

**В. В. Хрусталеv<sup>1</sup>, Т. А. Хрусталева<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

## **СКОРОСТЬ ЭВОЛЮЦИИ ГЕНА *APC*, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК, ПРЕПЯТСТВУЮЩИЙ РАЗВИТИЮ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

Скорость фиксации синонимичных замен в гене *Adenomatous polyposis coli* (*APC*) значительно варьируется среди разных видов животных. Мутационное GC-давление, которому ранее подвергались гены *APC* грызунов, впоследствии сменилось на AT-давление. В результате вероятность возникновения синонимичной замены в гене *APC* грызунов значительно выше, чем в гомологичном гене человека, что не позволяет считать их, в отличие от обезьян, подходящей моделью для изучения колоректального рака.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, мутационное давление, скорость эволюции, интрахоры, синонимичные замены.

**V. V. Khrustalev<sup>1</sup>, T. A. Khrustaleva<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

## **EVOLUTION RATE OF THE *APC* GENE CODING A PROTEIN PREVENTING THE COLORECTAL CANCER DEVELOPMENT**

The rates of synonymous mutations in *Adenomatous polyposis coli* (*APC*) gene varies greatly among different species of animals. *APC* genes of rodents had been under the influence of mutational GC-pressure that changed its direction to AT-pressure during a more recent period of time. As a result, the probability of synonymous mutation occurrence in the *APC* gene of rodents is significantly higher than in the homologous human gene. Rodents cannot be considered to be a reliable model for study of colorectal cancer, unlike monkeys.

**Keywords:** colorectal cancer, mutational pressure, evolution rate, intrachores, synonymous mutations.

**Введение.** Белок *Adenomatous polyposis coli* (*APC*) играет ключевую роль в предотвращении развития аденоматозного полипоза и колоректального рака [1]. Наиболее часто мутации в гене *APC* ведут к появлению стоп-кодона в середине рамки считывания (кодоны 1286–1585) [2]. Такие нонсенс-мутации связаны с мутационным AT-давлением [3]. Стоп-кодона отличаются низкой GC-насыщенностью (TAG, TAA, TGA). Нуклеотидные мутации по направлению GC на AT приводят к появлению стоп-кодонов гораздо чаще, чем замены обратного направления [3].

Известно, что развитию колоректального рака способствует целый ряд факторов (богатая жирами пища, курение, употребление алкоголя, низкая физическая нагрузка) [4, 5]. В конечном итоге эти неспецифические факторы приводят к развитию окислительного стресса в клетках-мишенях. Свободные радикалы окисляют азотистые основания в экспрессируемых в этих клетках генах. В том случае, если система репарации функционирует нормально (так, как она работает в данный период жизненного цикла определенного типа клеток), она наиболее эффективно устраняет последствия только части возникающих мутаций. Поэтому чем сильнее окислительный стресс, тем сильнее мутационное давление, возникающее во время транскрипции [6].

Популяционные исследования не всегда дают однозначный ответ на вопрос о риске развития рака, так как невозможно учесть все особенности образа жизни и наследственную предрасположенность. Лучшие результаты могут быть достигнуты при исследовании генетически однородной линии лабораторных животных. Чаще всего для этого используют мышей или крыс. Однако

частота возникновения мутаций в гене *APC* таких модельных организмов должна соответствовать таковой в гомологичном гене человека.

Цель данного исследования – подбор модельного организма, подходящего для изучения факторов, влияющих на развитие колоректального рака, путем молекулярно-филогенетического анализа.

Задачи включали: 1) расчет скорости накопления несинонимичных и синонимичных нуклеотидных замен в кодирующем участке гена *APC*; 2) расчет частот возникновения нуклеотидных мутаций в гене *APC* мыши; 3) сравнение сдвигов в частотах использования нуклеотидов в экзонах гена *APC* человека и других млекопитающих.

