

## P5. Dynamika genomů

V průběhu prvních třiceti let po znovuobjevení Mendlových zákonů dědičnosti vykryštovala první představa o uspořádání genů v chromosomech, jako zobecnění výsledků genetických experimentů. Při porovnávání rekombinačních frekvencí totiž vyplynuly určité zákonitosti: libovolnou trojici mutací se dařilo téměř vždy jednoznačně uspořádat na základě aditivity relativních frekvencí rekombinací mezi každou dvojicí dané trojice. Takto, krok za krokem, bylo možno konstruovat konsistentní genetické mapy rozsáhlých úseků chromosomů. Z pozorování, že vzdálenost mutací na genetické mapě se jevila lineární funkcí rekombinačních frekvencí, byl odvozen statický model chromosomu s lineárním uspořádáním genů: geny navzájem zachovávají neměnnou pozici a, v souladu s pravidlem aditivity, jsou uspořádány rovnoměrně, jeden vedle druhého, podobně, jako korálky na šňůrce. Všechny poznatky získané v onom klasickém období, převážně na jediném experimentálním modelu, octomilce (*Drosophila melanogaster*), můžeme reprodukovat i v moderních laboratořích za předpokladu, že oželíme vysokou rozlišovací schopnost analýzy a vyloučíme případné odchylky od aditivity.

Zjmenění genetické analýzy v dalších letech, zkoumání nových genetických objektů (rostlin, mikroorganismů), rozvoj cytologie a cytometrie spolu s poznatkem, že geny jsou tvořeny DNA, přineslo *nová fakta, která se vymykala statickému modelu chromosomu a zpochybnila představu o rovnoměrném rozmístění genů.*

☞ Byly to práce cytologů (*A.E. Mirsky a H. Ris, 1951; A.H. Sparrow, 1972*), které ukazovaly *nesoulad mezi obsahem DNA, vztaženým na haploidní buněčné jádro (tzv. hodnotou C) a stupněm evoluční komplexity organismu,*

☞ a pozorování *nestabilních mutací* ve zbarvení kukuřičných zrn, tzv. variegací (*R.A. Emerson; M.M. Rhoades*), které byly *Barbarou McClintock* poprvé v r. 1947 správně vysvětleny jako důsledek transposice nového typu genetického faktoru, genetického mobilního elementu.

☞ Dnes víme, že *paradoxní rozdíly v hodnotách C* („*cytologický paradox C*“) jsou způsobeny přítomností zvláštního druhu DNA, výrazně odlišné od DNA genů, kódujících posloupnosti aminokyselin v proteinech.

V genomu člověka představuje „genová“ („kódující“) DNA 2-3 procenta genomové DNA; u obojživelníků je genová DNA tisícinou - při čemž mezi jednotlivými druhy existují řádové rozdíly v obsahu DNA na haploidní jádro; genová DNA u některých nahosemenných rostlin a u některých řas je dokonce desetitisícinou celkové DNA.

Analýza kinetiky reasociace vláken denaturované DNA (*Britten, 1968*) ukázala, že významná část genomů je tvořena rodinami mnohonásobně se

opakujících jednoduchých sekvenčních modulů,  $R_i$ . Jejich opakováním vznikají buď různě dlouhé monotónní řetězce typu  $(R)_n$ , nebo domény s variacemi a permutacemi modulů  $R_1, \dots, R_i$ .

☞ Při srovnatelném množství genů kódujících proteinovou výbavu, hlavní příčinou paradoxních rozdílů ve velikosti genomů organismů stejné biologické complexity jsou rozdíly v obsahu repetitivní DNA (Hardman, 1986). Sekvence kódující proteiny jsou řetězcích repetitivní DNA rozptýleny jako izolované ostrůvky.

V této souvislosti narážíme na *genetický paradox*:

a) mapová (genetická) délka genomů eukaryotických organismů je při běžném křížení nezávislá na fyzické velikosti genomů v rozsahu tří řádů u 12 srovnávaných organismů,

b) frekvence intragenových rekombinací jsou konstantní (odrážejí „mapovou velikost“ genů) při srovnání organismů tak odlišných, jako jsou houby, kukuřice, drozofila (Thuriaux, cit. u: Holliday 1987). Regulární, reciproké meiotické rekombinace jsou podle toho lokalizovány pouze do strukturních (kódujících) genů a nikoli do rozsáhlých domén, obsazených repetitivní DNA. Tento závěr je o to podivnější, že repetitivní sekvence vnášejí do genomů rozsáhlé oblasti homologie. Zatímco *cytologický paradox C* vysvětlíme rozdíly v obsahu repetitivní DNA, *genetický paradox* souvisí se strukturou chromatinu - repetitivní sekvence jsou zpravidla z kondensovány do heterochromatinu, který je transkripčně i rekombinačně inaktivní.

☞ Na evoluci repetitivních sekvencí se podílejí *náhodná nerekiproká (nerovnoměrná) překřížení (crossovery)*, Smith 1976; *opakované cykly DNA replikace během buněčného cyklu i extrachromosomální (episomální) zmnožení excidovaných sekvencí s jejich následnou reintegrací* (Fried, Fao et al. 1991).

Repetitivní DNA však není jen reliktem z předchozích etap evoluce genomů, ale plní důležité funkce,

- ovlivňuje uspořádání chromatinu v buněčném jádře,
- spoluúčastní se kontroly integrity konců chromosomů,
- část repetitivních sekvencí je transkripčně aktivní a tyto transkripty jeví regulační funkce,
- je strukturním elementem v mechanice chromosomů - v mitose a meiose,
- působí při post-mitotické rekonstrukci buněčného jádra.
- opakování identických nebo podobných sekvenčních modulů, v podmínkách dekonkondensace heterochromatinu usnadňuje nerekiproké rekombinace a konverze segmentů DNA s důsledky pro vznik genetické variability (Charlesworth, Sniegowski et al. 1994; Shapiro 2002).

