

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СИСТЕМАТИКА ОТРЯДА ПРИМАТОВ НА УРОВНЕ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ КЕРАТИНОВ ВОЛОС ЧЕЛОВЕКА И ШЕРСТИ ОБЕЗЬЯН

В.А. Спицын¹, И.С. Афанасьева¹, Л.С. Бычкова¹, Н.Х. Спицына²

¹ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

² Институт этнологии и антропологии РАН, Москва

Молекулярная систематика располагает методами, которые могут быть успешно использованы для решения проблем приматологии. Тонкий анализ системы кератинизированных белков, образующих волосы человека и шерсть обезьян, позволяет сопоставить таксономическое древо отряда приматов в сравнении с используемыми для этой цели морфологическими признаками. Существенным положительным качеством данного подхода является возможность использования для анализа образцов, длительное время хранящихся в коллекциях. Проведено исследование внутривидовой и межвидовой изменчивости альфа-кератинов для 30 видов обезьян. Все исследованные образцы шерсти обезьян показали картину, весьма отличную от той, которая наблюдалась при анализе образцов волос человека. Если значения показателя подвижности (R_f) всех шести электрофоретических фракций *Homo sapiens* не превышают 0.5, то у обезьян, наряду с такими медленно мигрирующими электрофоретическими фракциями, наблюдается значительное число (от 3 до 7) быстро мигрирующих зон, R_f которых превышает величину 0.5. Медленно мигрирующие компоненты альфа-кератинов всех обезьян полностью соответствуют электрофоретическим зонам альфа-полипептидов человека по величинам R_f . Таким образом, отмечается полная редукция быстро мигрирующих электрофоретических фракций у человека и частичная – у шимпанзе. Различия в типах альфа-кератинов шерсти обнаружены только между крупными таксономическими группами, в основном на уровне подсемейств и выше. Особенности дифференциации типов кератинов шерсти среди различных видов приматов в целом соответствуют общепринятым положениям «классической» систематики.

Ключевые слова: альфа-кератины волос человека и шерсти обезьян, молекулярная систематика приматов

Посвящается памяти профессора
Всеволода Петровича Якимова

Введение

Волосистой покров млекопитающих является уникальной особенностью, отличающей их от других классов животных. Шерсть млекопитающих играет решающую роль в сохранении тепла у гомойотермных организмов. К другим функциям шерстяного покрова можно отнести отношение к половому диморфизму и защите собственно кожи. Система теплового контроля в филогенетическом отношении, по-видимому, способствовала быстрой радиации млекопитающих и их широкому распространению по земному шару. Интересным событием в эволюции волосистого покрова явилась его редукция у человека. Тем не менее, у человека отмечается сходная с человекообразными обе-

зьянами густота волосистых фолликулов на единицу поверхности тела. Сравнительные исследования показывают, что структура шерсти и особенности ее развития являются сходными для млекопитающих в целом.

Кератины являются основной группой белков, образующих волосы человека и шерсть животных. Сюда входят как волокнистые, так и аморфные белки, образуемые эпителиальными клетками, которые весьма устойчивы к разрушению ввиду наличия большого числа дисульфидных связей между цепями белковых молекул.

Оказывается, что ультраструктура волос, распределение кислых и основных кератинов у сумчатых и плацентарных видов животных обнаруживают большое сходство.

Генетико-биохимический анализ системы кератинизированных белков, образующих волосы человека и шерсть обезьян был предпринят первоначально в 1973–1975 гг. [Baden, Lee, Kubilus, 1975, Hrdy & Baden, 1973]. В результате были обнаружены некоторые различия в спектрах этих белков между различными видами приматов.

Методические приемы, с помощью которых экстрагировались белковые компоненты шерсти, включали разрушение дисульфидных связей с последующим расщеплением на полипептидные цепи. Такая обработка приводит к образованию двух основных фракций, одна из которых, именуемая α -кератином, имеет относительно высокую молекулярную массу и низкое содержание серы. Другая, β -кератин, характеризуется низкой молекулярной массой, но высоким содержанием серы [Birbeek, 1964]. По мнению автора, первый компонент имеет отношение к микрофибриллам, а второй – к матриксу.

В лабораторных исследованиях в качестве реагента для ослабления дисульфидных связей используется тиогликолат натрия, а для их разрыва – монооксисукциновая кислота. Образующиеся в результате S-карбоксиметилкератины дифференцировались на S-карбоксиметилкератин А (SCMKA) и S-карбоксиметилкератин В (SCMKB) [Gillespie, Simmons, 1960].

Последующий электрофоретический анализ [Shechter, Landau, Newcomer, 1969] показал отсутствие различий между изученными видами животных в типах SCMKB. Однако важно подчеркнуть, что для каждого отдельного вида млекопитающих, включая человека, была получена характерная, свойственная только им электрофоретическая картина типов SCMKA. На основании сравнительного анализа изученных образцов в отношении гетерогенности альфа-полипептидов белков шерсти был сформулирован вывод о перспективности изучения такой изменчивости для решения таксономических задач. Было установлено, что представители каждого семейства обезьян обладают собственной картиной распределения электрофоретических фракций.

Большинство компонентов волос и шерсти, относящихся к альфа-кератинам и к кератин-ассоциированным белкам (КАР), кодируется мультигенными комплексами. α -кератины включают два мультигенных подсемейства, а именно тип I (кислые) и тип II (основные) белки [Rogers, Winter, Wolf et al., 1998]; [Rogers, Winter, Langbein et al., 2000]. Они формируют волокнистый цитоскелет эпителия в целом, обеспечивающий защиту от внешних средовых воздействий [Hesse, Zimek, Weber, Magin, 2004].