**Материалы и методы исследования.** В качестве материала для исследования использованы 80 последовательностей кодирующих участков гена *APC* от различных животных. В выборку вошли 44 последовательности от млекопитающих, 18 – от птиц, 7 – от рептилий, 2 – от земноводных, 8 – от рыб, а также 1 последовательность от устрицы.

С помощью программы MEGA 7 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) аминокислотные последовательности выравнивали методом Muscle. Затем производили расчет синонимичных и несинонимичных эволюционных дистанций для каждой пары последовательностей с использованием метода Kumar. Время дивергенции между каждой парой животных из выборки получали из базы данных TimeTree ([www.timetree.org](http://www.timetree.org)). Далее строили графики зависимости между каждой из эволюционных дистанций и временем дивергенции, вычисляли коэффициенты корреляции между этими показателями, а также угол наклона прямой, соответствующей тренду линейной зависимости между ними. На следующем этапе вычисляли количество нуклеотидных замен на сайт в 1 млрд лет. Для этого в уравнение, описывающее тренд линейной зависимости, подставляли 1 млрд лет и умножали на 2, так как обе последовательности после расхождения их эволюционных путей накапливают нуклеотидные замены.

Материалом для исследования нуклеотидных последовательностей каждого экзона гена *APC* человека, мыши, крысы и макаки служили соответствующие последовательности из международной базы данных Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Для гена *APC* мыши использовали данные о полиморфизме (2196 точечных нуклеотидных мутаций), хранящиеся в той же международной базе данных.

Распределение частот использования нуклеотидов на протяжении кодирующих участков генов анализировали с помощью алгоритма VVTAK SW (<http://chemres.bsmu.by>), а частот использования нуклеотидов в каждом из трех положений кодонов – с помощью алгоритма VVK Protective Buffer (<http://chemres.bsmu.by>). Для сравнения частот возникновения герминативных нуклеотидных замен (синонимичных и миссенс мутаций) в генах *APC* мыши и человека применяли *t*-тест для относительных величин.

**Результаты и их обсуждение.** На рис. 1 приведен график зависимости между несинонимичными и синонимичными дистанциями и временем дивергенции между видами, которым принадлежат использованные последовательности.

Как несинонимичная, так и синонимичная дистанции в целом демонстрируют прямую зависимость от времени дивергенции (коэффициенты корреляции – 0,7946 и 0,8728 соответственно). Однако для каждой точки дивергенции разброс значений синонимичной дистанции очень велик (рис. 1). Действительно, для многих пар последовательностей время дивергенции является общим (например, для всех птиц и всех млекопитающих общее время дивергенции – 320,5 млн лет, для птиц и аллигаторов – 238,3 млн лет), а синонимичные эволюционные дистанции – разными. То есть для несинонимичных замен принцип молекулярных часов работает гораздо лучше, чем для синонимичных.

Средняя скорость накопления несинонимичных замен равна 0,858 замен на сайт в 1 млрд лет. Для синонимичных замен средняя скорость фиксации составила 6,6272 на сайт в 1 млрд лет. Скорость накопления синонимичных замен, судя по нашим результатам, у одних видов животных гораздо быстрее, чем у других. Если провести линию через точки, соответствующие минимальным значениям синонимичной дистанции для каждого времени дивергенции, то скорость накопления синонимичных мутаций (5,046 замен на сайт в 1 млрд лет) окажется почти в 2 раза ниже, чем при проведении линии через точки, соответствующие максимальным значениям (9,482 замен на сайт в 1 млрд лет).

