Eduard Kejnovský (Zdeněk Kubát) + Roman Hobza

EVOLUČNÍ GENOMIKA

IV. EVOLUCE GENŮ

OSNOVA

1. Definice genu, historie
2. Struktura genu
3. Vznik nových genů
4. Velikosti genů
5. Introny – staré nebo mladé

Definice genu

= základní jednotka genetické informace zapsaná v NK

Podle šíře definice:

1. všechny sekvence DNA potřebné k syntéze proteinu nebo RNA, tedy i regulační a signální sekvence (nejširší)

2. transkribované sekvence (nezahrnuje regulační oblasti)

3. úseky přímo kódující peptid (nejužší) nebo pořadí bází ve funkčních molekulách RNA

Typy genů (širší definice):

Geny strukturní, geny pro RNA a geny-regulační sekvence

Historie konceptu genu

Klasické období genetiky

- **Mendel, Bateson:** buněčné elementy, faktory určující vlastnosti
- **Boveri, Sutton** (1902-3): chromozomová teorie dědičnosti (chromozomy se přenášejí při mitóze a meióze)
- **Bateson** (1905): hrachor, vazba genů (odporuje Mendlovým zákonům)
- **Johansen** (1909): zavedl pojem „gen“ (Hugo de Vries - pangen)
- **Morgan** (1910) **(Lock, 1906):** geny jsou uspořádány lineárně na chromozomech, vazbové skupiny
- **Sturtevant** (1913): První genetická mapa D. melanogaster
- **Dobzhansky** a další (20. léta): cytologické pokusy s X-rays, indukce zlomů, přestaveb, důkaz genů na chromozomech
- **Griffith** (1928): transformační experimenty u bakterií – přenos genů
- **Muller** (20.- 30. léta): geny jsou neviditelné body na chromozomech (dědičnost, rekombinace, mutace, funkce)

Neoklasické období genetiky

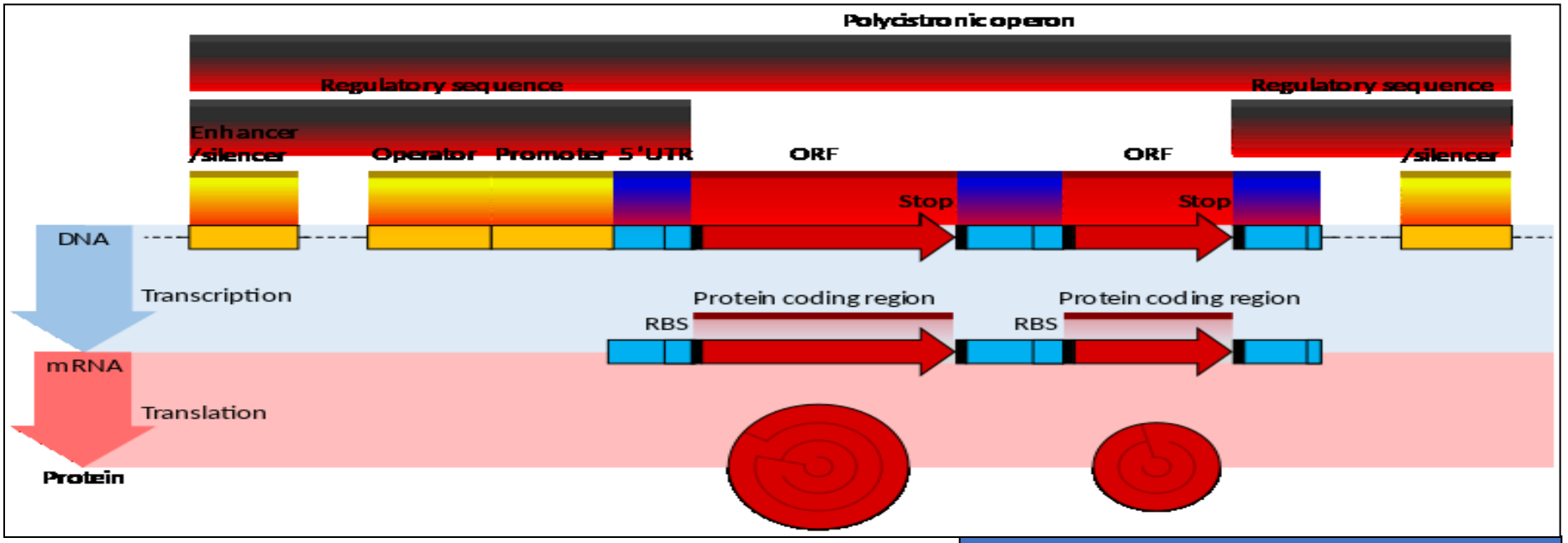
- **40. léta**: geny mohou být rozděleny rekombinací na segmenty – geny mají délku (DNA či proteiny?)
- **Avery, MacLeod a McCarthy** (1944): substancí zodpovědnou za transformaci je DNA
- **Hershey a Chaseová** (1952): genetickou informaci nese DNA (multiplikace bakteriofága zajištěna DNA)
- **Beadle a Tatum** (1941): „one gene – one enzyme“ (souvislost mezi geny a proteiny)
- **Watson a Crick** (1953): struktura DNA
- **Crick** (1958): centrální dogma MB a teorie proteosyntézy
- **Meselson a Stahl** (1958) semikonzervativní replikace
- **Jacob a Monod** (1961): mRNA, operonová teorie
- **Nirenberg, Khorana, Ochoa** (1966) genetický kód
- **60. léta:** gen – RNA – polypeptid

Moderní genetika

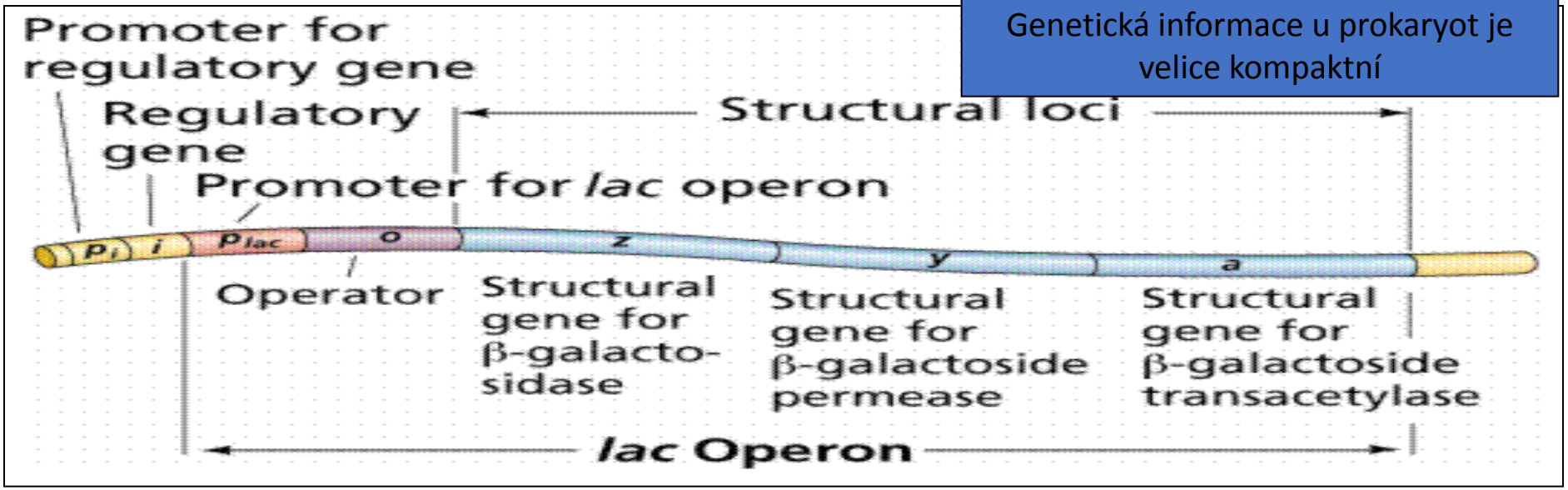
- **Cohen** (1973): rekombinantní molekuly DNA (genové inženýrství)
- **složené geny** (1977, Philip Sharp + Richard Roberts, NC 1993)
- **smRNA** (1998, Andrew Fire + Craig Mello, NC 2006)
- **genomově**-centrický pohled (např. Heng 2009, BioEssays)

STRUKTURA GENU

Geny prokaryot jsou uspořádány do operonů



Genetická informace u prokaryot je velice kompaktní



Hledání genů u prokaryot

- **ORF (otevřené čtecí rámce)**
  - start kodon je následován nejméně 60 AK, poté stop kodon
  - homologie se známými ORF

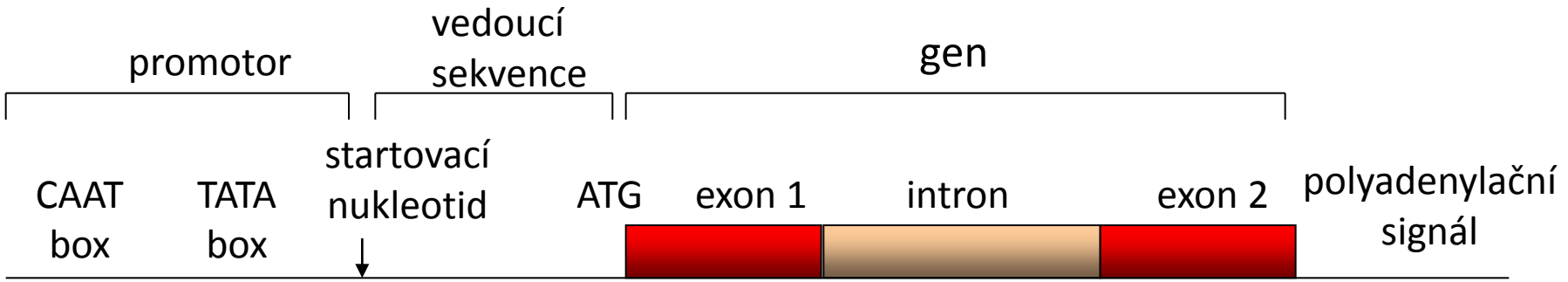
- **Signální sekvence**
  - Transkripce - konsensus promotorové a terminační sekvence
  - Translace - vazebné místo na ribozóm: Shine-Dalgarnova sekvence

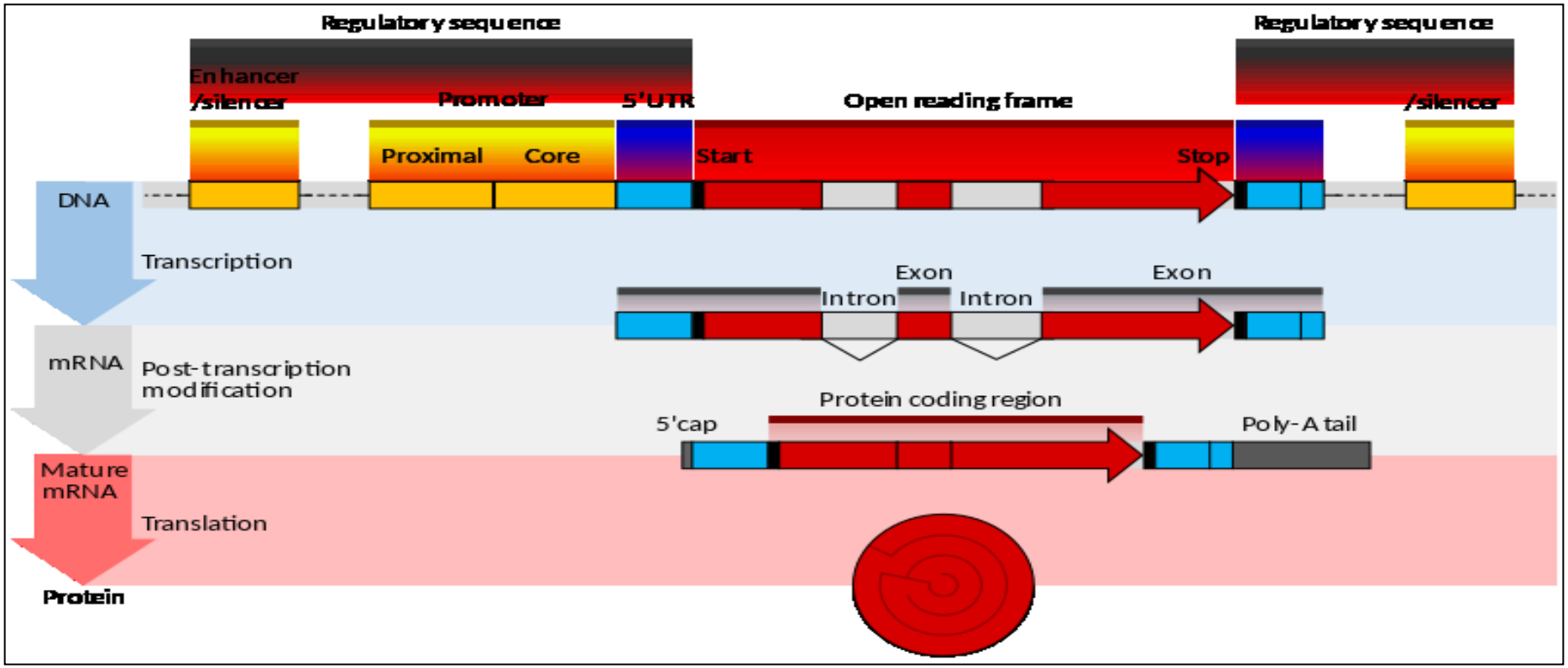
- **Rozdíly v obsahu bazí** mezi kódující a nekódující sekvencemi DNA - obsah GC, tzv. codon bias

Komplikace u eukaryot

- **Složené geny (split genes)**
  - introny a exony,
  - obratlovci - délka genu 30kb/1-2kb je kódující
  - např. gen pro dystrophin 2.4 Mb, desítky exonů, introny až 32kb
- **Velké genomy -** u rostlin až 110 000 Mb (*Fritillaria assyriaca)*
- **Většina DNA je nekódující**
  - introny, regulační oblasti, “junk” DNA
  - asi 1.5% kódující (člověk)
- **Složitá regulace** genové exprese (modifikace chromatinu, metylace DNA, RNAi, alternativní sestřih)
- **Regulační sekvence mohou být daleko** od start kodonu

