

ME 5 Evolucija genske regulatorne mreže u mikrobnim genomima

Mehanizmi evolucije

Dr. sc. Višnja Bačun-Družina, izv. prof.

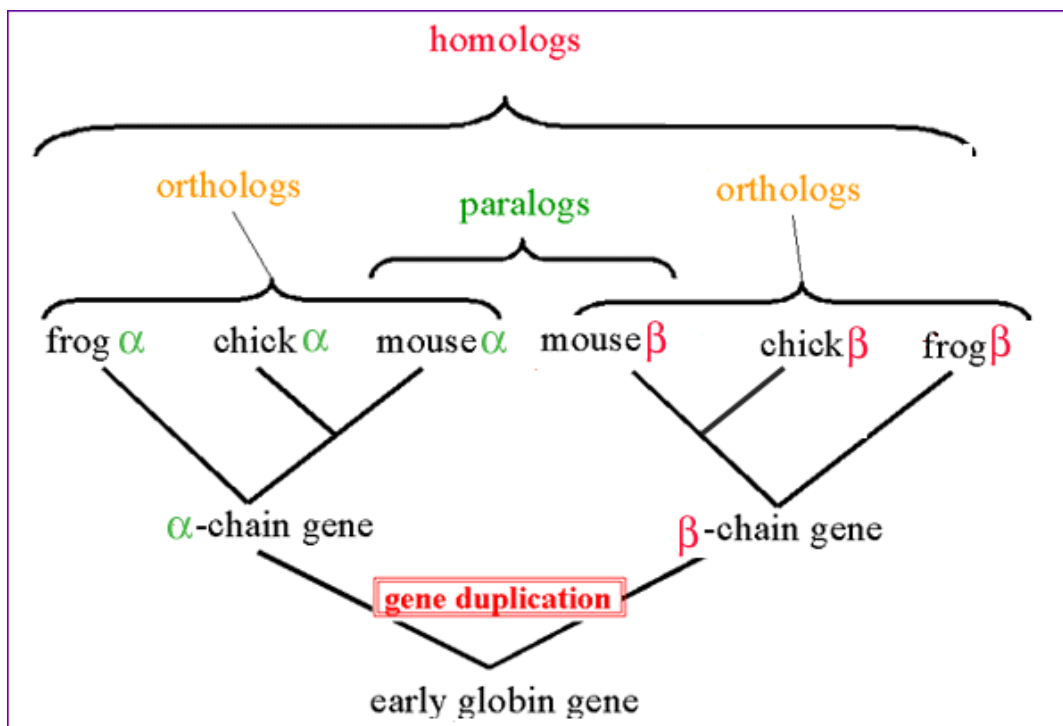
Porijeklo gena

Homologni geni - porijeklom od zajedničkog gena pretka:

ortolozi - gena razdvojenih specijacijom

paralozi - gena odvojenih duplikacijom

- Ortologni geni – homologni geni u različitim vrstama koji su se razvili specijacijom iz zajedničkog gena pretka. Tijekom evolucije zadržali su istu funkciju u različitim vrstama.
- Paralogni geni – evolucijski povezani geni nastali duplikacijom gena i razvili nove funkcije.



Slika 1. Shematski prikaz duplikacije gena za globulin

1. Struktura i evolucija *trans*-djelujućih elemenata

2. Struktura i evolucija *cis*-djelujućih elemenata

3. Struktura i evolucija *operona*

4. Struktura transkripcijske regulatorne mreže

1. Struktura i evolucija *trans*-djelujućih elemenata

Sigma faktori

- Inicijacija transkripcije u prokariota: srž RNA polimeraze ($\alpha 2\beta\beta$) + sigma faktor (σ)
 - specifično prepoznavanje promotora
 - varijabilan broj sigma faktora u bakterijskim genomima
 - dvije strukturalno nesrodne i filogenetski udaljene porodice: σ^{70} i σ^{54}
- prepoznavanje različitih promotorskih struktura

sigma faktor (σ)

- Primarni ili housekeeping sigma faktor u *E.coli* je σ^{70} i kodiran je *rpoD* genom
- 6 sigma faktora kodiranih genima *rpoN* (σ^{54}), *rpoS* (σ^{38}), *rpoH* (σ^{32}), *rpoF* (σ^{28}), *rpoE* (σ^{24}) i *fecI* (σ^{19}).