Генное семейство α -кератина у человека интенсивно изучалось, и в результате было идентифицировано 54 функциональных гена, локализованных на хромосомах 12q13.13 и 17q21.2 и обнаруживающих различную картину экспрессии в процессе формирования волос [Rogers, Langbein, Praetzel-Wunder et al., 2006]. Кератины волос образуют промежуточную филаментарную (волоконистую) сеть (IF) посредством сополимеризации типов I и II альфа-кератинов в трихоцитах, которые являются клетками, образующими центральный регион формирования волос в процессе становления волосяного фолликула. В волосяном кортексе кератины IFs включаются в интерфиламентарный матрикс с кератин-ассоциированными белками (КАР). Белки КАР подразделяются на две большие разновидности, содержащие: 1) высокую/сверхвысокую концентрацию цистеина (HS) и 2) высокую концентрацию глицина-тирозина (HGT), которые формируются независимо под действием дифференцированного генетического контроля [Rogers, Langbein, Praetzel-Wunder et al., 2006]; [Powell, Neski, Rogers, 1991]. Кератин-ассоциированные белки являются необходимыми элементами для обеспечения жесткой и прочной структуры оси волоса при взаимодействии с кератинами [Powell, Rogers, 1997]. Кератин-ассоциированные гены сгруппированы в 27 подсемейств, обозначаемых от KRTAP1 до KRTAP27 [Rogers, Winter, Langbein et al., 2007]. У человека идентифицировано около 100 генов KRTAP, которые объединяются в пять тандемно сгруппированных кластеров. Гены KRTAP локализованы в хромосомных районах 11p15.5, 11q13.4, 17q21.2, 21q22.1 и 21q22.3 [Yahagi, Shibuya, Obayashi et al., 2004].

Несмотря на почти полное отсутствие волосяного покрова, человек обнаруживает сходство по широкому спектру кератиновых и кератин-ассоциированных генов с другими приматами [Wong-Dong, Irvin, Zhang Ya-Ping, 2008]. Авторы приходят к выводу о быстрой дивергентной эволюции генов KRTAP между видами. Напротив, подсемейство KRTAP генов оказывается гомогенным внутри каждого вида, что может быть обусловлено согласованной эволюцией.

Полиморфизм кератиновых генов может ассоциироваться с проявлением некоторых наследственных болезней. Более того, кератины могут быть вовлечены в развитие мультифакториальных патологических состояний при заболеваниях печени, кишечника. Понимание молекулярных основ нарушений в структуре кератина может служить основой для улучшения диагностики, генетического консультирования и пренатального тестиро-

вания ряда серьезных заболеваний. Так, помимо основной механической роли, для этих белков идентифицированы дополнительные функции в клеточной пролиферации, тканевой дифференцировке, заживлении ран и тканевого обновления, а также при апоптозе. Более ясное понимание регуляторных функций кератинов может оказаться перспективным для новых разделов биомедицинского направления, включая профилактическую медицину [Agin, 2009]. Инфицирование вирусом Эпштейна-Барр и предрасположенность к карциноме молочной железы могут быть связаны с аномальным кератином 1 волос (hHb1-DeltaN). Этот нестабильный hHb1-DeltaN белок может изменять нормальную структуру цитоскелета и/или нарушать регуляции транскрипции [Nishikawa, Kiss, Imai et al., 2003]. Точковые мутации в кератиновых генах служат причиной наследственных эпителиальных болезней. Генетический полиморфизм кератинов на белковом уровне, обусловленный аллельным разнообразием, был описан для кератинов 4 и 5 второго типа (II). Последующее изучение этого типа кератинов на уровне ДНК посредством ПЦР анализа позволило установить трехаллельную систему для кератинов локусов 4 и 5, обусловленную однонуклеотидными заменами. Полагается, что такая генетическая изменчивость в норме у человека может стать полезной для популяционных исследований в кластере кератина II типа, локализованного на 21q хромосоме. [Wanner, Forster, Tilmans, Mischke, 1993].

Характер и схема представляемой ниже работы были продиктованы следующими, независимыми друг от друга, обстоятельствами: 1) отсутствием внутривидового полиморфизма в спектре альфа-кератинов, определяемого на уровне генной экспрессии и существованием видовой специфичности в этой категории признаков; 2) возможностью использования для исследования коллекционного материала, что позволяет увеличить число видов для сравнительного анализа.

Материал и методы

Материалы

Типы альфа-полипептидов белков шерсти приматов были исследованы от 139 особей, относящихся к видам, представленным в таблице 1. В нашем случае для сравнительного анализа использована классификационная схема отряда приматов, основанная на рассмотрении морфологических признаков [Нестурх, 1960].

Пробы шерсти зеленых мартышек, макаков резусов, яванских макаков и черных паукообразных обезьян были взяты непосредственно в обезьяньем питомнике Института полиомиелита и вирусных энцефалитов от живых особей обезьян. Большинство остальных образцов были любезно предоставлены в наше распоряжение из коллекции экспонатов Зоологического музея МГУ. Часть материала была получена от сотрудника НИИ и Музея антропологии МГУ В.И. Чернышева из его личной коллекции.

Методы анализа пептидных фракций кератинов волос и шерсти

Механическая прочность и химическая инертность белков волос и шерсти диктует специфику приготовления экстрактов белковых фрагментов через ряд последовательных стадий перед электрофоретическим анализом. Для расщепления кератинизированных белковых молекул на полипептидные компоненты применяется обработка материала монохлоруксусной кислотой с дополнительным использованием 2-меркаптоэтанола или дитиотреитола. В результате такой обработки образуются S-карбоксиметилкератины. Для идентификации типов этих производных кератина используется метод электрофоретического анализа в полиакриламидном геле. В данном случае применялась одна из разновидностей электрофореза [Baden, Lee, Kubilus, 1975].

Образцы волос или шерсти отмывались дистиллированной водой, высушивались при комнатной температуре и измельчались до порошкообразного состояния. Экстракция белка проводилась в смеси, содержащей 17.5 мг волос (шерсти) на 1 мл буфера, содержащего 0.2 М ТРИС, 6М мочевины, 2-меркаптоэтанола (pH = 9.5) в течение трех часов при температуре 45°C. Затем смесь центрифугировалась при $g = 15000$ и в полученный раствор вводилась монохлоруксусная кислота, растворенная в 0.6 М ТРИС/HCl буфере (pH = 8.5). Далее осуществлялся диализ системы против дистиллированной воды в течение 12 часов. Вертикальный электрофорез полученного материала проводился в блоке 7% полиакриламидного геля, содержащего 6М мочевины с применением ТРИС-глицинового буфера pH = 8.6 в течение 7 часов при напряжении $v = 10$ в/см. Для идентификации белковых фракций использовались красители амидочерный 10Б и Кумасси G-250 или R-250. Использовался также электрофоретический анализ с включением додецилсульфата натрия (SDS) [Cannon-Carlson, Tang, 1997].