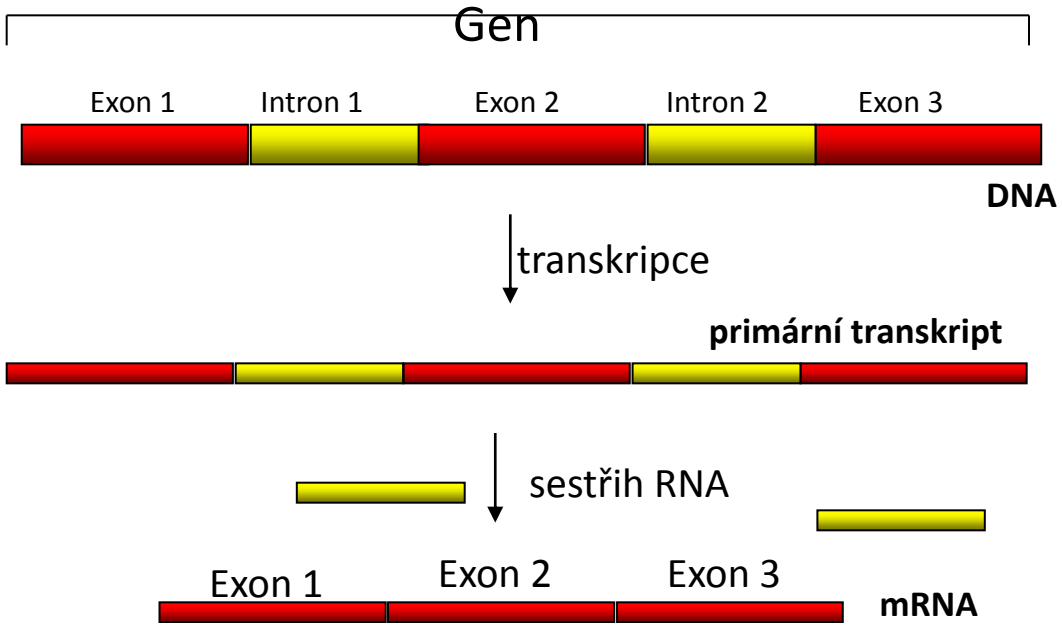
Obecné schéma eukaryotického genu

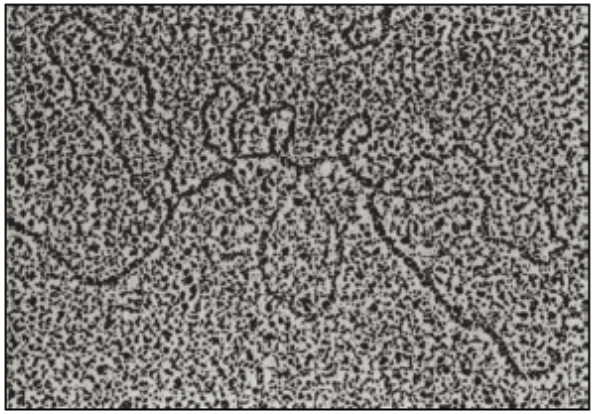


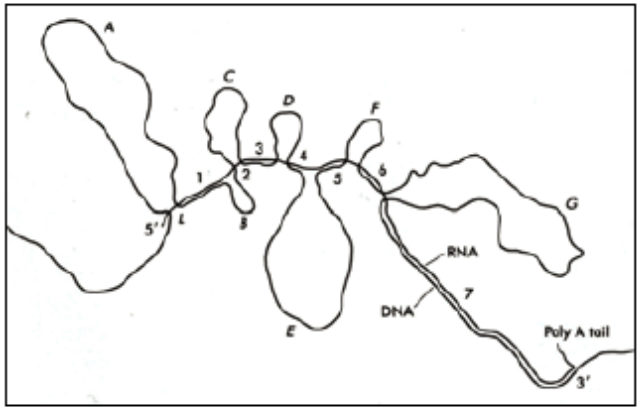


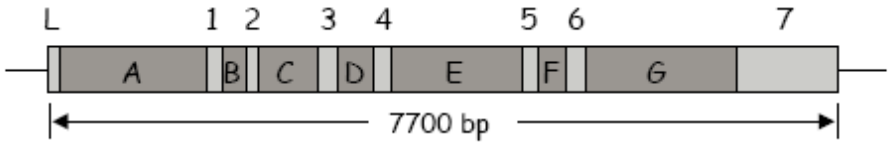
Složený gen

Genetická informace u eukaryot je fragmentována









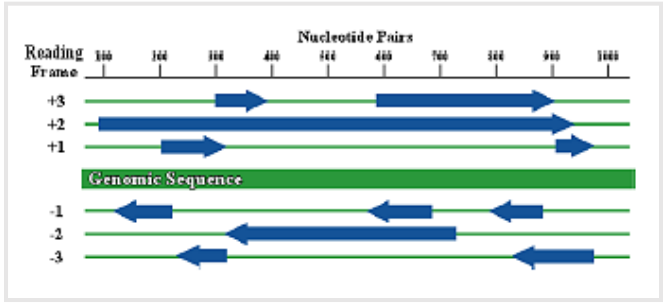
Ovalbumin gene from chicken

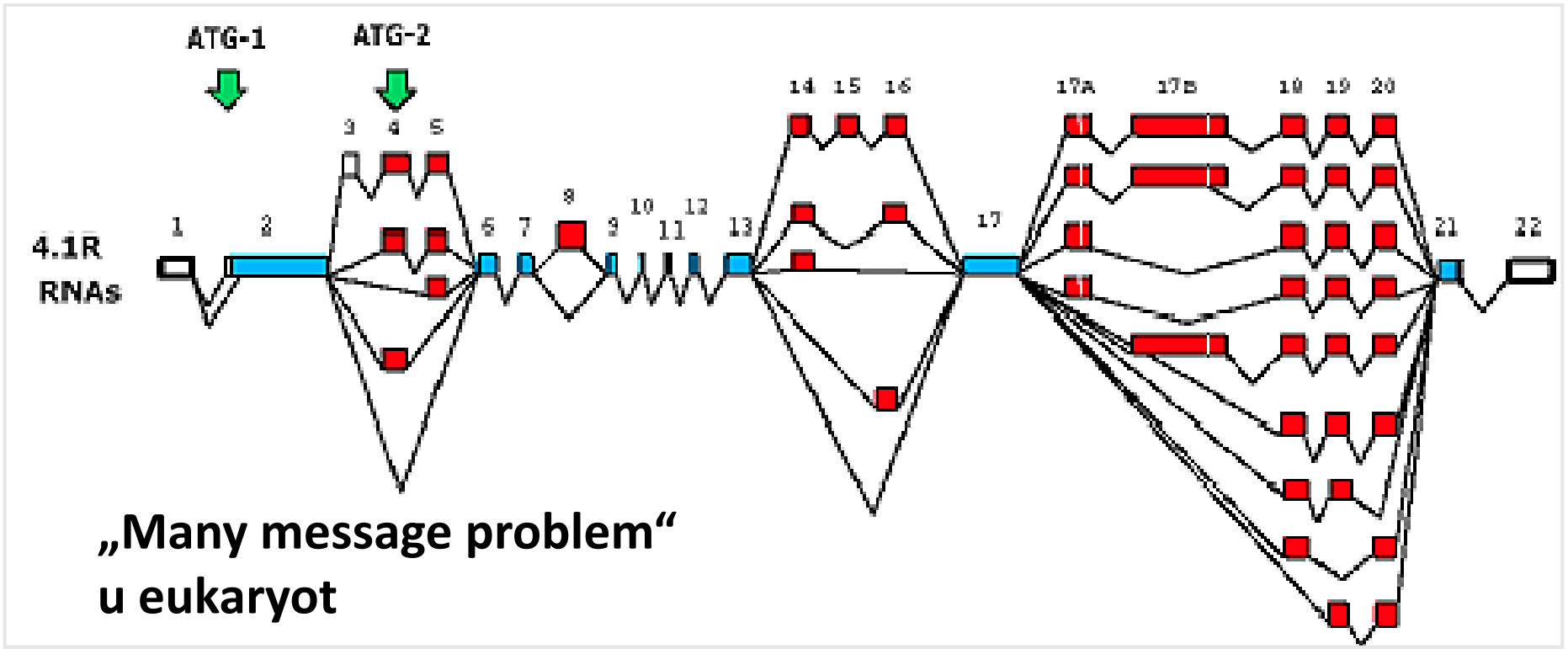
exon – expressed sequence
intron – intervening sequence

Jak se hledají geny?

- otevřené čtecí rámce (ORF)
- obsah a distribuce nukleotidů, „genové rysy“
- používání kodonů
- hranice exon-intron
- promotory, regulační sekvence
- homologie v databázích, EST

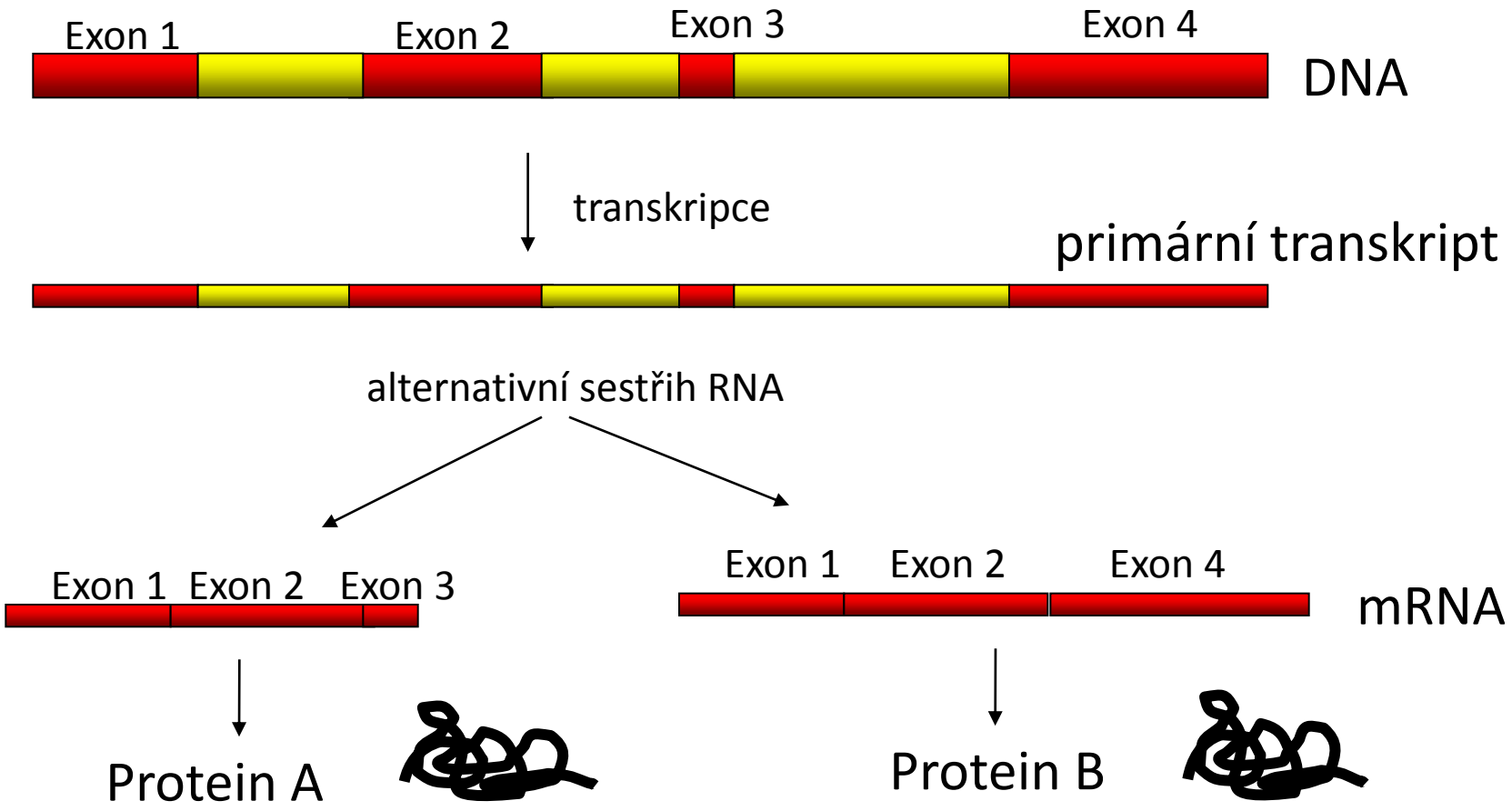
ORF:





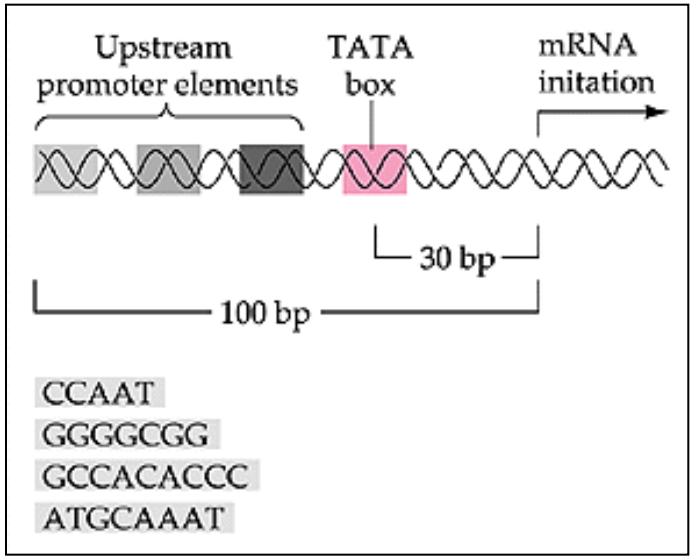
„Many message problem“ u eukaryot

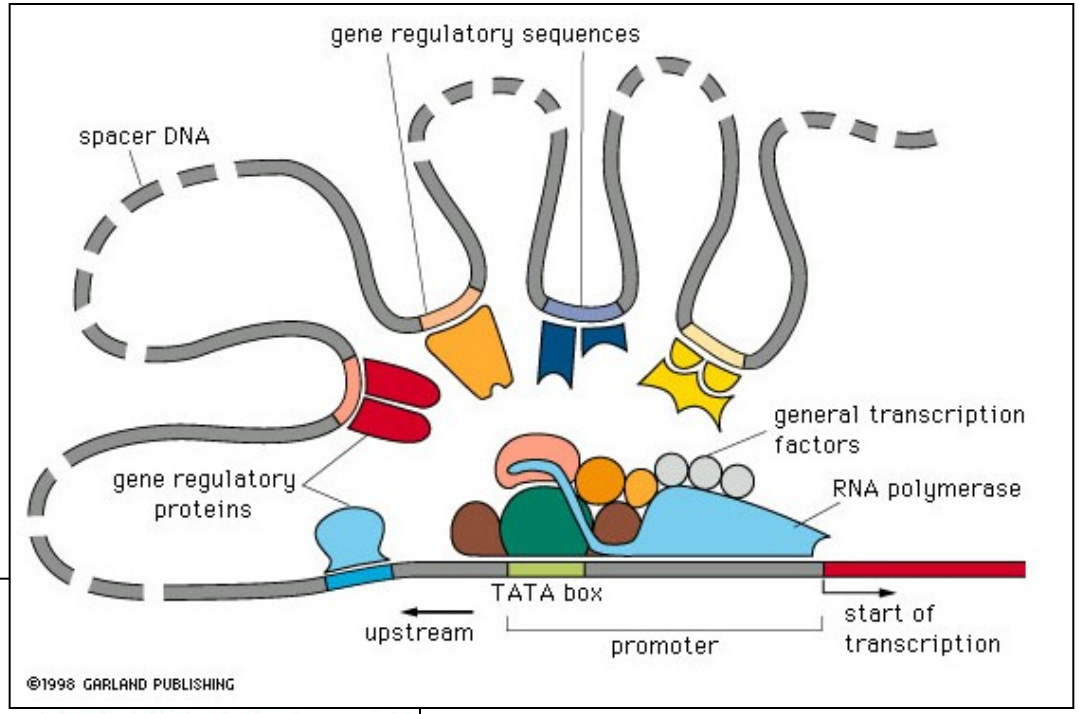
Alternativní sestřih

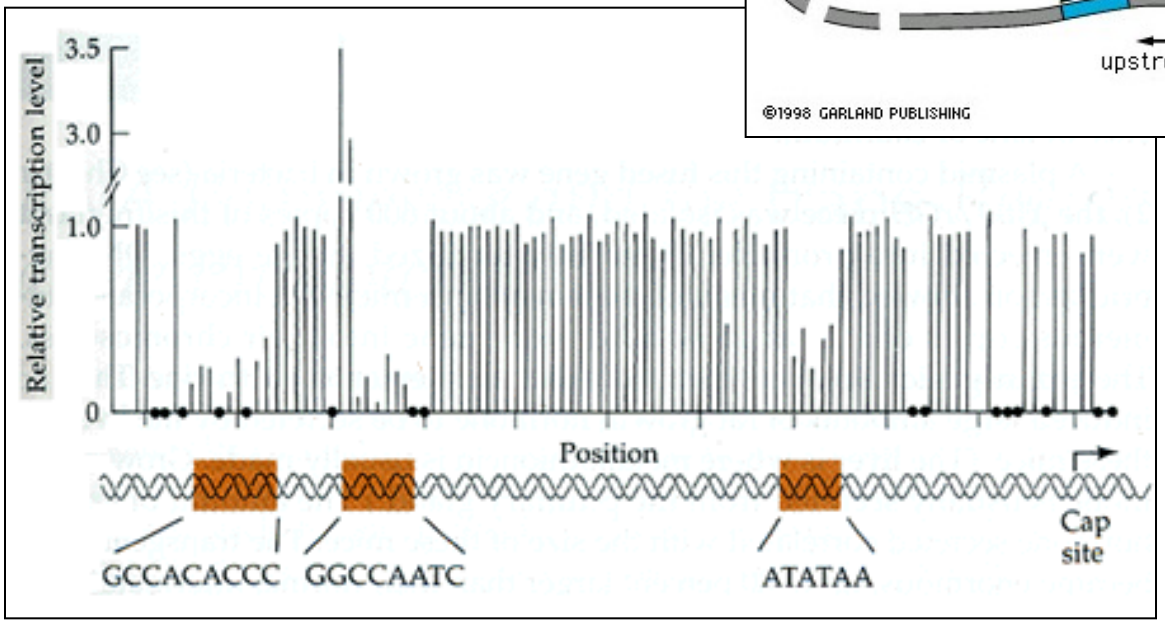


exitrony = introny bez stop kodonů

Struktura promotoru







mutace v kritických místech blokují transkripci

Geny v genech a jiné podivnosti

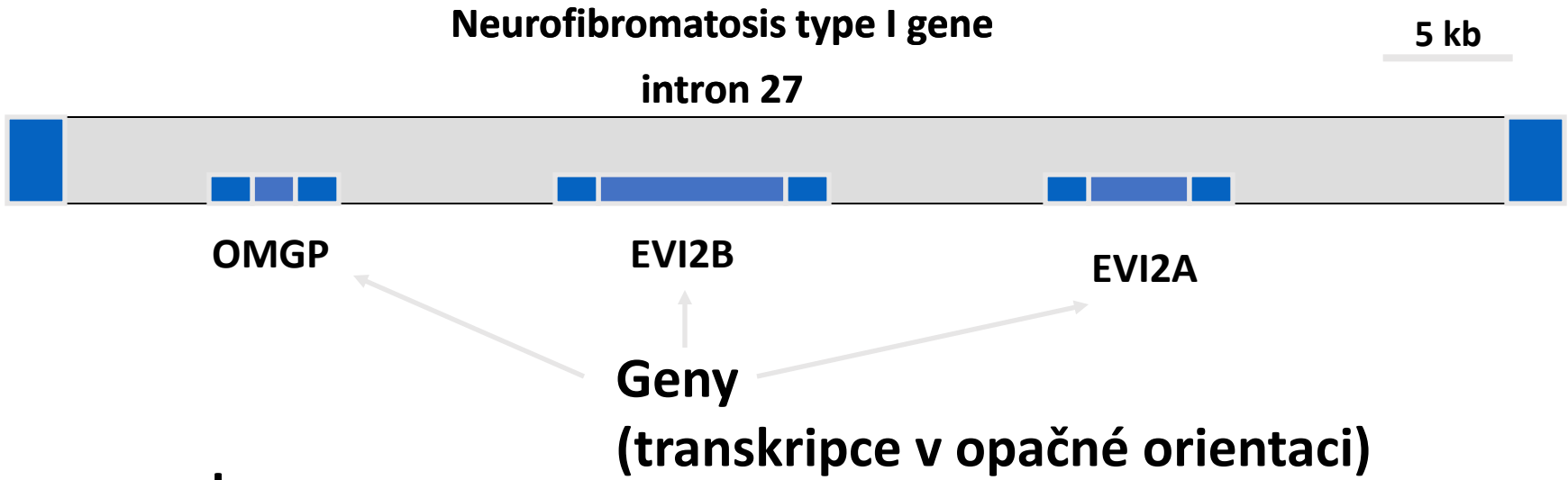
- **překrývající se geny:**

met val ….. Gen A

GTTTATGGTA

val tyr gly ……. Gen B

- **geny uvnitř jiných genů:**



- **pseudogeny:**

Pseudogeny

Definice:
- sekvence podobná genu, nekóduje funkční produkt
- nefunkční relikt původně funkčního genu

