

Молекулярная Зоология, весна 2014

лекция 1

**Введение в курс. Происхождение генного разнообразия:
дубликации, мобильные элементы, альтернативный
сплайсинг.**

Курс Молекулярная Зоология, или, что то же, «Системная зоология» (“System zoology”)

Мюге Николай Сергеевич

Институт Биологии Развития (ИБР РАН)

Институт Рыбного Хозяйства и Океанографии (ВНИРО)

- ▶ mugue@mail.ru
- ▶ 8(916)6877783
- ▶ <http://mugue.narod.ru/>



Структура курса

- ▶ Лекция 1. Введение в курс. Происхождение генного разнообразия: дупликации, мобильные элементы, альтернативный сплайсинг.
- ▶ Лекция 2. Видообразование. Генеалогия генов и видообразование. Гены видообразования. Генетические механизмы участвующие в формировании новых видов. Механизмы и генетические основы ассортативного скрещивания. Примеры молекулярных механизмов распознавания «свой-чужой» и ассортативного скрещивания у беспозвоночных.
- ▶ Лекция 3 Популяционная генетика. Законы Менделя и Условия выполнения законов Менделя. Генетический дрейф (дрейф генов, генетико-автоматические процессы). Эффект «бутылочного горлышка», («эффект основателя»). Эффект Валунда. Методы исследования ДНК
- ▶ Лекция 4. Исследование эндемичных комплексов видов и видов в процессе становления.

часть 2, Evo-Devo

- ▶ Лекция 5 От генотипа к фенотипу: регуляция на генном уровне. Типы Транскрипционных факторов. Регуляция экспрессии.
 - ▶ Лекция 6. Раннее развитие беспозвоночных. Формирование продольной оси и сегментогенез. Формирование дорзо-вентральной оси. Экспрессия *Gap-genes*, *paired-rule genes* и формирование границ сегментов. Основные гены сегментации мухи.
 - ▶ Лекция 7. Гомеобоксные гены и морфогенез сегментов. Гомеозисные гены семейства *HOX* и *ParaHOX*. Предковый набор *Hox* генов членистоногих. Дупликация гомеобоксного кластера у позвоночных и последующая редукция и субфункционализация генов паралогичных кластеров.
-



часть 3, молекулярные революции

- ▶ Лекция 8. Систематика беспозвоночных – современные «молекулярные революции». Xenoturbellida и прочие «плоские загадки».
- ▶ Лекция 9. Зоология в «пост-геномную» эру. Анализ экспрессии генов на микрочипах, Новые технологии в секвенировании - платформа 454, Solid и Illumina. Протеомика.
- ▶ Занятие 10. Разбор современных статей по молекулярной генетике, Зачет.



Три ключевых вопроса биологии

- ▶ Блок проблем 1. Как из одной клетки образуется сложный организм? (эмбриология)
- ▶ Блок проблем 2. Как из одного вида образуется много других видов? (эволюция)
- ▶ Блок проблем 3. Как связано сознание (мышление, память, творчество) и структура мозга?
- ▶ Список крайне субъективен. Кто хочет его дополнить?
- ▶ На первые 2 вопроса будем пытаться отвечать.



Уровни организации

▶ Гены (ДНК, Геном)



▶ Информационная РНК (Экспрессом)



▶ Белки (Протеомика)



▶ Белок-белковые и белок-ДНК взаимодействия



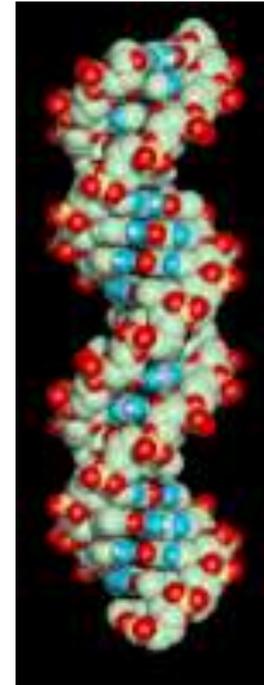
▶ Фенотип (морфология, физиология, гомеостаз, адаптации)



ДНК – самая сложная структура в живых организмах!

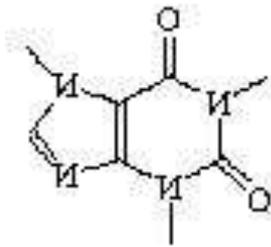


VS.

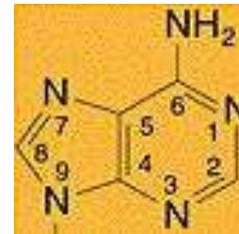


С другой стороны, ДНК по составу мало отличается от бутылки Кока-Колы!

Coke	DNA	Solubility
water	water	-
Sugar (sucrose)	Sugar (dexoyribose)	VERY High
Phosphate (PO ₄ ⁻ acid)	phosphate	moderate
caffeine	bases (A,T,C,G)	extremely low



caffeine



Adenine





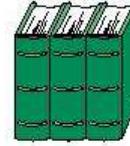
Phage λ
50 kb
2 pages



Escherichia coli
(bacteria)
4.7 Mb
200 pages



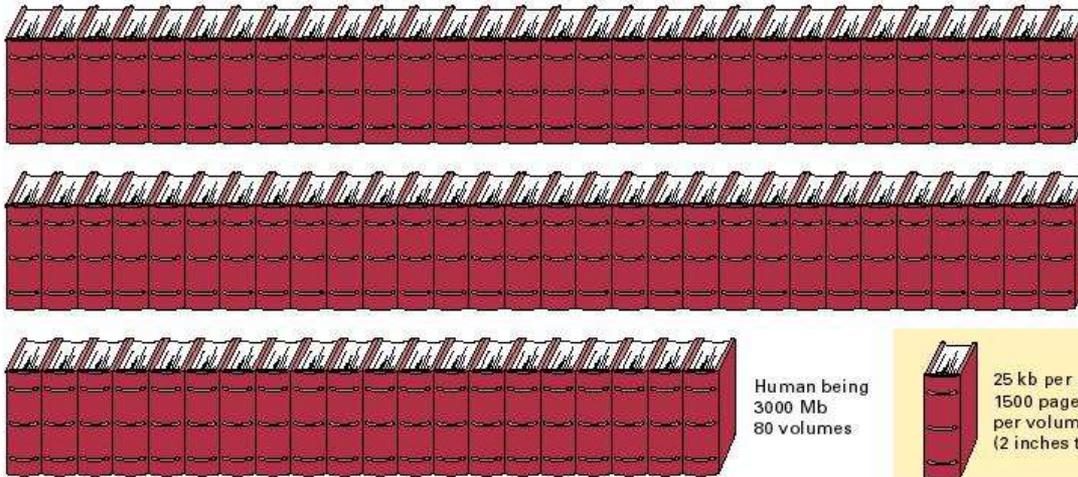
Saccharomyces cerevisiae
(yeast)
12.5 Mb
500 pages