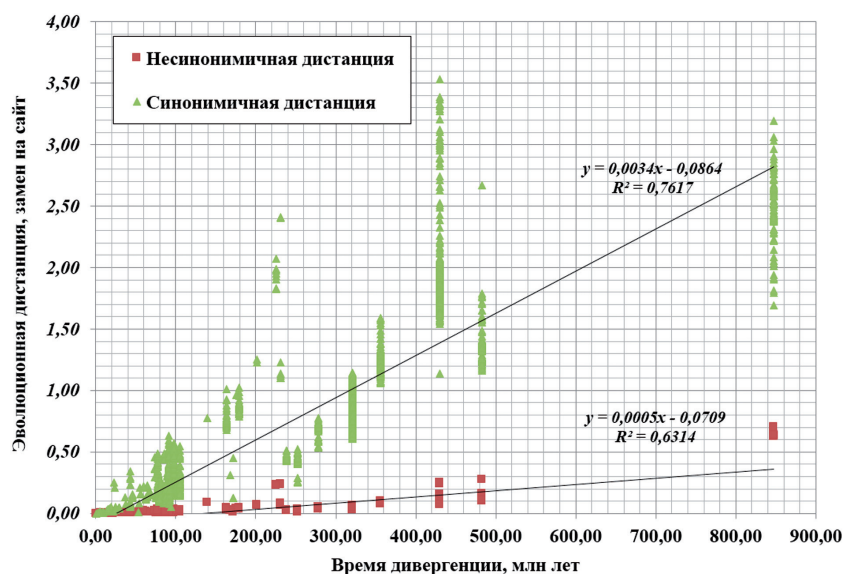


Рис. 1. Зависимость между временем дивергенции генов *APC* 80 видов животных и синонимичной и несинонимичной дистанциями между ними

Fig. 1. Dependence between the divergence time of the *APC* genes of 80 animal species and the nonsynonymous distances between them

Наиболее часто модели заболеваний создают на грызунах (мышях или крысах). В случае с геном *APC* такое моделирование может привести к серьезной недооценке факторов риска.

Сравнение насыщенности генов *APC* человека и мыши гуанином и цитозином (GC-насыщенности) показало, что кодирующий участок гена мыши отличается значительно более высокой GC-насыщенностью третьих положений кодонов. Как видно на рис. 2, на протяжении практически всего кодирующего участка 3GC в гене мыши выше, чем в гене человека. Однако в разных фрагментах кодирующего участка эта разность может увеличиваться или снижаться.

Известно, что в гене *APC* человека среди герминативных мутаций преобладают замены по направлению GC на AT [3]. Несмотря на более высокий уровень 3GC в гене мыши количество герминативных нуклеотидных замен по направлению GC на AT в нем (36,18 %) достоверно ( $P < 0,01$ )

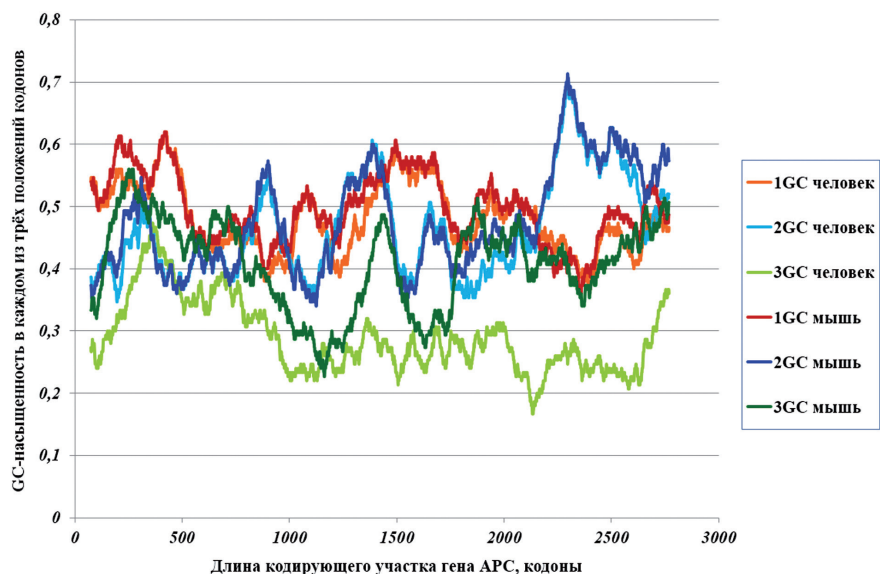


Рис. 2. Распределение частот использования гуанина и цитозина в трех положениях кодонов на протяжении гена мыши и человека. Размер окна – 150 кодонов