Problém definice:
- pseudogen může plnit důležitou funkci (nekódující RNA, regulační sekvence, stabilita RNA svého homologa),
- komplikují mol-biol. studie

An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene

Vznik:
(a) duplikace a degenerace jedné kopie – „non-processed“
(b) retrotransposice – „processed“ pseudogen
- člověk má 19 000 pseudogenů, pravidlo 50:50

Nekódující RNA

microRNAs – 22bází
siRNAs – small-interferring, 20-25 bází
piRNAs – PIWI-interacting RNA
snoRNAs – small nucleolar RNA
snRNAs – small nuclear RNA
exRNAs – extracellular RNA
scaRNAs – small Cajal body-specific RNA

long ncRNAs – delší než 200 bp, role v regulaci transkripce, některé translatovanaé, Xist and HOTAIR.

VZNIK NOVÝCH GENŮ

Každý gen vzniká z genu (nebo *de-novo*)

- geny jsou si podobné, duplikace a postupná **divergence** genů, genealogické stromy

- genové **rodiny** a nadrodiny

- počet genů u eukaryot: 10 000 – 40 000

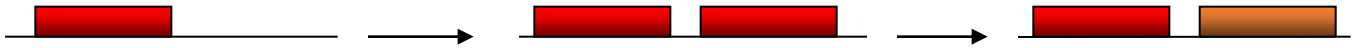
- počet základních **modulů** malý: stovky-max tisíce vzájemně nepříbuzných exonů, nejmenší jsou genové moduly

- Ale některé geny vznikají *de-novo* z „junk DNA“ !!!

Vznik nových genů

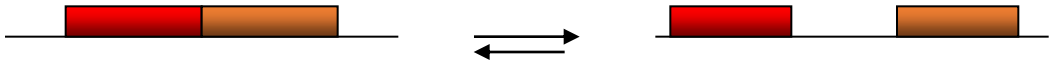
(a) Přeskupování exonů:

(b) Duplikace genů:

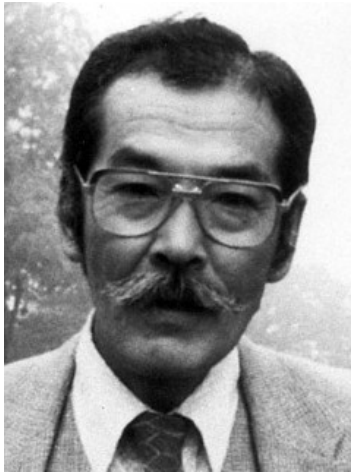


(c) Retrotranspozice:

(d) Fúze a štěpení genů:



Evoluce genovou duplikací



(Ohno, 1970)

- duplikace je základem diverzifikace
- zrod nových genů u rostlin, kvasinky a drosophily je 10x pomalejší než u *C. elegans*
- poločas rozpadu genů delší u rostlin, duplikáty přetrvávají, mechanizmy retence duplikátů?
- disperzní x tandemové kopie – rychlost asymetrické evoluce, často u rostlin zůstávají v tandemu
- v nerekombinujících oblastech – rychlejší evoluce

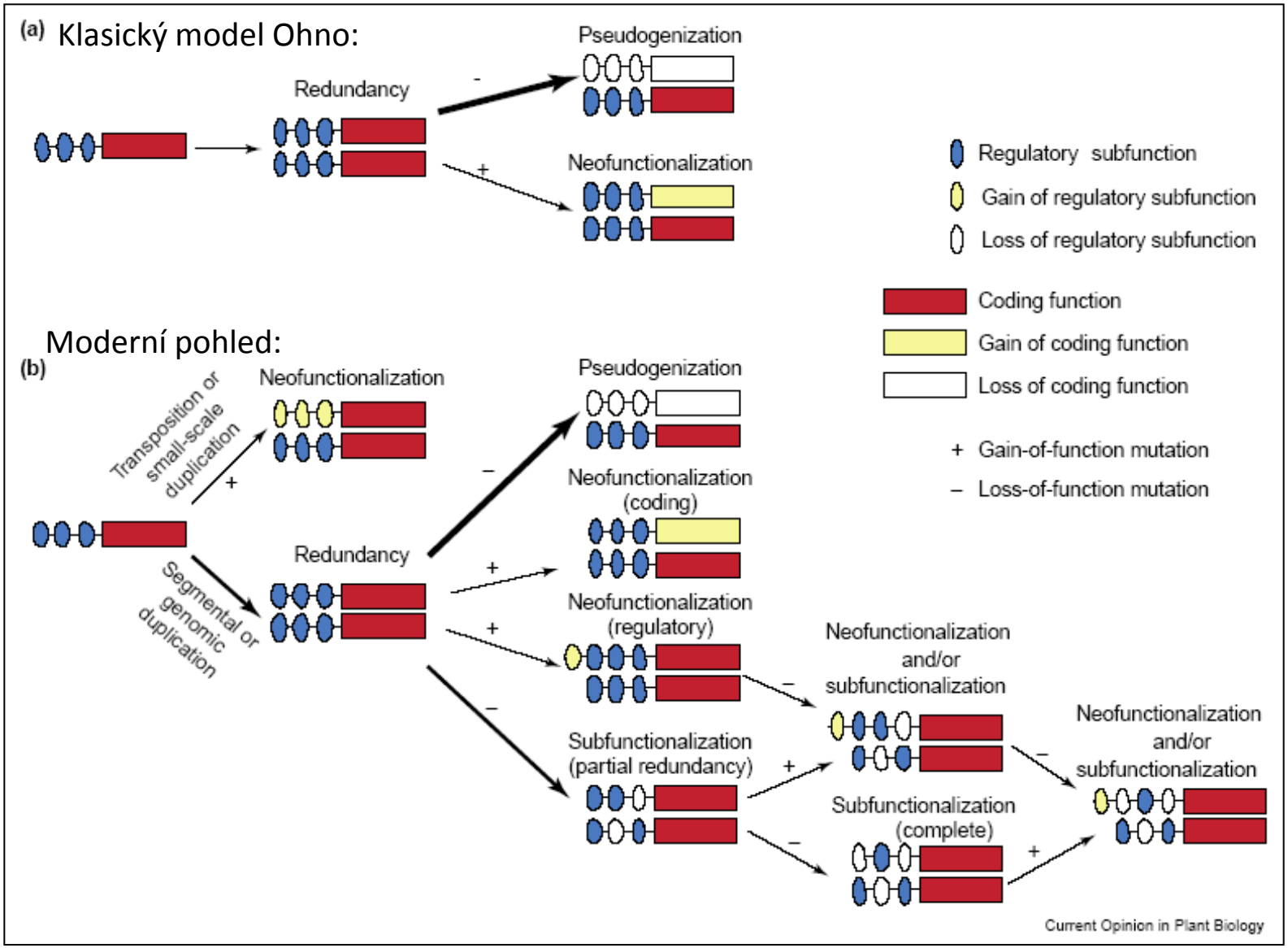
- **Duplikace části genu:**

  duplikace domén/vnitřní části genu → zvýšení funkce nebo nová funkce prostřednictvím nových kombinací
- **Duplikace celého genu (genová rodina)**

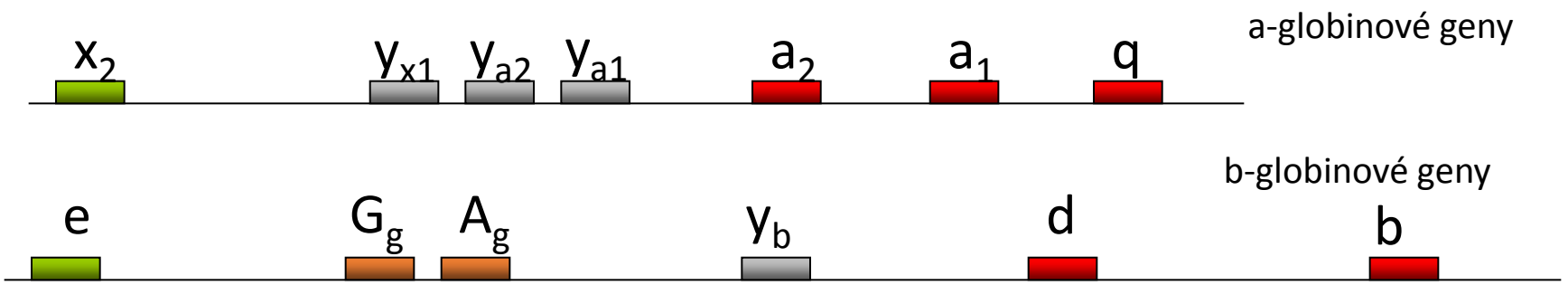
  stejná kopie: zvýšení dávky genu,

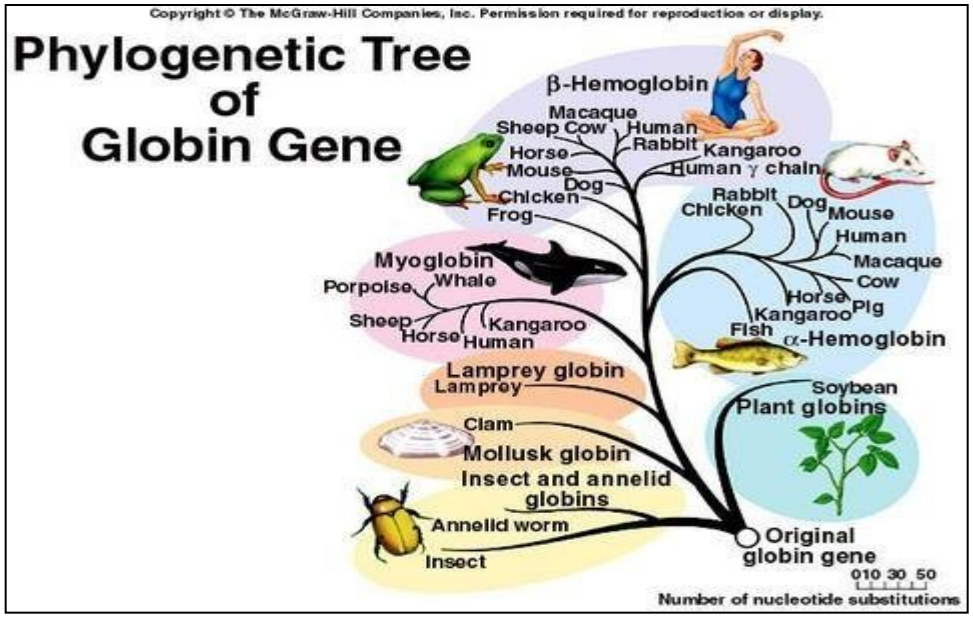
  rozrůznění kopií: nové funkce
- **Duplikace klastru genů**

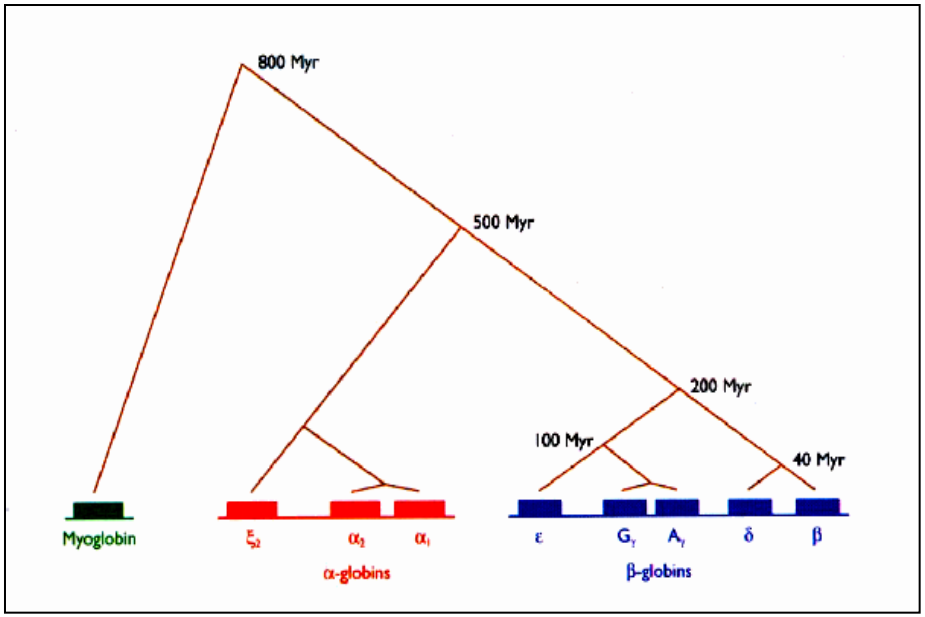
Genová duplikace: pseudogenizace, neofunkcionalizace, subfunkcionalizace



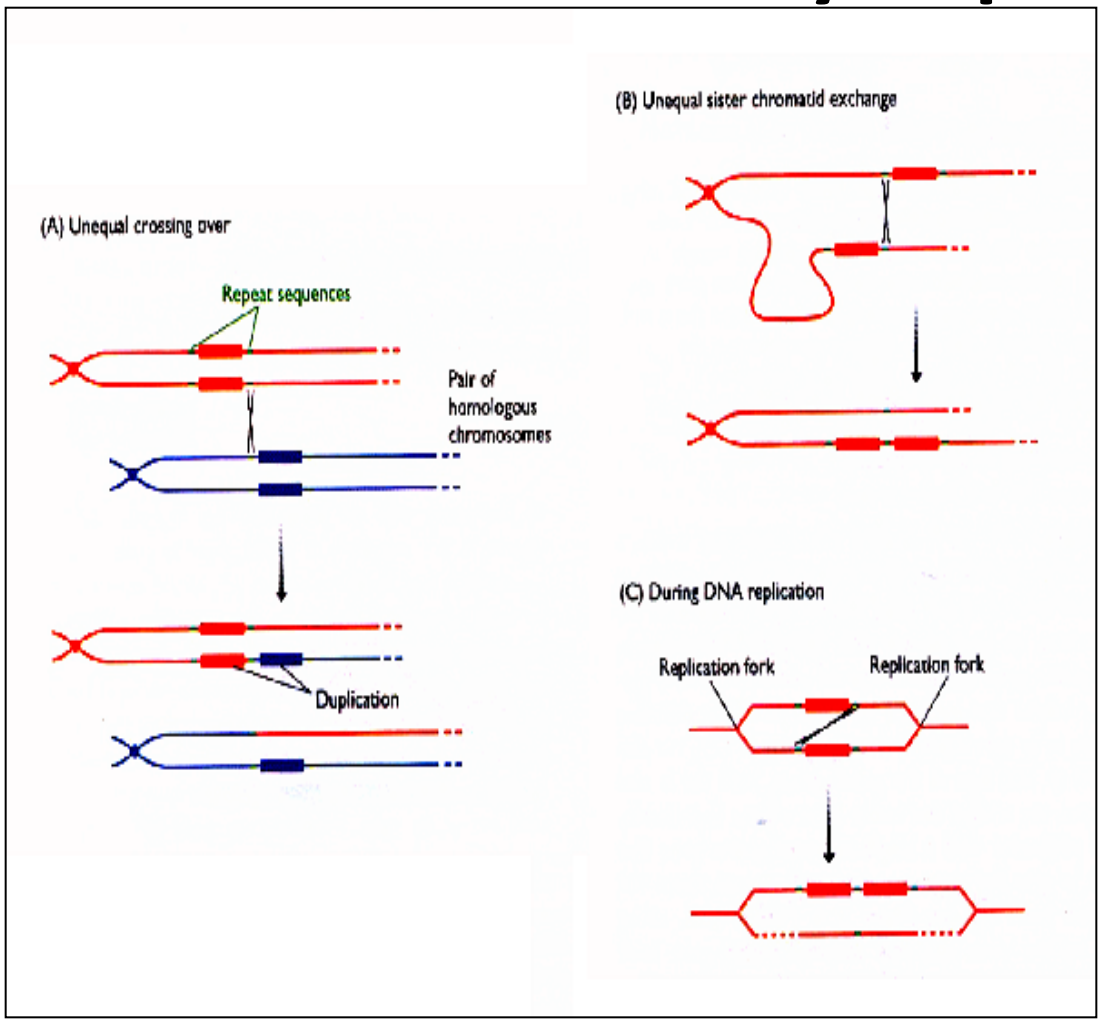
Globinová genová rodina – vznik duplikací