Таблица 1. Видовой состав и число изученных особей каждого вида

Исследованные виды обезьян	Число особей
Полуобезьяны	
Лори тонкий цейлонский (<i>Loris tardigradus</i>)	1
Индри короткохвостый (<i>Indri brevicaudatus</i>)	1
Авагис руконосный (<i>Avahi laniger</i>)	1
Сифака диадемовый (<i>Propithecus diadema</i>)	2
Сифака Верро (<i>Propithecus verreauxi</i>)	2
Лепилемур ласковый (<i>Lepilemur mustelinus</i>)	1
Лемур кошачий (<i>Lemur catta</i>)	2
Лемур мигрофронс (<i>Lemur microfrons</i>)	1
Лемур монгоц (<i>Lemur mongoz</i>)	1
Широконосые обезьяны	
Игрунка обыкновенная (<i>Callitrix jacchus</i>)	2
Шерстистая обезьяна (<i>Lagothrix lagotricha</i>)	4
Черная паукообразная обезьяна (<i>Ateles paniscus</i>)	4
Капуцин хохлокоголовый (<i>Cebus apella</i>)	4
Нижние узконосые обезьяны	
Мартышка зеленая (<i>Cercopithecus sabaenus</i>)	44
Мартышка Сикеса (<i>Cercopithecus albogularis</i>)	1
Мартышка голуболицая (<i>Cercopithecus cephus</i>)	1
Мартышка диана (<i>Cercopithecus diana</i>)	3
Макак резус (<i>Macaca mulatta</i>)	15
Макак яванский (<i>Macaca fascicularis</i>)	27
Макак шерстистый (<i>Macaca vestitus</i>)	1
Макак свинохвостый (<i>Macaca nemestrina</i>)	1
Мангобей черный (<i>Cercocebus atterimus</i>)	1
Мангобей серощекий (<i>Cercocebus albigena</i>)	2
Павиан хохлатый черный (<i>Cynopithecus niger</i>)	1
Павиан бабуин (<i>Papio cynocephalus</i>)	1
Мандрил (<i>Mandrillus sphinx</i>)	4
Гелада (<i>Theropithecus gelada</i>)	2
Человекообразные обезьяны	
Гиббон белорукий (<i>Hylobates lar</i>)	2
Сиаманг сростнопалый (<i>Symphalangus syndactylus</i>)	2
Шимпанзе обыкновенный (<i>Pan troglodytes</i>)	2

Статистическая обработка материала

При анализе приматологического материала предстояло сравнить виды, картины распределения фракций альфа-кератинов которых различались по числу, подвижности и интенсивности проявления (окрашивания) фракций.

Для количественного выражения сходства между двумя объектами существует ряд коэффициентов ассоциации. Все они основаны на сравнении двух наборов признаков для какой-либо пары объектов и выражаются через число совпадений и расхождений в наблюдаемых признаках. В данном случае был использован коэффициент Жаккара в связи с его эффективностью в реше-

нии таксономических задач: $J_j = a / a+b+c$, где a – число общих признаков (в нашем случае – число электрофоретических фракций, совпадающих по подвижности и интенсивности проявления), c , b – соответственно число признаков, имеющих у первого (второго) объекта и отсутствующих у второго (первого) объекта. В данном случае веса всех признаков полагаются одинаковыми. Для получения отчетливого представления об общей картине связей между различными видами приматов по типам б-кератинов шерсти на основе этих коэффициентов ассоциаций парно-групповым методом было построено таксономическое древо отряда приматов [Бейли, 1970; Песенко, 1982].

Результаты

Если принять расстояние на электрофореграмме от старта до середины наиболее быстрой (первой) фракции за единицу, то расстояние до любой из остальных фракций будет являться показателем ее подвижности (R_f) на электрофореграмме. Таким образом, R_f есть подвижность фракции, являющаяся отношением расстояния от старта до данной фракции к расстоянию до фронта.

Все исследованные образцы шерсти обезьян показали картину альфа-кератинов, весьма отличную от той, которая наблюдалась при анализе образцов волос человека (рис. 1, 2). Если значения R_f всех шести фракций кератинов волос не превышают величину 0.5, то в образцах обезьяньей шерсти, наряду с такими медленно мигрирующими фракциями, наблюдается значительное число (от 3 до 7) быстро мигрирующих фракций, R_f которых превышает 0.5. Следует отметить, что медленно мигрирующие зоны б-кератинов всех обезьян полностью соответствуют электрофоретическим зонам альфа-полипептидов человека по величинам R_f .

Если почти все человеческие образцы волос оказались практически идентичными по типам альфа-полипептидов, то остальные приматы оказались весьма гетерогенными между собой по этому признаку. Различия наблюдались как по числу, так и по подвижности и степени выраженности фракций. Всего было обнаружено 12 типов распределения полипептидных зон на электрофореграммах (рис. 1, 2, табл. 2).

Для исследования существования внутривидового полиморфизма нами были проанализированы 44 образца шерсти зеленых мартышек, 25 макак резусов, 27 яванских макак. Все образцы зеленых мартышек оказались совершенно одинаковыми по числу, R_f и интенсивности окрашивания фракций. Среди них регистрировалось по 12 зон (табл. 2), основные из которых имели $R_f = 0.36$; 0.42; 0.51; 0.61; 0.84. 27 яванских макак также не различались между собой, хотя и дифференцировались от зеленых мартышек. Картина распределения б-полипептидов у 14 из 15 образцов макак резусов была идентична картине распределения фракций яванских макак. Один образец несколько отличался от остальных – зона с $R_f = 0.84$ была представлена не одной интенсивно выраженной фракцией, а тремя. Во всех остальных случаях, когда какой-либо вид был представлен более, чем одной особью, внутривидовых различий в спектре б-кератинов обнаружено также не было.

