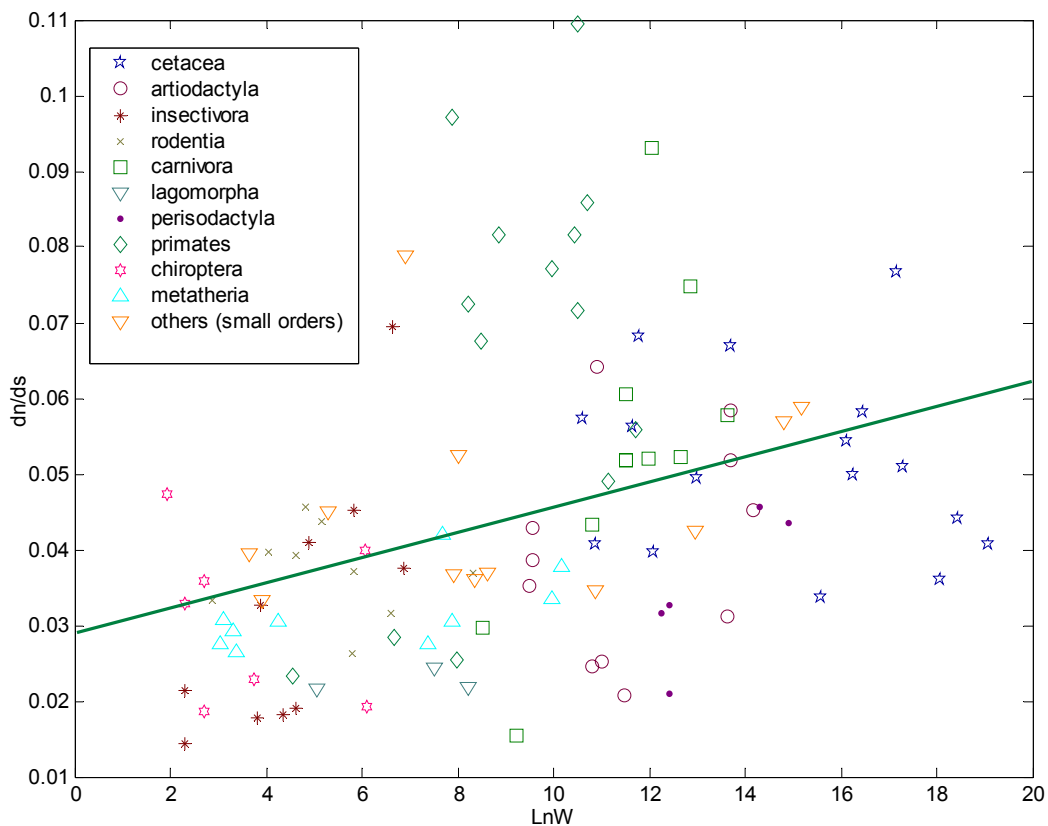
Из графика видно, что dN/dS митохондриальных генов в среднем меньше dN/dS бактериальных генов для всех четырёх комплексов (используя тест Уилкоксона, мы сравнили распределение величин dN/dS бактерий для каждого комплекса с соответствующими данными для каждого отряда млекопитающих - лишь в случае пятого комплекса китообразных, а также первого и пятого комплексов приматов, мы не смогли отвергнуть нулевую гипотезу о равенстве медиан двух сравниваемых выборок). Важно отметить, что удаление из α -протеобактерий всех представителей облигатно паразитической группы риккетсиевых, характеризующихся повышенными значениями dN/dS (Andersson et al., 1998), качественно не повлияло на результаты. Таким образом, можно утверждать, что dN/dS свободноживущих α -протеобактерий больше чем dN/dS митохондрий млекопитающих. Так как свободноживущие бактерии способны к обмену генетическим материалом, мы не ожидаем увидеть у них накопление слабо-вредных мутаций. Более низкие значения dN/dS генов митохондрий свидетельствуют, что в митохондриальных геномах также не происходит накопления вредных мутаций. Этот вывод противоречит работам Линча (Lynch, 1996; Lynch, 1997; Lynch, Blanchard, 1998), в которых была показана деграция митохондриальных геномов. Однако, в связи с меньшим количеством последовательностей в генетических базах данных в 1996-1998 годах, Линч сравнивал не ортологичные гены, как в нашей работе, а просто случайную выборку генов из митохондрий и бактерий.