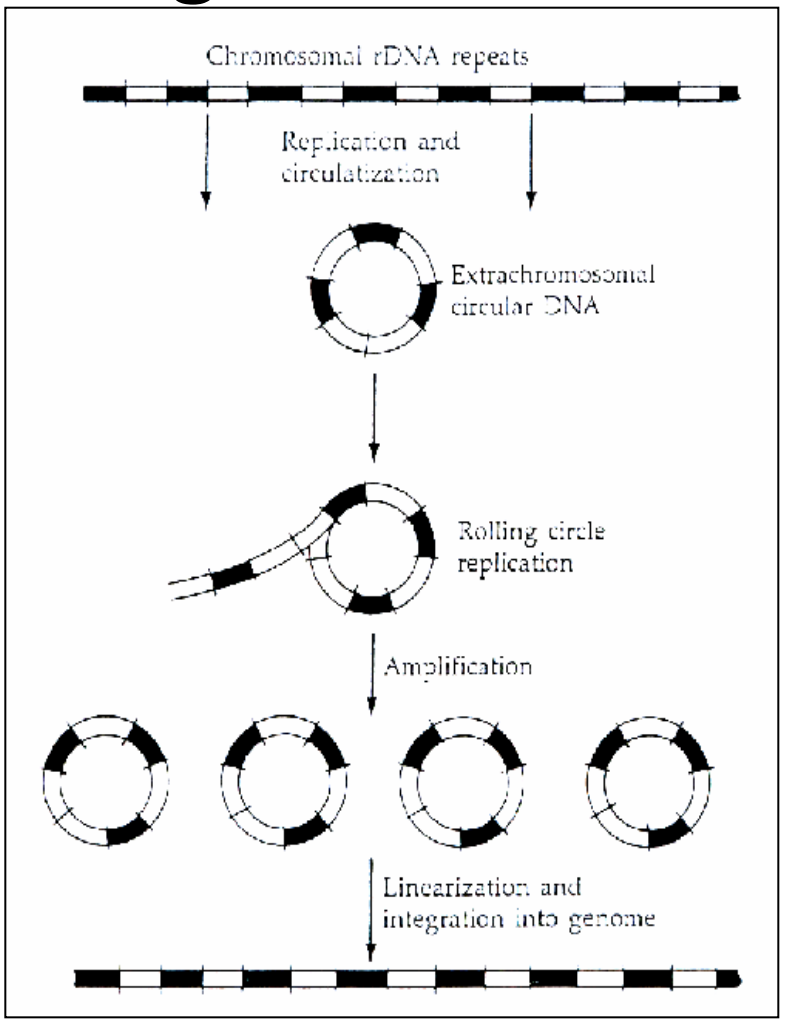






Mechanizmy duplikace genů



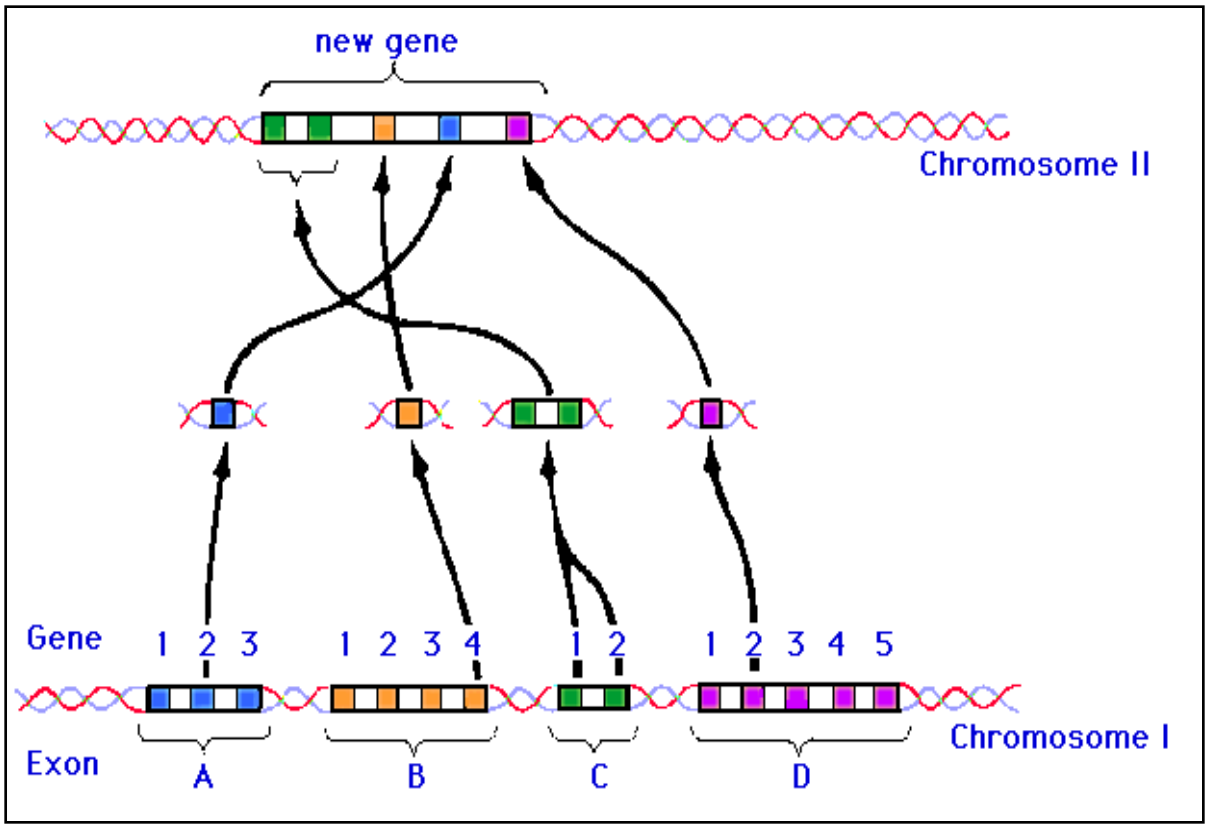


1. nerovnoměrný crossing-over (různé chromosomy)
2. nerovnoměrná výměna mezi sesterskými chromatidami
3. duplikace při replikaci
4. mechanismus otáčivé kružnice

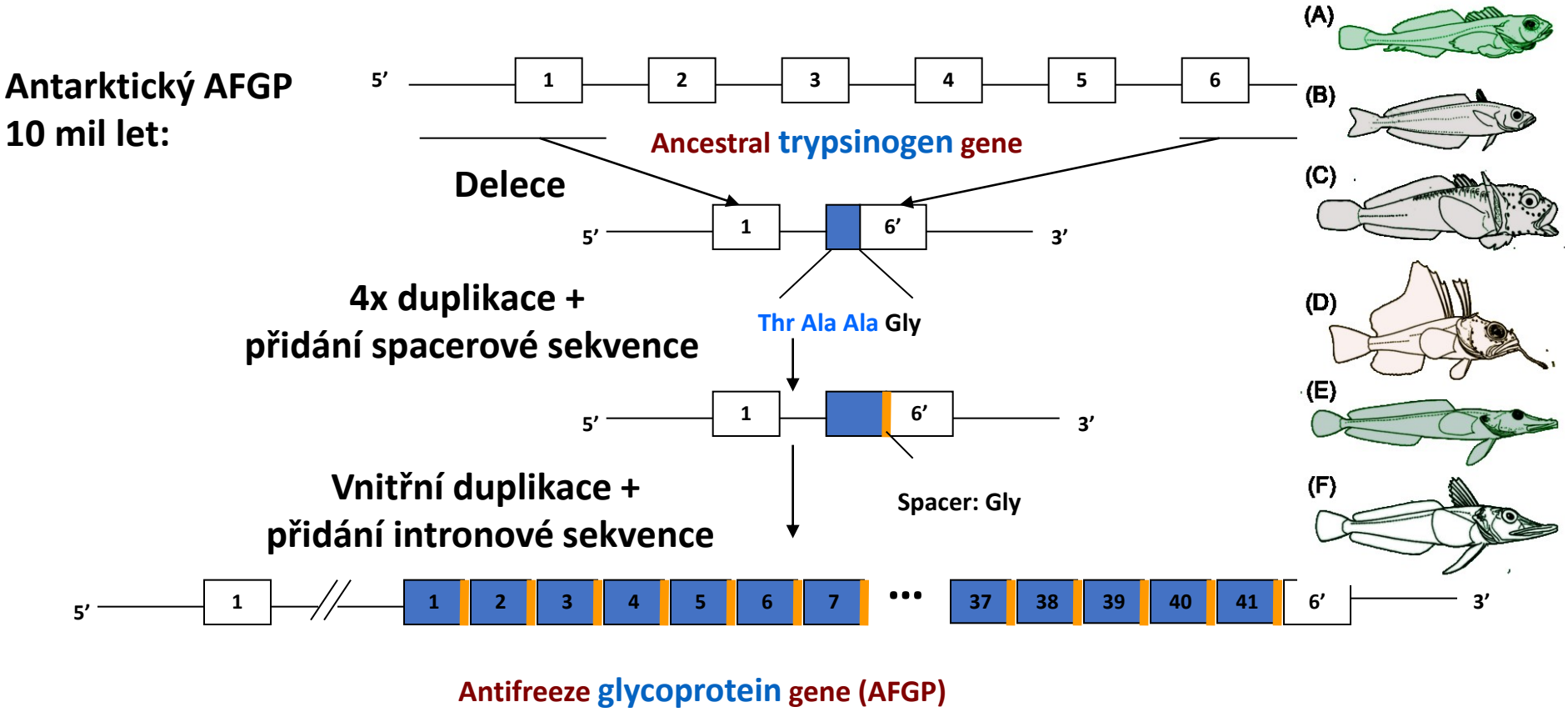
Původ nových genů: Přeskupování exonů (exon shuffling)

- exony různých genů jsou spojeny dohromady za vzniku nového genu
- exon může být duplikován za vzniku nové exon-intronové struktury
- kombinace domén různých proteinů – mozaikový protein

<u>Mechanizmy:</u>
Ektopická rekombinace
Nelegitimní rekombinace



Vznik nového genu na příkladu AFGP



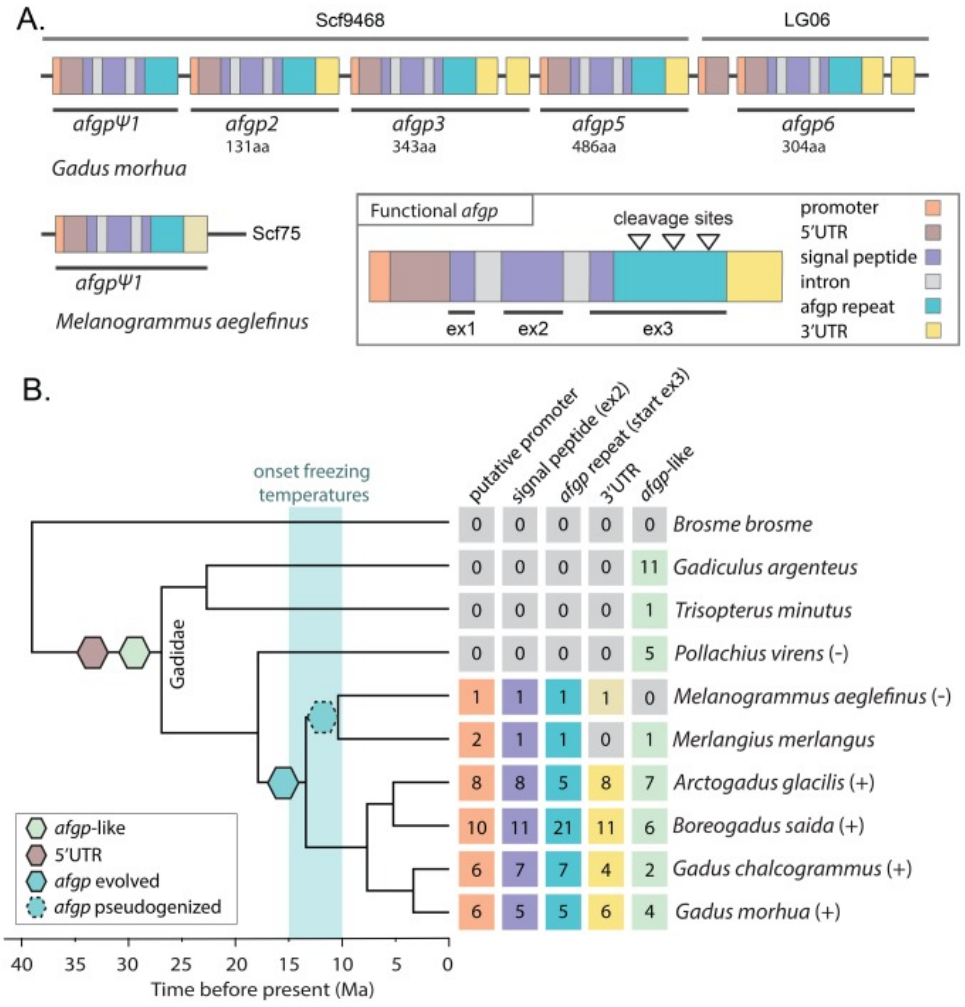
Antifreeze glycoprotein gene (AFGP)

- brání zmrznutí tělních tekutin, růstu krystalků ledu
- vznikl před 10 mil let, první zamrznutí polárních oblastí
- vznik z trypsinogenu, zachován 5’ a 3’ konce (sekrece)
- amplifikace (Thr-Ala-Ala)n, kde n=4-55
- konvergentní evoluce – antarktický a arktický

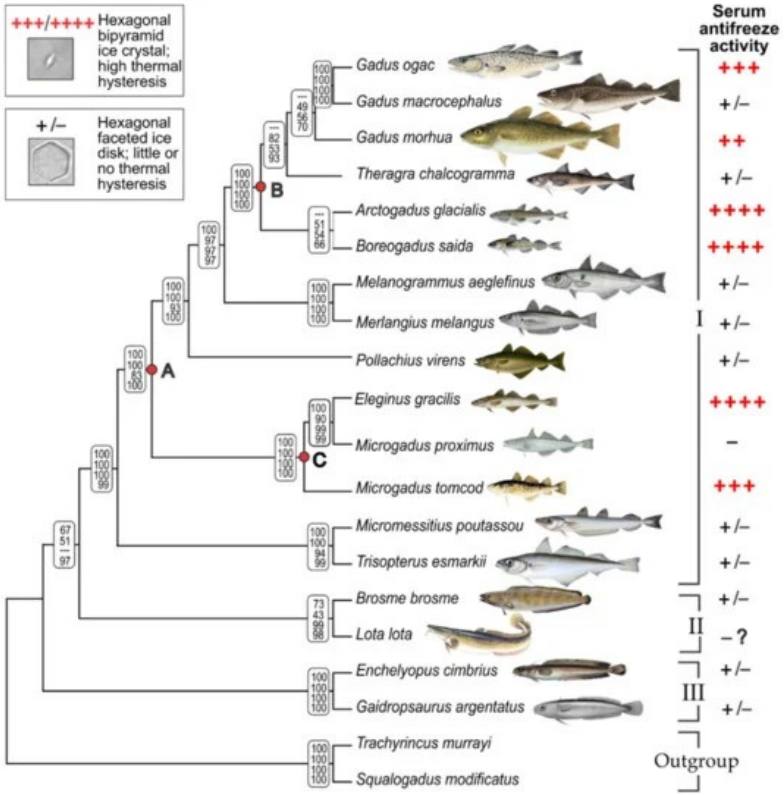
Antarktické ryby
Notothenioidei
Řád Ostnoploutví