Различия в типах альфа-полипептидов кератинов шерсти были обнаружены между образцами,

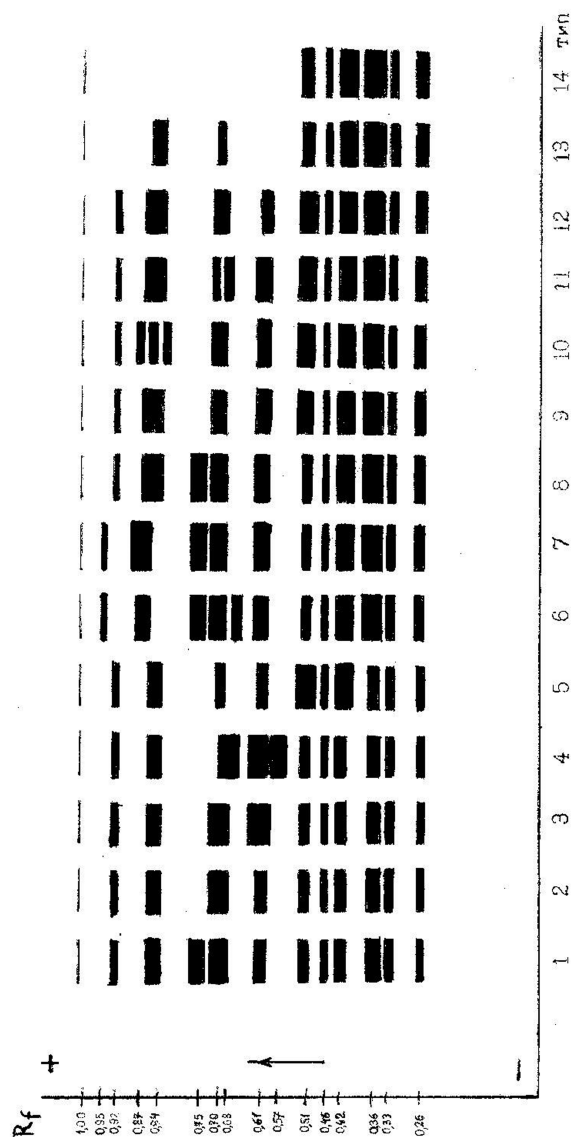


Рис. 1. Схематическое изображение фракций α -кератинов шерсти обезьян разных видов и волос человека

относящимися к различным видам, при том, что во многих случаях даже различные виды часто характеризовались однотипной картиной распределения электрофоретических фракций. Так, одинаковыми оказались все четыре исследованных вида мартышек общей численностью 49 особей. Особенностью, свойственной только этим видам, является наличие двух слабовыраженных близкорасположенных фракций с $R_f = 0.68$ и $R_f = 0.70$. Наиболее сходную с ними картину распределения пептидов имели остальные представители семейства мартышкообразных. Различия наблюдались только в области $R_f = 0.70$, где пос-

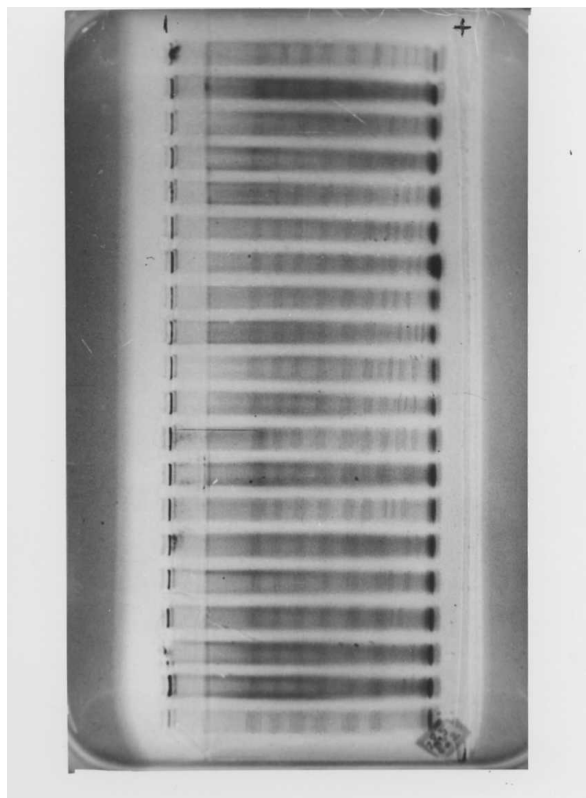


Рис. 2. Электрофоретическое разделение α -кератинов шерсти обезьян и волос человека

ледние имели одну зону высокой плотности. Следует заметить, что полное сходство в типах пептидов белков шерсти наблюдалось не только среди четырех видов, относящихся к одному роду макак, но и между видами рода мангобеев, и даже между всеми родами подсемейства мартышкообразных. Таким образом, оказалось, что вариации типов альфа-кератинов шерсти внутри этого подсемейства весьма невелики – в особую группу выделяется лишь род мартышек.

Значительно сильнее отличаются от них американские обезьяны, общая численность которых составила 14 образцов, представленных 4 видами (тип VI–VIII) (табл. 2). В отличие от низших узконосых обезьян, у всех платирин фракция с $R_f=0.51$ была выражена значительно слабее, однако дополнительно имела место фракция с $R_f=0.75$. Следует подчеркнуть, что обезьяны Нового Света оказались более гетерогенными в распределении альфа-полипептидов, чем узконосые обезьяны, что согласуется с данными о большей вариативности других признаков внутри этой

секции. Представители двух родов *Lagothrix* и *Ateles* одного подсемейства оказались весьма сходны между собой, но четыре образца, относящиеся к роду *Cebus* (другого подсемейства) уже отличались от них по подвижности двух фракций (тип VII). Игрунки, а также и цебусовые имели дополнительный пептид с $R_f=0.75$ и слабовыраженную зону с $R_f=0.51$, но у них была обнаружена дополнительная фракция с $R_f=0.67$, характерная только для них (тип VI). Две быстро мигрирующие фракции и у них оказались смещенными к аноду, как это наблюдалось у представителей рода *Cebus*, причем одна из них ($R_f=0.87$) была выражена несколько слабее.