☞ *Objev mobilních genetických elementů (MGE) v genomu kukuřice (Zea mays) otřásl paradigmatem o strukturní stabilitě chromosomů a byl proto napřed vědeckou veřejností odmítán. K všeobecnému přijetí faktu mobility genů došlo až zásluhou mikrobiální genetiky, když byl jeden druh MGE, tzv. inserční sekvence, prokázán v genomu bakterie Escherichia coli. Od té doby byly nalezeny mnohočetné formy a zjištěno všeobecné rozšíření MGE. Na příklad, jenom v genomu drozofily existuje nejméně 40 typů MGE. Přes velkou různorodost*

☞ *MGE tvoří kategorii s jedním společným znakem: jsou to segmenty RNA nebo DNA, které obsahují informaci pro translokaci v genomu nebo mezi genomy, často bez ohledu na mezidruhové bariéry.*

Genetická informace nezbytná k translokaci (transpozici) zpravidla zahrnuje tři složky: a) *informaci pro syntézu specifických enzymů katalyzujících excisi, replikaci (v případě RNA reverzní transkripci) a integraci mobilního elementu; b) terminální sekvence, sekvenční motivy, sloužící jako identifikační značky vymezující element jako fyzickou entitu, umožňující jeho nehomologní integraci do genomu. Pojmu "nehomologní integrace" rozumíme tak, že k integraci elementu stačí jen několik nukleotidových párů a proto v cílovém místě genomu zpravidla neexistují preferovaná místa; c) regulační sekvence, kontrolující translokační aktivitu MGE.*

Množení a šíření MGE je omezeno lokálním uspořádáním genomu, strukturou chromatinu, fyziologií organismu a podmínkami funkční integrity celého systému (buňky, organismu): zvýšení počtu homologních sekvencí zvyšuje pravděpodobnost restrukturační DNA a vzrůstu regulačního šumu. Z hlediska vlivu na okolní geny mohou být inserce MGE buď neutrální (dočasně bez vlivu), nebo se mohou v místě inserce uplatnit inaktivací, inhibicí nebo nekontrolovanou aktivací residentních genů. Významnou vlastností některých MGE je jejich schopnost budovat složitější mobilní soustavy, zahrnující v podstatě libovolné geny; takto se úsek genomu obklopený MGE může stát druhotným mobilním elementem.

Popíšeme dále MGE tří kategorií:

- i) *retroelementy,*
- ii) *DNA-transposony v genomech kukuřice a drozofily,*
- iii) *DNA-inserčními sekvencemi a transposony v genomech bakterií.*

Ad i) *Retroelementy a retrotransposice: transposice v cyklu DNA - RNA - DNA (Baltimore, 1985).*

Tento druh MGE vděčí za svoje vlastnosti enzymu reverzní transkriptáze (RT), která vytváří dvouvláknové kopie DNA z jednovláknového templátu

RNA. Retroelementy tvoří neobyčejně významnou a různorodou skupinu. Patří sem živočišné RNA viry, tzv. *retroviry*, které ve svém RNA genomu nesou tři základní geny: gen *pol* jehož transkript obsahuje informaci pro RT a geny *env*, *gag*, nezbytné pro tvorbu virové částice. Koncové (terminální) sekvence RNA genomu se při reverzní transkripci zdvojují a v DNA kopii vytváří *sekvence LTR* (Long Terminal Repeats). LTR, citlivé k různým regulačním signálům buňky, jsou charakteristické pro *endogenní* (integrované) *retroviry* a tzv. *retrotransposony*.

*Retrotransposony* jsou podobné endogenním retrovirům. Oba typy MGE se množí reverzní transkripcí a jejich integrační formou je kruhová dvouvláknová DNA s dvěma kopiemi LTR. Na rozdíl od retrovirů však retrotransposony zpravidla nemají gen *env* a proto nemohou opustit buňku hostitele. Z endogenních retrovirů a retrotransposonů v genomech hostitelů postupně vznikaly jejich neúplné kopie, nakonec pouze LTR.

Dalšími dvěma typy retroelementů jsou *retroposony*, a *pseudogeny*.

Mimořádně významnými *retroposony*, spoluúčastnými evoluce genomů obratlovců, jsou sekvence *LINE* (Long INterspersed Elements; (Kazazian and Goodier 2002), blízké retrotransposonům. V lidském genomu se v desítkách tisíc kopií vyskytují sekvence LINE-1 o délce 6-7 tisíc párů bází. LINE-1 nesou informaci pro syntézu proteinů, především pro syntézu RT. Na rozdíl od retrotransposonů, LINE-1 nejsou vymezeny sekvencemi LTR. Některé LINE-1 jsou již jen mrtvými pozůstatky dávných retrotransposičních událostí a tvoří pasivní součást repetitivní DNA; jiné si však dosud zachovaly retrotransposiční aktivitu v její evolučně primitivní podobě a staly se tak molekulárními fosíliemi, připomínajícími počátky DNA genomů.

Integrace LINE1 do nového cílového místa začíná incízí v cílovém místě a tvorbou lineárního hybridu RNA-DNA za katalytického působení RT. Pro tuto reakci se nejprve element transkribuje do RNA formy a ta, na jednom svém konci (na 3'-konci LINE1) rozpoznaná RT, iniciuje první fázi retrotransposice.

*Pseudogeny* jsou reverzními transkripty rozličných typů RNA, a neobsahují informaci pro RT. Pseudogeny schopné transkripce nazýváme *retrogeny*. Mohou být kopiemi mRNA (s promotorem pro RNA polymerázu II, na př. retrogeny myšího  $\alpha$ -globinu a lidské fosfoglycerát kinázy), nebo kopiemi jiných typů RNA (s promotorem pro RNA polymerázu III). Tuto vlastnost mají sekvence *Alu-1*, které lze v lidském genomu identifikovat s pomocí restriční endonukleázy AluI (v sekvenci *Alu-1* o délce cca 300 párů bází je jedno štěpné místo pro enzym AluI). *Alu-1* se v lidském genomu vyskytující ve statisících, až milionu kopií, jako neúplné reverzní transkripty 7SL RNA (ta patří do základní výbavy buňky a spoluúčastní se přenosu bílkovin v membránovém systému cytoplasmu). Mnohé *Alu-1* mohou být dosud transkribovány polymerázou pol III.

Formálně podobné *Alu-1* jsou *neúplné reverzní transkripty tRNA*, vyskytující se rovněž ve statisících kopiích v genomech obratlovců, včetně člověka. *Alu-1* a retroelementy na bázi tRNA se společně nazývají SINE (Short *IN*terspersed Elements).

SINE samy o sobě nejsou transposičně aktivní, ale některé tRNA-SINE a některé LINE1 mohou tvořit kooperativní dvojice, schopné retrotransposice.