Struktura i evolucija *trans*-djelujućih elemenata

σ^{54}

- rijetko se pojavljuju
- zahtijevaju aktivator za formiranje otvorenog promotorskog kompleksa
- promotori su visoko konzervirane kratke sekvence locirane na pozicijama -24 i -12 uzvodno od mjesta početka transkripcije

σ^{70} :

- u svim bakterijskim genomima
 - promotorska mjesta tipično smještena na -35 i -10 uzvodno
 - četiri glavne regije s najvećim stupnjem konzerviranosti u regijama 2 i 4
 - podregije regije 2 uključene u otvaranje promotora (*engl. promoter melting*) (regija 2.3) i prepoznavanja
- 10 sekvence (regija 2.4),
- dobro konzervirana subregija 4.2 regije 4 uključena u prepoznavanje -35 sekvence
- ECF (*extra cytoplasmic function*) faktor

Struktura i evolucija *trans*-djelujućih elemenata

Transkripcijski faktori

- aktivatori, represori ili dvostruki regulatori
- vezanje se na *cis*-regulatorne elemente DNA
- sedam globalnih regulatora koji kontroliraju više od 50% gena u cijeloj transkripcijskoj regulatornoj mreži
- represori dominantni transkripcijski faktori u *E. coli* i *Bacillus subtilis* → veća vjerojatnost koevolucije s ciljnim genima u srodnim genomima
- oko 75% transkripcijskih faktora u *E. coli* rezultat je duplikacije i evoluiraju brže nego njihovi ciljni geni unutar genoma

2. Struktura i evolucija *cis*-djelujućih elemenata

Promotorske regije

- promotor: dio DNA kojeg prepoznaje RNA polimeraza i povezuje se svojom sigma podjedinicom, nalazi se 6-8 bp od mjesta početka transkripcije
 - σ^{70} DNA promotor: dva heksamera smještena oko pozicija -35 i -10 od početka mjesta transkripcije i odvojena s 15-21 pb, s konsenzus sekvencama TTGACA i TATAAT
 - jačina promotora u vezi sa sličnosti konsenzus sekvenci
 - tipična *E. coli* σ^{70} sekvenca sadrži dvije razlike (*mismatch*) unutar i -35 i -10 heksanukleotidnih elemenata
 - pronađene varijacije s više od tri razlike od konsenzus sekvencije
- određivanje funkcionalne promotorske sekvence otežano

Mjesta za vezanje transkripcijskih faktora

- dva računalna tipa analize mjesta za vezanje transkripcijski faktora u promotorskim regijama:
 - analiza koreguliranih seta gena
 - analiza filogenetskih otisaka uzvodnih regija ortolognih gena u srodnim genomima