Fig. 2. Frequency of guanine and cytosine use at three positions of codons during the *APC* gene of mouse and human. Window size – 150 codons

превышает количество замен по направлению АТ на GC (29,97 %). Судя по этим данным, в гене *APC* мыши должно существовать мутационное АТ-давление [6], так же как и в соответствующем гене человека [3]. Если предположить, что у общего предшественника млекопитающих ген *APC* имел низкую GC-насыщенность, то на протяжении эволюционной истории мыши этот ген подвергся GC-давлению, которое впоследствии сменилось на исходное АТ-давление. Однако на сегодняшний день повышенный уровень 3GC в кодирующей части еще сохранился.

При более высоких значениях 3GC в гене вероятность того, что мутация GC на АТ будет синонимичной, должна быть выше. Действительно, в гене мыши синонимичные мутации (71,09 %) значительно ( $P < 0,01$ ) преобладают над несинонимичными (28,91 %). Такая ситуация считается вполне закономерной с точки зрения теории нейтральности М. Кимуры [7]. Странной с точки зрения этой теории является ситуация, описанная для гена *APC* человека, в котором несинонимичные замены (76,03 %) преобладают ( $P < 0,001$ ) над синонимичными (23,97 %) [3]. Получается, что за счет повышенной GC-насыщенности третьих положений кодонов гена *APC* мыши вероятность несинонимичной и нонсенс-мутации в нем значительно ниже, чем в гомологичном гене человека.

Свидетельством недавней смены мутационного давления в гене мыши является 3GC = 34,86 %, что на 10,05 % превышает аналогичный показатель у человека (3GC = 24,81 %). Похожая ситуация в гене *APC* обнаружена нами и у других часто используемых модельных животных: у крысы (3GC = 39,65 %) и у собаки (3GC = 33,42 %). У кошки (3GC = 26,24 %) и у морской свинки (3GC = 26,90 %) уровень 3GC приближается к таковому у человека. Однако значение 3GC, практически идентичное такому же показателю в гене человека, характерно для *APC* обезьян, из которых наибольший интерес представляют макаки (3GC = 24,93 %).

Структура экзонов в гене *APC* всех млекопитающих консервативна. Если сравнить GC-насыщенность каждого из соответствующих друг другу экзонов генов человека и мыши, то выяснится, что у двух из них различия в 3GC особенно выражены (рис. 3). Это говорит о том, что в предшественнике гена *APC* мыши не только существовало общее GC-давление, но и еще более сильное локальное GC-давление в районе экзонов № 5 и № 6. Такой феномен наблюдается при наличии автономно транскрибирующихся последовательностей внутри гена [8]. Предположительно эти последовательности кодируют короткие регуляторные РНК (микроРНК), экспрессирующиеся на определенном этапе эмбриогенеза [8]. Интересно отметить, что попадающие в состав таких «мини-генов» экзоны довольно быстро накапливают (или теряют) GC-насыщенность в третьем положении кодонов. Даже в гене *APC* крысы уровень 3GC в гомологичном экзоне № 6 значительно