Arktický AFGP: vznikl *de-novo* před 13-18 miliony let

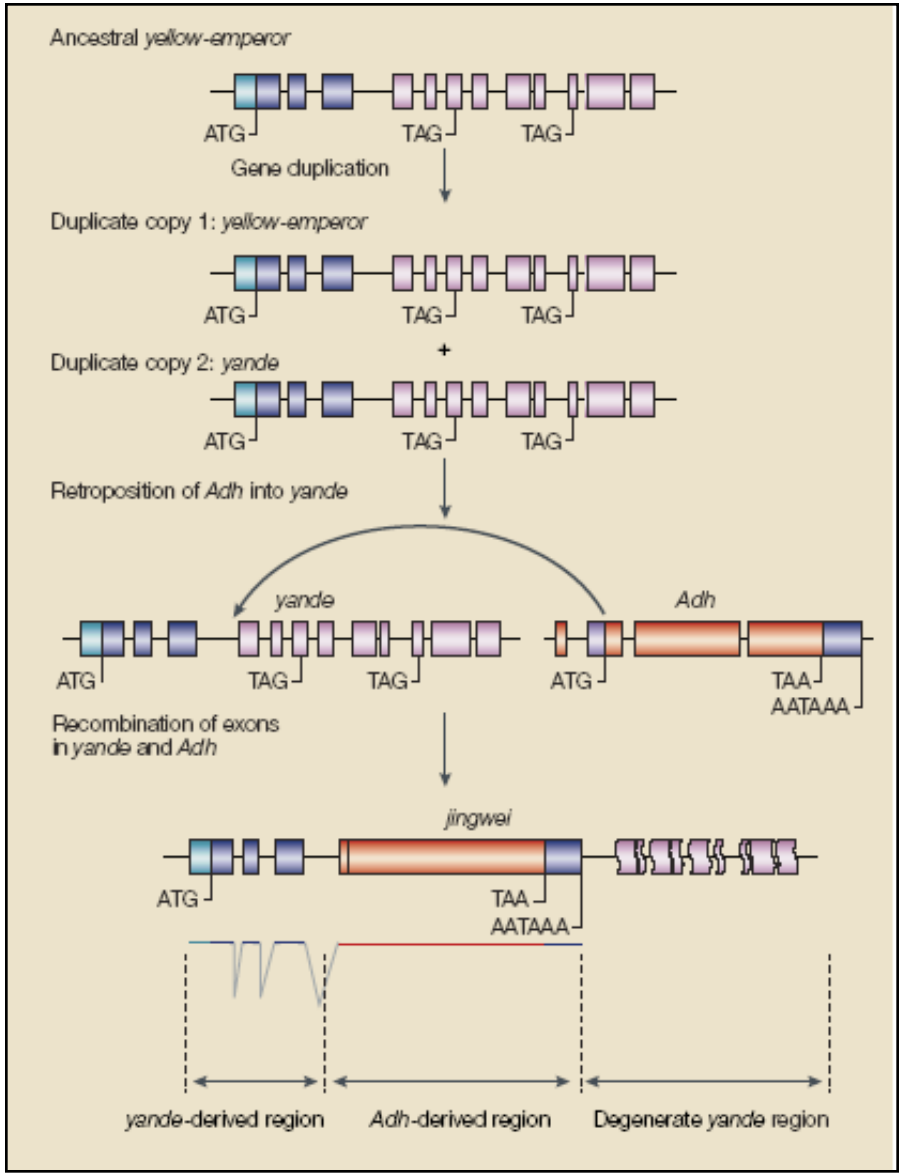
AFGP vznikl tandemovou duplikací původně nekódující DNA a ziskem regulačních sekvencí (žádná homologie nebo syntenie k trypsinogenu)



Treskovité ryby:



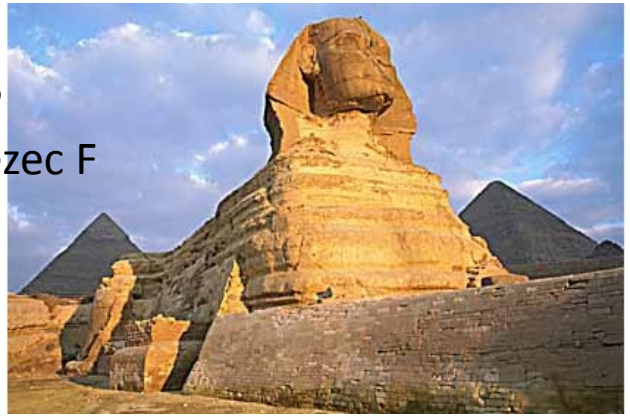
Původ genu *Jingwei + Sfinx* retrotranspozicí do intronu



- vznik před 2 mil let, drosophila
- základem yellow emperor
- duplikace a retro-včlenění Adh
- Adh terminační signál
- degenerace exonů na 3’konci
- nová kombinace exonů

- pohádka o princezně Jingwei: reinkarnace utonulé princezny v krásného ptáka podobně jako odhalení fungujícího genu v původně objeveném pseudogenu

Gen Sfinx:
rRNA gen+ATP
syntázový řetězec F



Původ genu SETMAR – „recyklace“ transposonu

Birth of a chimeric primate gene by capture of the transposase gene from a mobile element

Richard Cordaux*, Swalpa Udit†, Mark A. Batzer*, and Cédric Feschotte†‡

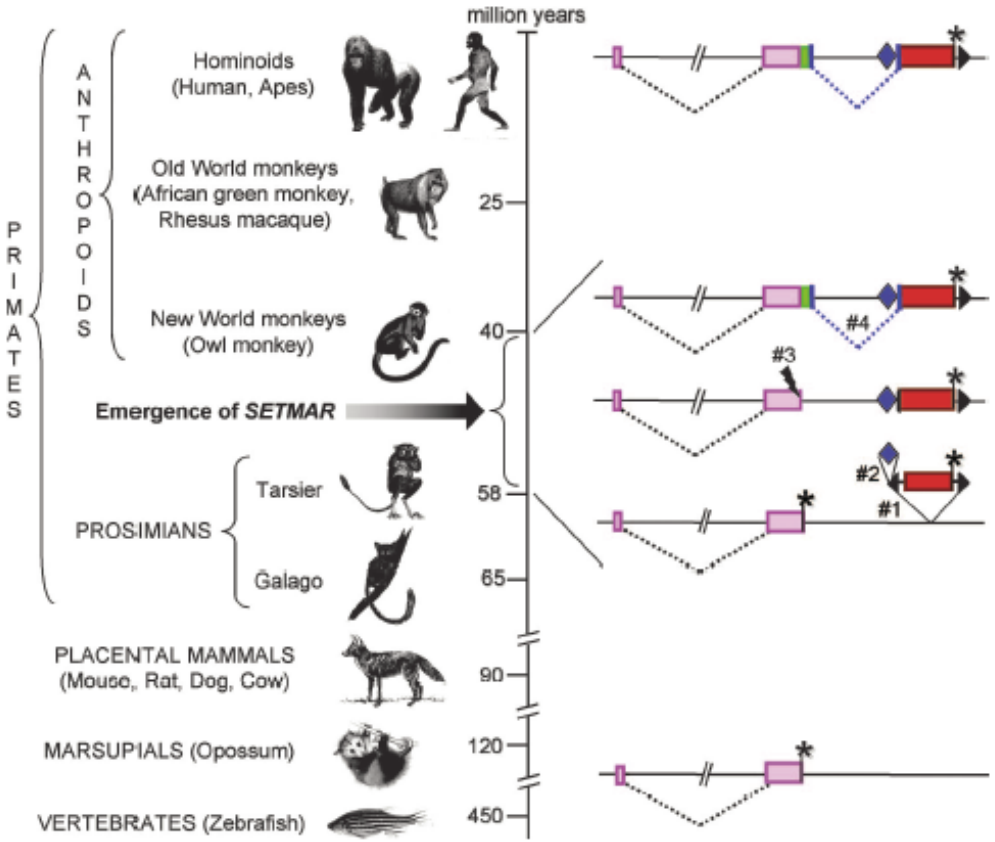


Fig. 1. Milestones leading to the birth of *SETMAR*. The structure of the *SETMAR* locus (*Right*) and a simplified chronology of the divergence time of the species examined relative to hominoid primates (*Left*) are shown. Pink boxes represent the two *SET* exons, which are separated by a single intron (interrupted black line) and form a "*SET*-only" gene whose structure is conserved in all nonanthropoid species examined and terminated with a stop codon (*) located at a homologous position (except in cow; see Fig. 2a). The *Hsmar1* transposon (event 1) was inserted in the primate lineage, after the split between tarsier and anthropoids, but before the divergence of extant anthropoid lineages. The transposon is shown here with its TIRs (black triangles) and transposase coding sequence (red box). The secondary *AluSx* insertion within the TIR of *Hsmar1* (event 2) is represented as a blue diamond. The position of the deletion removing the stop codon of the "*SET*-only" gene (event 3) is indicated as a lightning bolt. The *de novo* conversion from noncoding to exonic sequence is shown in green, the creation of the second intron is represented as a dashed blue line (event 4), and the splice sites are shown as thick blue lines.

Histon metyltransferáza

+

transpozáza

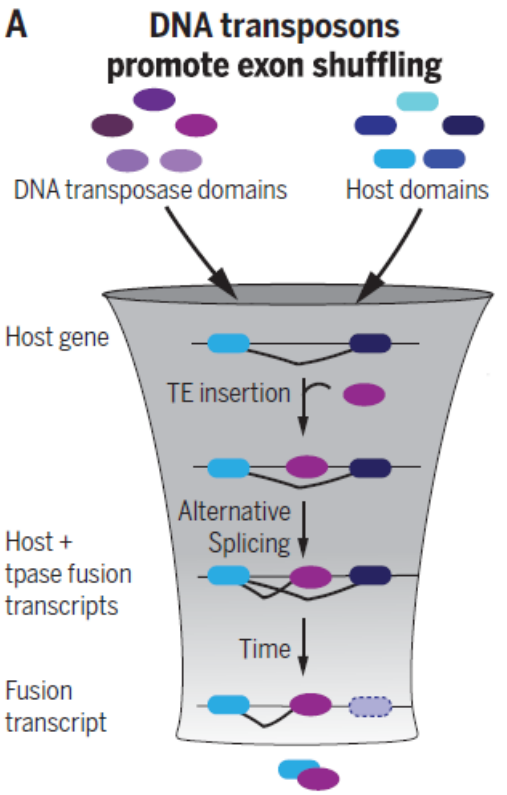
- **zrušení stop**
- **vznik nového stop**
- **exonizace**
- **degenerace TIRu**
- **vznik intronu**
- **DNA vazebná doména**