Повышенные значения dN/dS бактерий, по сравнению с млекопитающими могут быть обусловлены следующими эволюционными факторами отрицательно коррелирующими с темпом молекулярной эволюции генов (dD/dS): (1) значимость данного белка (на сколько упадёт приспособленность организма, если экспрессия данного гена прекратится) (Hirsh, Fraser, 2001); (2) уровень экспрессии данного белка (Pal, Papp, Hurst 2001a); (3) количество протеин-протеиновых взаимодействий, в которые вовлечён данный белок (Fraser, Wall, Hirsh, 2003).

3.2.2. Сила очищающего отбора в генах митохондрий млекопитающих. В чём причина сильных различий значений dN/dS митохондриальных генов между разными отрядами млекопитающих (рис. 4)? Для ответа на данный вопрос для каждого из 109 млекопитающих мы “сшили” все его 13 митохондриальных генов вместе. Далее, оценив dN/dS каждой ветви филогенетического дерева с помощью программы `codeml`, мы получили оценку силы очищающего отбора для каждого вида млекопитающего как значение dN/dS внешней ветви, ведущей к данному виду. Для объяснения изменчивости силы очищающего отбора внутри млекопитающих мы допустили ведущее влияние на dN/dS эффективной численности (N_e) популяций млекопитающих (теория нейтральности: Кимура 1983). Поскольку значения N_e для 109 видов неизвестны (нет данных по нейтральному нуклеотидному полиморфизму), а приблизительные оценки современной численности популяций, во-первых, не точны, а, во-вторых, не отражают той численности популяции, которая была ранее, то мы воспользовались хорошо известным в экологии правилом энергетической эквивалентности (Damuth, 1981; 1987): плотность популяций млекопитающих N (среднее число особей на единицу используемой

территории) убывает пропорционально массе тела W в степени -0.75 , то есть $N \approx W^{-0.75}$. Таким образом, чем крупнее зверь, тем меньше плотность его популяции и, следовательно (при сходном размере ареалов), тем меньше общая численность. Масса тела взрослой особи каждого вида является хорошо известным и наиболее точно оцениваемым параметром (Felisa et al., 2003). Более того, ожидается, что именно масса тела, благодаря своей связи с плотностью популяции, лучше всего коррелирует со средней эффективной численностью в эволюционной истории каждого вида. Построив зависимость значений dN/dS от массы тела 109 видов млекопитающих, мы получили значимую положительную регрессию: чем больше масса тела (тем меньше численность популяции) тем больше скорость накопления несинонимичных мутаций, относительно синонимичных (рис. 5).

Рисунок 5. Зависимость dN/dS от массы тела ($\ln W$) млекопитающих. Общая регрессия dn/ds от массы тела ($\ln W$) для всех млекопитающих ($y=0.0017 \cdot x+0.029$, $R^2=0.1330$, $p=0.0001$) образуется за счёт более крутых регрессий внутри отрядов Carnivora ($y=0.0098 \cdot x-0.0593$, $R^2=0.5189$, $p=0.0124$), Insectivora ($y=0.0083 \cdot x-0.0059$, $R^2=0.5793$, $p=0.0566$) и Primates ($y=0.007 \cdot x+0.0028$, $R^2=0.2665$, $p=0.0588$), а также за счёт разницы средних dn/ds между остальными отрядами с различающейся средней массой тела.