V tomto případě LINE-1 poskytne svou RT komplementárnímu tRNA-SINE a umožní mu retrotransposici mechanismem podle vzoru LINE-1. Komplementarita je dána přítomností kopie 3'-segmentu původem z LINE-1 na 3'-konci tRNA-SINE; tento segment iniciuje lineární integraci do genomu, tak jak bylo uvedeno v případě retrotransposice LINE1 (přenos toho krátkého segmentu z LINE-1 na tRNA-SINE je příkladem genomové dynamiky v mikroměřítku).

Kromě genomů obratlovců byly retroelementy nalezeny v genomech hmyzu (na př. geneticky aktivní retrotransposony *gypsy* a *copia* u drozofily; (Corces and Geyer 1991), červů, hlenek a kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*, retrotransposon *Ty1*, podobný *copia*, a *Ty3* podobný *gypsy*), a u mnoha druhů rostlin, (Grandbastien 1992), (retrotransposony typu *Ty1/copia*).

Srovnávací studie ukazují, že některé rostlinné retrotransposony jsou mezidruhově příbuzné a jsou bližší retrotransposonům hmyzu, než jiným rostlinným retrotransposonům. Lze se proto domnívat, že se retrotransposony mohly šířit mezi různými taxonomickými skupinami rostlin horizontálně za účasti živočišných přenašečů. Stojí za zmínku, že v rostlinné říši neznáme ani jednoho představitele integrujících se retrovirů.

Přítomnost podobných nebo příbuzných retroelementů v nejrůznějších taxonomických skupinách svědčí o tom, že jejich vznik předcházal oddělení základních evolučních větví. Pozoruhodným byl nález RT v bakteriích a nález bakteriálních nemobilních retroelementů, *retronů* u *Myxococcus xanthus* a *E. coli* (*S.Inouye* a *M Inouye*, 1989).

Společný základ v RNA a její druhotné konverzi v molekulu DNA ukazuje, že retroelementy patří k nejstarším evolučním vrstvám genomů a významně se podílely na jejich evoluci (Baltimore 1985; Shedlock and Okada 2000; Sverdlov 2000; Kazazian and Goodier 2002).

*Vztahy mezi různými typy retroelementů* (Singer 1982; Ullu and Tschudi 1984; Daniels and Deininger 1985; Wagner 1986; Lover, Lower et al. 1996):

**RV:** *Retrovirý* [LTR, *pol*, *env*, *gag*]; existence ve dvou modech:

a) reprodukce,

b) integrace:

b1) Integrace **RV** ⇔ ztráta *env*, *gag* ⇔ **RTS:** *retrotransposony* [LTR, *pol*];  
ztráta *pol* ⇔ **LTR**;

- b2) **RTS**, ztráta LTR  $\Rightarrow$  **RP**: *retroposony* [pol]  $\Rightarrow$  **LINE**
- b3) Aktivitou *pol*  $\Rightarrow$  **PG**: *pseudogeny* - reverzní transkripty různých mRNA;
  - i) **SINE**: reverzní transkripty 7SL RNA = *Alu*;  
reverzní transkripty tRNA;  
SINE jsou často transkribovatelné pol III;
  - ii) **retrogeny** jsou často transkribovatelné pol II.


Ad ii) *Transposice v cyklu DNA - DNA: transposony v genomu kukuřice a drozofily*

Prototypem tohoto druhu MGE je systém *Ac/Ds* kukuřice, objevený B. McClintock. Ta zkoumala spontánní výskyt charakteristických chromosomových aberací které se u některých linií kukuřice vyskytovaly mnohem častěji, než u jiných. Postřehla při tom dvě korelace. Rostliny s vysokým výskytem aberací byly současně náchylné k barevným variegacím zrn; variegace i aberace korelovaly s určitou genetickou konstitucí rostliny. Zlomy i variegace bylo možno indukovat přikřížením jakýchsi genetických faktorů, přítomných v genomech některých kultivarů kukuřice. Na základě těchto pozorování B. McClintock vysvětlila aberace i variegace jedním modelem zahrnujícím dvě komponenty: „disociátor“ *Ds* odpovědný za časté zlomy v místě lokalizace, a „aktivátor“ *Ac* odpovědný za aktivaci vzdálených elementů *Ds*.

Genetickými experimenty bylo dokázáno, že jak *Ac* tak *Ds* (v závislosti na přítomnosti *Ac*) mohly v genomu měnit polohu (místo integrace) a dokonce překlenout vzdálenost mezi chromosomy.

Nestabilitu fenotypu, vyvolaného aktivitou *Ac/Ds* lze vysvětlit takto: zatímco jejich insercí dochází k inaktivaci cílového genu (např. vmezeřením *Ds* do lokusu *C*, odpovědného za zbarvení kukuřičného zrna); excisí může dojít k obnovení funkční integrity genu; důsledkem nahodilých excisí *Ds* z lokusu *C* vznikají buněčné linie, tvořící na povrchu zrn viditelné barevné sektory.

Oba elementy, *Ac* i *Ds*, byly izolovány technikami klonování DNA a byla prozkoumána jejich struktura (Doring and Starlinger 1984). Ukázalo se, že *Ac* i *Ds* mají totožné terminální sekvence, ale *Ds* je defektní kopií *Ac*, v níž chybí gen pro transposiční enzym (transposázu). Proto transpozici aktivace *Ds* závisí na přítomnosti a expresi *Ac*.

 *Expresí Ac transposázy podléhá regulaci, citlivé na endogenní signály i vstupy z prostředí. Ostatně tato vlastnost je charakteristická pro všechny typy genetických mobilních elementů, včetně těch, jejichž mobilita závisí na retrotransposici. V této souvislosti můžeme hovořit o regulované nestabilitě genomu.*

V genomu kukuřice a v genomech mnoha jiných rostlinných druhů byly objeveny další transposony s vlastnostmi podobnými systému *Ac/Ds*.

V genomu drozofily byly podrobně prozkoumány dva různé MGE, působící podobné chromosomové aberace, jako systém *Ac/Ds*. Jsou to elementy *P* a *hobo*. Byly objeveny stejně jako element *Ds* díky tomu, že jejich přítomnost zvyšovala frekvenci aberací v jednom z chromosomů (v pohlavním chromosomu X).

