

Влияние переназначения кодонов на свойства и структуру митохондриальных белков байкальских амфипод

Юдинцева А.В.^{*1}, Романова Е.В.¹, Щербаков Д.Ю.^{1,2}, Букин Ю.С.^{1,3}

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

Аннотация. Существует более десяти вариантов митохондриального генетического кода эукариот. Изменение генетического кода в ходе эволюции, иначе называемое переназначением кодонов, может происходить в результате механизма, включающего стадию ремолдинга тРНК генов (изменение идентичности тРНК вследствие точечных мутаций в антикодоновой последовательности). При изучении структур митохондриальных геномов байкальских амфипод (Crustacea) у ряда видов был выявлен ремолдинг тРНК генов, случаи которого наиболее достоверно были показаны у *Acanthogammarus victorii* (3 случая ремолдинга), *Eulimnogammarus vittatus* и *Gmelinoides fasciatus* (по одному случаю ремолдинга). Примечательно, что помимо копии тРНК, подвергшейся ремолдингу, в митохондриальных геномах байкальских амфипод сохранился исходный ген тРНК этого типа. В данной работе при помощи биоинформатического анализа оценивалось потенциальное влияние переназначения кодонов вследствие ремолдинга тРНК генов на некоторые физико-химические свойства и пространственную структуру митохондриальных белков, главным образом на белок цитохром *b* (CYTB), у вышеупомянутых видов амфипод. Проводилась *in silico* трансляция митохондриальных белков с использованием различных вариантов генетического кода: стандартным митохондриальным кодом беспозвоночных (без переназначения кодонов), а также с учетом частичного и полного переназначения кодонов. Сравнивались такие физико-химические свойства белка CYTB, как молекулярный вес, средний вес аминокислотного остатка, изоэлектрическая точка и заряд. Также оценивалось сходство трехмерных структур моделей белка CYTB по показателю RMSD (среднеквадратичное отклонение). Анализ позволил установить, что эволюционные дистанции в митохондриальных белках с учетом частичного и полного переназначения кодонов на внутривидовом уровне меньше тех, которые формируются на межвидовом уровне в процессе эволюционной дивергенции. Выявлено, что переназначение кодонов приводит к изменениям как физико-химических свойств белка, так и его пространственной структуры, однако эти изменения также были значительно меньше таковых, посчитанных для белков у разных видов амфипод. Влияние на физико-химические свойства и пространственную структуру белка CYTB зависит как от количества переназначенных кодонов, так и от разности свойств заменяемых аминокислот. Наибольшее влияние переназначение кодонов оказало на значение изоэлектрической точки (от 5.5 до 8.9) и заряда (от – 3.5 до 9) белка CYTB у вида *A. victorii*. Возможно, экологические условия озера Байкал способствуют появлению дополнительных копий митохондриальных тРНК и их ремолдингу.

Ключевые слова: митохондриальный геном, митохондриальный протеом, цитохром *b* (CYTB), эволюционные дистанции, аминокислотные замены

ВВЕДЕНИЕ

Митохондриальный (мт) геном большинства многоклеточных животных содержит 13 белок-кодирующих генов, которые являются необходимыми компонентами электрон-транспортной цепи митохондрий, осуществляющей процесс окислительного фосфорилирования. Известно, что большая часть белков этой системы кодируется ядерным геномом и только 13 белков кодируются в митохондриальных ДНК. Также митохондриальный геном включает 22 гена транспортных РНК (тРНК) и 2 рибосомных гена (рРНК), которые участвуют в трансляции белков с митохондриальных мРНК.

Транспортная РНК является молекулой длиной около 70–85 нуклеотидов [1], главная функция которой – служить адаптером в процессе трансляции белка, обеспечивая соответствие между нуклеотидной последовательностью мРНК и аминокислотной последовательностью. В отличие от цитозольных тРНК, митохондриальные тРНК отличаются вариативностью в размерах D-петли и T-петли (D-loop, T-loop) [2], а в некоторых митохондриальных тРНК D-ветвь или T-ветвь (D arm, T arm) может и вовсе отсутствовать [3–5]. В редких случаях наблюдается изменение размеров антикодоновой ветви [6, 7]. Учитывая данные особенности вторичной структуры митохондриальных тРНК, возникает вопрос об их идентичности, поскольку установлено, что данные участки содержат сайты узнавания аминокислот-тРНК-синтетазой (aaRS). Часто в геномных исследованиях идентичность тРНК генов определяется программами аннотации, учитывающими только последовательность антикодона и заданный исследователем генетический код, известный для наиболее близкородственного организма [8]. Однако, реальное соответствие кодона мРНК и аминокислоты определяется сложными взаимодействиями между тРНК и специфической aaRS, детально изученными лишь для небольшой группы модельных организмов [9]. В молекулах митохондриальных тРНК присутствуют участки, взаимодействующие с родственными aaRS (детерминанты), а также участки, предотвращающие взаимодействие с неродственными aaRS (антидетерминанты). Изменения последовательности этих участков могут влиять на процесс аминокислотирования.

Экспериментальные работы, посвященные влиянию отдельных структурных элементов на специфичность трансляции митохондриальных тРНК проведены для небольшой части организмов [10–13]. Было показано, что для разных типов тРНК характерны разные участки распознавания aaRS; кроме того, эти участки отличаются у разных групп организмов [14].

Аминокислотирование митохондриальных тРНК – сложный процесс на точность которого влияет множество факторов. Тем не менее, согласно результатам современных исследований, можно утверждать, что антикодон и акцепторная область являются наиболее важными элементами идентичности тРНК [9]. Учитывая важность последовательности антикодона тРНК в реализации генетического кода, представляет интерес такое явление, как ремолдинг тРНК генов. Под ремолдингом понимают изменение идентичности тРНК вследствие точечных мутаций в антикодоновой последовательности [15]. Ремолдинг митохондриальных тРНК генов впервые был описан в работе П. Кантаторе и др. в 1987 году [15]. Важно заметить, что ремолдинг происходит чаще всего в результате дупликации гена тРНК [15]. С тех пор ремолдинг был обнаружен у различных групп животных: у губок [16], насекомых [17], моллюсков [18] и др. В большинстве случаев явление ремолдинга тРНК генов было обнаружено посредством анализа *in silico*. Экспериментальные исследования подтвердили смену идентичности тРНК у бактерии *Escherichia coli* [19], губки *Axinella corrugata* [16], инфузории *Paramecium tetraurelia* [20] и др.

Можно предположить, что в процессе аминокислотирования aaRS идентифицирует тРНК, подвергшуюся ремолдингу, по детерминантам, не связанным с антикодоном, и, соответственно, присоединит аминокислоту согласно этим детерминантам, в то время

как тРНК останется комплементарной кодону мРНК в соответствии с последовательностью своего антикодона. В результате такого явления произойдет изменение соответствия между кодоном и аминокислотой, иными словами, произойдет переназначение кодона. Таким образом, ремолдинг тРНК генов (при условии функциональности измененных тРНК), может привести к встраиванию в последовательность полипептида другой аминокислоты.

Действительно, процесс реализации генетического кода строго контролируется на всех стадиях трансляции, поскольку даже незначительные изменения в аминокислотной последовательности могут критически повлиять на жизнеспособность организма. Между тем, известно о существовании 27 вариантов генетического кода, 13 из которых представляют собой генетический код митохондрий. Отличия от стандартного генетического кода у всех этих вариантов небольшие (переназначены до шести кодонов). Изменения затрагивают как смысловые, так и терминирующие кодоны (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi>).