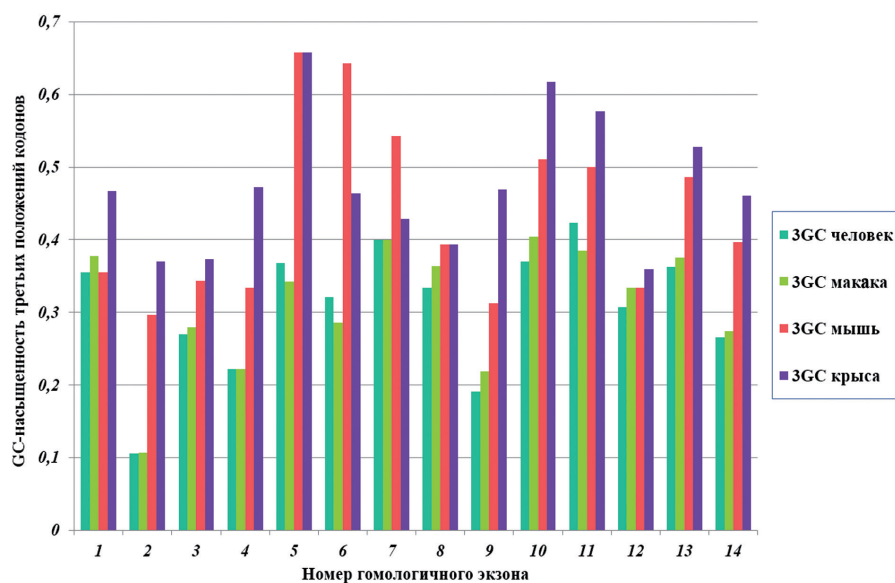


Рис. 3. Насыщенность гуанином и цитозином третьих положений кодонов экзонов гена *APC* человека, макаки, мыши и крысы

Fig. 3. Saturation by guanine and cytosine of third codon positions of exons of the *APC* gene of human, macaque, mouse and rat

ниже, чем в соответствующем экзоне гена мыши (рис. 3), но значения 3GC в экзоне № 5 у мыши и крысы практически идентичны. В гене крысы имеются и свои собственные «интрахоры» с более высокой GC-насыщенностью: гомологичные экзоны № 10 и № 11.

GC-насыщенность третьих положений кодонов гомологичных экзонов гена макаки практически идентична таковой для экзонов гена человека (рис. 3).

Мутационное АТ-давление в гене *APC* у человека и макаки является более сильным, чем в гене *APC* мыши и крысы. Любой неспецифический фактор при одинаковой интенсивности воздействия вызовет возникновение миссенс- и нонсенс-мутаций в гене *APC* мыши или крысы в среднем через более продолжительный промежуток времени, чем в гене *APC* человека или макаки.

**Заключение.** Скорость накопления синонимичных замен в гене *APC* значительно варьируется среди хордовых животных, что связано со сменой направления мутационного давления как на протяжении всего гена, так и в отдельных экзонах.

Несмотря на совпадение направления мутационного давления в гене *APC* мыши и человека, вероятность возникновения мутации, способной привести к развитию колоректального рака, для гена мыши значительно ниже, чем для гена человека.

Модельные исследования *in vivo* по выяснению уровня риска развития колоректального рака под воздействием различных факторов внешней среды на мышах и других грызунах не будут являться достаточно информативными, так как их гены, как правило, защищены от возникновения канцерогенных мутаций.

Для модельных исследований по оценке степени риска развития колоректального рака больше подходят виды животных с полным совпадением как направления, так и силы мутационного давления в гене *APC* (обезьяны, в частности макака).