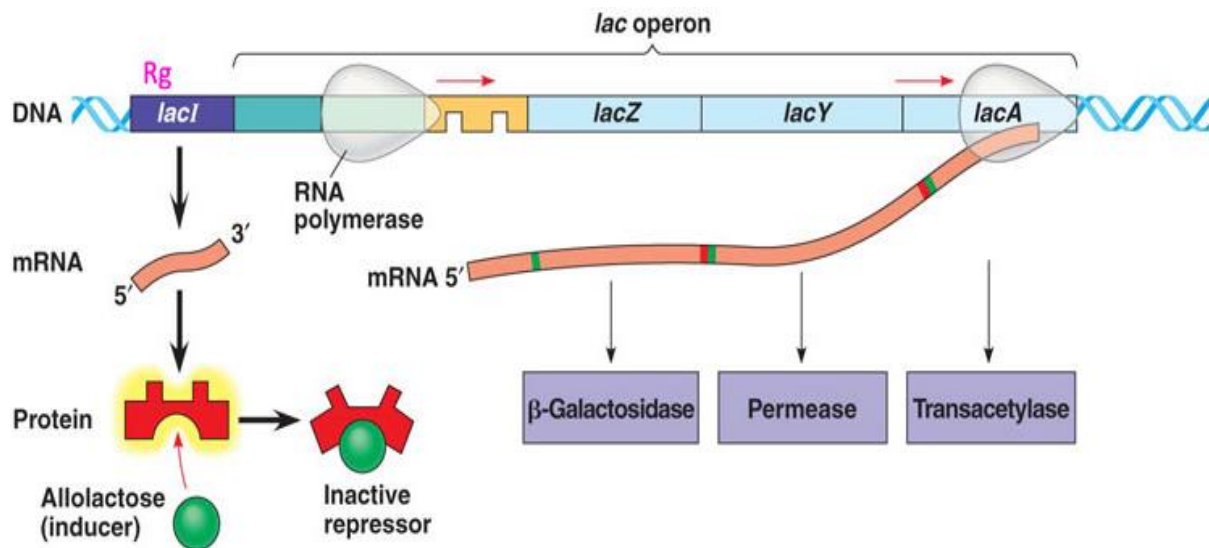
Terminacija transkripcije

- → otpuštanje mRNA transkripta i disocijaciju RNA polimeraze s lanca DNA

- unutarnja ili Rho-neovisna terminacija
 - struktura ukosnice iza koje slijedi niz timinskih ostataka.
- Rho-ovisna terminacija
 - jedini konzervirani element: mnoštvo citozinskih ostataka
- pola terminatora u *E. coli* Rho-ovisni terminatori
- više od 90% terminacijskih signala u *B. subtilis* Rho-neovisno
- razvijen algoritam za brzo određivanje Rho-neovisnih terminatora: dominantni u rodova *Neisseria* i *Vibrio*.

3. Struktura i evolucija bakterijskih operona

- jedinica regulacije ekspresije gena u prokariota, sadrži strukturne gene i kontrolne elemente koje prepoznaju produkti regulatornih gena



(b) Lactose present, repressor inactive, operon on

Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Slika 2. operom Lac bakterije *E. coli*

Zašto su bakterijski operoni učestali?

- tri teorije:
 1. geni su smješteni unutar istog operona kako bi imali slični ekspresijski model
 2. operoni su sebični (olakšani HTG)

3. smještanje gena koji kodiraju za proteinske komplekse od više podjedinica u isti operon je povoljno

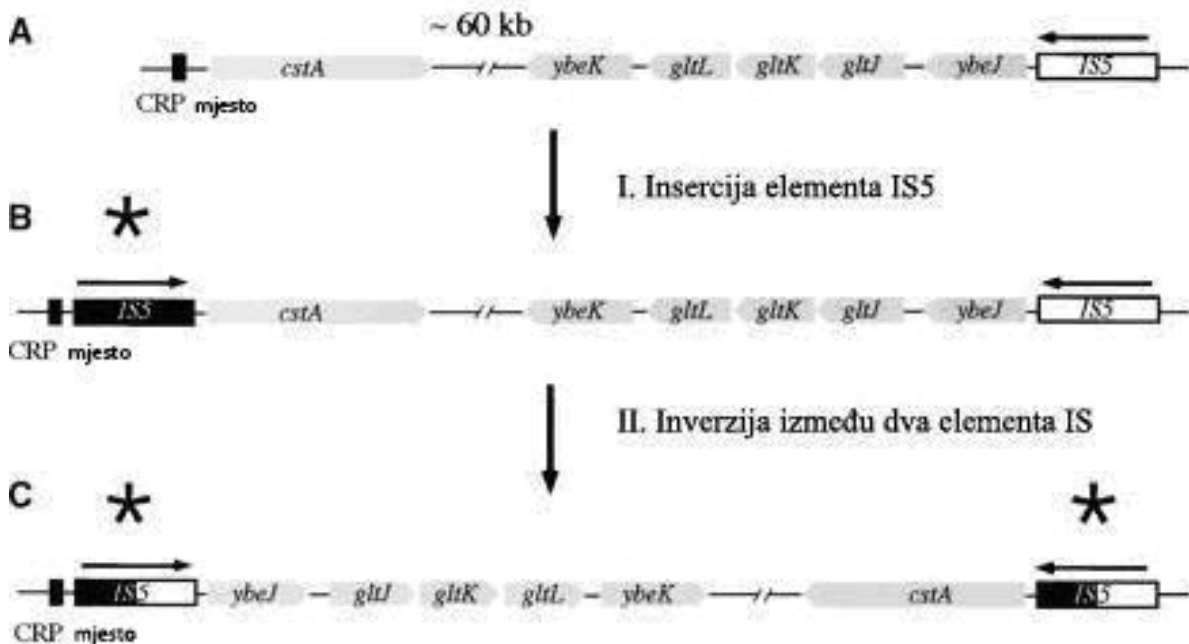
- istraživanja genoma podupiru teoriju da operoni postoje zbog koregulaciju