#### Ad iii) *Inserční sekvence a transposony bakterií*

Historie objevu MGE v genomech bakterií je analogická historii objevů B. McClintock. Odehrávala se však o dvacet let později. V tomto případě byly zkoumány nestabilní (snadno revertující) mutace v operonu odpovědném za utilizaci galaktózy nebo laktózy buňkami *E.coli*. Tento druh mutací lze snadno zviditelnit na indikátorových živných půdách, kdy jsou kolonie nemutovaných bakterií zbarvené a mutantní formy bezbarvé. Excize MGE vyvolávaly v bakteriálních koloniích tvorbu barevných sektorů, podobných variegacím u kukuřice. Elektron-optickým zkoumáním DNA bylo prokázáno, že gen postižený nestabilní mutací se prodloužil přibližně o 800 párů bází, a po reverzi se znovu zkrátil na původní délku. MGE odpovědný za tento efekt byl nazván inserční sekvencí, *Is*. *Is* jsou elementy v délkovém rozmezí 800-1500 párů bází, vymezené krátkými terminálními sekvencemi, schopné transposice nezávisle na hostitelském rekombinačním systému.

☞ *Is* obsahují regulační sekvence, které mohou ovlivnit expresi okolních genů; jsou citlivé ke stresovým faktorům- indukce mobility *Is* může destabilizovat hostitelský genom.

*Is* jsou nejjednoduššími formami bakteriálních MGE a jsou patrně jsou předchůdci složitějších elementů, transposonů.

*Transposony* v průběhu své vlastní evoluce integrovaly rozličné geny, které nijak nesouvisejí s transposicí. Například transposon *Tn10* obsahuje gen pro rezistenci k tetracyklinu, transposon *Tn9* gen pro rezistenci k chloramfenikolu; oba tyto transposony jsou vymezeny párem *Is*. Za účasti transposonů mohou vznikat MGE vyššího řádu; dobře prostudovanou je schopnost dvou *Tn9* mobilizovat různě dlouhé, vmezežené segmenty hostitelského genomu.

V důsledku mutací, rekombinací, delecí a insercí vznikaly různé strukturní formy transposonů; např. transposon *Tn3*, který nese gen *bla* (ten odpovídá za rezistenci k ampicilinu), ztratil většinu sekvencí svých terminálních *Is*, včetně informace pro syntézu transposázy. Gen pro transposázu se však přenesl do vnitřní části *Tn3*, kde sousedí s genem *bla*. Transposony a inserční sekvence byly nalezeny ve všech dosud zkoumaných druzích bakterií. Zahrnují rezistence k antibiotikům, těžkým kovům a mnoha jiným cytotoxickým látkám.

☞ *Dynamika genomů ve vztahu k jejich evoluci*

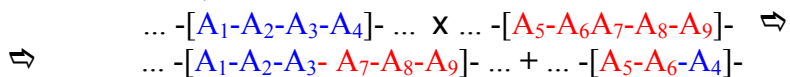
Mikrobiální a rostlinné MGE se transponují buď tak, že opustí svoje původní místo a přemístí se jinam (přitom po sobě zanechají „stopu“ v podobě několika párů bází), nebo se replikací na jiné místo zkopírují. Prvním způsobem se přemísťuje například transposon *Tn10* a rostlinné transposony typu *Ac/Ds*, druhým způsobem například *Tn3*.

*Is a transposony jsou faktorem evoluce bakteriálních episomů.* Umožňují na kointegraci různých plasmidů a kombinaci různých genů pro rezistenci k antibiotikům. Proměnlivost a horizontální šíření mnohonásobné rezistence k antibiotikům jsou umožněny právě spojením různých transposonů s konjugativními a promiskuitními plasmidy. Významnou úlohu v horizontálním (mezidruhovém) šíření genetické informace měly v živočišné říši retroviry. Retroviry, podobně jako transposony a *Is*, mohou svými regulačními sekvencemi ovlivnit expresi okolních genů.

☞ *S genomovou dynamikou a evolucí genomů souvisejí genetické mechanismy, založené na nereciprokých genetických výměnách:*

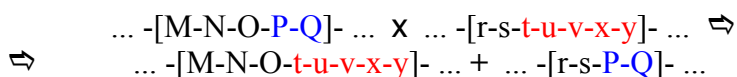
- a) nerovnoměrná překřížení, nereciproké rekombinace,
- b) nehomologní rekombinace,
- c) genové konverze,
- d) molekulární drajv;

Ad a) *nerovnoměrná překřížení a nereciproké rekombinace*, jsou umožněny přítomností opakujících se homologních modulů v genech, opakujících se sekvencí v tomtéž chromosomu nebo v homologních chromosomech,



v důsledku zpravidla dochází k nereciprokým změnám v délce chromatid

Ad b) *nehomologní rekombinace*; jak sám název ukazuje, souvisejí z výměnou sekvencí mezi chromatidami nebo mezi chromosomy, nezávisle na homologii v místě výměny,



v důsledku zpravidla dochází k nereciprokým změnám v délce chromatid, k prodloužení jedné a zkrácení druhé.



Nehomologní rekombinace (typické pro transposici MGE) mohou probíhat nejen mezi geny, ale i mezi intragenovými moduly za vzniku genů s novými funkcemi

Ad c) *genové konverze* jsou mechanismem, který umožňuje vzájemným posunem chromatid přepis sekvencí jednoho genu (lokusu  $mG$ ) podle předlohy v jiném genu (lokusu  $G^n$ ) za vzniku hybridní struktury  $mG^n$ , aniž dojde k fyzické rekombinaci (a změně délky chromatid),

⇒  $\dots mG(uuuvvv) \dots G^n(xxxyyy) \dots$   
 $\dots mG^n(uuuyyy) \dots G^n(xxxyyy) \dots$

Ad d) *molekulární drajv* (Dover 1986) kombinuje rozličné nereciproké výměny v jednom a totéž genomu; umožňuje postupnou náhradu sekvencí v multigenních rodinách geneticky pozměněnými sekvencemi. Dochází k „*homogenizaci*“ sekvencí nového typu na úkor sekvencí původních.

☞ Evoluční význam molekulárního drajvu spočívá v tom, že se variantní *geny*, které vznikají ojedinělými mutacemi, mohou šířit genomem a meioticky mohou být distribuovány do všech typů gamet.

Tento mechanismus umožňuje *fixaci geneticky modifikovaných sub-populací dočasně skryté před selekcí*. Naopak, darwinovský („selekční“) mechanismus fixace *jednotlivých* mutantních alel podléhá v populaci náhodným fluktuacím a zpočátku i možné extinkci.

Molekulární drajv se při speciaci může doplňovat s jiným „neselekčním“ mechanismem, *genetickým driftem*.