Caenorhabditis elegans
(nematode)
Arabidopsis thaliana
(plant)
100 Mb
3 volumes



Drosophila melanogaster
(fruit fly)
165 Mb
5 volumes



Human being
3000 Mb
80 volumes

25 kb per page
1500 pages
per volume
(2 inches thick)

У мужчин на два тома меньше...

Но многие организмы имеют геном еще

больше!

Мутации как основа ЭВОЛЮЦИИ

- ▶ Спонтанные мутации возникают самопроизвольно на протяжении всей жизни организма в нормальных для него условиях окружающей среды с частотой около 10^{-9} - 10^{-12} на нуклеотид за клеточную генерацию.
- ▶ различают следующие виды мутаций:
- ▶ **геномные;**
 - ▶ Полиплоидизация, анеуплоидия
- ▶ **Хромосомные** (крупные перестройки структуры отдельных хромосом)
 - ▶ потеря (**делеция**) или удвоение части (**дупликация**) генетического материала одной или нескольких хромосом, изменение ориентации сегментов хромосом в отдельных хромосомах (**инверсия**), а также перенос части генетического материала с одной хромосомы на другую (**транслокация**)



Виды мутаций

- ▶ **геномные;**

- ▶ Полиплоидизация, анеуплоидия

- ▶ **Хромосомные** (крупные перестройки структуры отдельных хромосом)

- ▶ потеря (**делеция**) или удвоение части (**дупликация**) генетического материала одной или нескольких хромосом, изменение ориентации сегментов хромосом в отдельных хромосомах (**инверсия**), а также перенос части генетического материала с одной хромосомы на другую (**транслокация**, крайний случай -объединение двух хромосом - **Робертсоновская транслокация**)



Виды мутаций

▶ **генные.**

- ▶ В результате генных мутаций происходят замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дупликации и инверсии различных частей гена.
- ▶ Транзиция — это мутация замены оснований, когда одно пуриновое основание замещается на другое пуриновое основание (аденин на гуанин или наоборот), либо пиримидиновое основание на другое пиримидиновое основание (тимин на цитозин или наоборот).
- ▶ Трансверсия — это мутация замены оснований, когда одно пуриновое основание замещается на пиримидиновое основание или наоборот). Транзиции происходят чаще, чем трансверсии.
- ▶ Делеции (инсерции) — это мутация сдвига рамки чтения, когда в молекуле ДНК выпадает (встраивается) один или несколько нуклеотидов.



Типы мутаций

- ▶ Синонимичная
- ▶ Миссенс (несинонимичная)
- ▶ Нонсенс (STOP gained) и обратная (STOP lost)

- ▶ Большинство «плохих» для клетки мутаций вызывают апоптоз. Нарушение апоптоза (поломка P53 и др) – путь к раку.
- ▶ Равномерность возникновения некодирующих мутаций – основа концепции «молекулярных часов», позволяющих оценить время формирования таксонов.
- ▶ Соматические и половые мутации



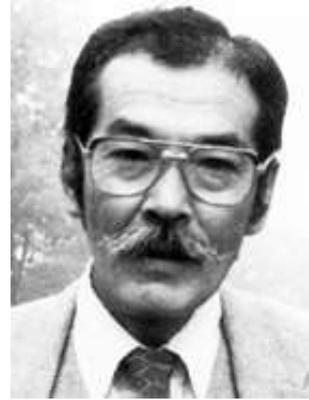


- ▶ Может ли обезьяна, бьющая по клавишам компьютера, напечатать сонет Шекспира?

А может ли функциональный ген возникнуть из случайного набора нуклеотидов?