Причины появления большого разнообразия митохондриальных кодов у эукариот не до конца поняты, но к настоящему моменту преобладают две основные гипотезы переназначения кодонов: гипотеза «захвата кодонов» [21] и «неоднозначного промежуточного кодона» [22]. Из-за относительно небольшого размера митохондриального генома и отклонения в нуклеотидном составе (часто в сторону большего использования нуклеотидов А и Т) некоторые кодоны используются редко. В этом случае процесс переназначения митохондриальных кодонов часто объясняется гипотезой «захвата кодонов» [23, 24]. Согласно теории «захвата кодонов», в геномах с сильно смещенным содержанием пар АТ или GC, редко используемые кодоны могут исчезнуть из-за давления мутаций и утраты соответствующей тРНК. Впоследствии эти кодоны могут повторно появиться в результате генетического дрейфа и быть декодированы («захвачены») тРНК другого типа. Гипотеза «неоднозначного промежуточного кодона» предполагает наличие двух тРНК заряженных разными аминокислотами, которые конкурируют за один и тот же кодон [24]. Измененная (мутантная) тРНК будет постепенно перенимать декодирование неоднозначного кодона от исходной тРНК, которая впоследствии утратится [24]. Таким образом, эволюционные преобразования молекулы тРНК играют ключевую роль в процессе переназначения кодонов.

Ремолдинг тРНК генов был обнаружен в митохондриальных геномах ряда байкальских эндемичных амфипод [25, 26]. Интересно, что в митохондриальных геномах байкальских амфипод, в которых были обнаружены тРНК гены с ремолдингом, сохраняется также и неизмененный ген тРНК того же типа [26]. К числу этих видов относятся *Acanthogammarus victorii* (семейство Acanthogammaridae), *Eulimnogammarus vittatus* (семейство Eulimnogammaridae) и *Gmelinoides fasciatus* (семейство Micrurpodidae). Амфиподы являются наиболее разнообразным отрядом ракообразных в Байкале; описано более чем 350 морфологических видов и подвидов [27]. Амфиподы в Байкале занимают разнообразные экологические ниши. Среди них встречаются фитофаги, детритофаги, падальщики и хищники. Эти виды распространены от уреза воды до самых больших глубин озера [27].

Белок СУТВ представляет удобную модель для изучения влияния переназначения кодонов на свойства и структуру белка. Этот трансмембранный белок представляет собой центральную каталитическую субъединицу убихинол-цитохром с-редуктазы (комплекс *bc1*) [28], посредством которой осуществляется перенос электронов от убихинона к цитохрому с. Белок СУТВ является единственной субъединицей комплекса *bc1*, которая кодируется митохондриальным геномом. В базе данных PDB представлены трехмерные структуры СУТВ для некоторых модельных организмов, что позволяет реконструировать ее третичную структуру для других организмов методом гомологического моделирования без привлечения дополнительных аминокислотных

последовательностей других субъединиц комплекса. Для оценки влияния переназначения кодонов могут применяться и другие биоинформатические методы, такие как оценка эволюционных расстояний между аминокислотными последовательностями белков и сравнение физико-химических свойств белка (молекулярного веса, изоэлектрической точки (pI), заряда и т.д.).

В настоящей работе проводится анализ влияния переназначения кодонов, в результате ремолдинга митохондриальных тРНК генов, на некоторые физико-химические свойства белковых субъединиц, кодируемых митохондриальным геномом, а также на пространственную структуру белка СУТВ трех видов байкальских амфипод.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходных данных в работе использовались последовательности 13 митохондриальных белок-кодирующих генов (CDS), являющихся частями белковых комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий: гены NADH-дегидрогеназ (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6); гены цитохром-с-оксидаз (COX1, COX2, COX3); ген цитохрома *b* (CYTB); и гены АТФ-синтазы (ATP6 и ATP8). Последовательности генов были взяты из полных и частичных митохондриальных геномов девяти видов байкальских амфипод, в трех из которых (*A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus*) был обнаружен ремолдинг тРНК генов с высокой статистической поддержкой [26]. Кроме того, использовались последовательности голарктического вида амфипод *Gammarus lacustris* (табл. 1).

Таблица 1. Список видов, использованных в исследовании, с номерами в базах данных RefSeq/GenBank и выявленными случаями ремолдинга тРНК генов

Вид	Номер в базе данных RefSeq/GenBank	Ремолдинг генов тРНК
<i>Acanthogammarus victorii</i>	KX341962.1	trnD(GUC) → trnH(GUG) trnA(UGC) → trnI(GAU) trnY(GUA) → trnD(GUC)
<i>Eulimnogammarus vittatus</i>	NC_025564.1	trnP(UGG) → trnL(UAG)
<i>Gmelinoides fasciatus</i>	NC_033361.1	trnQ(UUG) → trnH(GUG)
<i>Brachyuropus grewingkii</i>	NC_026309.1	-
<i>Crypturopus tuberculatus</i>	KX341963.1	-
<i>Pallaseopsis kessleri</i>	NC_033362.1	-
<i>Eulimnogammarus cyaneus</i>	NC_033360.1	-
<i>Eulimnogammarus verrucosus</i>	NC_023104.1	-
<i>Macrohectopus branickii</i>	NC_058990.1	-
<i>Gammarus lacustris</i>	NC_044469.1	-

Поскольку в митохондриальных геномах байкальских амфипод присутствуют неизменная тРНК и тРНК, подвергшаяся ремолдингу, предполагается, что в процессе трансляции могут участвовать оба гена (рис. 1). Таким образом, в протеомах этих организмов могут присутствовать: 1) аминокислотные последовательности, соответствующие стандартному митохондриальному генетическому коду беспозвоночных (без переназначения кодонов); 2) аминокислотные последовательности с переназначенными кодонами во всех соответствующих позициях (полное переназначение кодонов); 3) аминокислотные последовательности со случайным переназначением в соответствующих кодонах (частичное переназначение кодонов), что возможно в случае функциональной активности обеих тРНК (неизменной тРНК и тРНК, подвергшейся ремолдингу).

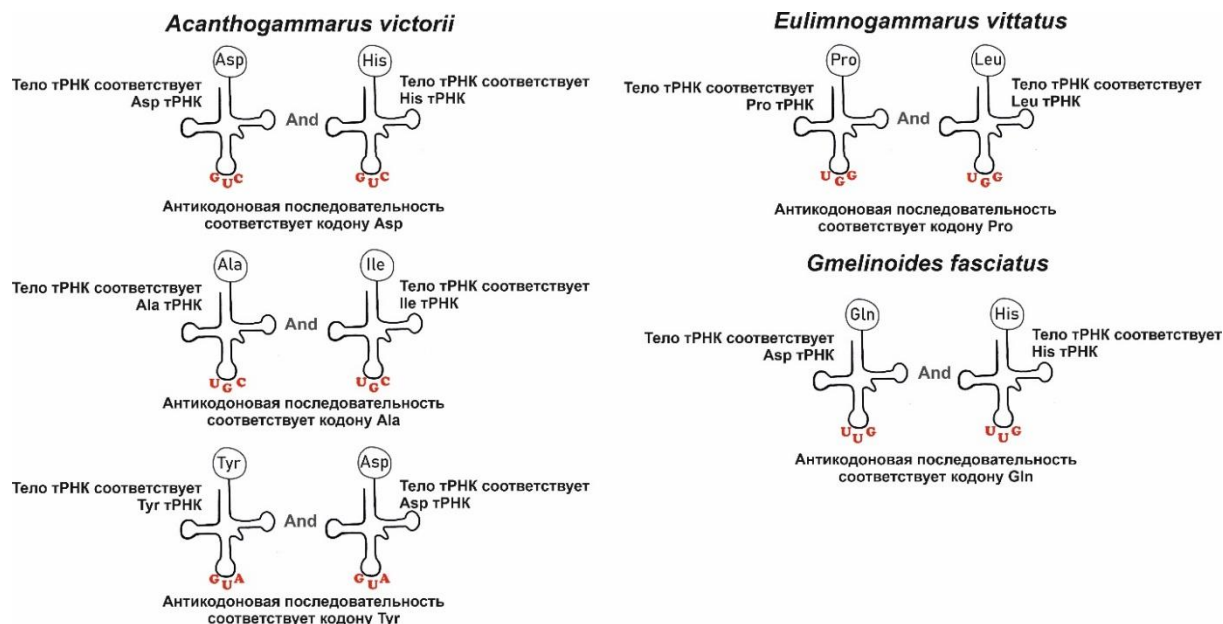


Рис. 1. Схемы тРНК генов в митохондриальных геномах байкальских амфипод видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus*, отражающие наличие двух тРНК одного типа (неизмененную и подвергшуюся ремолдингу).