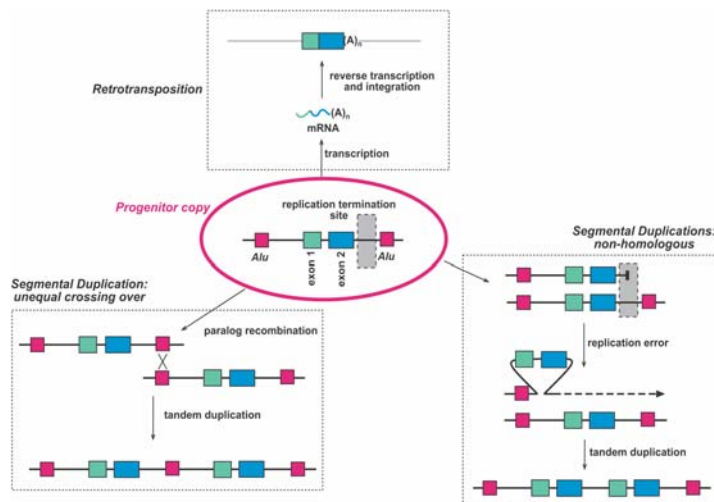
*Molekulární drajv* nezaměňujeme s *meiotickým drajvem* (*meiotic drive*, Lyttle 1993); *meiotický drajv* nesouvisí s intra-genomovým šířením sekvencí, ale s distorzí mendelovské segregace alel během meiosis.

Meiotický drajv má evoluční význam, protože některé alely, původem z parentálních heterozygot, mohou obejít určité fáze meiosis a jejich distribuce v gametách pak může převýšit teoretických 50%. V důsledku toho se v populacích dočasně mohou udržet a šířit i ty mutantní alely, které snižují přizpůsobivost diploidních potomků.

*Genetický drift* je založen na nenáhodném výběru vzorku alel z populace, například geografickým oddělením sub-populace, dočasně mimo vliv selekce.

☞ *Dynamika genomů, včetně horizontálního šíření genů, je součástí evoluční logiky, která postupně budovala systémy se vzrůstající komplexitou* (Leslie and Watt 1986).

## Mechanismy duplikace sekvencí DNA a osudy duplikovaných sekvencí - příklad živočišných genomů:



Jsou zobrazeny tři způsoby duplikací jednoho lokusu (progenitorové sekvence), genu s dvěma exony (zeleným, modrým), obklopené dvěma sekvencemi *Alu*. Lokus obsahuje i terminační signál pro replikaci (šedý obdélník).

a) *Reversní transkripce* mRNA poskytla bez-intronovou kopii genu, která se náhodně integruje do genomu jako druhá, *paralogní* sekvence.

b) *Nereciproká rekombinace* dvou homologních sekvencí *Alu* mezi dvěma posunutými chromatidami - poskytuje v jedné chromatidě kompletní duplikaci lokusu, a jeho delecii v druhé chromatidě. (Tento mechanismus byl patrně příčinou exploze genových duplikací v recentní evoluci primátů v důsledku zmnožení *Alu* sekvencí).

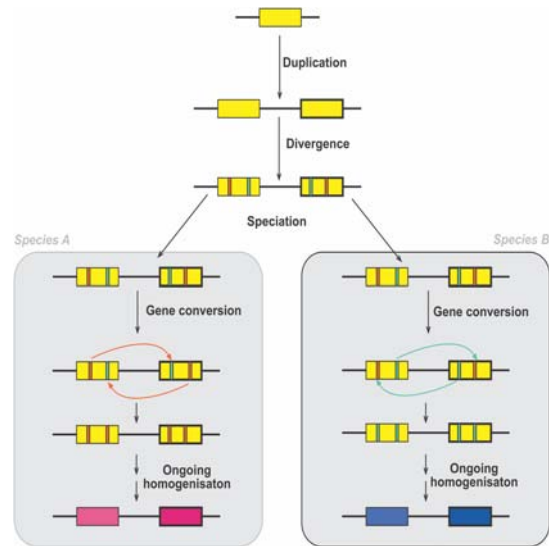
c) *Replikační chyba*, vyvolanou replikačními termíny, vznikla v jedné chromatidě smyčka; její nehomologní rekombinací s druhou chromatidou dochází k tandemové duplikaci (k duplikaci s paralogními geny uspořádanými za sebou).

Osudy duplikovaných (amplifikovaných) sekvencí nejsou predeterminovány. Závisí na souhrě náhodných jevů a působení vnitřních i vnějších selekčních tlaků:

Sekvence mohou být více-méně inaktivovány (např. metylací cytosinu), degradovány mutacemi nebo postupně eliminovány rekombinačními mechanismy.

Sekvence mohou být strukturně modifikovány genovými konverzemi, nebo dále šířeny mechanismem molekulárního dražvu. V obojím případě může dojít ke strukturní inkompatibilitě genomů.

Příklad divergence duplikovaných sekvencí genovou konverzí:



Divergence duplikovaných sekvencí umožňuje vznik nových genotypů a divergenci genomů. V oddělených liniích A a B dochází k nezávislým kolektivním transformacím sekvencí, zde genovými konverzemi (tj. k přepisu sekvencí podle vzoru jiných sekvencí, červené a modré šipky), *molekulárním dražvem*; linie A a B se proto postupně od sebe vzdalují až ke vzájemné genetické i fenotypové inkompatibilitě (o mechanismu genových konverzí, viz např. P. (Kourilsky 1986)).

Obrázky v tomto textu jsou převzaty z e-publikace M. Hurlése „*Gene duplication: the genomic trade in spare parts*“, zveřejněné v časopise PLoS Biology (Hurlés 2004)).

- Jednotlivé komponenty repetitivních rodin mohou být zdrojem nových funkcí (neo-funkcionalizace sekvencí).
  - Mezi redundantními sekvencemi může dojít k přerozdělení funkcí (k jejich sub-funkcionalizaci) díky přeskupení a diferenciálnímu působení regulačních sekvencí.
- O adopci nových funkcí díky zmnožení genů viz (Ganfornina and Sánchez 1999).