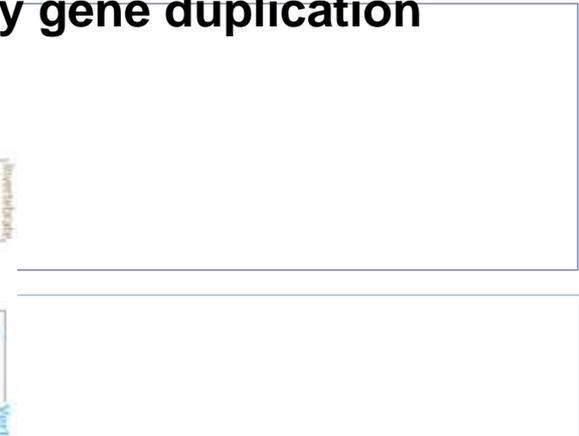
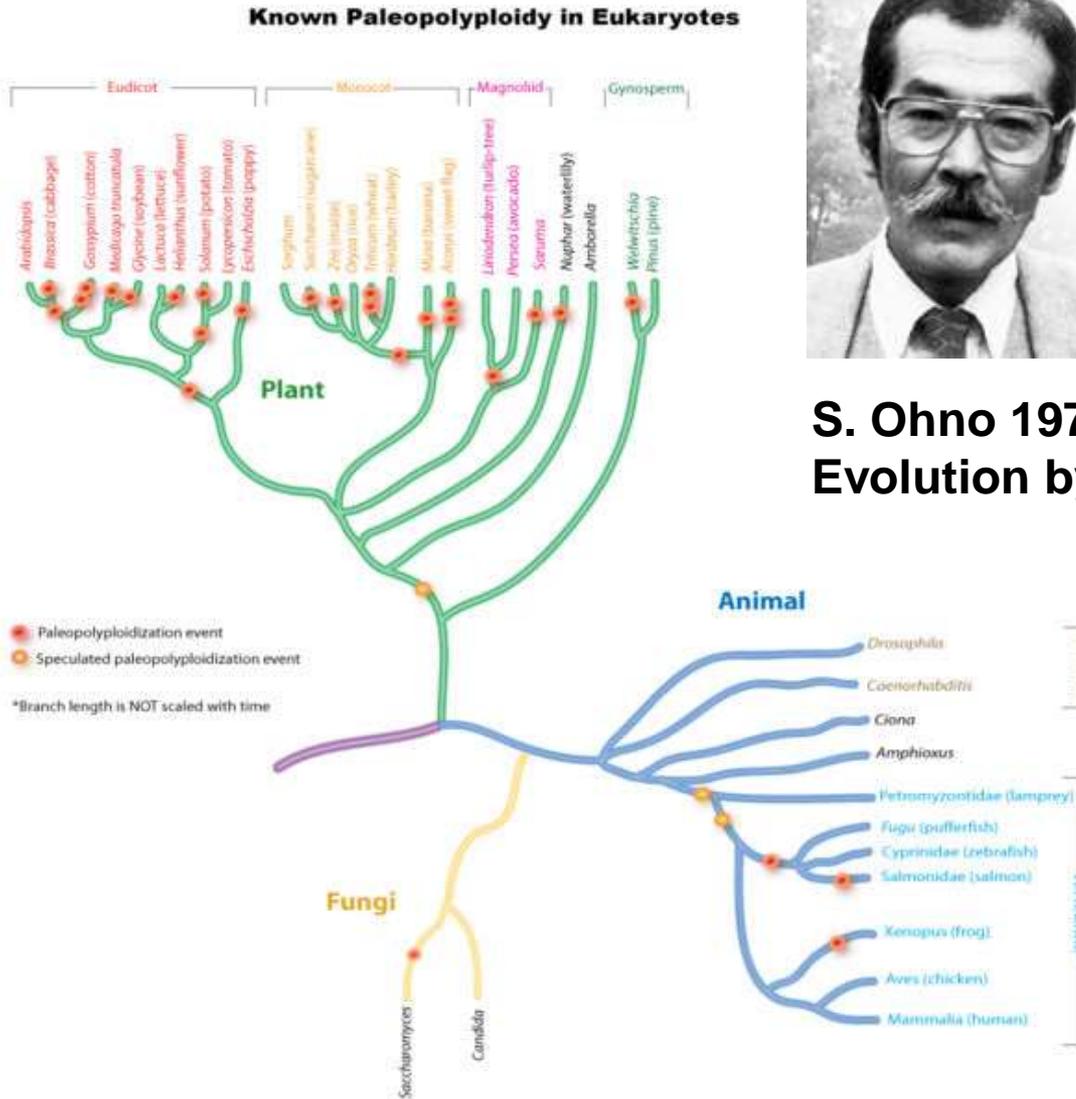
Роль дупликации генов и геномов. Полиплоидия у многоклеточных



Susumu Ohno

Susumu Ohno
Feb. 1, 1928 - Jan 13, 2000

S. Ohno 1970
Evolution by gene duplication



ТЕРМИНОЛОГИЯ

- ▶ Аутополиплоид – удвоение генома одного вида
 - ▶ Аллотетраплоид (Амфитетраплоид) –слияние геномов двух близких видов
 - ▶ Гомологичные последовательности называют *ортологичными*, если к их разделению привел акт видообразования: если ген существует у некоего вида, который дивергирует с образованием двух видов, то копии этого гена у дочерних видов называются ***ортологами***.
 - ▶ Гомологичные последовательности называют *паралогичными*, если к их разделению привело удвоение гена: если в пределах одного организма в результате хромосомной мутации произошло удвоение гена, то его копии называют ***паралогами***.
-



Странные свойства ЛДГ у вьюна из холодильника.

Держали вьюна (*Misgurnus fossilis*) в холодильнике и при комнатной температуре по 2-3 недели

Выделяли ЛДГ-А из мышц

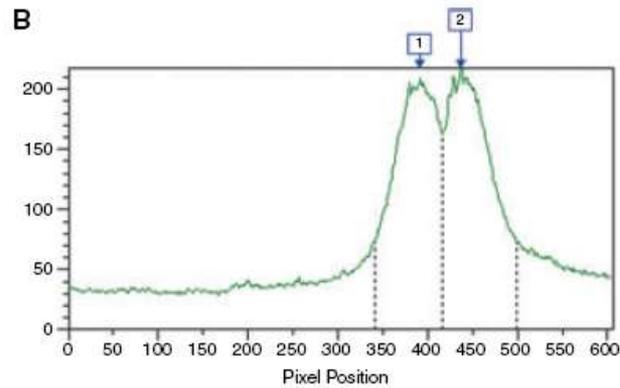
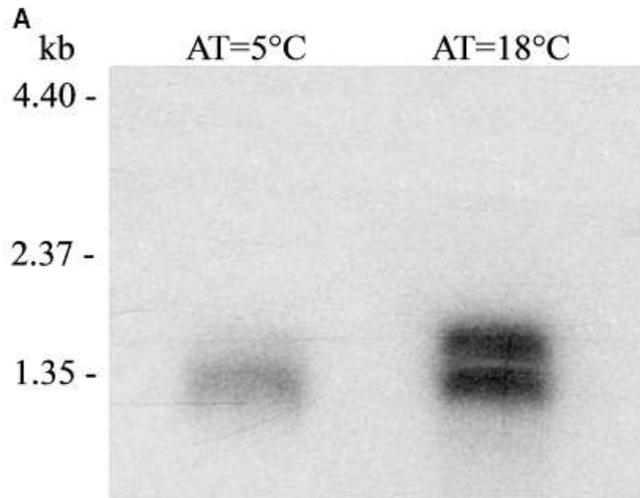
Различия между «теплой» и «холодной» ЛДГ:

Различная активность,

Термостабильность,

денатурация мочевиной и т.д.