Дальнейший анализ данной регрессии показал, что она не может объясняться ни особенностями топологии дерева (связь dN/dS с длиной ветви и связь длины ветви с массой тела млекопитающих), ни накоплением соматических мутаций у крупных, долго живущих млекопитающих, ни накоплением благоприятных несинонимичных мутаций у крупных

млекопитающих. Таким образом, регрессия dN/dS от массы тела свидетельствует о менее эффективном очищающем отборе в популяциях крупных млекопитающих с низкой эффективной численностью, что подтверждает эффективно-нейтральную теорию молекулярной эволюции. Слабо-вредные мутации, элиминирующиеся в популяциях мелких млекопитающих с высокой эффективной численностью, накапливаются в популяциях крупных млекопитающих с низкой эффективной численностью, поскольку в последних они становятся эффективно-нейтральными (с коэффициентами отбора $|s| \leq \frac{1}{N_e}$). Если предположить, что эффективная численность митохондриальных генов млекопитающих колеблется от 10^3 (усатые киты) до 10^5 (грызуны), то наблюдаемая нами регрессия dN/dS от массы тела, должна быть обусловлена слабо-вредными мутациями с коэффициентами отбора $10^{-5} \leq |s| \leq 10^{-3}$. При этом, средний коэффициент отбора мутаций, накопленных в крупных видах должен быть больше среднего коэффициента отбора мутаций, накопленных в мелких видах. Для проверки этого предположения мы провели следующий анализ.

Пользуясь программой `codeml` пакета PAML (Yang, 1997), мы подсчитали степень консерватизма каждого сайта для всех 13 протеин кодирующих генов. Оценку $\frac{dn}{ds}$ для каждого сайта протеин-кодирующих генов, мы получили на основе множественного выравнивания генов 99 видов млекопитающих (сюда не были включены сумчатые, поскольку они отличаются пониженным уровнем метаболизма, в связи с чем, могут иметь другие эволюционные ограничения (dn/ds) генов дыхательной цепи) предполагая одинаковые значения dn/ds в ветвях филогенетического дерева, но разные значения dn/ds между сайтами. В результате, для каждого из 13 генов, мы получили три дискретных класса сайтов с разными значениями dn/ds : сайты класса 1 являются наиболее консервативными и имеют dn/ds , близкое к нулю; сайты класса 3 наименее консервативны и их dn/ds ближе к единице; сайты класса 2 обладают промежуточными величинами dn/ds . Далее, мы проанализировали природу аминокислотных замен, накапливаемых в популяциях крупных видов с низкой N_e . Для этого, мы, учитывали несинонимичные замещения, произошедшие на внешней ветви дерева, то есть те несинонимичные замещения, которыми отличается последовательность современного млекопитающего от восстановленной по методу максимального правдоподобия последовательности его предка. В результате, каждый современный вид млекопитающих, был охарактеризован набором несинонимичных замещений, произошедших в сайтах с известным уровнем консерватизма (dn/ds). Все аминокислотные замещения, накопленные разными видами, мы поделили на радикальные и консервативные, в соответствии с классификацией Занга (Zhang 2000), который на основе заряда и размера аминокислот разделил их на шесть групп (специальная группа: C; нейтральные и маленькие: A, G, P, S, T; полярные и относительно маленькие: N, D, Q, E; полярные и относительно большие: R, H, K; неполярные и относительно маленькие: I, L, M, V;

неполярные и относительно большие: F, W, Y) и радикальным определил межгрупповое замещение, тогда как консервативным – внутригрупповое. Поскольку радикальные замещения *a priori* должны иметь больший эффект на приспособленность, нежели консервативные, отношение числа радикальных замещений к числу консервативных (R/C) говорит о силе отбора. Подсчитав соотношение R/C для 99 плацентарных видов, мы получили значимую положительную регрессию с массой тела: мелкие виды млекопитающих характеризуются преимущественным накоплением консервативных замещений (R/C<1), тогда как крупные имеют больше радикальных замещений (R/C>1). Причём данная корреляция обусловлена в основном сайтами первого класса (наиболее консервативными): $R/C=0.055 \cdot \ln W+0.18$, $R=0.36$, $p<0.001$. Таким образом, мы доказали, что в консервативных сайтах крупных млекопитающих накапливаются более вредные аминокислотные замещения, нежели у мелких млекопитающих.