Kako nastaje bakterijski operona?

- uspoređen je slijed gena *E. coli* K12 i njenih bliskih srodnika kako bi se identificirali nedavno nastali i razoreni operoni u *E. coli* K12.
- na temelju dobivenih rezultata predložen model evolucije operona
- s obzirom na način nastajanja, razlikuju se dva tipa operona:
 - novi operoni
 - operoni nastali modifikacijom već postojećih operona

Nastajanje GASP mutanata

- modifikacijom već postojećih operona



Mutacija *sgaA* u mutanata GASP

Slika 3. shematski prikaz nastajanja mutanta GASP

Struktura i evolucija bakterijskih operona

Nastajanje novih operona

- Nativni (urođen), HGT i orphan (ORFan) geni
- parovi operona: nativni-nativni, orphan - nativni i orphan – orphan
- novi operoni su bogati orphan genima i nađena kombinacija orphan gena s nativnim genima u *E. coli* i *B. subtilis*
- operoni koji sadrže orphan nastaju insercijom orphan gena blizu nativnog gena
- Insercija se događa najčešće nizvodno od nativnog gena
- pronađeni orphan – orphan parovi pri čemu je operon unešen u genom jednim događajem, moguće i horizontalnim transferom gena.
- operoni koji sadrže samo native gene nastaju ili delecijama DNA između gena ili prerasporedima što rezultira približavanjem međusobno udaljenijih gena

Orphan geni

- Orphan geni (ORF/Open reading frames) , siročad, bez podrijetla, nemaju prepoznatljive homologe izvan srodnih bakterija.
- Koji puta kodiraju za proteine koji pridonose fitnessu bakterije i moguće je da su stečeni od bakteriofaga.
- imaju važnu ulogu u embrionalnom razvoju i u interakcijama organizama s okolišem.
- mogu nastati bilo kada tijekom evolucije, što uključuje i sadašnje organizme na Zemlji.
- de novo nastanak gena iz nekodirajućih dijelova genoma važan evolucijski mehanizam.

Modifikacije postojećih operona

- mogu nastati kao posljedice četiri različita događaja:
 - insercije
 - spajanje gena
 - dodavanje gena ispred operona
 - dodavanje gena iza operona
- najčešće dodavanje gena na početak ili kraj već postojećeg operona

- uobičajeno dodavanje novog gena na kraj operona

Udaljenosti gena unutar operona

- dva gena unutar operona mogu biti blizu, udaljeni, ili može

doći do preklapanja: pravilno (preklapanje 1 ili 4 nukleotida) ili veća preklapanja

- geni unutar istog operona obično udaljeni 20 baza
- geni u visoko eksprimiranim operonima razdvojeni velikim razmakom
- razmaci između gena često su posljedica delecija ili insercija na kraju proteinskih sekvenci
- pravilna preklapanja se formiraju delecijom u već postojećem operonu, a manje vjerojatno u novih operona
- preklapanja mogu uslijediti zbog razaranja stop kodona te nastati veća preklapanja no to se pojavljuju znatno rjeđe od pravilnih.