Northern hybridization – две формы mRNA



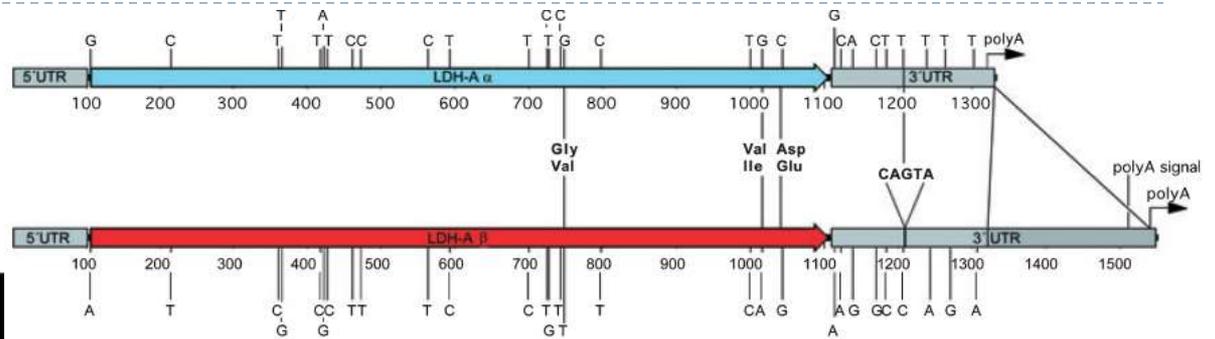


Fig. 2. Structure of the short ($mRNA_{LDH-A}^{\alpha} = 1332$ bp) and long ($mRNA_{LDH-A}^{\beta} = 1550$ bp) forms of LDH-A mRNAs from skeletal muscle of weatherfish *Misgurnus fossilis*. Nucleotide mismatches are indicated outwards, whereas amino acid mismatches are indicated inwards.

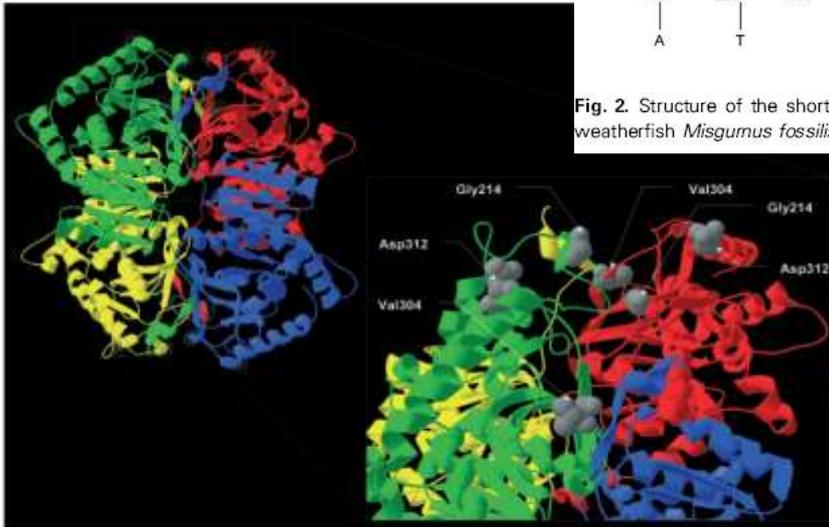
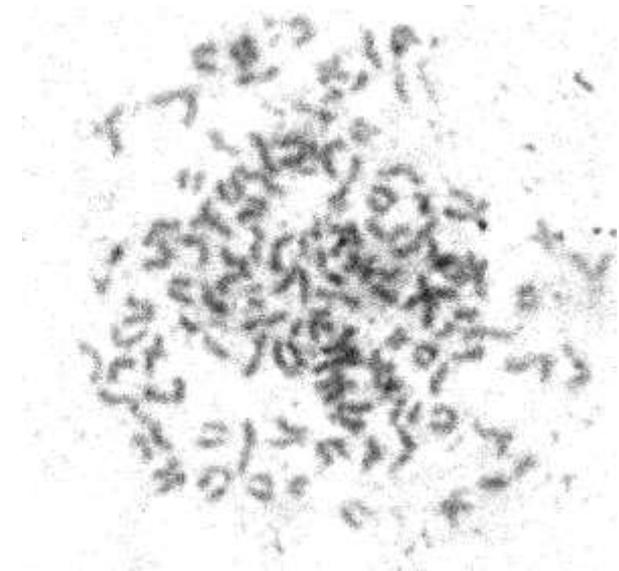
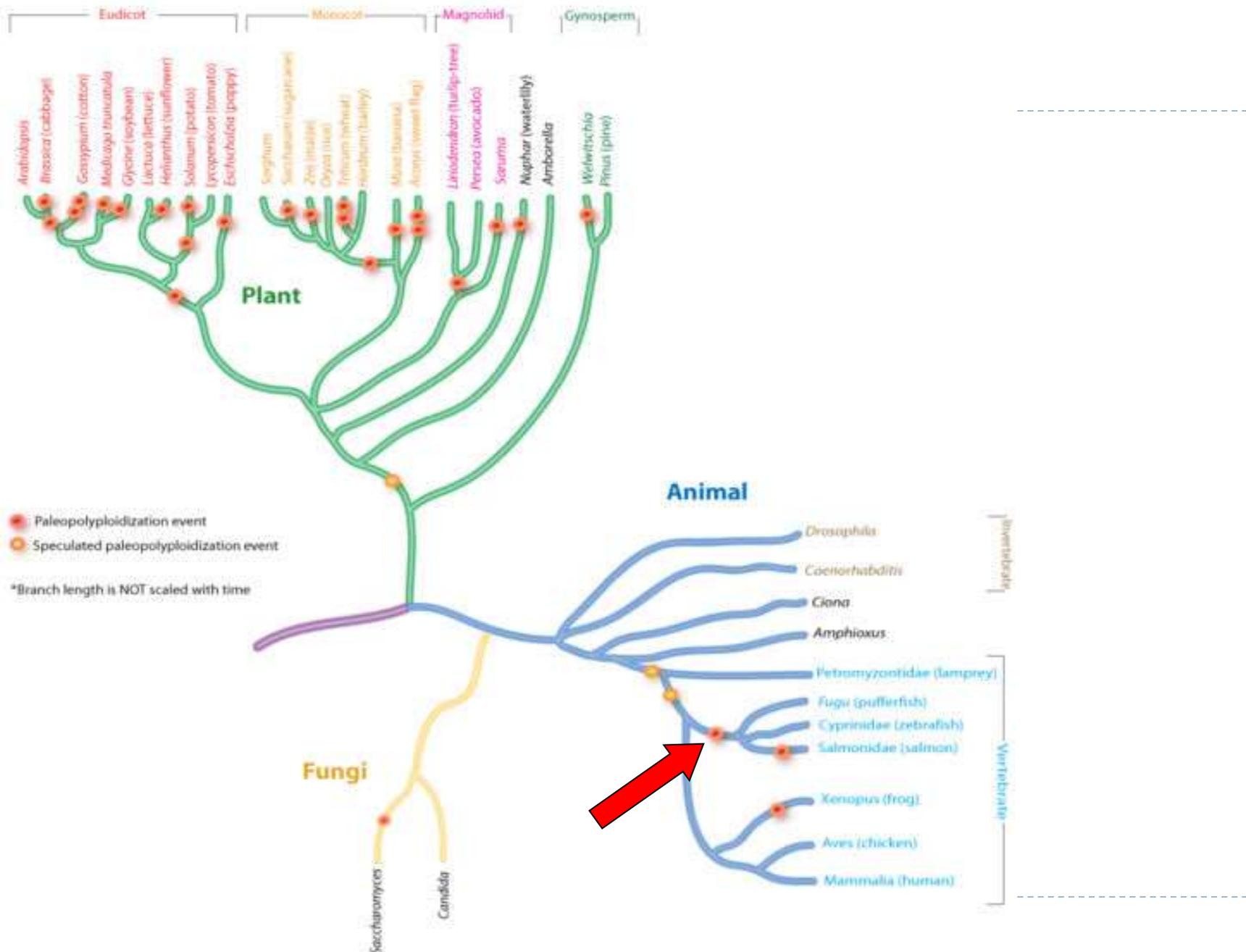