Для компьютерной трансляции белковых последовательностей (или *in silico* трансляции) с различными вариантами аминокислот в интересующих кодонах был написан скрипт для языка программирования R с использованием пакетов «seqinr» [29] и «stringr» [30]. С помощью данной программы последовательности митохондриальных генов байкальских амфипод с обнаруженным ремолдингом тРНК генов транслировались следующим образом: 1) стандартным митохондриальным генетическим кодом беспозвоочных (генетический код NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi>); 2) стандартным митохондриальным генетическим кодом беспозвоочных с полным переназначением кодонов (случаи ремолдинга тРНК генов представлены в таблице 1); 3) стандартным митохондриальным генетическим кодом беспозвоочных с частичным переназначением кодонов (при данном варианте трансляции предполагается, что все тРНК с измененной последовательностью антикодона являются функциональными. Аминокислотные замены в соответствующих кодонах производились случайным образом). Последовательности митохондриальных генов байкальских амфипод, у которых явление ремолдинга тРНК генов не было обнаружено, транслировались только стандартным митохондриальным генетическим кодом беспозвоочных.

Для филогенетического анализа использовались последовательности, транслированные стандартным митохондриальным генетическим кодом беспозвоочных, с полным переназначением кодонов, с частичным переназначением кодонов (10 вариантов). Для расчета физико-химических свойств, реконструкции трехмерных структур белка СУТВ и их дальнейшего анализа использовались последовательности, транслированные стандартным митохондриальным генетическим кодом беспозвоочных, с полным переназначением кодонов и с частичным переназначением кодонов (30 вариантов).

Аминокислотные последовательности были сгруппированы в комплексы на основе их принадлежности к соответствующим белкам: АТР, СОХ, СУТВ и ND, соответственно. Выравнивание массивов данных белковых комплексов АТР, СОХ, СУТВ и ND осуществлялось с помощью программы «MAFFT» [31].

Модель эволюции аминокислотных последовательностей (модель расчета эволюционных дистанций по аминокислотным последовательностям) для каждого белкового комплекса выбиралась с помощью алгоритма «ModelFinder» [32] в

программе «IQ-TREE» [32] на основе значений байесовского информационного критерия (BIC). Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей проводился методом максимального правдоподобия в программе «IQ-TREE» [33]. Оценка достоверности топологии кластеризации проводилась методами сверхбыстрого бутстрепа (ultrafast bootstrap) [34] и SH-aLRT [35], встроенными в программу «IQ-TREE». Филогенетическая реконструкция выполнялась для каждого белкового комплекса отдельно, а также для интегрального набора данных, объединяющих все белковые комплексы (для каждого комплекса использовалась оптимальная модель расчета эволюционных расстояний). Визуализация результатов филогении проводилась в программе «FigTree» версии 1.4.4 [36]. Укоренение деревьев в программе «FigTree» производилось за среднюю точку – корнем выбиралась точка на ветви дерева, которая делит пополам расстояние между двумя наиболее удаленными таксонами.

Для белка CYTB видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus* были рассчитаны следующие физико-химические свойства: молекулярный вес, средний вес аминокислотных остатков, изоэлектрическая точка (pI), и заряд. Расчеты физико-химических свойств проводились в программе «EMBOSS» [37]. Для каждого вида с обнаруженным ремолдингом тРНК генов оценивались максимальные, минимальные и средние значения физико-химических свойств. Визуализация распределения значений физико-химических свойств проводилась в виде графиков box-plot.

Моделирование и оптимизация трехмерной структуры белка CYTB видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus* осуществлялись на веб-сервере «SWISS-MODEL» [38]. Визуализация трехмерных структур моделей белка проводилась в программе «PyMOL» [39]. Сравнение полученных структур осуществлялось на основе среднеквадратичного отклонения (RMSD) также в программе «PyMOL»: чем больше значение RMSD, тем сильнее различаются трехмерные структуры.

Разработанный нами скрипт для языка программирования R, который применялся в работе для трансляции последовательностей, доступен по ссылке: <https://github.com/barnsys/remolding>.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам алгоритма «ModelFinder» на основе значения BIC наилучшими моделями эволюции для митохондриального белкового комплекса АТР является mtVer+G4, для COX – mtREV+F+I+G4, для CYTB – mtREV+I+G4 и для белкового комплекса ND – mtMet+F+I+G4. Данные модели использовались для филогенетических реконструкций.

Филогенетические деревья, построенные по комплексам аминокислотных последовательностей АТР, COX, CYTB и ND, представлены в [Дополнительном файле](#). Также было реконструировано филогенетическое дерево по общему массиву данных, объединяющему аминокислотные последовательности всех комплексов (рис. 2).

Анализ топологии филогенетического дерева показывает, что для всех белковых комплексов в отдельности и для общего массива данных, аминокислотные последовательности с частичным и полным переназначением кодонов образуют кладу с последовательностями этого же вида без переназначения кодонов. Во всех случаях внутривидовые кластеры аминокислотных последовательностей (транслированных разными вариантами) митохондриальных генов видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus* являлись мономорфными (кластеры без присутствия других видов) с поддержкой 100 % по методу SH-aLRT и 100 % по методу ultrafast bootstrap. Эволюционные дистанции внутривидовых кластеров аминокислотных последовательностей (транслированных разными вариантами) всех белковых комплексов (АТР, COX, CYTB, ND и общий массив данных) видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus* были значительно меньше, чем межвидовые. Наибольшая внутривидовая дистанция (рис. 2) по всем белковым комплексам наблюдалась у вида *A. victorii*. Очевидно, это связано с тем

фактом, что у вида *A. victorii* (табл. 1, рис. 1) выявлено три случая ремолдинга тРНК генов, соответственно, по нашему предположению происходит переназначение сразу трех кодонов, в то время как у видов *E. vittatus* и *G. fasciatus* предполагается переназначение только одного кодона. Для всех филогенетических реконструкций при укоренении дерева за среднюю точку небайкальский вид *G. lacustris* встраивается внутрь дерева (рис. 2), а не является аутгруппой, следовательно, байкальские амфиподы разных семейств имеют полифилетическое происхождение. Подобная кластеризация наблюдается в деревьях, построенных на основе последовательностей каждого комплекса митохондриальных белков в отдельности (см. [Дополнительный файл](#)).