Еще большее своеобразие обнаруживают кератины шерсти лемурувых (тип I–V) (табл. 2). Особенностью данной группы является низкая плотность двух фракций ($R_f=0.36$, $R_f=0.42$) по сравнению с таковыми у других обезьян, для которых характерна интенсивная выраженность этих электрофоретических зон. Фракция с $R_f=0.84$ у них также проявляется слабее, чем у американских и мартышкообразных, тогда как основными являются зоны с $R_f=0.61$ и $R_f=0.70$, плотность которых на электрофореграммах всех человекообразных оказалась наименьшей. Внутри этого подотряда были отмечены значительные вариации по числу, подвижности и интенсивности проявления фракций. Полное сходство обнаруживают два различных рода *Propithecus* и близкий к ним род *Avahi*. Наиболее сходен к ним род *Indri*, относящийся к тому же семейству индризид – различия заключаются лишь в степени проявления одной из фракций ($R_f=0.61$).

Значительно отличались от них, а также дифференцировались между собой лори, лепилемур и лемуры. Следует заметить, что 3 изученных вида лемурувых показали одинаковую картину распределения пептидных зон.

Особый интерес представляют электрофоретические изображения фракций б-полипептидов человекообразных обезьян, а также у человека (тип XII–XIII) (табл. 2). Картина распределения электрофоретических фракций у гиббона и сроснопала наиболее близка таковой у низших узконосых обезьян. Различия заключаются лишь в том, что у первых фракция с $R_f = 0.61$ выражена несколько слабее. У шимпанзе эта фракция отсутствует полностью, также как и фракция с $R_f = 0.92$, а три другие, имеющиеся у всех обезьян, но отсутствующие у человека, значительно редуцированы. Такая закономерность свидетельствует о возможном процессе постепенного уменьшения и окончательной потери целого ряда пептидных зон в процессе эволюции человека.

Таблица 2. Распределение исследованных видов обезьян и *Homo sapiens* по типам альфа-кератинов

№№	Тип α-кератинов	Вид	Число особей
1	I	Лори тонкий цейлонский (<i>Loris tardigradus</i>)	1
2	II	Индри короткохвостый (<i>Indri brevicaudatus</i>)	1
3	III	Авагис руконосный (<i>Avahi laniger</i>)	1
4		Сифака диадемовый (<i>Propithecus diadema</i>)	1
5		Сифака Верро (<i>Propithecus verreauxi</i>)	2
6	IV	Лепилемур ласковый (<i>Lepilemur mustelinus</i>)	1
7	V	Лемур кошачий (<i>Lemur catta</i>)	2
8		Лемур монгоц (<i>Lemur mongoz</i>)	1
9		Лемур чернолобый (<i>Lemur nigrofrons</i>)	1
10	VI	Игрунка обыкновенная (<i>Callithrix jacchus</i>)	2
11	VII	Капуцин хохолкоголовый (<i>Cebus apella</i>)	4
12	VIII	Шерстистая обезьяна (<i>Lagothrix lagotricha</i>)	4
13		Черная паукообразная обезьяна (<i>Ateles paniscus</i>)	4
14	IX	Макак резус (<i>Macaca mulatta</i>)	15
15		Макак яванский (<i>Macaca fascicularis</i>)	27
16		Макак шерстистый (<i>Macaca vestitus</i>)	1
17		Макак свинохвостый (<i>Macaca nemestrina</i>)	1
18		Мангобей черный (<i>Cercocebus aterrimus</i>)	1
19		Мангобей серощекий (<i>Cercocebus albigena</i>)	2
20		Павиан хохлатый черный (<i>Cynopithecus niger</i>)	1
21		Павиан бабуин (<i>Papio cynocephalus</i>)	1
22		Мандрил (<i>Mandrillus sphinx</i>)	4
23		Гелада (<i>Theropithecus gelada</i>)	2
24		X	Мартышка зеленая (<i>Cercopithecus sabaues</i>)
25	Мартышка Сикеса (<i>Cercopithecus albogularis</i>)		1
26	Мартышка голуболицая (<i>Cercopithecus cephus</i>)		1
27	Мартышка диана (<i>Cercopithecus diana</i>)		3
28	XI	Гиббон белорукий (<i>Hylobates lar</i>)	2
29		Сиаманг сrostнопальный (<i>Symphalangus syndactylus</i>)	2
30	XII	Шимпанзе обыкновенный (<i>Pan troglodytes</i>)	2
31	XIII	Человек (<i>Homo sapiens</i>)	486

Оценка степени сходства между видами приматов по типам альфа-полипептидов белков шерсти

На основании сравнительного анализа альфа-полипептидов была проведена оценка степени таксономического сходства для каждой пары из исследованных видов. Эта оценка учитывала как подвижность, так и интенсивность проявления фракций. Интенсивность имеет немалое значение, так как для каждой фракции она постоянна у каждого вида и, следовательно, различия по этому признаку между видами являются генетически обусловленными.

По-видимому, существенную роль в наблюдаемой биохимической изменчивости играют гены-регуляторы, хотя не исключена и роль структурных генов.

В качестве меры сходства между группами нами использовался коэффициент ассоциации, представляющий долю совпадающих по числу, подвижности и интенсивности проявления фракций у данной пары. В общей сложности было рассчитано 78 коэффициентов ассоциации, которые приведены в таблице 3. Коэффициенты ассоциации между видами, типы альфа-кератинов которых были идентичны, равны единице. Для получения более наглядного представления об общей картине связей между видами приматов на осно-

вании полученных коэффициентов была построена дендрограмма (рис. 3).