Fig. 3. Predicted quaternary structure of skeletal muscle LDH-A α -homotetramer (LDH-A $^{\alpha}$) from weatherfish *Misgurnus fossilis* and close up view on the contact area between two neighbouring subunits. Each subunit is coloured and the corresponding mismatched amino acids are indicated.



Known Paleopolyploidy in Eukaryotes



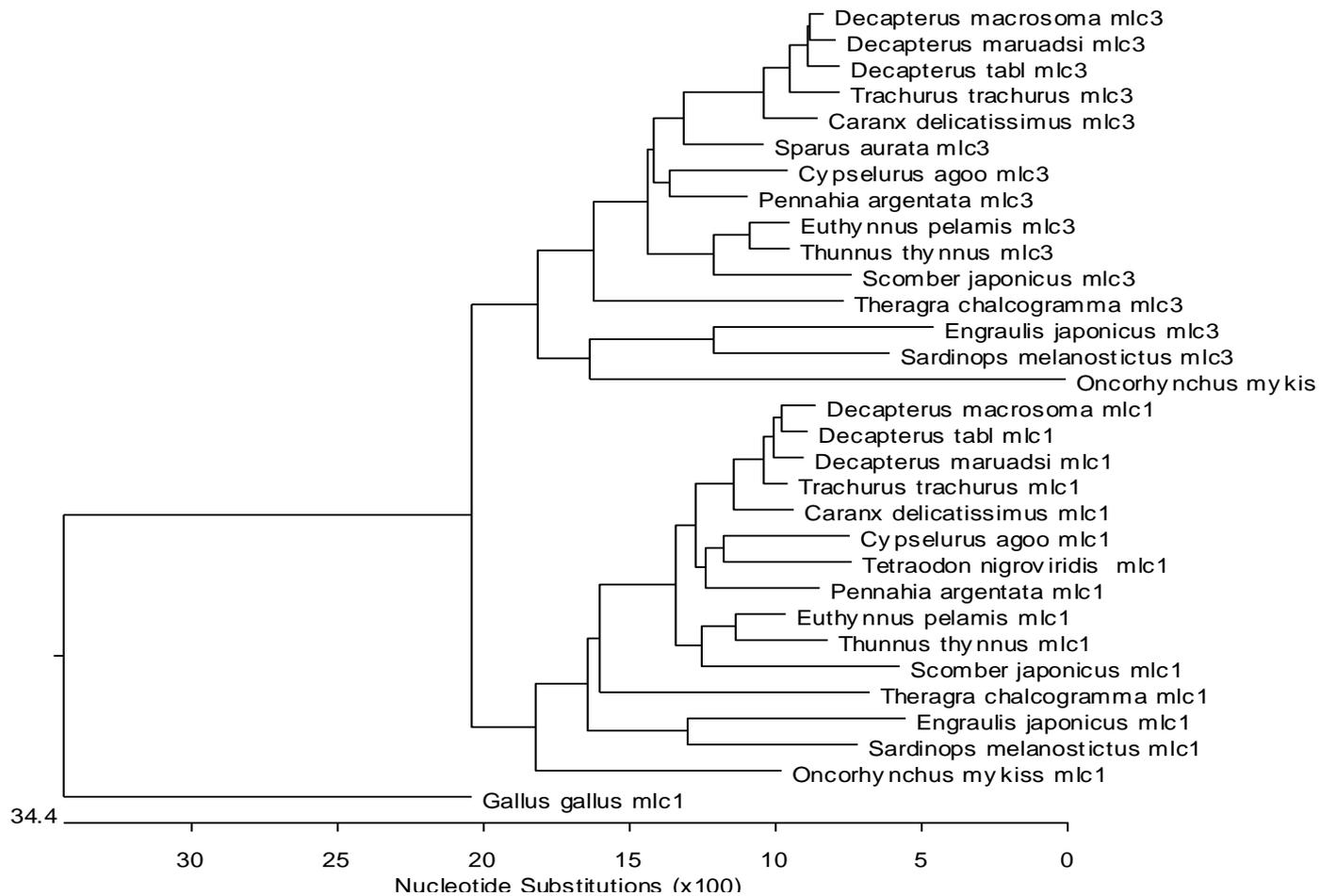
Genome Duplication, a Trait Shared by 22,000 Species of Ray-Finned Fish