### Список использованных источников

1. Aoki, K. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene / K. Aoki, M. M. Taketo // *J. of Cell Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 3327–3335.
2. Fearnhead, N. S. The ABC of APC / N. S. Fearnhead, M. P. Britton, W. F. Bodmer // *Human Mol. Genetics.* – 2001. – Vol. 10. – P. 721–733.
3. Барашкова, Е. С. Преобладающие типы нуклеотидных мутаций в гене *APC* человека, кодирующем белок, препятствующий развитию колоректального рака [Электронный ресурс] / Е. С. Барашкова, Т. А. Хрусталева, В. В. Хрусталева // Молодежь в науке : материалы XII Междунар. науч. конф. молодых ученых, 1–4 дек. 2015 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Совет молодых ученых. – Электрон. текстовые, граф. данные и приклад. программа. – 1 комп. опт. диск (CD-ROM). – Минск, 2015. – С. 73–84.
4. Браун, Е. М. Факторы диеты и риск возникновения колоректального рака / Е. М. Браун // *Клин. хирургия.* – 1996. – № 6. – С. 44–46.
5. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis / E. Botteri [et al.] // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 134. – P. 388–395.
6. Sueoka, N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution / N. Sueoka // *Proc. of the Nat. Acad. of Sci. of USA.* – 1988. – Vol. 85. – P. 2653–2657.
7. Кимура, М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности : пер. с англ. / М. Кимура ; пер. А. Г. Имашевой, Е. А. Салменковой и Е. Я. Тетушкина ; под ред. Ю. П. Алтухова и Л. А. Животовского. – М. : Мир, 1985. – 394 с.
8. Intragenic isochores (intrachores) in the platelet phosphofructokinase gene of Passeriform birds / V. V. Khrustalev [et al.]. – *Gene.* – 2014. – Vol. 546, iss. 1. – P. 16–24.

### References

1. Aoki, K., Taketo M. M. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science*, 2007, vol. 120, pp. 3327–3335.
2. Fearnhead N. S., Britton M. P., Bodmer W. F. The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, 2001, vol. 10, pp. 721–733.
3. Barashkova E. S., Khrustaleva T. A., Khrustalev V. V. Mutational pressure in the human APC gene. *Materialy XII Mezhduнародnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchenykh "Molodezh' v nauke"* [Materials of the XII International Conference of Young Scientists "The Youghth in Science"], Electronic Resources (CD-ROM), Natsional'naiia akademiia nauk Belarusi, Sovet molodykh uchenykh [National Academy of Sciences of Belarus, Council of Young Scientists]. Minsk, 2015, pp. 73–84. (in Russian).
4. Braun E. M. Factors of diet and a risk of colorectal cancer appearance. *Clinicheskaya Chirurgiya* = Clinical Surgery, 1996, no. 6, pp. 44–46. (in Russian).

5. Botteri E., Iodice S., Raimondi S., Maisonneuve P., Lowenfels A. B. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, pp. 388–395.

6. Sueoka N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1988, vol. 85, pp. 2653–2657.

7. Kimura M. *The neutral theory of molecular evolution*, translation from English by Imasheva A. G., Salmenkova E. A., Tetushkina E. Ya., in Altukhov Yu. P., Zhivotovsky L. A. (ed.). Moscow, Mir [World], 1985, 394 p. (in Russian).

8. Khrustalev V. V., Barkovsky E. V., Khrustaleva T. A., Lelevich S. V. Intragenic isochores (intrachores) in the platelet phosphofructokinase gene of Passeriform birds. *Gene*, 2014, vol. 546, iss. 1, pp. 16–24.

### Інфармацыя аб аўтарах

*Хрусталеў Владіслаў Віктаравіч* – доцент, заведуючы кафедрай. Беларускі дзяржаўны медыцынскі ўніверсітэт (пр. Дзяржынскага, 83, 220116, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru.

*Хрусталева Тат'яна Аляксандраўна* – ст. науч. супрацоўнік. Інстытут фізіялогіі НАН Беларусі (ул. Акадэміцкая, 28, 220072, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: tanissia.lir@gmail.com.

### Для цытавання

Хрусталеў, В. В. Скорость эволюции гена *APC*, кодирующего белок, препятствующий развитию колоректального рака / В. В. Хрусталеў, Т. А. Хрусталева // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 2. – С. 121–126.

### Information about the authors

*Khrustalev Vladislav Victorovich* – Assistant Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskiy Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru.

*Khrustaleva Tatyana Aleksandrovna* – Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tanissia.lir@gmail.com.

### For citation

Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A. Evolution rate the of *APC* gene coding a protein preventing the colorectal cancer development. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2017, no. 2, pp. 121–126.