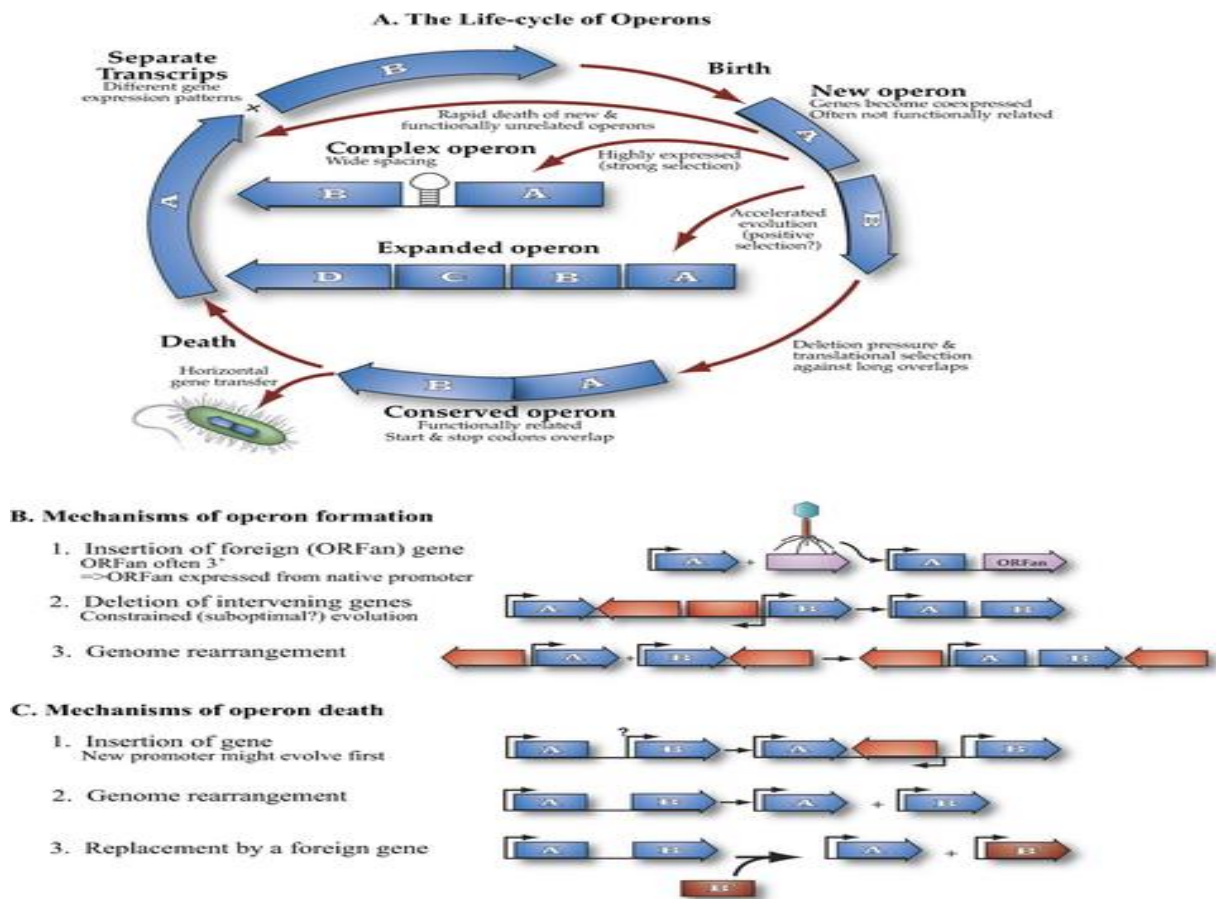
Umiranje operona

- uslijed delecije jednog ili više gena ili razdvajanjem strukture operona.
- do razaranja operona dolazi uslijed insercija, pri čemu može nastati novi par operona, ili preraspodjelama genoma.
- novi operoni češće umiru od starih
- visok stupanj preživljenja pronađen je u operona koji sudjeluju u opskrbi organizma energijom, a nizak u operona koji kodiraju za koenzime metabolizma i prijenos aminokiselina u metaboličkim putevima