John S. Taylor,^{1,2} Ingo Braasch,¹ Tancred Frickey,¹ Axel Meyer,^{1,4} and Yves Van de Peer³

¹Department of Biology, University of Konstanz, D-78457, Konstanz, Germany; ²Biology Department, University of Victoria, Victoria, BC, V8W 3N5 Canada; ³Department of Plant Systems Biology, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB), Ghent University, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgium

Table 1. Duplicated Fish Genes and Human Orthologs

Human Query Sequences	Each Column Lists Members of a Clade That is Orthologous to the Human Query Sequence			NJ	QP	AS
<i>ATP1B1</i> (4502277)	<i>Danio</i> 9789577	<i>Danio</i> 11096273, <i>Anguilla</i> 1703468, <i>Anguilla</i> 7406523, <i>Takifugu</i> JGI22524		+	–	+
<i>ATP1B2</i> (4502279)	<i>Danio</i> 9789579	<i>Danio</i> 14150727, <i>Takifugu</i> JGI789		+	+	+
<i>ATP1B3</i> (4502278)	<i>Danio</i> 974774, <i>Anguilla</i> 7406521	<i>Danio</i> 9837579, <i>Takifugu</i> JGI9802		+	+	+
<i>BMP2</i> (4557369)	<i>Danio</i> 2149148	<i>Danio</i> 2804175, <i>Takifugu</i> JGI7838		+	+	+
<i>CYP19</i> (13904858)	<i>Danio</i> 12655890, <i>Carassius</i> 3913347, <i>Oreochromis</i> 4838530, <i>Oreochromis</i> 4838536, <i>Takifugu</i> JGI6225, <i>Pimephales</i> 14041612	<i>Danio</i> 12655892, <i>Carassius</i> 2662332, <i>Oreochromis</i> 3913346, <i>Oreochromis</i> 4838538, <i>Takifugu</i> JGI22275, <i>Ictalurus</i> 3913357, <i>Oncorhynchus</i> 228574, <i>Oryzias</i> 3913355, <i>Dicentrarchus</i> 14589321, <i>Hippoglossus</i> 13620178, <i>Paralichthys</i> 4239990		+	+	+
<i>DLL</i> (10518497)	<i>Danio</i> 2809389, <i>Takifugu</i> JGI3940	<i>Danio</i> 1888392, <i>Takifugu</i> JGI18204		+	+	–
<i>DLX2</i> (4758168)	<i>Danio</i> 2842748	<i>Danio</i> 108243, <i>Takifugu</i> JGI119697		+	+	+
<i>DLX4</i> (4503343)	<i>Danio</i> 2842751	<i>Danio</i> 2842750		+	+	+
<i>EFNA5</i> (4503487)	<i>Danio</i> 2494365, <i>Takifugu</i> JGI4301	<i>Danio</i> 2462953, <i>Takifugu</i> JGI34618		–	–	–
<i>EN1</i> (7710119)	<i>Danio</i> 4322044, <i>Takifugu</i> JGI28510	<i>Danio</i> 417127, <i>Takifugu</i> JGI32850		–	–	–
<i>EN2</i> (11422302)	<i>Danio</i> 417128	<i>Danio</i> 417129, <i>Takifugu</i> JGI7515		–	–	–
<i>EPHB4</i> (4758290)	<i>Danio</i> 3163942, <i>Takifugu</i> JGI26074	<i>Danio</i> 3005901, <i>Takifugu</i> JGI17145		+	+	+
<i>FKH1</i> (4503735)	<i>Danio</i> 12004940	<i>Danio</i> 12004938, <i>Takifugu</i> JGI9390		–	–	–
<i>FKH5</i> (8134472)	<i>Danio</i> 2982347, <i>Takifugu</i> JGI20315	<i>Danio</i> 2982343, <i>Takifugu</i> JGI3282		–	–	+
<i>FLOT1</i> (5031699)	<i>Danio</i> 12751185, <i>Carassius</i> 2190561, <i>Takifugu</i> JGI8518	<i>Danio</i> 12751187, <i>Carassius</i> 12751189, <i>Takifugu</i> JGI3374		–	+	+