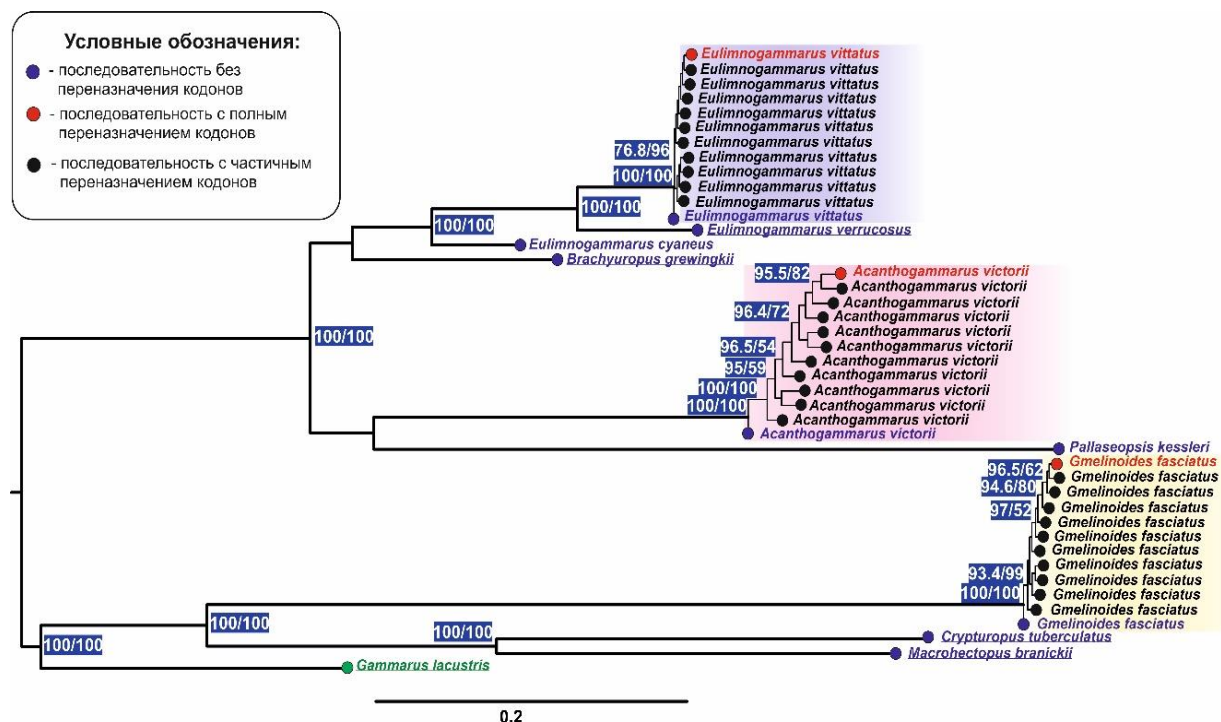


Рис. 2. Филогенетическое дерево по общему массиву данных байкальских амфипод (последовательности комплексов ATP, COX, CYTB и ND). В узлах дерева указаны поддержки топологии по методам SH-aLRT и ultrafast bootstrap (%).

Для оценки влияния переназначения кодонов на физико-химические свойства белков был выбран белок CYTB, длина которого у видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus* составляет 378 аминокислотных остатков. Распределение значений физико-химических свойств белка CYTB (молекулярный вес, средний вес аминокислотных остатков, pI, заряд) и их значения представлены в таблице 2 и на рисунке 3.

Анализ распределения значений физико-химических свойств белка CYTB видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus* показывает, что молекулярный вес и средний вес аминокислотных остатков с полным переназначением и без переназначения кодонов варьируют в достаточно узком диапазоне, и межвидовые границы (пределы минимальных и максимальных значений) не пересекаются. Межвидовые различия этих параметров превышают пределы внутривидовых, которые потенциально могут возникнуть из-за переназначения кодонов. Наибольшая вариабельность молекулярного веса и среднего веса аминокислотных остатков белка CYTB отмечается у вида *A. victorii*. Пределы варьирования этих параметров у видов *E. vittatus* и *G. fasciatus* были значительно меньше (табл. 2, рис. 3). Наибольший разброс значений pI и заряда белка CYTB наблюдается у последовательностей вида *A. victorii* (минимальные и максимальные значения различаются на десятки и сотни процентов), что значительно превосходит вариабельность этих значений у видов *E. vittatus* и *G. fasciatus*.

Наименьший разброс по значениям pI и заряда наблюдается у последовательностей вида *E. vittatus*. Пределы изменения pI у вида *E. vittatus* пересекаются с верхней границей значений вида *A. victorii*. Также примечательно, что пределы изменения заряда белка CYTB у видов *E. vittatus* и *G. fasciatus* частично пересекаются с верхними пределами значений вида *A. victorii*.

Таблица 2. Значения рассчитанных физико-химических свойств белка CYTB видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus*, транскрипированных без переназначения и с полным переназначением кодонов, а также статистические показатели для вариантов с частичным переназначением кодонов

Физико-химические характеристики	Без переназначения кодонов	С полным переназначением кодонов	С частичным переназначением кодонов		
			Min	Max	Mean
Acanthogammarus victorii					
Молекулярный вес	41758.7	41698.7	41554.4	41955.2	41767.3
Средний вес аминокислотных остатков	110.5	110.3	109.9	111	110.5
pI	7.7	6.7	5.5	8.9	7.2
Заряд	3	1	−3.5	9	2.7
Gmelinoides fasciatus					
Молекулярный вес	42761	42824.1	42770	42815.1	42791.9
Средний вес аминокислотных остатков	113.1	113.3	113.2	113.3	113.2
pI	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2
Заряд	8.5	12	9	11.5	10.2
Eulimnogammarus vittatus					
Молекулярный вес	42534.1	42646.4	42550.1	42630.3	42590.8
Средний вес аминокислотных остатков	112.5	112.8	112.6	112.8	112.7
pI	8.9	8.9	8.9	8.9	8.9
Заряд	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5

При сравнении реконструированных трехмерных структур моделей белка CYTB видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus* без переназначения кодонов наблюдается хорошее выравнивание (рис. 4) с величиной среднеквадратичного отклонения атомных координат (RMSD), составляющее не более 0.3 Å. Рассчитанные значения RMSD для пар видов составили: *A. victorii* – *E. vittatus* = 0.473 Å, *A. victorii* – *G. fasciatus* = 0.752 Å, *E. vittatus* – *G. fasciatus* = 0.701 Å. На филогенетическом дереве, построенном по аминокислотным последовательностям белка CYTB ((см. [Дополнительный файл](#)), виды *A. victorii* и *E. vittatus* оказались в одной кладе и имели меньшие эволюционные расстояния по сравнению с *G. fasciatus*. Таким образом, различия структур моделей белка CYTB по значению RMSD соответствуют эволюционным дистанциям между этими видами (рис. 2). Это указывает на то, что структуры белка CYTB у более близкородственных в эволюционном отношении видов байкальских амфипод имеют меньше различий, чем таковые у более отдаленных видов.