Ещё одним косвенным подтверждением того, что почти нейтральная молекулярная эволюция хорошо описывает эволюцию митохондриальных генов является связь dN/dS с вероятностью вымирания, и соответственно включения в Красную книгу, а именно - при одной и той же массе тела те виды, которые имеют большее dN/dS имеют большую вероятность присутствия в Красной книге ($p<0.05$). С позиции нейтральности этот факт объясняется следующим образом: все красно-книжные виды достаточно малочисленны (одним из пунктов внесения вида в красную книгу является его малая численность), в связи с чем даже у мелких млекопитающих, включённых в красную книгу, накапливается больше эффективно-нейтральных мутаций, чем у мелких, не входящих в Красную книгу. Другими словами, значение dN/dS каждого вида само по себе несёт в себе информацию об эффективной численности популяции, без связи с массой. Возможно, связь dN/dS митохондриальных генов с эффективной численностью популяции может послужить удобным и точным способом определения необходимости охранять тот или иной вид.

ВЫВОДЫ

1. На основе анализа литературных данных показано, что основной вклад в мутирование организмов из половых популяций вносят гаметогенез самцов, мутагенные эффекты гомологичной рекомбинации и транспозиция мобильных генетических элементов. Следствием этого является существенно пониженный (в 5-30 раз) темп мутирования бесполой и факультативно-половых организмов, по сравнению с облигатно-половыми.
2. Оценка параметров распределений слабо-вредных мутаций в половых и бесполой популяциях позволила сформулировать гипотезу “подвижного мутационно-селективного равновесия”, объясняющую происхождение высоко-приспособленных и, следовательно, долгоживущих бесполой видов от факультативно-половых предков.

3. Показано, что большинство молодых бесполой линии, таких как нео-Y хромосома и эндосимбиотические бактерии демонстрируют признаки накопления слабо-вредных мутаций, тогда как для древних бесполой линии характерен пониженный темп фиксации слабо-вредных мутаций, обусловленный интенсивной генной конверсией и гомоплазмией.
4. Сравнительно-геномный анализ митохондриальных генов млекопитающих и α -протеобактерий показал эффективность очищающего отбора в митохондриальных генах, что опровергает положение о накоплении слабо-вредных мутаций в митохондриальных геномах млекопитающих.
5. молекулярная эволюция митохондриальных генов хорошо описывается эффективно-нейтральной теорией, о чем свидетельствуют результаты сравнительно-геномного анализа митохондрий млекопитающих, а именно:
 - темп накопления несинонимичных замещений относительно синонимичных (dN/dS) выше у крупных млекопитающих,
 - отношение числа радикальных к консервативным аминокислотным замещениям выше у крупных млекопитающих,
 - значения dN/dS положительно коррелируют с вероятностью вымирания млекопитающих.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Попадьян К. Как долго можно жить без полового размножения? // Материалы семинара кафедры общей экологии, 2004, http://www.sevin.ru/fundecology/archive/8_04_2004_text.html
2. Попадьян К., Мамирова Л. История одинокой хромосомы // Природа, 2004, т. 9, с. 11-16.
3. Mamirova L, Popadin K. 2004. Mitochondrial genome as ancient asexual // PARTNER workshop-2: origin and spread of asexuals, Valencia, Spain, 16-18 April.
4. Попадьян К. Эволюция полового размножения: роль вредных мутаций и мобильных элементов // Журнал Общей Биологии, 2003, т. 64, с. 463-478.
5. Popadin K. 2003. Ancient asexuals and the maintenance of sex // PARTNER workshop-1: asexuality and time-scales, Wageningen, the Netherlands, 20-23 November.
6. Popadin K. Body size of *Holopedium gibberum* under the influence of fish predation in small subarctic lakes // Verh. Internat. Verein. Limnol., 2002, v. 28, № 1, p. 204-209.