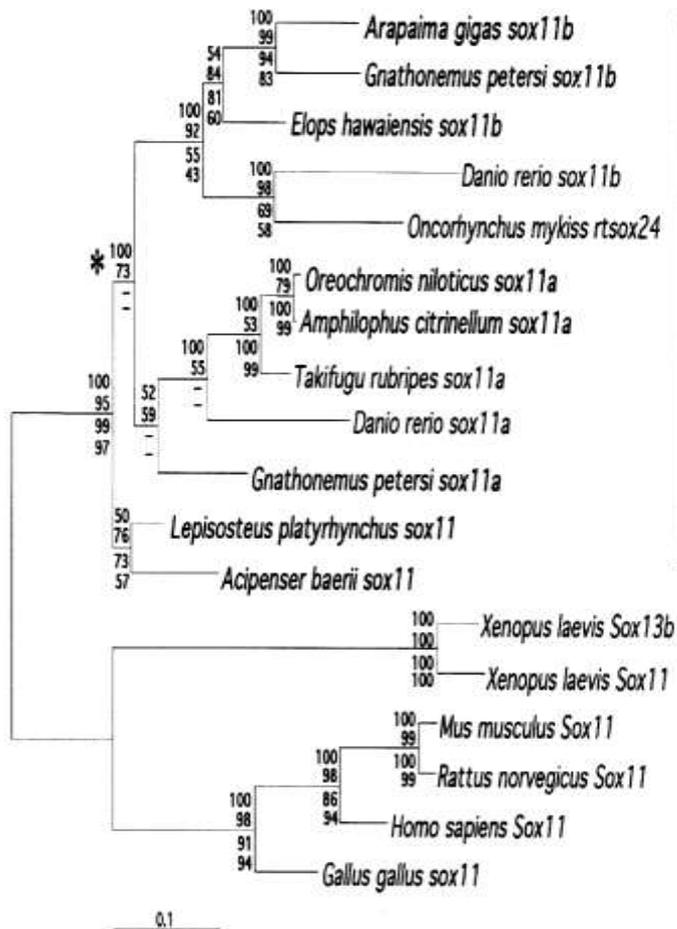


ЛЦМ3

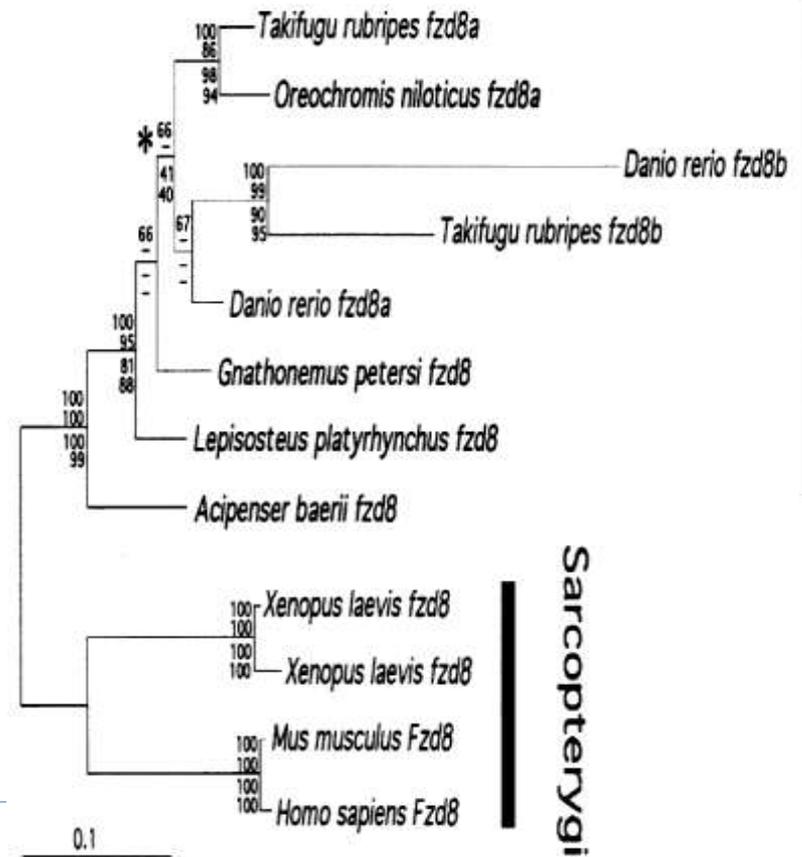
ЛЦМ1

Phylogenetic Timing of the Fish-Specific Genome Duplication Correlates with the Diversification of Teleost Fish