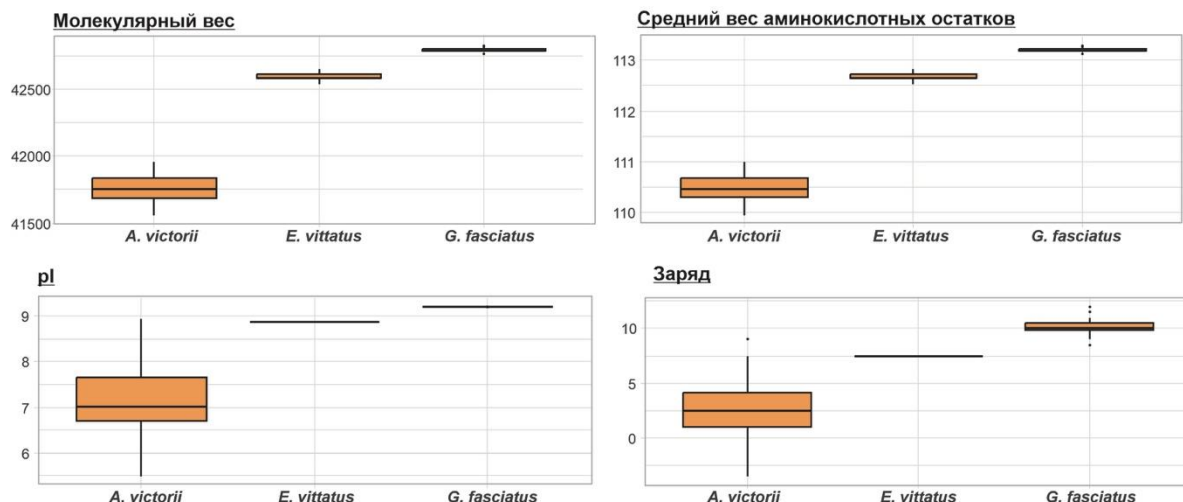


Рис. 3. Графики box-plot распределений значений физико-химических свойств белка CYTB видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus*, транслированных с учетом разных вариантов переназначения кодонов.

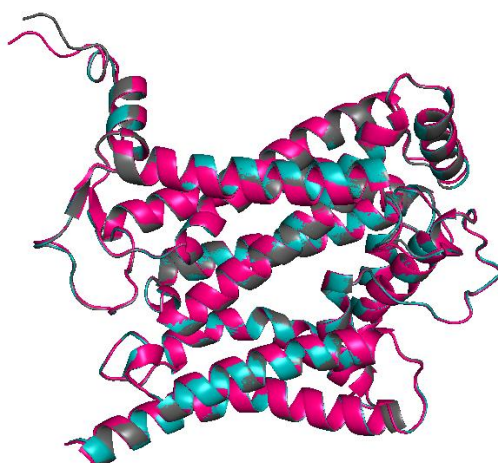


Рис. 4. Выравнивание трехмерных моделей белка CYTB байкальских амфипод видов *A. victorii* (голубой цвет), *E. vittatus* (серый цвет) и *G. fasciatus* (розовый цвет). Модели белка были реконструированы по аминокислотным последовательностям, транслированным без переназначения кодонов.

Анализ полученных значений RMSD (табл. 3) реконструированных трехмерных моделей белка CYTB с полным и частичным переназначением кодонов трех байкальских видов показал, что для вида *A. victorii* максимальное отклонение при выравнивании моделей белка без переназначения и с полным переназначением кодонов составило 0.286 Å, что превосходило аналогичные показатели для видов *G. fasciatus* и *E. vittatus* (значения RMSD составляли 0.179 Å и 0.147 Å соответственно).

Таблица 3. Значения RMSD для трехмерных моделей белка CYTB, с учетом полного и частичного переназначения кодонов для видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus*

Вид	RMSD структуры белка без переназначения кодов со структурой с полным переназначением кодонов (Å)	Среднее значение RMSD структуры белка без переназначения кодов со структурой с частичным переназначением кодонов (Å)
<i>A. victorii</i>	0.286	0.191
<i>G. fasciatus</i>	0.179	0.120
<i>E. vittatus</i>	0.147	0.102

Аналогичные результаты были получены и при анализе значений RMSD, рассчитанных при сравнении трехмерных структур моделей белка СУТВ без переназначения кодонов с 30 моделями с частичным переназначением кодонов. Наибольшее среднее отклонение RMSD также было отмечено у вида *A. victorii*, тогда как средние отклонения RMSD для видов *G. fasciatus* и *E. vittatus* оказались меньше (табл. 3).

Можно установить, что вариация значений RMSD для трехмерных структур моделей белка СУТВ имеет ту же зависимость, что и вариация эволюционных дистанций и физико-химических свойств этого белка: наибольшая вариабельность наблюдается у вида *A. victorii*, поскольку предполагается переназначение сразу трех кодонов, в отличие от видов *G. fasciatus* и *E. vittatus*, где переназначение затрагивает только по одному кодону. Важно отметить, что межвидовые различия по значению RMSD для *A. victorii*, *G. fasciatus* и *E. vittatus* также превышают внутривидовую вариабельность даже с учетом полного переназначения кодонов для каждого из этих видов как минимум в полтора раза. Иными словами, изменения в аминокислотной последовательности белка СУТВ при переназначении кодонов, вследствие ремолдинга тРНК генов, приводят к существенно меньшим изменениям пространственной структуры белка по сравнению с аминокислотными заменами, накопившимися в результате межвидовой дивергенции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Биоинформатический анализ, проведенный в настоящей работе, был нацелен на изучение возможного влияния переназначения кодонов, вызванного ремолдингом тРНК генов, на некоторые физико-химические свойства и пространственную структуру белковых субъединиц, кодируемых митохондриальным геномом трех видов байкальских амфипод.

В результате оценки влияния переназначения кодонов на физико-химические свойства белка СУТВ было установлено, что у вида *A. victorii* без учета переназначения кодонов и у видов *E. vittatus* и *G. fasciatus* с учетом и без учета переназначения кодонов pI белка СУТВ находится в пределах от 7.6 до 9.2, что соответствует слабощелочной и щелочной среде. При трансляции с учетом частичного переназначения кодонов у вида *A. victorii* могут синтезироваться варианты белка СУТВ с минимальным значением pI 5.4, что характерно для слабокислой среды, до максимального 8.9, что соответствует щелочной среде. Заряд белка СУТВ с учетом переназначения кодонов у вида *A. victorii* также может изменяться в широких пределах (от 9 до –3). Эта особенность разброса pI и заряда белка связана с тем, что у вида *A. victorii* в результате переназначения кодонов аспартат может замениться на гистидин (аспартат – отрицательно заряженная аминокислота с гидрофильным боковым радикалом, гистидин – положительно заряженная аминокислота с гидрофильным боковым радикалом), аланин может замениться на изолейцин (обе аминокислоты относятся к категории с гидрофобным незаряженным боковым радикалом), тирозин может замениться на аспартат (тирозин относится к категории с незаряженным гидрофильным боковым радикалом, аспартат – отрицательно заряженная аминокислота с гидрофильным боковым радикалом). У вида *E. vittatus* при переназначении кодонов аминокислота пролин может быть заменена на лейцин, обе эти аминокислоты относятся к категории с гидрофобным незаряженным боковым радикалом. У *G. fasciatus* в результате переназначения кодонов глутамин может быть заменен на гистидин (глутамин – аминокислота с гидрофильным незаряженным боковым радикалом, гистидин – положительно заряженная аминокислота с гидрофильным боковым радикалом). Таким образом, у вида *A. victorii* в двух из трех случаев переназначения кодонов происходит замена аминокислот со значительным изменением физико-химических свойств бокового радикала, что, в свою очередь, приводит к значительному разбросу pI и заряда. Теоретические расчеты

значений pI белка CYTB проводились ранее и для других групп организмов. Например, у 16 видов насекомых из разных отрядов данный белок имеет щелочную природу, значение его pI варьирует от 9.71 до 7.20 у разных видов [40]. У вида карповых рыб *Labeo rohita* теоретически предсказанное значение pI белка CYTB ближе к нейтральному и составляет 6.86 [41]. Результаты анализа полученных значений физико-химических свойств белка CYTB видов *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus* без переназначения, с учетом частичного и полного переназначения кодонов позволяют сделать следующий вывод: разброс всех исследуемых физико-химических свойств зависит от количества переназначенных кодонов и свойств аминокислот, вовлеченных в данный процесс.