Evolucija bakterijskih operona

- moguće posljedice adaptivnih promjena u ekspresiji gena
- ne mora biti i optimalna (sadrži nesrodne gene koji su se našli u blizini formiranja operona)

Životni ciklus bakterijskih operona



Slika 4. shematski prikaz životnog ciklusa bakterijskog operona

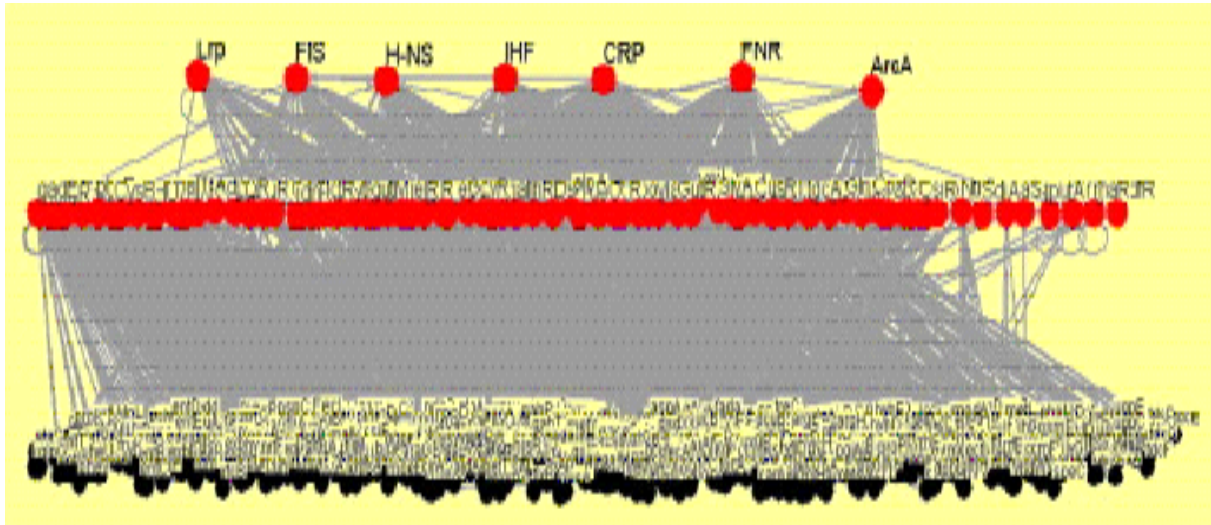
4. Struktura transkripcijske regulatorne mreže

- *trans*-djelujući elementi (transkripcijski i sigma faktori) formiraju jedan set čvorova, a njihovi ciljni geni, čiju aktivnost kontroliraju, formiraju drugi

povezanost između njih, usmjerena od *trans*-djelujućih elemenata prema ciljnim genima, a pod kontrolom *cis*-regulatornih elemenata, formira kompleksnu i usmjerenu mrežu interakcija

- moduli su međusobno povezane nakupine koje dijele mrežu transkripcijskih interakcija na podmreže; sastoje se od mrežnih motiva

Struktura transkripcijske regulatorne mreže u *E. coli*



Slika 5. shematski prikaz mrežne regulacije gena u *E. coli*. **Lrp** = leucine-responsive regulatory protein; **CRP** = cAMP-receptor protein **FIS** = nucleoid-associated protein in *E. coli*, participates in the normal control of chromosomal replication **H-NS** = nucleoid-associated protein involved in gene regulation, DNA compaction **IHF** integration host factor architectural protein bends DNA and activates transcription at several promoters **FNR** protein (regulator of fumarate and nitrate reduction) is the global transcription factor that manages the distribution of RNA polymerase **AraC** protein represses and induces the *araBAD* operon in response to the absence or presence of L-arabinose.