## P5.1 Rostlinné genomy a jejich dynamika (Walbot and Cullis 1985)

Mikromutace i makromutace u metazoi mohou mít evoluční význam jen pokud postihnou buňky germinální linie a stanou se součástí pohlavních buněk. Zcela jiná situace je v rostlinné říši. Vývojové strategií rostlin a

živočichů se principiálně liší. V případě rostlin se diferenciaci jednotlivých tkání těla nezakládá během embryonálního vývoje, ale *vývoj všech rostlinných orgánů, včetně orgánů pohlavních a diferenciaci pohlavních buněk probíhá v postembryonální fázi. Vychází z kmenových buněk tzv. apikálních meristemů* (nacházejících se ve špičce kořene a prýtu). Buňky apikálních meristemů jsou pluripotentní, tj. schopné diferenciaci ve specializované buňky rostlinného těla (Baurle and Laux 2003). U rostlin tedy nemá smysl hovořit o germinální linii. Nejen to, i diferencované buňky mohou v různé míře dosáhnout deiferencované úrovně, analogické stavu kmenových meristemových buněk; díky tomu se rostliny vyznačují neobyčejnou plasticitou regenerační.

Plynou z toho možné důsledky i pro genetickou variabilitu v populacích: *genetické změny, které nahodile postihnou somatické buňky a mutantní linie pak získají příležitost k regeneraci ve fertilní rostlinu, představují zdroj nových alel s možností šíření mnohem účinnější generativní cestou.* Příkladem plasticity rostlinných genomů může být indukce genotrofů působením faktorů prostředí a tzv. somaklonální variabilita rostlinných buněk ve tkáňových kulturách. Účinným nástrojem vzniku strukturních přestaveb rostlinných genomů jsou mobilní genetické elementy, podrobněji diskutované v předchozích částech textu.

#### *1. Případ genotrofů (Cullis 1977; Cullis 1986; Cullis 2005)*

Před více než čtyřiceti lety zkoumal A. Durrant na univerzitě v Aberystwythu (Wales) růst semenáčků lnu (*Linum usitatissimum*) v závislosti na koncentraci živin. Pozoroval při tom změny fenotypu, závislé na složení kultivačního media. *Fenotypová plasticita, tj. vratné (nedědičné) změny vlastností vyvolané vlivy prostředí,* jsou v rostlinné říši běžné. Některé morfologické změny, které Durrant sledoval, se však zcela neočekávaně staly dědičnými. Tyto *geneticky fixované formy, indukované vnějšími vlivy,* byly pak nazvány *genotrofy*. Nebylo pochyb, že různorodost genotrofů je podmíněna různorodostí genotypů. Variabilita rostlin přitom dosahovala vrcholu v podmínkách maximálního fyziologického stresu. Podobné výsledky byly následně získány i v jiných laboratořích i s jinými rostlinnými druhy.

Zprávy o vlivu prostředí na dědičnost připadaly některým badatelům jako "vyvolávání Lamarckova ducha", není proto divu, že byla tomuto jevu věnována značně kritická pozornost. O potvrzení Durrantových pozorování a další výzkum v tomto směru se zasloužil jiný britský vědec, C. A. Cullis. Pokračoval v genetické analýze Durrantových genotrofů a zaměřil se i na sledování molekulárních změn v buňkách a genomu. Dospěl k závěru, že vznik genotrofů není důsledkem mutací v konvenčních genech (v mendelovských lokusech), ale že souvisí se strukturními přestavbami genomu. Pozoroval změny v obsahu celkové DNA v jádře, variabilitu v relativním zastoupení některých isoenzymů a

ribosomální RNA, a zejména změny v obsahu různých typů repetitivních sekvencí DNA.

## 2. Příklad somaklonální variability (Larkin and Snowcroft 1981; Evans, Sharp et al. 1984; Evans 1989)

Pozoruhodnou vlastností rostlin je schopnost vegetativního množení. U mnoha druhů můžeme dosáhnout klonování regenerací rostlin z buněčných linií, odvozených z diferencovaných somatických buněk, nejčastěji z buněk listového mesofilu. V populaci takových regenerantů se však často objevují geneticky stabilizované formy, lišící se morfologickými znaky prýtlů a květů. Tento jev byl nazván *somaklonální variabilitou*. Podobně jako v případě genotrofů, podstatou somaklonální variability rostlin jsou změny v obsahu různých složek DNA a jejich topografie v jádře (Walbot 1985). Strukturálními změnami však bývají často postiženy i genomy chloroplastů a mitochondrií. Somaklonální variabilitu lze využít i v rostlinném šlechtitelství.

V Biofyzikálním ústavu ČSAV byla zkoumána fenotypová a genotypová variabilita rostlin regenerovaných z buněčných linií tabáku (*Nicotiana tabacum*). Výsledky analýz prokázaly odlišnosti genomů rostlin původem z různých buněčných klonů (interklonální rozdíly) a podobnost genomů v různých rostlinách z téže buněčné linie (intraklonální podobnost), Vyskot, Reich et al. 1991. Je proto pravděpodobné, že v tomto případě genetická variabilita somatických buněk vznikla již během jejich proliferace a diferenciaci v listový mesofil (viz dále případ transplantace jader z různých vývojových stadií žáby, R. Briggs, T. J. King, J.B. Gurdon, 1952 - 1964).

## 3. Různé druhy stresu a genetická variabilita

Jak mohou zmíněná pozorování přispět k obecnějším zákonitostem? Barbara McClintock uvedla dvě možné odpovědi na "výzvu", které jsou buňky vystaveny v podmínkách stresu (McClintock 1983). V některých případech, jako při odpovědi na tepelné poškození nebo při SOS reparaci poškození DNA u bakterií, dochází k programované (geneticky determinované) posloupnosti reakcí, zaměřených na odstranění následků poškození. Jindy se však buňka může dostat do traumatizujících situací, kdy nemá žádný předpis pro záchranný program. Je to v případě fragmentace chromosomů nebo ztráty jejich konců (telomér), a často následkem genetického stresu při nepříbuzném křížení (případ hybridní disgeneze). Genovou konverzi některých lokusů jako projev hybridní disgeneze můžeme pozorovat u *N. tabacum*, který vznikl před 4 miliony let hybridizací dvou odlišných druhů rodu *Tabacum*. Do kategorie stresových traumat s neprogramovanou genetickou kompenzací B. McClintocková řadí i kultivaci buněk v podmínkách "in vitro". Genetická variabilita vyvolaná stresovými vlivy prostředí souvisí s „hypermutacemi“ v důsledku indukce nepřesných (error-prone) opravných procesů a s

přestavbami genomu (makromutacemi) v důsledku amplifikace DNA a indukce nehomologních rekombinací.