При сравнении трехмерных структур моделей белка CYTB по значению RMSD выявлено, что изменения, которые могут возникнуть в пространственной структуре, вследствие переназначения кодонов, меньше тех, которые возникают в результате эволюционной дивергенции. Наибольшие возможные изменения в пространственной структуре в результате переназначения кодонов отмечены у вида *A. victorii*.

Анализ эволюционных дистанций также указывает на то, что потенциальные изменения, которые может вносить переназначение кодонов в аминокислотные последовательности митохондриальных белков на уровне особей одного вида, гораздо меньше масштабов изменений, которые накопились в виде аминокислотных замен в процессе эволюции на межвидовом уровне. Также данный анализ подтверждает, что наибольшая вариабельность эволюционных дистанций на уровне особей одного вида отмечается у видов с наибольшим количеством кодонов, вовлеченных в процесс переназначения.

Так, переназначение кодона в результате ремолдинга тРНК генов может быть закреплено в ходе эволюции и привести, хотя и в редких случаях к изменению генетического кода определенной группы организмов. Отклонение от универсального генетического кода впервые было показано для митохондриального кода млекопитающих в работе Баррелла 1979 года [42]. И, как отмечалось ранее, к настоящему моменту обнаружено 13 вариантов генетического кода в митохондриальных геномах. Случаи переназначения кодонов в митохондриальных геномах были отмечены у разных групп организмов, например, у вида *Rhabdopleura compacta* (Pterobranchia) было отмечено переназначение кодона AGG на лизин [43], у *Ashbya (Eremothecium) gossypii* (Saccharomycetes) выявлено переназначение кодонов CUU и CUA на аланин [44], а у видов *Asterias amurensis* и *Asterina pectinifera* (Asteroidea) кодон AAA кодирует аминокислоту аспарагин [45] и др. Эти данные указывают на продолжающуюся эволюцию митохондриального генетического кода.

Известны случаи, когда при неблагоприятных или стрессовых условиях неоднозначная трансляция кодона повышает жизнеспособность организма за счет увеличения разнообразия протеома [46, 47].

Результаты недавних исследований показывают, что ремолдинг генов тРНК часто встречается в митохондриальных геномах различных видов амфипод, однако у байкальских амфипод этот феномен наблюдается значительно чаще [26]. Так как считается, что естественный отбор способствует уменьшению размера митохондриального генома, наличие и сохранение дополнительных копий генов тРНК может указывать на их важную роль в функционировании митохондриального генома байкальских амфипод. Конечно, данные копии могут являться псевдогенами и не принимать участие в трансляции, однако, на функциональность обнаруженных копий тРНК косвенно указывает сохранность их вторичной структуры (форма клеверного листа) [26]. Помимо роли адаптера в процессе трансляции, тРНК также участвует в ряде других важных процессов в клетке, таких как: экспрессия генов, регуляция трансляции, модификация липидов, биосинтез антибиотиков и многих других [1].

Если рассматривать гипотезу, что тРНК гены в митохондриальных геномах байкальских амфипод, которые были подвержены ремолдингу являются функциональными, изменения в трансляции вероятно не будут летальными для организма, а в некоторых случаях даже могут быть адаптивными. В таком случае переназначение кодонов может быть возможно в данной группе организмов.

Возможно, в букете видов байкальских амфипод, сформированном в результате длительной эндемичной эволюции (более 30 миллионов лет) [48] в пределах замкнутой экосистемы озера, наблюдается процесс формирования у некоторых видов нового варианта митохондриального генетического кода в ходе нейтральной молекулярной эволюции. Несмотря на то, что у всех трех исследуемых видов байкальских амфипод обнаружены незначительные внутривидовые различия по эволюционным дистанциям, трехмерным структурам белка СУТВ, а также по молекулярному весу белка и среднему весу аминокислотных остатков, у вида *A. victorii* наблюдаются значительные вариации предсказанных значений pI и заряда белков вследствие переназначения кодонов. По нашему предположению, это должно быть связано со свойствами аминокислоты, вовлеченной в переназначение кодонов. Можно предположить, что альтернативные варианты митохондриальных белков, которые могут синтезироваться с учетом переназначения кодонов, вследствие ремолдинга тРНК генов, позволяют видам более гибко реагировать на сезонные и межгодовые изменения окружающей среды.

С другой стороны, ремолдинг тРНК генов, даже при изменении соответствующих кодонов, может являться частью нейтрального эволюционного процесса, не приводящего к значительным изменениям структуры и свойств белка. Эта гипотеза подтверждается данными о генетических дистанциях, которые существенно меньше внутри последовательностей одного вида, даже с учетом полного переназначения кодонов, чем между родственными видами. Таким образом, изменение кодонов, вероятно, не окажет негативного влияния на жизнеспособность организма. Тем не менее, возможность этого процесса у байкальских амфипод подтверждается лишь наличием копий генов тРНК с измененной последовательностью антикодона.

ВЫВОДЫ

Проведенный биоинформатический анализ оценки влияния переназначения кодонов на некоторые физико-химические свойства белка СУТВ и его пространственную структуру, вследствие ремолдинга тРНК генов, а также на эволюционную дистанцию митохондриальных белков, вычисленную для трех байкальских видов: *A. victorii*, *E. vittatus* и *G. fasciatus*, позволяет сделать следующие выводы:

1) Внутривидовая эволюционная дистанция между аминокислотными последовательностями митохондриальных генов с учетом полного и частичного переназначения кодонов у всех исследованных видов байкальских амфипод значительно меньше, чем межвидовая. Наибольшая внутривидовая эволюционная дистанция наблюдается у вида *A. victorii*, что можно объяснить большим количеством переназначенных кодонов по сравнению с *E. vittatus* и *G. fasciatus*.

2) Внутривидовая вариабельность, рассчитанная для моделей трехмерных структур белка СУТВ, с учетом полного и частичного переназначения кодонов по показателю RMSD существенно меньше межвидовой вариации, вызванной накоплением аминокислотных замен в процессе эволюционной дивергенции. Внутривидовая вариабельность в моделях трехмерных структур белка СУТВ возрастает с увеличением количества переназначенных кодонов.

3) Для всех трех видов наблюдается незначительная внутривидовая вариабельность по молекулярному весу, а также по среднему весу аминокислотных остатков белка СУТВ с учетом вариантов без переназначения кодонов, с частичным и полным переназначением кодонов. Наибольшая вариабельность этих показателей отмечается у

вида *A. victorii*, что связано с большим количеством переназначенных кодонов по сравнению с другими видами.

4) Внутривидовая вариабельность pI и заряда белка СУТВ с учетом вариантов без переназначения кодонов, с частичным и полным переназначением кодонов у видов *E. vittatus* и *G. fasciatus* незначительная; в отличие от внутривидовой вариабельности данных свойств белка у вида *A. victorii* (pI варьирует от щелочного значения 8.9 до слабокислого 5.5, заряд варьирует от 9 до –3,5). Причиной данного эффекта являются разные физико-химические свойства аминокислот (в частности, заряд их боковых радикалов), кодируемых переназначенными кодонами.

На основании вышеизложенного можно заключить, что переназначение кодонов, возможное вследствие ремолдинга тРНК генов, приводит к значительно меньшим изменениям физико-химических свойств белка и его пространственной структуры, чем изменения, накопленные в ходе эволюционной дивергенции.