В целом дендрограмма отражает реальные таксономические взаимоотношения, существующие между различными группами обезьян. Так, полным сходством обладают виды, относящиеся к одним и тем же родам, а также близкие рода. Два основных кластера образуют гаплориновые и стрепсириновые приматы; дифференцируются низшие узконосые и широконосые обезьяны. Наибольшим сходством обладают типы, полученные при анализе близких в таксономическом отношении групп. Следует обратить внимание на то, что по соотношению белковых компонентов гиббоны оказались значительно ближе к мартышкообразным, чем к шимпанзе и человеку, а человек и шимпанзе образуют единый кластер. Вместе с тем наблюдается определенное несоответствие масштабов сходства и различия отдельных таксономических групп известной «классической» морфологической классификации, а в некоторых случаях даже их положения. Так, паукообразные и шерстистые обезьяны обнаруживают большее, чем можно было бы ожидать, сходство с узконосыми, а капуцины сближаются с игрунковыми, хотя сходство между последними на основании других признаков не так велико. Сравнительно большие различия отмечаются между лемурами и лепилемурами, относящимися к одному семейству, а шим-

Таблица 3. Коэффициенты ассоциации между типами альфа-полипептидов кератинов шерсти приматов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	–												
2	.82	–											
3	.73	.90	–										
4	.62	.67	.75	–									
5	.64	.67	.60	.50	–								
6	.28	.14	.14	.13	.21	–							
7	.31	.15	.15	.13	.23	.83	–						
8	.45	.27	.27	.30	.36	.64	.69	–					
9	.36	.30	.30	.25	.40	.50	.54	.82	–				
10	.25	.27	.27	.25	.45	.50	.43	.67	.82	–			
11	.45	.40	.30	.25	.50	.43	.46	.73	.90	.73	–		
12	.27	.30	.30	.25	.36	.46	.50	.54	.50	.45	.50	–	
13	.18	.20	.20	.18	.30	.42	.45	.45	.50	.45	.50	.62	–

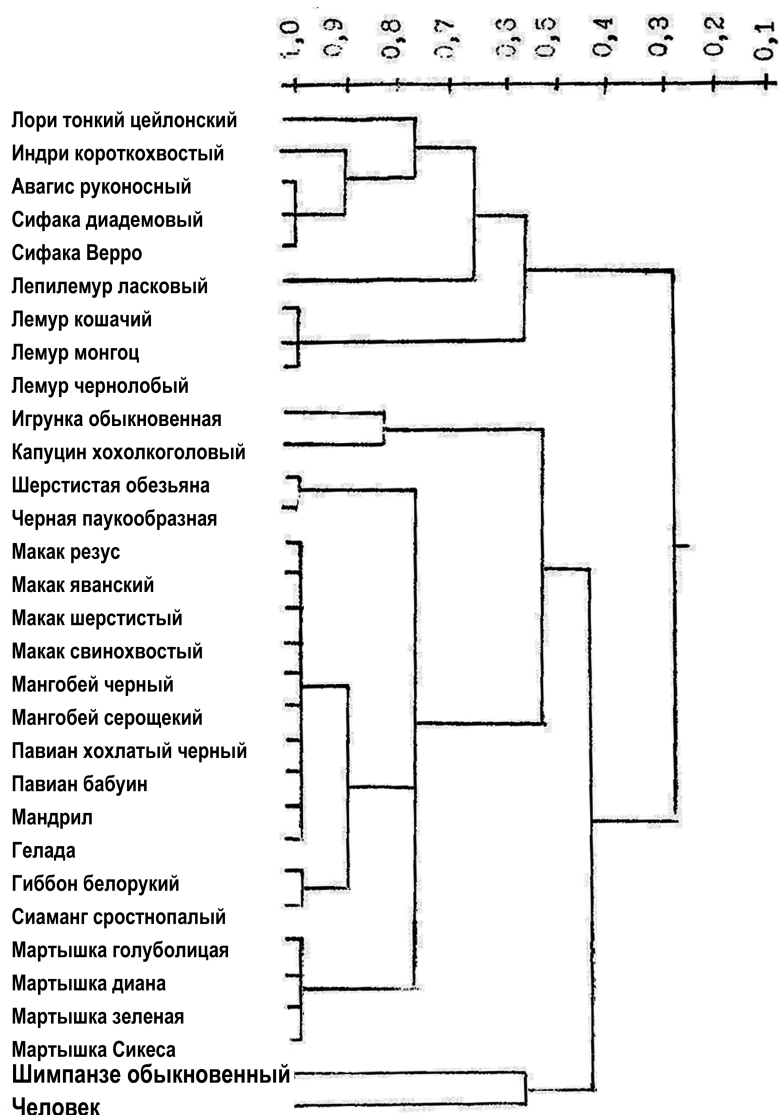


Рис. 3. Дендрограмма, иллюстрирующая взаимоотношение видов отряда приматов по данным о полиморфизме α -кератинов

панзе занимает весьма отдаленное положение от остальных узконосых обезьян.

На основании предпринятого анализа мы склонны полагать, что наблюдаемый эффект связан с неравномерной скоростью эволюционных изменений, отразившихся в дифференциации структуры альфа-кератинов шерсти у разных видов на различных этапах филогенеза. Так, например, у антропоморфных приматов отмечается последовательный процесс редукции целого ряда пептидов, возможно связанный с делеционными изменениями в ДНК и отсутствующий у остальных приматов. Следствием этого и явилось включение шимпанзе и человека в общий отдельный

кластер по отношению к остальным узконосым и американским обезьянам, образующим единую ветвь на таксономическом древе. Следует заметить, что при расчете коэффициента ассоциации идентичными фракциями у двух сравниваемых видов мы считали зоны, совпадающие по подвижности и интенсивности, а несовпадающими – все остальные, независимо от степени различий. То есть не учитывалось, отличаются ли виды лишь незначительно по интенсивности или у одного такая фракция отсутствует полностью, а у другого выражена максимально. Существенным моментом здесь является и то, что резко дифференцирующиеся по подвижности альфа-кератиновые

зоны, вероятно, определяют различия на разных таксономических уровнях, а именно, чем меньше значение R_f фракции, тем более высокого таксономического ранга различия она определяет. Различия между представителями семейства цебусовых наблюдались в области $R_f = 0.84 - 0.95$, а между американскими обезьянами в целом и низшими узконосыми – в области $R_f = 0.75$ и 0.51 . Среди представителей лемуroidных наибольшей вариабельностью обладали фракции, имеющие $R_f = 0.42 - 0.75$, притом, что именно эти фракции у них являются основными. Фракции же, R_f которых меньше 0.5 в данной группе, оказываются достаточно стабильными. В то же время наблюдается четкая дифференциация по интенсивности трех из этих медленно мигрирующих фракций в образцах шерсти стрепсириновых и гаплориновых приматов, при наличии полного мономорфизма по ним внутри этих крупных подразделений.