☞ Dříve zmíněné *makromutace* projevující se vznikem nebo přeskupením bloků repetitivních sekvencí mají vztah k tzv. *strukturním a chromatinovým kódům* (Vogt 1990). Diferenciace buněk je výsledkem hierarchické posloupnosti regulačních procesů, kontrolujících expresi genů. Ty rozhodují o čase, místě a způsobu rozrůznění buněk při vývoji organismu. Jednodušším příkladem genových regulací jsou mechanismy založené na působení alosterických proteinů, objevené v minulých desetiletích u bakterií. V eukaryotických buňkách, mimo přenos molekulárních signálů, hrají významnou úlohu i *regulace podmíněné konformačními změnami chromatinu*, tedy zmíněné strukturní a chromatinové kódy. Různé typy repetitivních sekvencí DNA v součinnosti s bílkoviny ovlivňují lokální vlastnosti chromatinu a jeho topografii v buněčném jádře. Jako příklad lze uvést dva typy repetitivních sekvencí, jejichž základní jednotky, monomery HRS a GRS, byly izolovány v brněnském Biofyzikálním ústavu z *heterochromatinových domén* genomu tabáku. Charakteristickou vlastností heterochromatinu je právě vysoký obsah repetitivních sekvencí nebo mobilních genetických elementů a absence konvenčních genů. *Heterochromatin* se dále od ostatního chromatinu (*euchromatinu*, obsahujícího především DNA s geny kódujícími proteiny) liší vyšším stupněm kondenzace. Kondenzace je regulována přítomností různých proteinů a často i metylační modifikací DNA.

Počítačové modelování konformací DNA v závislosti na primární struktuře ukázalo, že sekvence HRS nebo GRS obsahují informaci pro zcela určité prostorové uspořádání (Fajkus, Vyskot et al. 1992, Kralovics, Fajkus et al. 1995). Jejich mnohonásobné opakování v genomu nutí delší úseky DNA ke stáčení do struktur, připomínajících cívky s různým způsobem vinutí. Odlišné konformace DNA však mohou rozhodovat o vazbě různých typů regulačních a strukturních proteinů.

Restrukturace genomu lze prokázat i v liniích dlouhodobě kultivovaných živočišných buněk. V těchto případech nejčastěji dochází ke spontánní transformaci diferencovaných buněk v buňky nádorové.

Ani genomy diferencovaných buněk v tělesných tkáních živočichů nejsou zcela totožné. Svědčí o tom již zmíněné experimenty Gurdon, Briggse a Kinga s transplantací jader z různých stadií vývoje žabího embrya do enukleovaných žabích vajíček (Gurdon, 1964).

Tyto experimenty, vlastně první pokusy o klonování živočichů, ukázaly, že pouze jádra z velmi ranných fází embryonálního vývoje si zachovávají potenciál k vývoji normálního jedince. Genomy jader z buněk pozdějších vývojových fází umožňovaly jen omezený vývoj s malformacemi. Tento

experimentální fakt lze nyní interpretovat jako důsledek spontánní genetické variability genomů v somatických buňkách.

☞ Ty úseky genomu, které v pozdějších stádiích ontogeneze již neslouží k zajištění vývojového programu, jsou patrně náchylnější k různým nekontrolovaným genetickým změnám v důsledku vnitřní selekce (selekce jejíž podmínkou je životaschopnost embrya). Fakt genetické variability somatických buněk je v souvislosti s otázkou klonování živočichů závažným omezujícím faktorem.

Údaje o regulační úloze různých typů heterochromatinu byly potvrzeny u drozofily a v případě hybridní disgeneze u *Triticale* (v hybridech s genomy pšenice a žita); v prvním případě vedla translokace genů do blízkosti heterochromatinu k jejich inaktivaci, hybridní disgeneze byla spojena s fragmentací a přemístováním heterochromatinových bloků, rovněž s inhibičními důsledky pro okolní geny.

*Heterochromatinová kondenzační centra* lze v jádře nebo na chromosomech zviditelnit technikami molekulární cytologie. Takto bylo experimentálně prokázáno, že z kondenzovaný chromatin zaujímá v interfázovém jádře určitou charakteristickou polohu a ovlivňuje i prostorové uspořádání přilehlého euchromatinu (v této souvislosti hovoříme o tkáňové a funkčně specifické topografii buněčného jádra).

Genomová dynamika může spolupůsobit při vzniku nových druhů (specií). Adaptivní význam mají ovšem jen ty genetické změny, které jsou lokalizovány v gametách. Bloky repetitivních sekvencí jsou potenciálním zdrojem genetické nestability a přirozeným akumulátorem spontánních mikro- i makromutací. Odlišnosti v uspořádání sekvencí DNA mohou způsobit (i při zachování původního informačního obsahu) poruchy meiotického párování chromosomů a ztrátu genetické kompatibility, nutné pro vzájemné křížení. Strukturní specifické odlišnosti genomů, doprovázející evoluční radiaci druhů, jsou známy např. u některých drobných sladkovodních a mořských korýšů rodu *Cyclops* (*Copepoda*). V evoluci rostlin se, díky jejich vysoké regenerační schopnosti, může navíc uplatnit i přímá indukce genetických změn faktory prostředí.

### **Doporučená literatura:**

Přehled mechanismů mutací, rekombinací (dynamika genomů) a transkripce, klasické učebnice: „*Základy buněčné biologie*“, Bruce Alberts a spol., český překlad Espero Publishing Ústí n. Labem; „*Genes*“ Benjamina Lewina, např. „*Genes V*“, Oxford Univ. Press, 1994, nebo vynikající poslední verze „*Genes IX*“ z r. 2008 (Jones and Bartlett Publishers), která obsahuje nejaktuálnější doplnění.

Poznatky o konformační dynamice genomů: J. Rennie, „DNA'S new twists“, Scientific American, March 1993, 88-96; M. Chicurel, „Can organisms speed their own evolution?“, Science 292,1824-1827, 2001.

Monografie S. Ohno, „*Evoluce Genovou Duplikací*“, Academia, Praha, 1975, která exponuje problém genomových přestaveb a relevance makromutací pro evoluci.

Nobelovská přednáška Barbary Mc Clintock o nestabilitě genomů z hlediska mobilních genetických elementů a působení stresových faktorů na opravné a rekombinační procesy (McClintock 1983)

O mobilních genetických elementech a vzniku genetické rozmanitosti viz učebnice: „*Základy buněčné biologie*“, Bruce Alberts a spol., český překlad Espero Publishing Ústí n. Labem, kapitola 9.

Podrobněji, viz Benjamin Lewin, „*Genes IX*“ (Jones and Bartlett Publishers, 2008), kapitoly 21 (Transposons), 22 Retroviruses and Retroposons).