Работа выполнена при поддержке темы бюджетного финансирования № 0279-2021-0010 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamashima K., Kanai A. Alternative genetic code for amino acids and transfer RNA revisited. *BioMolecular Concepts*. 2013. V. 4. No. 3. P. 309–318. doi: [10.1515/bmc-2013-0002](https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0002)
2. Pütz J., Dupuis B., Sissler M., Florentz C. Mamit-tRNA, a database of mammalian mitochondrial tRNA primary and secondary structures. *RNA*. 2007. V. 13. No. 8. P. 1184–1190. doi: [10.1261/rna.588407](https://doi.org/10.1261/rna.588407)
3. Wolstenholme D.R., Macfarlane J.L., Okimoto R., Clary D.O., Wahleithner J.A. Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987. V. 84. No. 5. P. 1324–1328. doi: [10.1073/pnas.84.5.1324](https://doi.org/10.1073/pnas.84.5.1324)
4. Jühling F., Pütz J., Florentz C., Stadler P.F. Armless mitochondrial tRNAs in enoplea (nematoda). *RNA biology*. 2012. V. 9. No. 9. P. 1161–1166. doi: [10.4161/rna.21630](https://doi.org/10.4161/rna.21630)
5. Arcari P., Brownlee G.G. The nucleotide sequence of a small (3S) seryl-tRNA (anticodon GCU) from beef heart mitochondria. *Nucleic Acids Research*. 1980. V. 8. No. 22. P. 5207–5212. doi: [10.1093/nar/8.22.5207](https://doi.org/10.1093/nar/8.22.5207)
6. Masta S.E., Boore J.L. Parallel evolution of truncated transfer RNA genes in arachnid mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 2008. V. 25. No. 5. P. 949–959. doi: [10.1093/molbev/msn051](https://doi.org/10.1093/molbev/msn051)
7. Masta S.E., McCall A., Longhorn S.J. Rare genomic changes and mitochondrial sequences provide independent support for congruent relationships among the sea spiders (Arthropoda, Pycnogonida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010. V. 57. No. 1. P. 59–70. doi: [10.1016/j.ympev.2010.06.020](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.06.020)
8. Ardell D.H. Computational analysis of tRNA identity. *FEBS Letters*. 2010. V. 584. No. 2. P. 325–333. doi: [10.1016/j.febslet.2009.11.084](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.084)
9. Salinas-Giege T., Giege R., Giege P. tRNA biology in mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. V. 16. No. 3. P. 4518–4559. doi: [10.3390/ijms16034518](https://doi.org/10.3390/ijms16034518)
10. Senger B., Auxilien S., Englisch U., Cramer F., Fasiolo F. The modified wobble base inosine in yeast tRNA^{Ile} is a positive determinant for aminoacylation by isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*. 1997. V. 36. No. 27. P. 8269–8275. doi: [10.1021/bi970206l](https://doi.org/10.1021/bi970206l)
11. Tsunoda M., Kusakabe Y., Tanaka N., Ohno S., Nakamura M., Senda T., Moriguchi T., Asai N., Sekine M., Yokogawa T., Nishikawa K., Nakamura K.T. Structural basis for

- recognition of cognate tRNA by tyrosyl-tRNA synthetase from three kingdoms. *Nucleic Acids Research*. 2007. V. 35. No. 13. P. 4289–4300. doi: [10.1093/nar/gkm417](https://doi.org/10.1093/nar/gkm417)
12. Gruic-Sovulj I., Jaric J., Dulic M., Cindric M., Weygand-Durasevic I. Shuffling of discrete tRNASer regions reveals differently utilized identity elements in yeast and methanogenic archaea. *Journal of Molecular Biology*. 2006. V. 361. No. 1. P. 128–139. doi: [10.1016/j.jmb.2006.06.008](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.008)
 13. Chen M., Kuhle B., Diedrich J., Liu Z., Moresco J.J., Yates III J.R., Pan T., Yang X.L. Cross-editing by a tRNA synthetase allows vertebrates to abundantly express mischargeable tRNA without causing mistranslation. *Nucleic Acids Research*. 2020. V. 48. No. 12. P. 6445–6457. doi: [10.1093/nar/gkaa469](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa469)
 14. Giege R., Eriani G. The tRNA identity landscape for aminoacylation and beyond. *Nucleic Acids Research*. 2023. V. 51. No. 4. P. 1528–1570. doi: [10.1093/nar/gkad007](https://doi.org/10.1093/nar/gkad007)
 15. Cantatore P., Gadaleta M.N., Roberti M., Saccone C., Wilson A.C. Duplication and remoulding of tRNA genes during the evolutionary rearrangement of mitochondrial genomes. *Nature*. 1987. V. 329. No. 6142. P. 853–855. doi: [10.1038/329853a0](https://doi.org/10.1038/329853a0)
 16. Lavrov D.V., Lang B.F. Transfer RNA gene recruitment in mitochondrial DNA. *Trends in Genetics*. 2005. V. 21. No. 3. P. 129–133. doi: [10.1016/j.tig.2005.01.004](https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.01.004)
 17. Jiang P., Li H., Song F., Cai Y., Wang J., Liu J., Cai W. Duplication and remolding of tRNA genes in the mitochondrial genome of *Reduvius tenebrosus* (Hemiptera: Reduviidae). *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. V. 17. No. 6. P. 951. doi: [10.3390/ijms17060951](https://doi.org/10.3390/ijms17060951)
 18. Rawlings T.A., Collins T.M., Bieler R. Changing identities: tRNA duplication and remolding within animal mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. V. 100. No. 26. P. 15700–15705. doi: [10.1073/pnas.2535036100](https://doi.org/10.1073/pnas.2535036100)
 19. Saks M.E., Sampson J.R., Abelson J. Evolution of a transfer RNA gene through a point mutation in the anticodon. *Science*. 1998. V. 279. No. 5357. P. 1665–1670. doi: [10.1126/science.279.5357.1665](https://doi.org/10.1126/science.279.5357.1665)
 20. Seilhamer J.J., Cummings D.J. Altered genetic code in Paramecium mitochondria: possible evolutionary trends. *Molecular and General Genetics MGG*. 1982. V. 187. No. 2. P. 236–239. doi: [10.1007/BF00331123](https://doi.org/10.1007/BF00331123)
 21. Osawa S., Jukes T.H. Codon reassignment (codon capture) in evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 1989. V. 28. P. 271–278. doi: [10.1007/BF02103422](https://doi.org/10.1007/BF02103422)
 22. Schultz D.W., Yarus M. Transfer RNA mutation and the malleability of the genetic code. *Journal of Molecular Biology*. 1994. V. 235. No. 5. P. 1377–1380. doi: [10.1006/jmbi.1994.1094](https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1094)
 23. Kollmar M., Mühlhausen S. How tRNAs dictate nuclear codon reassignments: Only a few can capture non-cognate codons. *RNA Biology*. 2017. V. 14. No. 3. P. 293–299. doi: [10.1080/15476286.2017.1279785](https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1279785)
 24. Santos M.A., Moura G., Massey S.E., Tuite M.F. Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends in Genetics*. 2004. V. 20. No. 2. P. 95–102. doi: [10.1016/j.tig.2003.12.009](https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.12.009)
 25. Romanova E.V., Aleoshin V.V., Kamaltynov R.M., Mikhailov K.V., Logacheva M.D., Sirotinina E.A., Gornov A.Yu., Anikin A.S., Sherbakov D.Yu. Evolution of mitochondrial genomes in Baikalian amphipods. *BMC Genomics*. 2016. V. 17. P. 291–306. doi: [10.1186/s12864-016-3357-z](https://doi.org/10.1186/s12864-016-3357-z)
 26. Romanova E.V., Bukin Y.S., Mikhailov K.V., Logacheva M.D., Aleoshin V.V., Sherbakov D.Y. Hidden cases of tRNA gene duplication and remolding in mitochondrial genomes of amphipods. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2020. V. 144. P. 106710. doi: [10.1016/j.ympev.2019.106710](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106710)
 27. *Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна*. Под ред. О.А. Тимошкин. Новосибирск: Наука, 2001. Т. I: Озера Байкал, кн. 1. 832 с.