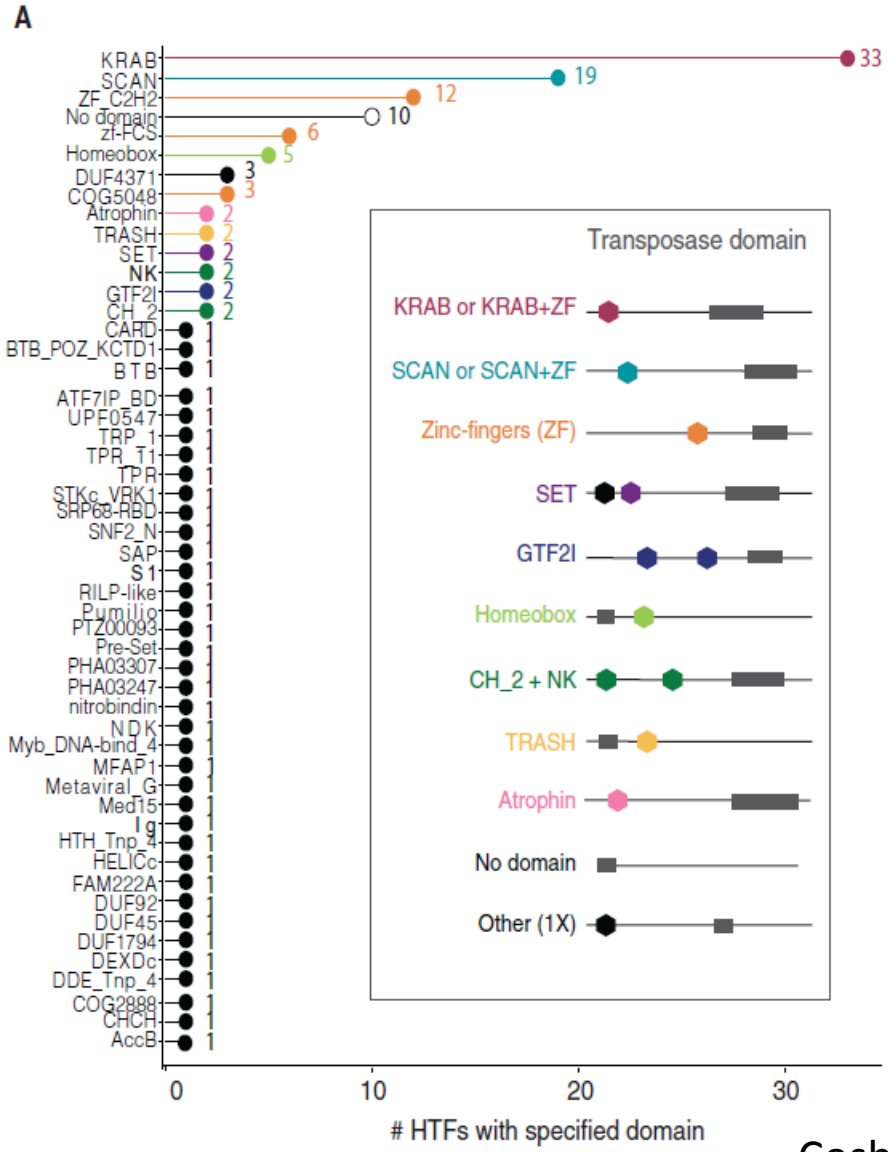
Tn zachována

- **TIR místa v genomu**

- **50 mil let**

Mnohonásobný vznik transkripčních faktorů začleněním transpozázy u obratlovců

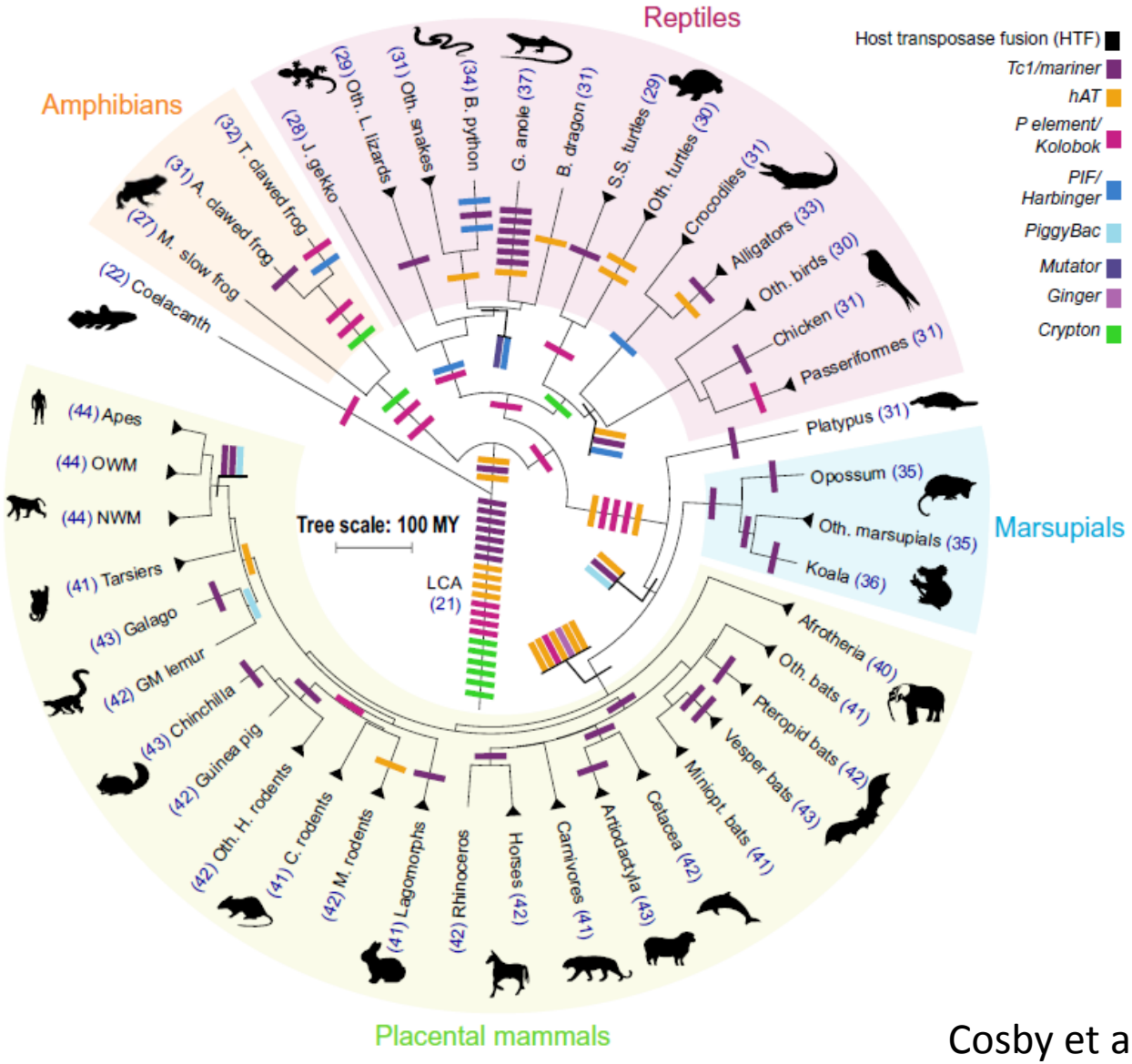




Cosby et al., 2021

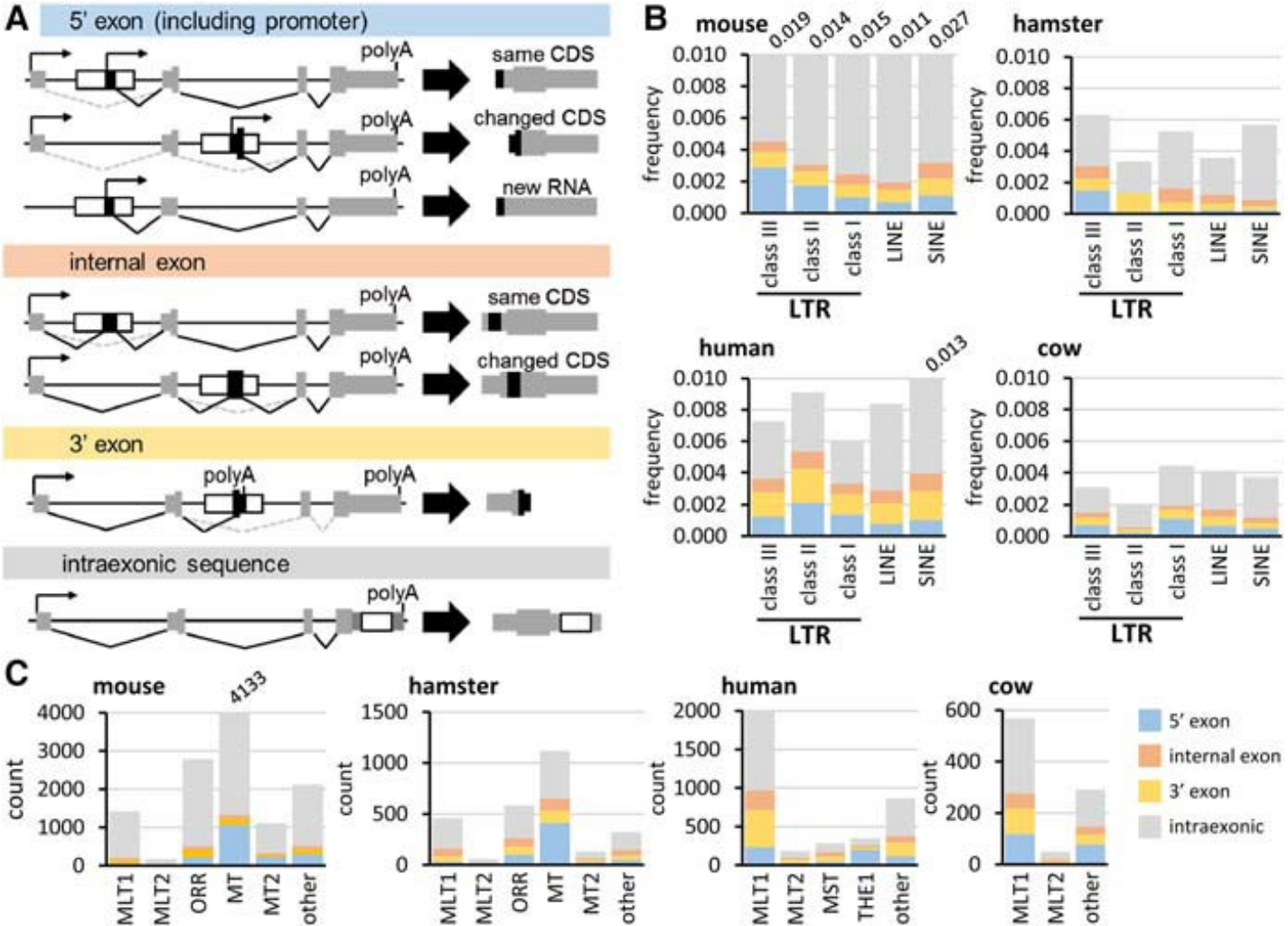
Mnohonásobný vznik transkripčních faktorů začleněním transpozázy u obratlovců

Fig. 1. Gene birth by transposase capture in tetrapods. Tetrapod phylogenetic tree with boxes representing HTF fusion genes. Colors indicate the transposase superfamily assimilated. Numbers in parentheses indicate the number of HTF genes identified in the specified lineage. OWM, Old World monkeys; NWM, New World monkeys; GM, gray mouse; Oth., other; H., hystricoid; C., castorid; M., muroid; Miniopt., miniopterid; Vesper, vespertilionid; S.S., soft-shelled; B., bearded dragon; G., green; B., Burmese python; L., lacertid; J., Japanese; T., tropical; A., African; M., mountain; LCA, last common ancestor; MY, million years.



Cosby et al., 2021

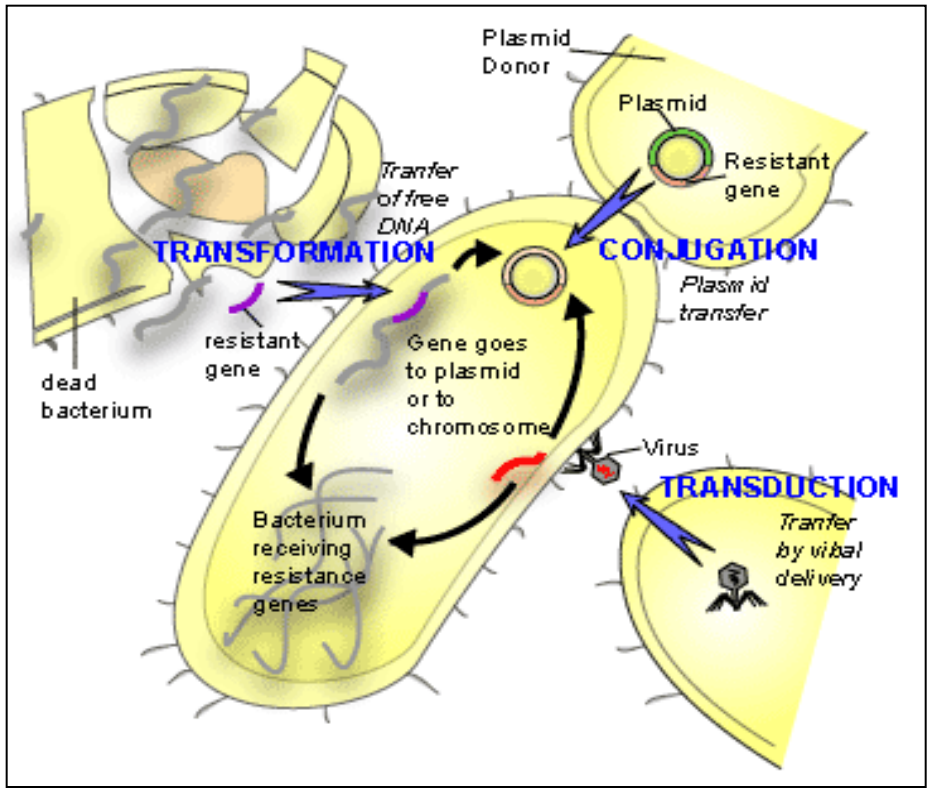
Long terminal repeats power evolution of genes and gene expression programs in mammalian oocytes and zygotes (Franke et al., 2017)

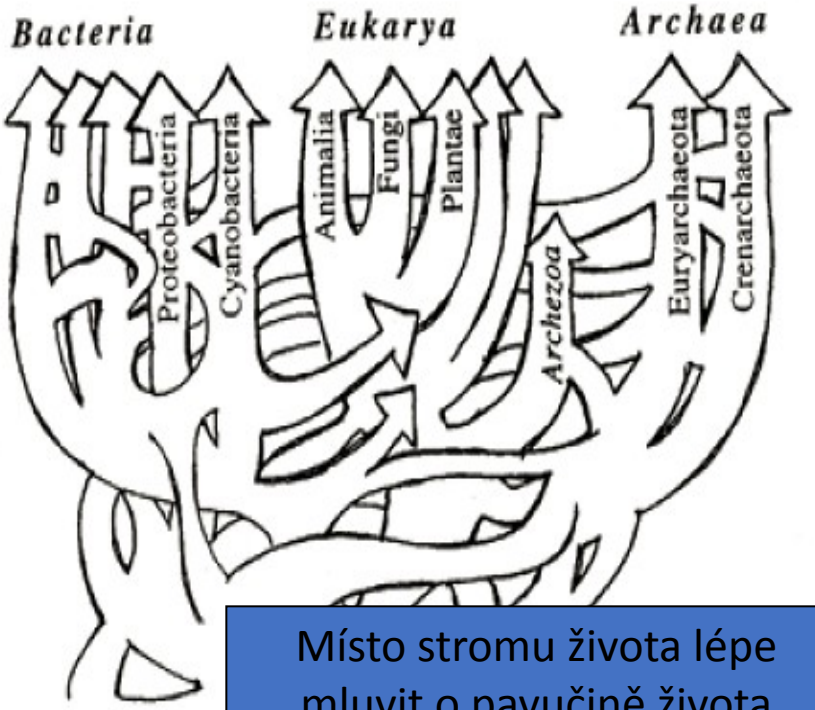


Původ nových genů: Horizontální přenos

- vertikální (sexualita) a horizontální přenos (mezi druhy)
- bakterie - konjugace, transdukce a transformace
- vířníci pijavenky (Bdelloidea) – z bakterií, hub, řas, prvoků
- vnitrobuněčný parazitismus (Wolbachia)
- DNA transposony
- endosymbióza – promiskuitní DNA
- GMO organizmy si budou vyměňovat geny s ne-GMO

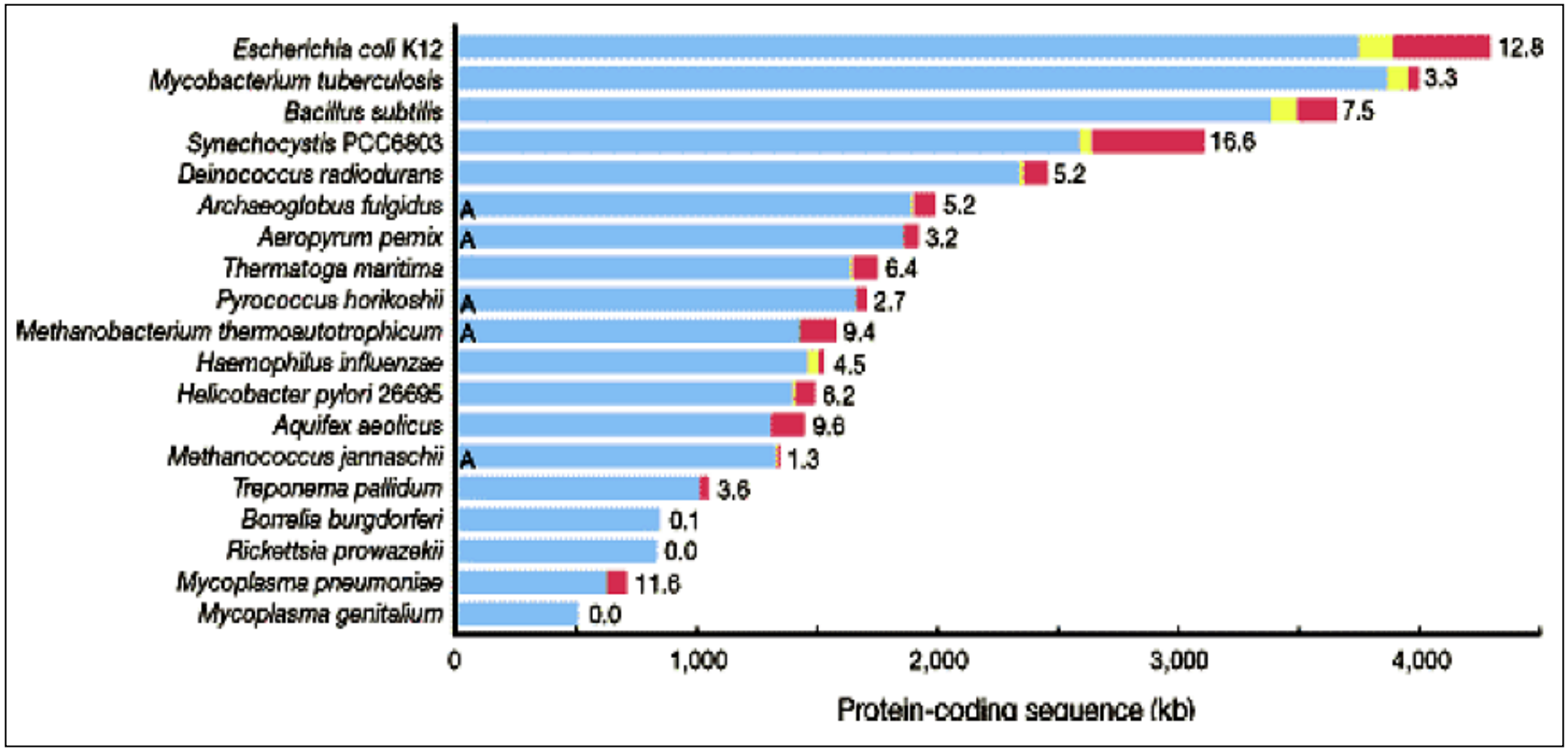
Přírodní genetické inženýrství je časté, dokonce i mezi evolučně vzdálenými taxony





Místo stromu života lépe mluvit o pavučině života

Horizontální genový přenos u bakterií



Metody studia

přímé:

Subtraktivní hybridizace

Microarrays

nepřímé:

Zastoupení kodonů (codon bias)

GC obsah

Konzervativní pořadí genů

Vysoká homologie se vzdáleným druhem

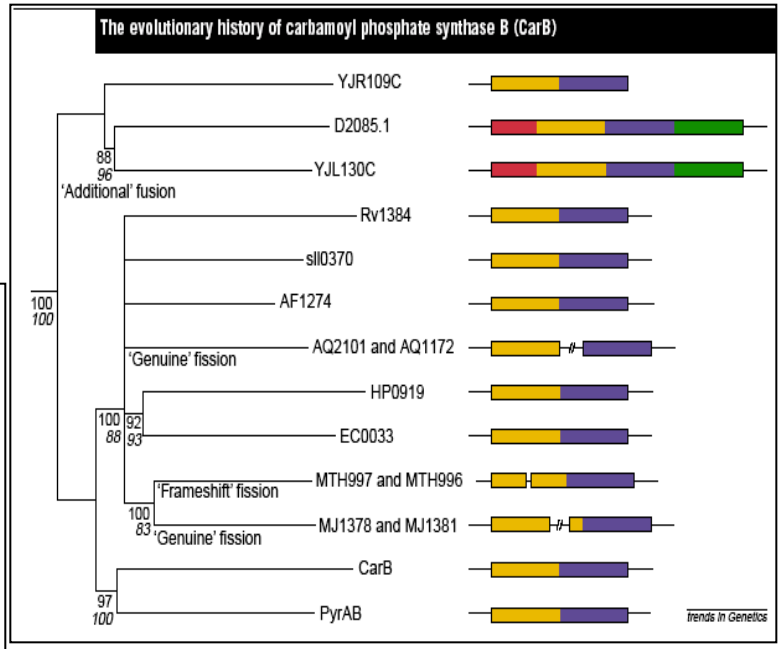
Původ nových genů: Štěpení a fúze genů (na základě studia ortologů)

Větší genom – více fúzí

Number of gene organizations resulting from fission and fusion

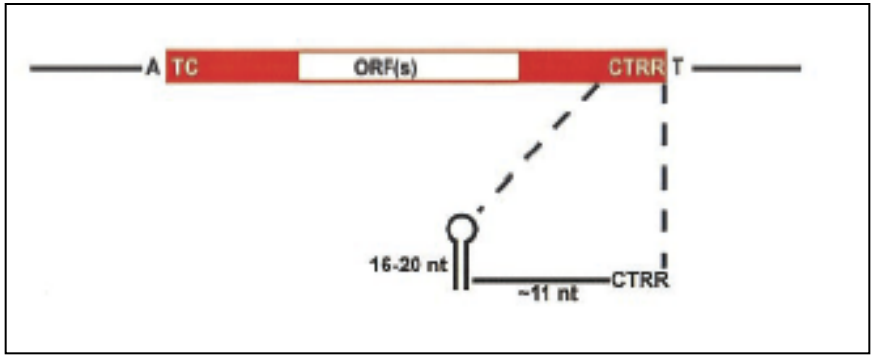
Species[c]	Genome size[a]	Fusion	Fission		
			Total	Genuine[b]	Frameshift[b]
Mycoplasma genitalium	468	2	2	1	1
Mycoplasma pneumoniae	677	2	1	0	1
Rickettsia prowazekii	834	6	2	0	2
Borrelia burgdorferi	850	3	1	1	0
Chlamydia trachomatis	876	8	0	0	0
Treponema pallidum	1031	6	0	0	0
Aquifex aeolicus	1522	12	13	8	5
Helicobacter pylori 26695	1590	9	0	0	0
Haemophilus influenzae	1717	18	13	3	10
Methanococcus jannaschii	1735	12	7	5	2
Methanobacterium thermoautotrophicum	1871	16	18	5	13
Pyrococcus horikoshii	2061	4	3	3	0
Archaeoglobus fulgidus	2407	19	9	8	1
Synechocystis PCC6803	3168	24	4	4	0
Mycobacterium tuberculosis	3924	36	4	1	3
Bacillus subtilis	4100	19	1	1	0
Escherichia coli	4290	33	10	2	8

[a]Genome size in number of predicted genes.
[b]For a definition of the subdivision in 'genuine' and 'frameshift', see text.
[c]Thermophilic species are shown in bold.