Обсуждение

Необходимо подчеркнуть, что существенной особенностью примененного в данном исследовании метода является использование для анализа коллекционных образцов, поскольку не всегда представляется возможным получение материала от живых представителей отряда приматов.

Сопоставить наши данные с уже имеющимися литературными данными оказалось возможным лишь по некоторым видам, изученным, например, Д.Б. Хрди и Х.П. Баденом [Hrdy, Baden, 1973], которые проанализировали незначительное число видов обезьян. Тем не менее, для тех видов, которые оказалось возможным сопоставить, полученные нами электрофоретические спектры распределения фракций альфа-кератинов в целом соответствуют картинам распределения фракций, которые представляются в вышеуказанной работе. Так, типы альфа-кератинов, характерные для большинства представителей мартышкообразных (тип IX) по числу и подвижности (R_f) практически полностью соответствуют таковым, полученным Хрди и Баденом для макак и павианов [Hrdy, Baden, 1973].

Полная редукция быстромигрирующих фракций у человека и частичная – у шимпанзе наблюдается как по данным уже упомянутых выше исследователей [Hrdy, Baden, 1973], так и по нашим результатам. Для американских обезьян имеется совпадение по большинству электрофоретических фракций, за исключением зоны с $R_f = 0.7$, где в наших наблюдениях отмечалось раздвоение

соответствующей зоны. Лемуровые, к сожалению, не исследовались этими авторами, и напротив, образцов шерсти тупайи, изученной ими, не оказалось в нашем распоряжении.

Для анализа систематики приматов применялись и применяются различные подходы: иммунологический, генетико-биохимический метод изучения полиморфизма ферментных и других белков, гибридизация нуклеиновых кислот, полиморфизм митохондриальной ДНК, изучение полиморфных сайтов ДНК в различных генах методом полимеразной цепной реакции. На основании полученных результатов были представлены многочисленные классификации отряда приматов. Тем не менее, все эти классификации обнаруживают значительное сходство и, в основном, соответствуют общепринятой таксономии отряда приматов. Причем закономерности сходства особенно четко проявляются на уровне семейств и подсемейств. Степень же близости родов, а тем более видов, оказывается не всегда одинаковой. Так, исследователями [Sarich & Cronin, 1976] была предпринята попытка сопоставления иммунологических расстояний с дистанциями, полученными на основании изучения аминокислотных замещений, электрофоретического анализа белков крови, гибридизации ДНК-ДНК. Оказалось, что иммунологические расстояния прямо пропорциональны числу аминокислотных замещений. Следует заметить, что структура белков и последовательностей оснований ДНК человека и африканских человекообразных обезьян характеризуются очень большим сходством, но отличается в большей степени от таковых при сравнении с азиатскими антропоидами.

Существует несколько объяснений несоответствия между данными молекулярной антропологии и классической систематикой приматов. Так, одни авторы объясняют его замедлением молекулярной эволюции в родословных человека и антропоидов [Goodman, 1976]. Другие авторы полагают, что равномерная эволюция по структурным генам сопровождалась возрастанием роли мутаций в регуляторных областях генома, которые, согласно их представлению, лежат в основе морфофизиологического прогресса предков человека и сопровождалась крупными хромосомными перестройками [Sarich & Cronin, 1976].

Заключение

Изучение характера распределения типов альфа-кератинов среди различных представите-

лей отряда приматов позволяет сформулировать некоторые предположения об эволюционных изменениях этой системы.

К специфическим особенностям данного белка на уровне используемого нами метода генной экспрессии следует отнести полное, или почти полное, отсутствие внутривидового полиморфизма у обезьян. Единственный, отличающийся от других вариант альфа-полипептидов кератинов шерсти у макак резусов, вероятно, является исключением, так как подобной картины распределения электрофоретических фракций не наблюдалось ни у одного из остальных 43 образцов шерсти различных видов макак, равно как у представителей других родов мартишкообразных, имевших идентичное распределение фракций полипептидов. Подобный эффект потери внутривидовой изменчивости у приматов наблюдался, например, при анализе полиморфизма в большом комплексе генов гистосовместимости (МНС) [Garamazegi, de Groot, Bontrop, 2009]. Более того, различия в системе альфа-кератинов проявляются только на уровне крупных таксонов, в основном подсемейств, отряда приматов.

Синтез альфа-кератинов связан с теми фрагментами ДНК, которые отвечают за контроль стабильных структур наружных покровов, что в свою очередь обуславливает инертность филогенетических изменений в системе белков этого класса.

Можно полагать, что в целом эволюция белков шерсти характеризовалась двумя качественно различными этапами. На ранних этапах дифференциации отряда приматов формирование отдельных его таксономических групп, обладающих собственной картиной распределения фракций (полиморфизма), сопровождалось мутационными событиями в локусах, ответственных за синтез альфа-кератинов. На более поздних этапах эволюции более высоко организованных представителей отряда приматов, по-видимому, изменения системы генов альфа-кератинов и ассоциированных с ними генов проистекла по иному пути, а именно имели место последовательные делеционные изменения, приведшие к редукции отдельных альфа-кератинов шерсти.

Благодарности

Авторы выражают признательность Российскому фонду фундаментальных исследований (грант № 09-06-00114-а) и Российскому гуманитарному фонду (грант № 04-01-00283а) за частичную финансовую поддержку работы.