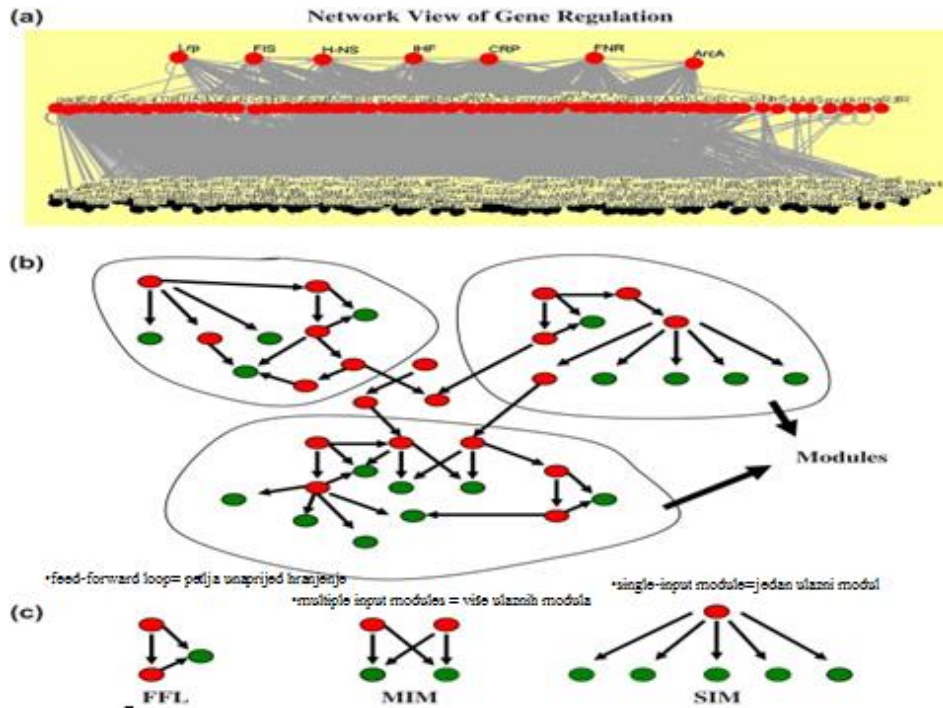
Struktura transkripcijske regulatorne mreže

- mrežni motivi predstavljaju veze koje su najzastupljenije u transkripcijskoj mreži
- najčešće pojavljuju tri mrežna motiva:

FFL (feed-forward loop= petlja unaprijed hranjenje): jedan transkripcijski faktor regulira transkripciju drugog transkripcijskog faktora, koji regulira gen reguliran i prvim transkripcijskim faktorom;

SIM (single-input module=jedan ulazni modul): jedan transkripcijski faktor regulira nekoliko gena (jednostavni regulon);

MIM (multiple input modules = više ulaznih modula): gdje nekoliko transkripcijskih faktora regulira preklapajuće setove gena (kompleksni regulon).



Slika 6. shematski prikaz mrežne regulacije gena u *E. coli*.

Struktura transkripcijske regulatorne mreže

- informacija o distribuciji povezanosti gena
- smatra se da je duplikacija transkripcijskih faktora i ciljnih gena dostigla značajne razmjere u regulatornim mrežama u *E. coli* i *S. cerevisiae*
- transkripcijski faktori su slabo konzervirani u genomu u usporedbi s ciljnim genima → skloniji bržoj evoluciji nego njihovi ciljni geni
- u globalnih regulatora nema veće konzerviranosti nego kod transkripcijskih faktora → brza evolucija regulatornih mehanizama gena je prisutna u bakterija.

Zaključci

- Dostupnost sekvenciranih genoma mikroorganizama omogućila je razumijevanje strukture, funkcije i evolucije regulatornih sustava u modelnih organizama.
- razumijevanje transkripcijskih regulatornih mehanizama daleko od potpunog,
- napredak u tehnologiji sekvencioniranja, eksperimentalnim tehnikama i u računalnoj znanosti pruža sve više informacija te će u skoroj budućnosti pružiti odgovore na fundamentalno pitanje kako nastaju funkcionalni geni.