28. Degli Esposti M., De Vries S., Crimi M., Ghelli A., Patarnello T., Meyer A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1993. V. 1143. No. 3. P. 243–271. doi: [10.1016/0005-2728\(93\)90197-N](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90197-N)
29. Charif D., Lobry J.R. SeqinR 1.0-2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. In: *Structural Approaches to Sequence Evolution: Molecules, Networks, Populations*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007. P. 207–232. doi: [10.1007/978-3-540-35306-5_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-35306-5_10)
30. Wickham H. stringr: modern, consistent string processing. *The R Journal*. 2010. V. 2. No. 2. P. 38.
31. Katoh K., Standley D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013. V. 30. No. 4. P. 772–780. doi: [10.1093/molbev/mst010](https://doi.org/10.1093/molbev/mst010)
32. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K., Von Haeseler A., Jermin L.S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 2017. V. 14. No. 6. P. 587–589. doi: [10.1038/nmeth.4285](https://doi.org/10.1038/nmeth.4285)
33. Nguyen L.T., Schmidt H.A., Von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 2015. V. 32. No. 1. P. 268–274. doi: [10.1093/molbev/msu300](https://doi.org/10.1093/molbev/msu300)
34. Hoang D. T., Chernomor O., Von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*. 2018. V. 35. No. 2. P. 518–522. doi: [10.1093/molbev/msx281](https://doi.org/10.1093/molbev/msx281)
35. Anisimova M., Gil M., Dufayard J.F., Dessimoz C., Gascuel O. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology*. 2011. V. 60. No. 5. P. 685–699. doi: [10.1093/sysbio/syr041](https://doi.org/10.1093/sysbio/syr041)
36. Rambaut A. FigTree-v1.4.4. 2014. URL: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (дата обращения: 13.02.2025).
37. Rice P., Longden I., Bleasby A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends in Genetics*. 2000. V. 16. No. 6. P. 276–277. doi: [10.1016/S0168-9525\(00\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)00204-2)
38. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., De Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*. 2018. V. 46. No. W1. P. W296–W303. doi: [10.1093/nar/gky427](https://doi.org/10.1093/nar/gky427)
39. DeLano W.L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr.* 2002. V. 40. No. 1. P. 82–92.
40. Seddigh S., Darabi M. Functional, structural, and phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b (cytb) in insects. *Mitochondrial DNA Part A*. 2018. V. 29. No. 2. P. 236–249. doi: [10.1080/24701394.2016.1275596](https://doi.org/10.1080/24701394.2016.1275596)
41. Ghosh R., Upadhyay A.D., Roy A.K., Tiwari A. Structural and functional analysis of cytochrome b protein of Indian major carps *Labeo rohita*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2020. V. 8. No. 2. P. 540–550.
42. Barrell B.G., Bankier A.T., Drouin J. A different genetic code in human mitochondria. *Nature*. 1979. V. 282. No. 5735. P. 189–194. doi: [10.1038/282189a0](https://doi.org/10.1038/282189a0)
43. Perseke M., Hetmank J., Bernt M., Stadler P.F., Schlegel M., Bernhard D. The enigmatic mitochondrial genome of *Rhabdopleura compacta* (Pterobranchia) reveals insights into selection of an efficient tRNA system and supports monophyly of Ambulacraria. *BMC Evolutionary Biology*. 2011. V. 11. P. 1–12. doi: [10.1186/1471-2148-11-134](https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-134)

44. Ling J., Daoud R., Lajoie M.J., Church G.M., Söll D., Lang B.F. Natural reassignment of CUU and CUA sense codons to alanine in *Ashbya* mitochondria. *Nucleic Acids Research*. 2014. V. 42. No. 1. P. 499–508. doi: [10.1093/nar/gkt842](https://doi.org/10.1093/nar/gkt842)
45. Tomita K., Ueda T., Watanabe K. The presence of pseudouridine in the anticodon alters the genetic code: a possible mechanism for assignment of the AAA lysine codon as asparagine in echinoderm mitochondria. *Nucleic Acids Research*. 1999. V. 27. No. 7. P. 1683–1689. doi: [10.1093/nar/27.7.1683](https://doi.org/10.1093/nar/27.7.1683)
46. Blazquez J., Oliver A., Gomez-Gomez J.M. Mutation and evolution of antibiotic resistance: antibiotics as promoters of antibiotic resistance? *Current Drug Targets*. 2002. V. 3. No. 4. P. 345–349. doi: [10.2174/1389450023347579](https://doi.org/10.2174/1389450023347579)
47. Santos M.A., Cheesman C., Costa V., Moradas-Ferreira P., Tuite M.F. Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in *Candida* spp. *Molecular Microbiology*. 1999. V. 31. No. 3. P. 937–947. doi: [10.1046/j.1365-2958.1999.01233.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01233.x)
48. Мац В.Д., Щербаков Д.Ю., Ефимова И.М. Позднемеловая–кайнозойская история байкальской впадины и формирование уникального биоразнообразия Байкала. *Стратиграфия. Геологическая корреляция*. 2011. Т. 19. № 4. С. 40–61.

Рукопись поступила в редакцию 19.12.2024, переработанный вариант поступил 03.02.2025.

Дата опубликования 18.02.2025.

===== BIOINFORMATICS =====

The Effect of Codon Reassignment on the Properties and Structure of the Mitochondrial Proteins of the Baikal Amphipods

Yudinceva A.V.¹, Romanova E.V.¹, Sherbakov D.Y.^{1,2}, Bukin Y.S.^{1,3}

¹*Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

³*Irkutsk State University, Irkutsk, Russia*

Abstract. There are more than ten mitochondrial genetic codes are known in eukaryotes. Genetic code changes also called as codon reassignment may occur through the mechanism including tRNA gene remolding (changing tRNA gene identity through mutations in the anticodon). Our recent study showed that mitochondrial genomes of some amphipod species from Lake Baikal possess tRNA genes copies which underwent remolding along with appropriate canonic tRNA genes. Three cases of tRNA gene remolding were revealed in mitochondrial genome of *Acanthogammarus victorii* and by one case were shown in mitochondrial genomes of *Eulimnogammarus vittatus* and *Gmelinoides fasciatus*. In this work, we performed the analysis of theoretical codon reassignment influence on physicochemical features (molecular weight, average weight of amino-acid residue, isoelectric point, average protein charge) and spatial structure of mitochondrial CYTB protein of aforementioned amphipod species based on amino acid substitutions according to tRNA remolding cases. *In silico* translation

of CYTB gene sequences of three amphipod species was made using standard genetic code, a code with partially reassigned codons, and the completely reassigned genetic code. Physicochemical and spatial features of obtained proteins were compared at species level and between each species. Comparative analysis of proteins obtained both with partially and completely reassigned codons allowed us to conclude that evolutionary distances within proteins estimated at intraspecific level are less than those obtained at the interspecific level, appeared during evolutionary divergence. It was also revealed that codon reassignment leads to changes in both the physicochemical features of the protein and its spatial structure, however these changes were also significantly less than those calculated for proteins in different species of amphipods. Alterations in physicochemical features and spatial structure of CYTB depends on number of reassigned codons as well as on the difference in the properties of the amino acids being replaced. The biggest impact of codon reassignment was shown in *A. victorii*. Isoelectric point of CYTB protein sets altered from 5.5 to 8.9, and protein charge altered from –3.5 to 9. We suppose that environment conditions in Lake Baikal facilitate appearance of redundant tRNA genes and their remolding in mitochondrial genomes of amphipods.

Key words: *mitochondrial genome, mitochondrial proteome, cytochrome b (CYTB), evolutionary distances, amino acid substitutions*