- častější fúze než štěpení
- štěpení u termofilů

Napomáhají Helitrony vzniku nových genů?



Rolling-circle transposons in eukaryotes

Vladimir V. Kapitonov* and Jerzy Jurka

Genetic Information Research Institute, 2081 Landings Drive, Mountain View, CA 94043

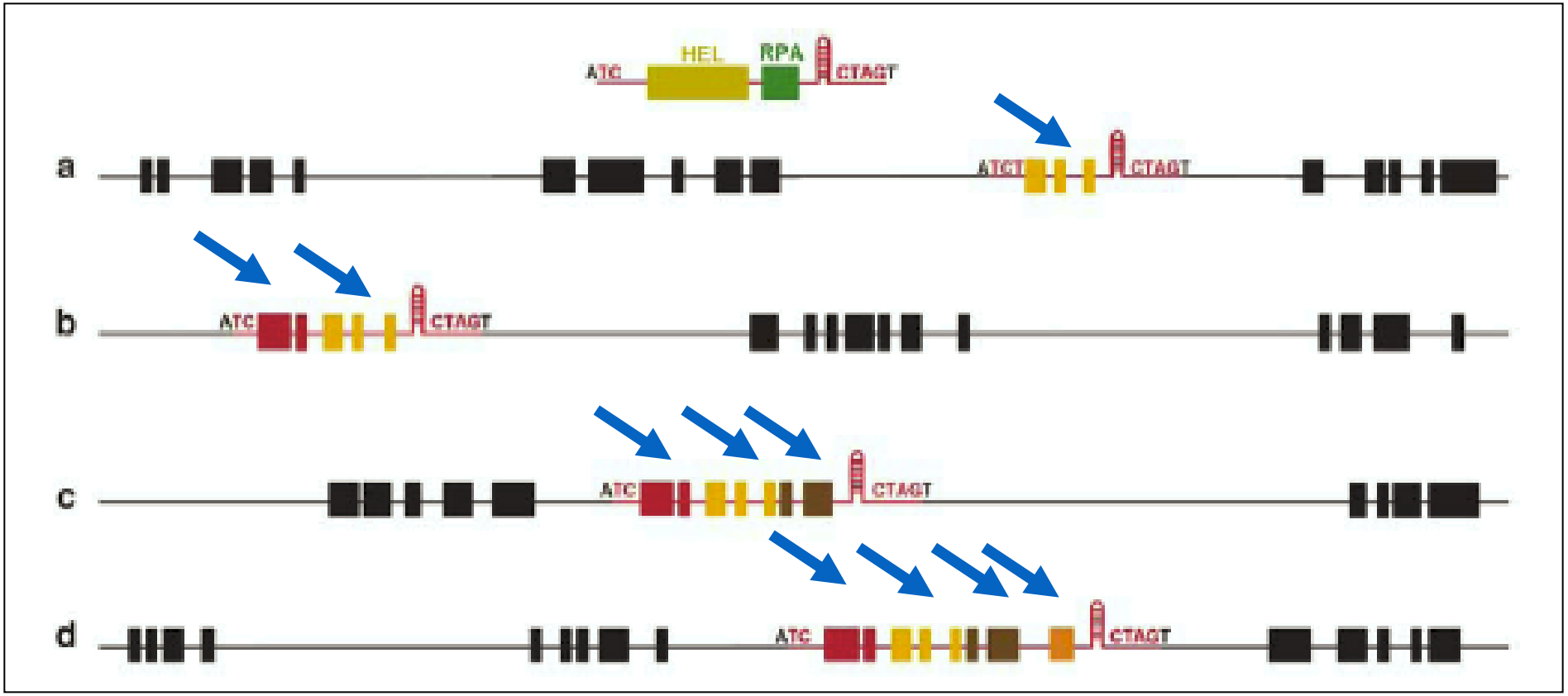
Communicated by Margaret G. Kidwell, University of Arizona, Tucson, AZ, May 29, 2001 (received for review April 10, 2001)

All eukaryotic DNA transposons reported so far belong to a single category of elements transposed by the so-called "cut-and-paste" mechanism. Here, we report a previously unknown category of eukaryotic DNA transposons, *Helitron*, which transpose by rolling-circle replication. Autonomous *Helitrons* encode a 5′-to-3′ DNA helicase and nuclease/ligase similar to those encoded by known rolling-circle replicons. *Helitron*-like transposons have conservative 5′-TC and CTRR-3′ termini and do not have terminal inverted repeats. They contain 16- to 20-bp hairpins separated by 10–12 nucleotides from the 3′-end and transpose precisely between the 5′-A and T-3′, with no modifications of the AT target sites. Together with their multiple diverged nonautonomous descendants, *Helitrons* constitute ~2% of both the *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans* genomes and also colonize the *Oriza sativa* genome. Sequence conservation suggests that *Helitrons* continue to be transposed.

and best illustrated by a recent study of *Sleeping Beauty*, a Tc1-like transposon from fish (13), reconstructed from its inactive copies and demonstrated to be transpositionally active in a test tube. Another much more ancient example is a PiggyBac-like DNA transposon, *Looper*, discovered in the human genome [V.V.K. and J.J., Repbase Update (1998) www.girinst.org/Repbase_Update.html], whose consensus sequence is based on a multiple alignment of the inactive copies, which are ≈100 million years old. All genomic copies of *Looper* are mutated to the extent that no traces of its transposase could be detected at the sequence level. However, the transposase re-emerged from the virtual background noise after reconstructing the consensus sequence.

Materials and Methods

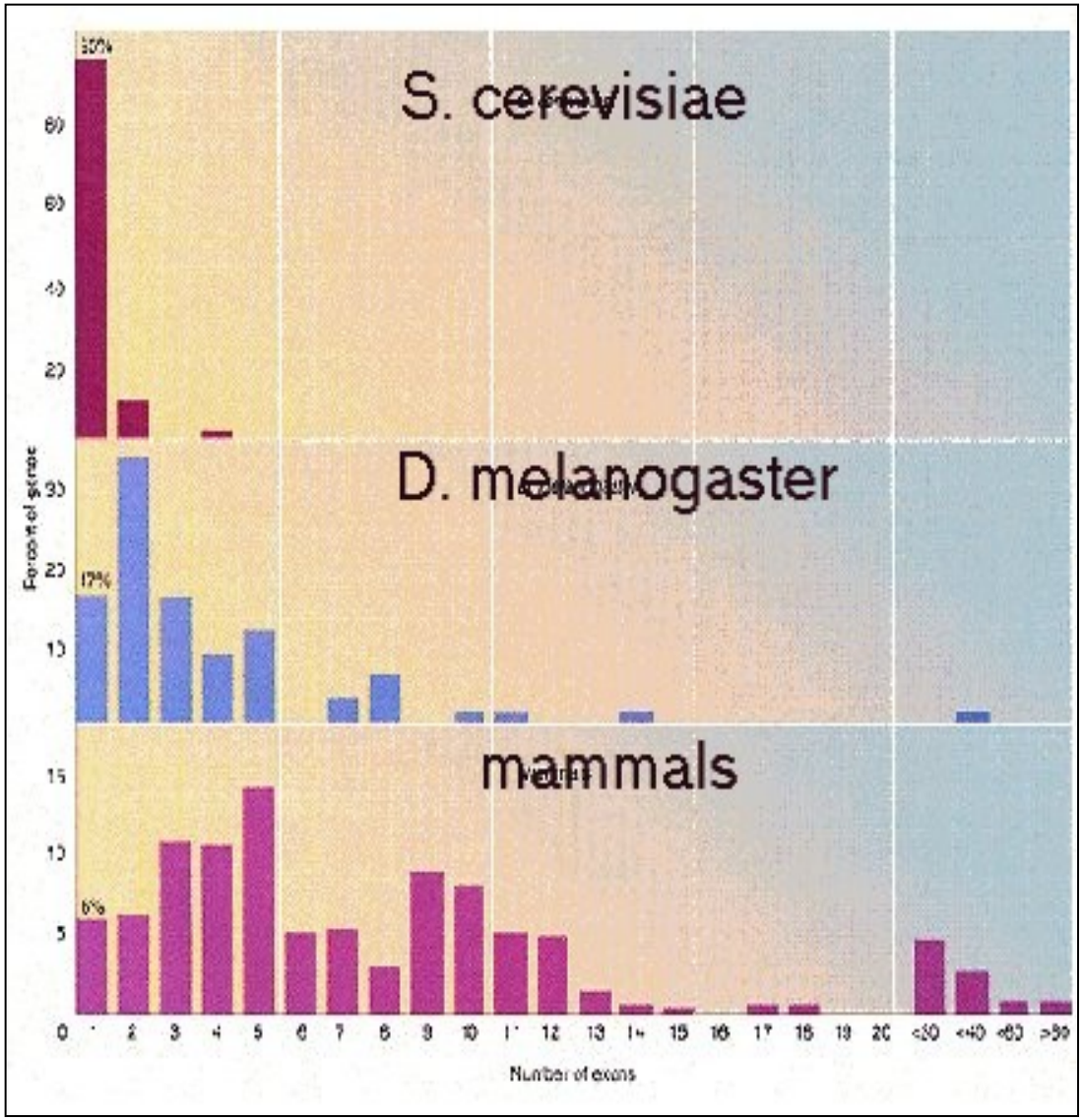
Computational Analysis. TEs reported in the manuscript were identified by running DNA sequences of prospective TEs against



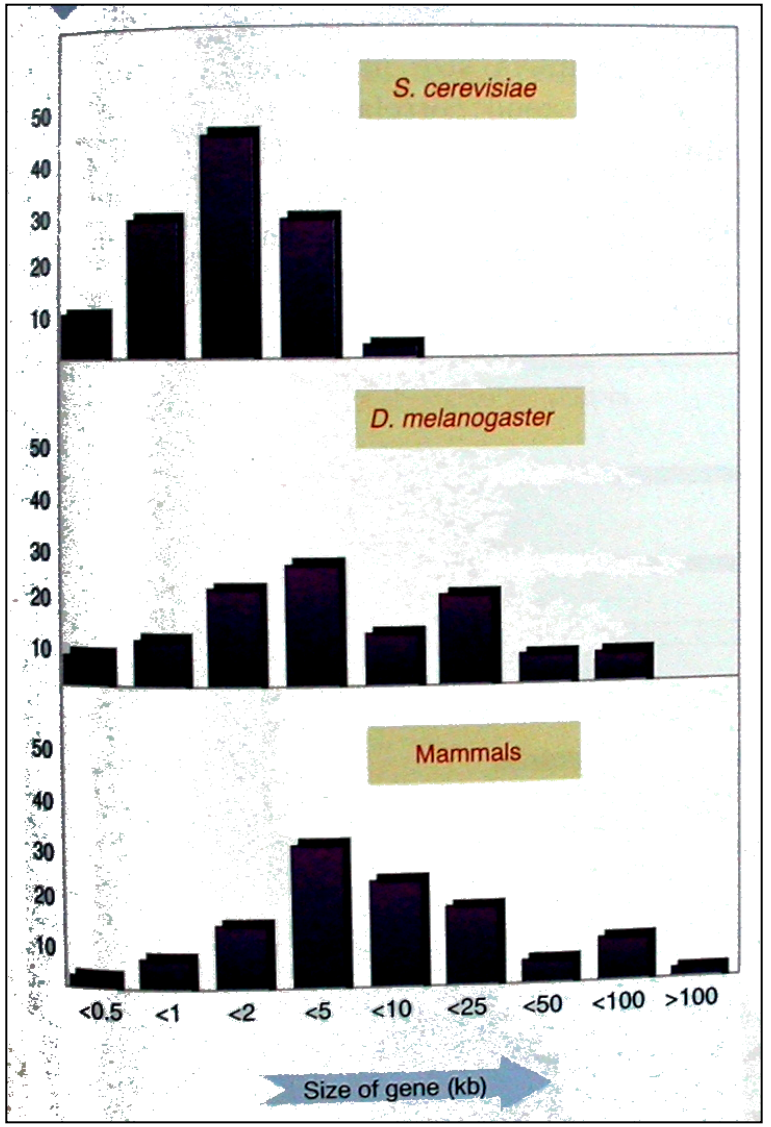
VELIKOSTI GENŮ

Počty exonů jsou nejvyšší u savců

Počet exonů

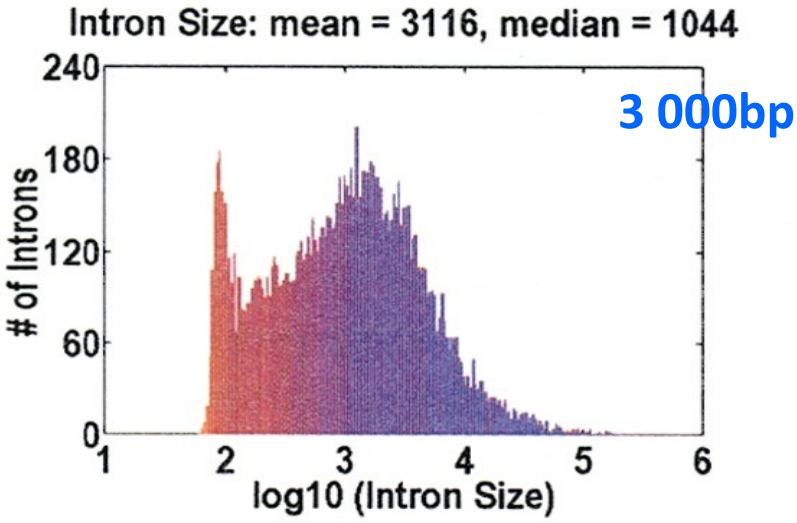


Délka genu (kb)



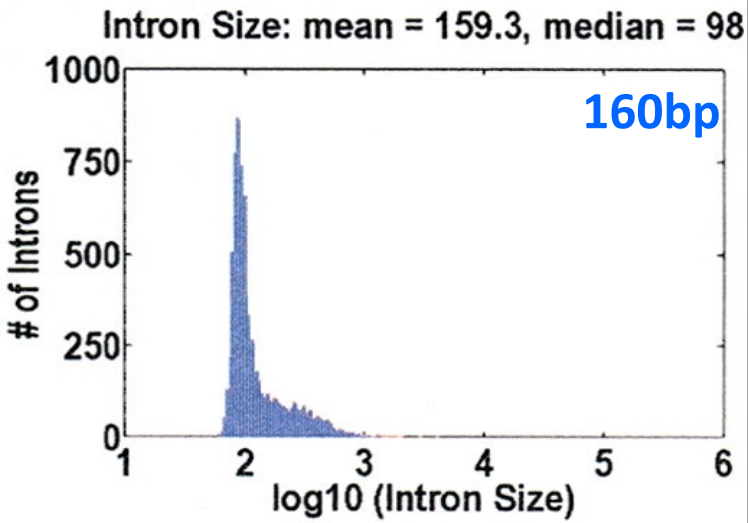
Velikosti intronů

Homo sapiens



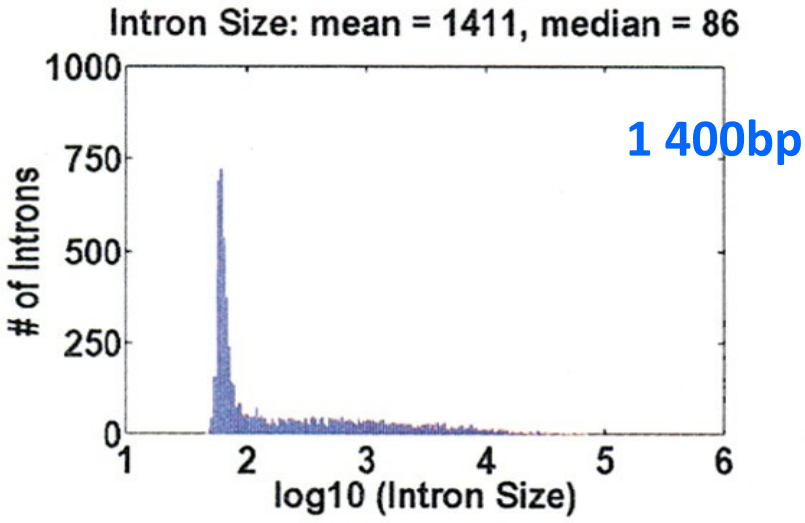
(a)