Библиография

- Бейли Н.* Математика в биологии и медицине. М.: Мир. 1970.
- Нестурх М.Ф.* Приматология и антропогенез. М.: Медгиз. 1960.
- Песенко Ю.А.* Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. М.: Наука. 1982.
- Arin M.J.* The molecular basis of human keratin disorders // Hum. Genet. 2009. PMID: 19247691.
- Baden H.P., Lee L.D., Kubilus J.* A genetic electrophoretic variants of human hair alpha-polypeptides // Am. J. Hum. Genet. 1975. Vol. 27. P. 472–477.
- Birbeck M.S.* Keratin: ultrastructural review // Progress in the biological sciences in Relation to Dermatology. Cambridge. 1964. P. 193–198.
- Cannon-Carlson S., Tang J.* Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and non-reducing gels // Anal. Biochem. 1997. Vol. 246. N 1. P. 146–148.
- Garamazegi L.Z., de Groot N.G., Bontrop R.E.* Correlated evolution of nucleotide substitution rates and allelic variation in MHC-DRB lineages of primates // BMC Evol. Biol. 2009. Vol. 12. N 9. P. 73.
- Gillespie J.M., Simmons D.H.* Amino acid composition of a sulphur-rich protein from wool // Biochem. Biophys. Acta. 1960. Vol. 39. P. 538–545.
- Goodman M.* Toward a genealogical description of the primates // Molecular Anthropology. New York. 1976. P. 301–320.
- Hesse M., Zimek A., Weber K., Magin T.M.* Comprehensive analysis of keratin gene clusters in human and rodents // Eur. J. Cell. Biol. 2004. Vol. 83. N 1. P. 19–26.
- Hrdy D.B. and Baden H.P.* Biochemical variation of hair keratins in man and non-human primates // Am. J. Phys. Anthropol. 1973. Vol. 39. P. 19–24.
- Nishikawa J., Kiss C., Imai S. et al.* Upregulation of the truncated basic hair keratin 1 (hHb1-DeltaN0 in carcinoma cells by Epstein-Barr virus (EBV) // Int. J. Cancer. 2003. Vol. 107. N 4. P. 597–602.
- Powell B.C., Neski A., Rogers G.E.* Regulation of keratin gene expression in hair follicle differentiation // Ann. NY Acad. Sci. 1991. Vol. 642. P. 1–20.
- Powell B.C., Rogers G.E.* The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure and properties of hair // Formation and Structure of Human Hair. Ed.: Jolles PZH, Hocker H. Basel: Birkhauser Verlag: 1997. P. 59–148.
- Rogers M.A., Winter H., Langbein L. et al.* Characterization of a 300 kbp region of human DNA containing the type II hair keratin gene domain // J. Invest. Dermatol. 2000, Vol. 114, N 3. P. 464–472.
- Rogers M.A., Winter H., Langbein L. et al.* Characterization of human KAP24. I, a cuticular hair keratin-associated protein with unusual amino-acid composition and repeat structure // J. Invest. Dermatol. 2007. Vol. 127. P. 1197–1204.
- Rogers M.A., Winter H., Wolf C. et al.* Characterization of a 190-kilobase pair domain of human type I hair keratin genes // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. N 41. P. 26683–26691.
- Sarich V.M., Cronin J.E.* Molecular systematics of primates // Molecular Anthropology. New York. 1976. P. 141–170.

Shechter Y., Landau G.W., Newcomer V.D. Comparative disk electrophoresis of hair keratines // J. Invest. Dermatol. 1969. Vol. 52. P. 57–62.

Wanner R., Forster H.H., Tilmans I., Mischke D. Allelic variation of human keratins K4 and K5 provide polymorphic markers within the type II keratin gene cluster on chromosome 12 // J. Invest. Dermatol. 1993. Vol. 100. N 6. P. 735–741.

Wo Dong-Dong, Irvin D.M., Zhang Ya-Ping. Molecular evolution of the keratin associated protein gene family in mammals, role in the evolution of mammalian hair // BioMed Central (BMC) Evolutionary Biology. 2008. Vol. 8. P. 1–15.

Yahagi S., Shibuya K., Obayashi I. et al. Identification of two novel clusters of ultrahigh-sulfur keratin-associated protein genes on human chromosome 11 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 318. P. 655–664.

Контактная информация:

Спицын В.А. 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1. Медико-генетический научный центр РАМН. E-mail: Ecolab@med-gen.ru;
Афанасьева И.С. 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1. Медико-генетический научный центр РАМН. E-mail: Ecolab@med-gen.ru;
Бычковская Л.С. 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1. Медико-генетический научный центр РАМН. E-mail: Ecolab@med-gen.ru;
Спицына Н.Х. 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 32-а, Институт этнологии и антропологии РАН.

MOLECULAR SYSTEMATICS OF PRIMATES ORDER ON THE GENIC EXPRESSION LEVEL OF HAIR KERATINS

V.A. Spitsyn¹, I.S. Afanasyeva¹, L.S. Bychkovskaya¹, N.Kh. Spitsyna²

¹ *Research Centre for Medical Genetics, RAMS, Moscow*

² *Institute of Ethnology and Anthropology, RAS, Moscow*

Some problems of human evolutionary history have been tried to be resolved by analyzing molecular evolution. Molecular systematics has some methods, which can be useful for primatological investigations. Detail analysis of keratin protein systems forming human and other mammalian hair allows to match the taxonomical tree of Primates order as compared with dendrograms using another traits. The advantages of this method consist in the possibility of utilization of old hair samples. Intraspecific and interspecific variability of α -keratins has been studied in thirty Primates species. In general all studied hair samples showed different protein structure from human hair. Human Rf coefficient values, namely relative mobility of electrophoretic zones, do not exceed 0.5 unit. On the contrary, monkeys possess from 3 to 7 fast migrating electrophoretic zones with Rf more than 0.5, including the same «human» stripes. On the whole, we observed an absolute reduction of fast electrophoretic migrating zones in humans and partial zones reduction in chimpanzee. Differences in the α -keratin types were observed between large taxonomical groups of primates, mainly between subfamilies and higher. In our case the trichotomy of humans – chimpanzees – gibbons as apes has not been resolved by the α -keratin study. On the contrary, Hylobatinae species joined with Cercopithecidae groups.

Key words: α -keratins, Primates hair, molecular systematics