### **Doplňková literatura:**

Baltimore, D. (1985). "Retroviruses and retrotransposons: The role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome." Cell **40**: 481-48.

Baurle, I. and T. Laux (2003). "Apical meristems: the plant's fountain of youth." BioEssays **25**(10): 961-970.

Caporale, L.H. (2000). "Mutation is modulated: implications for evolution." BioEssays **22**: 388-395.

Corces, V. G. and P. Geyer (1991). "Interaction of retrotransposons with the host genome: the case of the gypsy element of *Drosophila*." Trends in Genetics **7**: 86-90.

Cullis, C. A. (1977). "Molecular aspects of the environmental induction of heritable changes." Heredity **38**: 129-154.

Cullis, C. A. (1986). "Phenotypic consequences of environmentally induced changes in plant DNA." Trends in Genetics **2**: 307-309.

Cullis, C. A. (2005). "Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax." Annals of Botany **95**: 201-206.

Daniels, G. R. and P. L. Deininger (1985). "Repeat sequence families derived from mammalian tRNA genes." Nature **319**: 819-822.

Doring, H.-P. and P. Starlinger (1984). "Barbara McClintock's Controlling Elements: Now at the DNA Level." Cell **39**: 253-259.

Dover, G. A. (1986). "Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated." Trends in Genetics **2**: 159-165.

Evans, D. A. (1989). "Somaclonal variation - genetic basis and breeding applications." Trends in Genetics **5**: 46-50.



- Evans, D. A., W. R. Sharp, et al. (1984). "Somaclonal and gametoclonal variation." Amer. J. Bot. **71**: 759-774.
- Fajkus, J., B. Vyskot, et al. (1992). "Changes in chromatin structure due to hypomethylation induced with 5-azacytidine or DL-ethionine." FEBS Letters **314**: 13-16.
- Ganformina, M. D. and D. Sánchez (1999). "Generation of evolutionary novelty by functional shift." BioEssays **21**: 432-439.
- Grandbastien, M.-A. (1992). "Retroelements in higher plants." Trends in Genetics **8**: 103-108.
- Henikoff, S., Greene, et al. (1997). "Gene families the taxonomy of protein paralogs and chimeras." Science **278**: 609-614.
- Holliday, R. (1987). "The inheritance of epigenetic defects." Science **238**: 163-170.
- Hurles, M. (2004). "Gene duplication: the genomic trade in spare parts." PLoS Biology **2** (7 doi: 10.1371/journal.pbio.0020206): 0900-0904.
- Charlesworth, B., P. Sniegowski, et al. (1994). "The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes." Nature **371**: 215-220.
- Kazazian, H. H., Jr. and J. L. Goodier (2002). "LINE Drive: Retrotransposition and Genome Instability." Cell **110**: 277-280.
- Kourilsky, P. (1986). "Molecular mechanisms for gene conversion in higher cells." Trends in Genetics **2**: 60-63.
- Kralovics, R., J. Fajkus, et al. (1995). "DNA curvature of the tobacco GRS repetitive sequence family and its relation to nucleosome positioning." J. Biomolecular Structure and Dynamics **12**: 1103-1119.
- Larkin, P. J. and W. R. Snowcroft (1981). "Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement." Theor. Appl. Genet. **60**: 197-214.
- Leslie, J. F. and W. B. Watt (1986). "Some evolutionary consequences of the molecular recombination process." Trends in Genetics **2**: 288-291.
- Lover, R., J. Lower, et al. (1996). "The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences." Proc. Natl. Acad. Sci., USA **93**: 5177-518.
- Lytte, T. W. (1993). "Cheaters sometimes prosper: distortion of mendelian segregation by meiotic drive." Trends in Genetics **9**: 205-210.
- McClintock, B. (1983). "The significance of responses of the genome to challenge." Science **226**: 792-801.
- Miller, R. V. (1998). "Bacterial gene swapping in nature." Scientific American **January 1998**: 47-51.
- Multiautor (1992). "Programmed DNA Rearrangements." Trends in Genetics **8**: 403-463; (a special issue No.12).

- Nowak, M. A., M. C. Boerlijst, et al. (1997). "Evolution of genetic redundancy." Nature **388**(167-171).
- O'Brien, S. J., H. N. Seuánez, et al. (1988). "Mammalian genome organization: an evolutionary view." Ann. Rev. Genet. **22**: 323-351.
- Petrov, D. A. (2001). "Evolution of genome size: new approaches to an old problem." Trends in Genetics **17**: 23-28.
- Shapiro, J. A. (2002). "Repetitive DNA, genome system architecture and genome reorganization." Research in Microbiology **153**: 447-453.
- Shedlock, A. M. and N. Okada (2000). "SINE insertions: powerful tools for molecular systematics." BioEssays **22**: 148-160.
- Singer, M. F. (1982). "SINEs and LINEs: Highly Repeated Short and Long Interspersed Sequences in Mammalian Genomes." Cell **28**: 433-434.
- Smith, G. P. (1976). "Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover." Science **191**: 528-535.
- Smith, M. W., D.-F. Feng, et al. (1992). "Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfer." Trends in Biochemical Sciences **17**: 489-493.
- Soltis, D. E. and P. Soltis (1995). "The dynamic structure of polyploid genomes." Proc. Natl. Acad. Sci., USA **92**: 8089-8091.
- Soltis, D. E. and P. Soltis (1999). "Polyploidy: recurrent formation and genome evolution." Trends in Ecology and Evolution **14**: 348-352.
- Sverdlov, E. G. (2000). "Retroviruses and primate evolution." BioEssays **22**: 161-171.
- Thomas, J. H. (1993). "Thinking about genetic redundancy." Trends in Genetics **9**: 395-399.
- Ullu, E. and T. Tschudi (1984). "*Alu* sequences are processed 7SL RNA genes." Nature **312**: 171-172.
- Vogt, P. (1990). "Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on highly conserved "chromatin folding code"." Hum. Genet **84**: 301-336.
- Vyskot, B., J. Reich, et al. (1991). "Genome modifications in protoplast-derived tobacco plants: contents of repetitive sequences." Biol. Plantarum **33**: 448-454.
- Wagner, M. (1986). "A consideration of the origin of processed pseudogenes." Trends in Genetics **2**: 134-137.
- Walbot, V. and C. A. Cullis (1985). "Rapid genomic change in higher plants." Ann. Rev. Plant. Physiol. **36**: 367-396.