Arabidopis thaliana



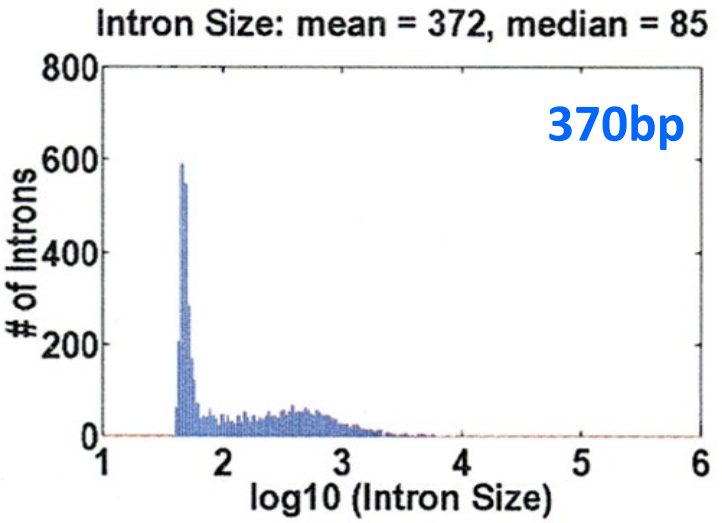
(b)

Drosophila melanogaster



(c)

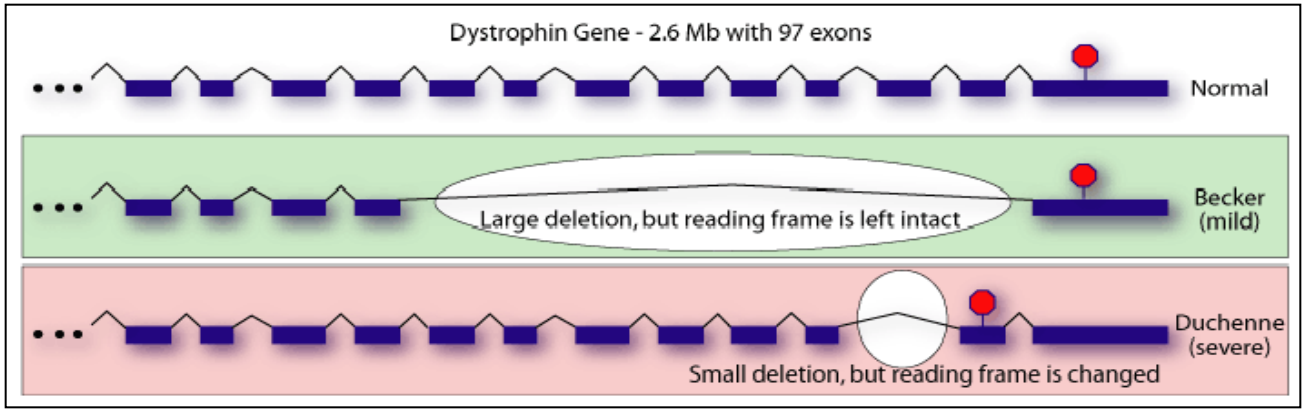
Caenorhabditis elegans

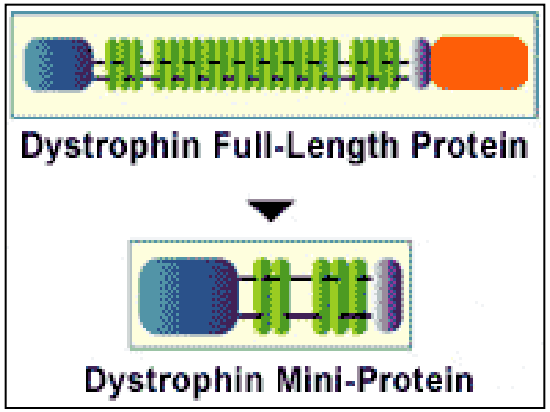


(d)

Dystrofinový gen – obří gen

79 exonů, nejdelší známý gen
8 promotorů, exprese ve svalech a mozku
2.5 Mb dlouhý (0.1% genomu), 14kb mRNA
delece: Duchenne MD nebo Becker MD
Poloha Xp21, 1:3500 u mužů





INTRONY – STARÉ NEBO MLADÉ

Hypotézy původu intronů

„Intron first“:
- původní organizmy obsahovaly introny
- prokaryota je ztratila

„Intron late“:
- původní organizmy introny neobsahovaly
- eukaryota je získala

Význam intronů:

1. Introny užitečné nejsou, ale organizmy se jich nedokáží zbavit

2. Introny mají funkční význam pro organizmy, jsou užitečné

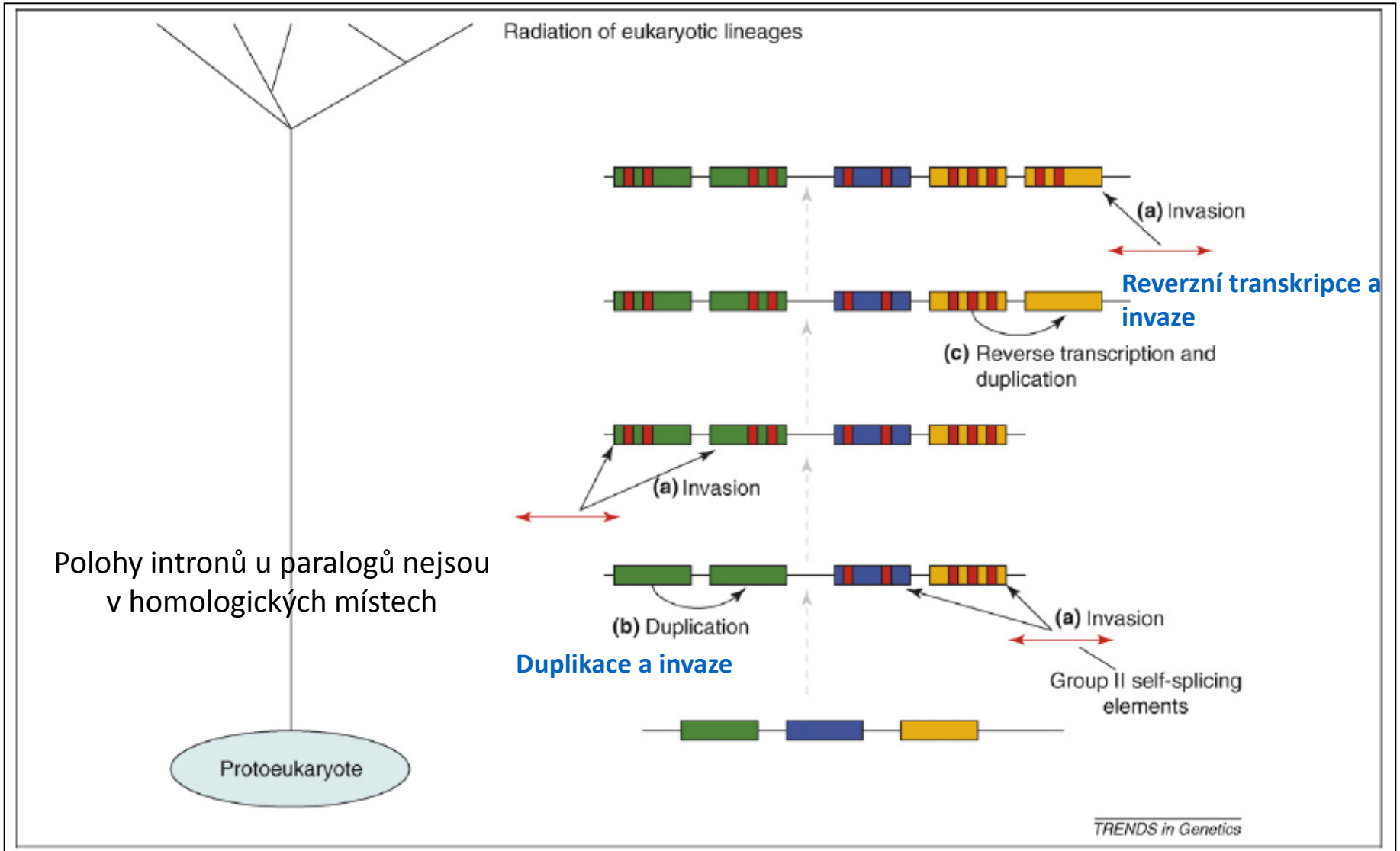
Introny byly v genech již na počátku ("intron first")

• studium vnitřní periodicity genů – stejné motivy v exonech i v sousedních intronech
• malá pravděpodobnost dlouhých úseků bez stop-kodonů,
• evoluční výhoda enzymatického aparátu, který vystřihne oblasti se stop-kodony a sestaví dlouhou mRNA

Introny byly do genů vloženy až dodatečně ("intron late")

• Existuje řada různých intronů lišících se mechanizmem vystřihování z RNA – vznikaly nezávisle
• Distribuce intronů v rámci fylogenetických stromů svědčí o dodatečném vložení spíše než o opakovaném nezávislém vymizení

„Introns first“ versus „introns late“



Polohy intronů u paralogů nejsou v homologických místech

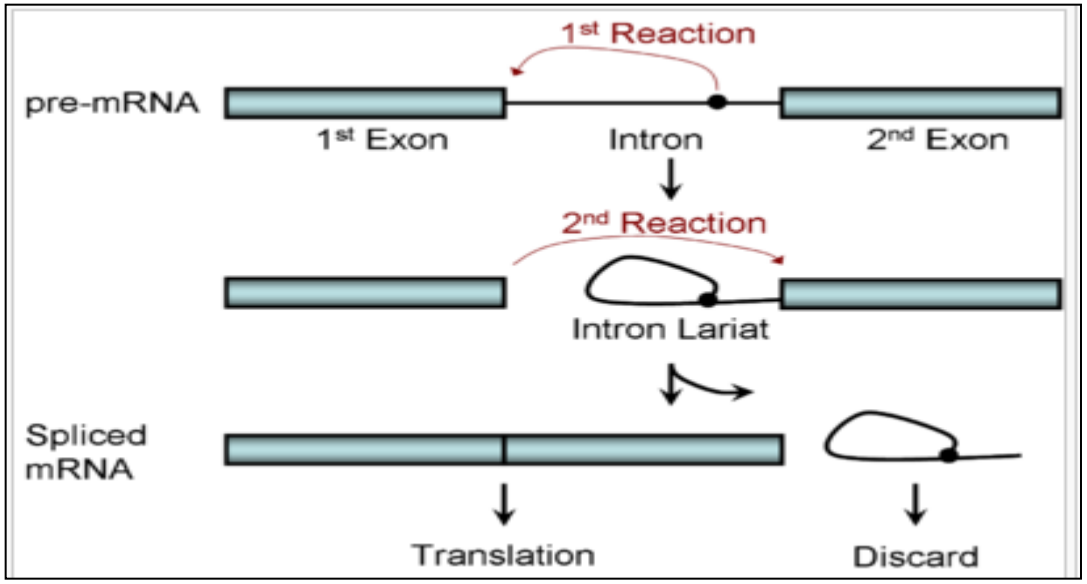
Figure 2. The processes that probably account for the lack of conservation of intron positions between ancient eukaryotic paralogs. (a) Ongoing invasion of group II self-splicing elements into eukaryotic genes, giving rise to spliceosomal introns. (b) Duplication of an intronless gene followed by differential insertion of introns into the paralogs. (c) Reverse-transcription-mediated duplication of an intron-containing gene, yielding an intronless paralog that, subsequently, accumulates introns in different positions. A schematic tree of eukaryotic evolution is shown, emphasizing that all of these processes are attributed to the time between the emergence of the eukaryotes and the radiation of the known eukaryotic lineages.

Introny jsou genomovými parazity

• Šíří se pouze v rámci genomu, vertikální přenos, aby nezabíjeli buňku, před translací se vystřihnou

• schopnost **samosestřihu**

• **Splicesom** – komplex kódovaný buňkou, původně parazitickými introny, kódují enzymy pro šíření v rámci genomu



Introny jsou užitečné pro organizmy

1. Zvyšují evoluční potenciál organizmu

- souvisí se vznikem eukaryot, v pozadí adaptivní radiace eukaryot
- nenáhodná distribuce, oddělují funkční domény proteinů
- snižuje pravděpodobnost rekombinace v exonech (doménách)
- stavebnicový charakter genů urychluje evoluci nových proteinů

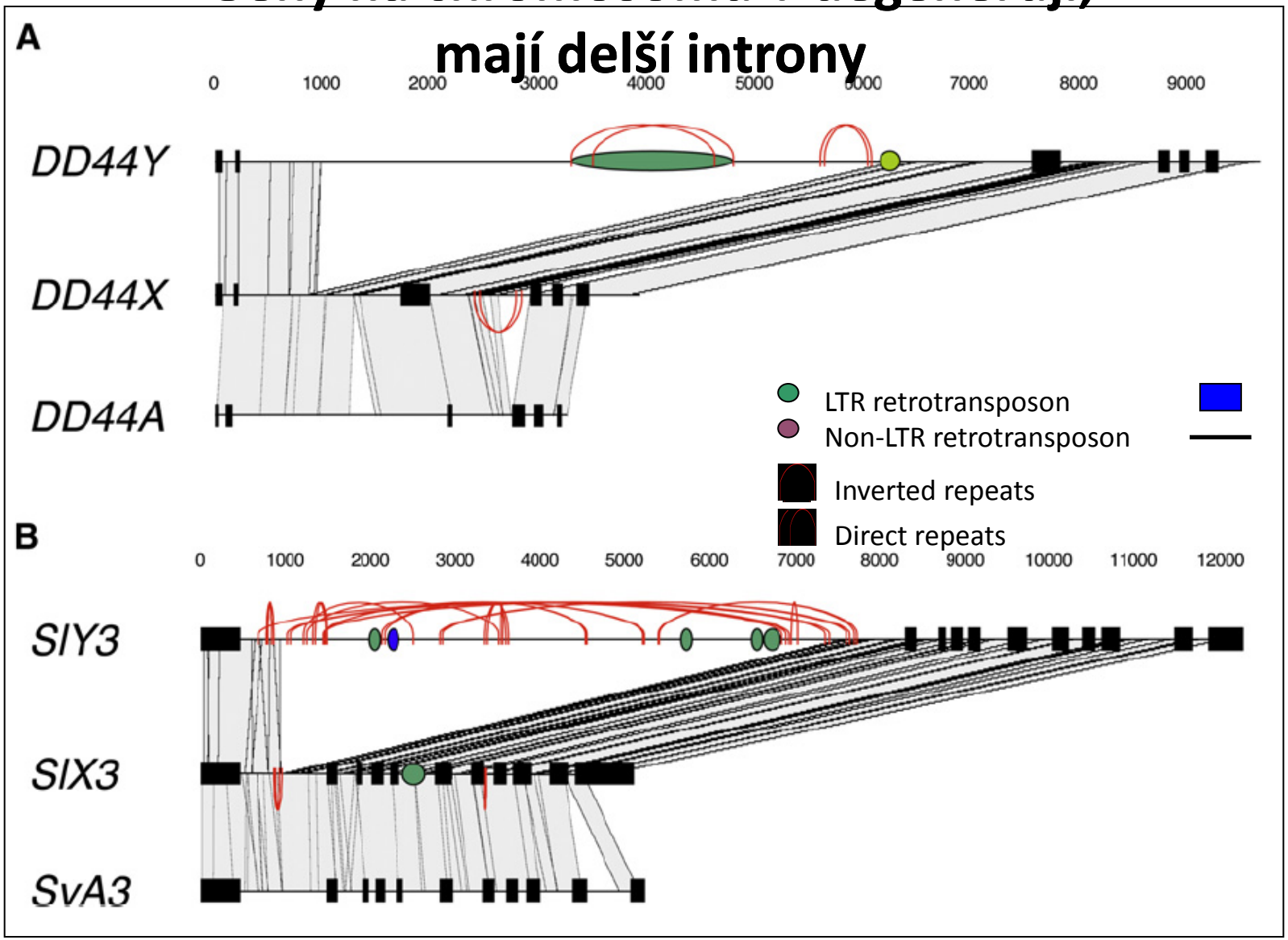
2. Souvisí s existencí histonů

- oblasti v kontaktu s histony nepřístupné
- introny zpřístupňují regulační oblasti

3. Snižují riziko nelegitimní rekombinace

- paralogy a riziko nelegitimní rekombinace
- včlenění intronů do různých míst diferencuje geny, snižuje riziko NR

Geny na chromosomu Y degenerují, mají delší introny



Marais et al (CurrBiol 2008)