Simone Hoegg, Henner Brinkmann,* John S. Taylor,† Axel Meyer



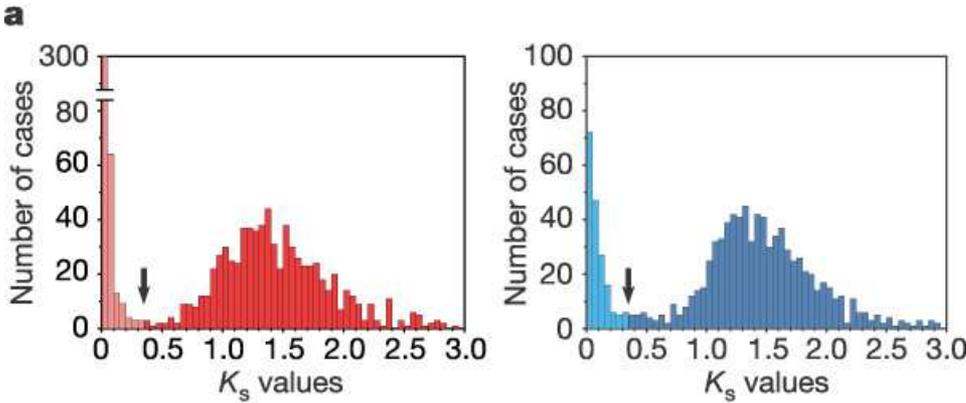
Actinopterygii



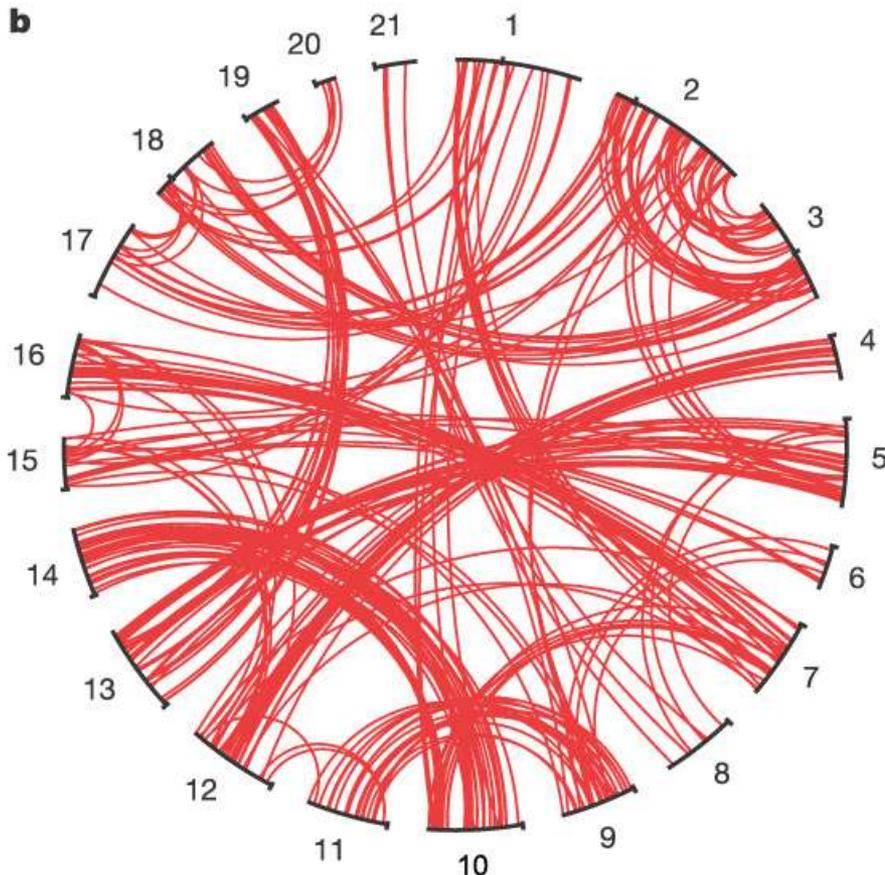
Actinopterygii

Sarcopterygii

Sarcopterygii



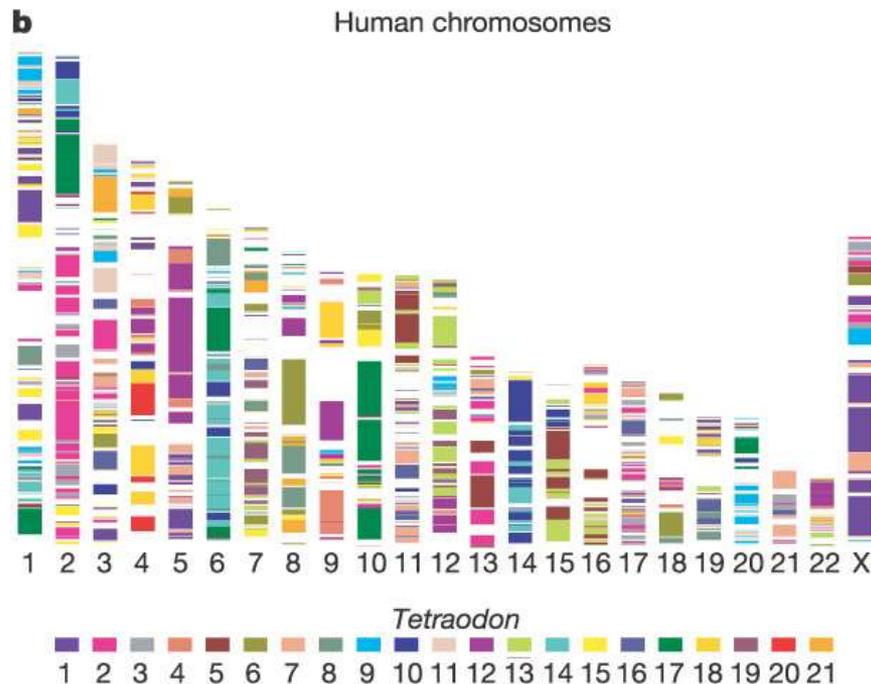
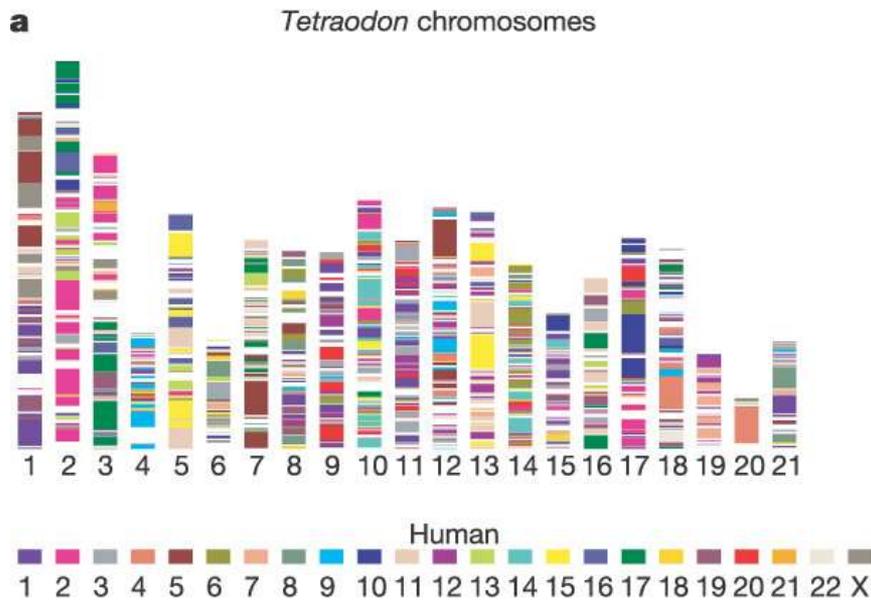
a, Distribution of K_s values of duplicated genes in *Tetraodon* (left) and *Takifugu* (right) genomes. Duplicated genes broadly belong to two categories, depending on their K_s value being below or higher than 0.35 substitutions per site since the divergence between the two puffer fish (arrows).



b, Global distribution of ancient duplicated genes ($K_s > 0.35$) in the *Tetraodon* genome. The 21 *Tetraodon* chromosomes are represented in a circle in numerical order and each line joins duplicated genes at their respective position on a given pair of chromosomes.

Jaillon et al., Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype

Nature **431**, 946-957 (21 October 2004) |



a, For each *Tetraodon* chromosome, coloured segments represent conserved synteny with a particular human chromosome. Synteny is defined as groups of two or more *Tetraodon* genes that possess an orthologue on the same human chromosome, irrespective of orientation or order. *Tetraodon* chromosomes are not in descending order by size because of unequal sequence coverage. The entire map includes 5,518 orthologues in 900 syntenic segments.

b, On the human genome the map is composed of 905 syntenic segments. See Supplementary Information for the synteny map between *Tetraodon* and mouse (Supplementary Fig. S11).

Jaillon et al., Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype

Nature **431**, 946-957 (21 October 2004) |

Мобильные элементы генома

- ▶ Инсерционные элементы, например, IS1603
- ▶ Транспозоны, например, Tn5
- ▶ Профаги - латентная форма умеренных бактериофагов, например, транспозонподобного фага Ми (мю)
- ▶ Плазмиды - эписомы, например, половой фактор кишечной палочки (F-плазида)



Транспозоны

- ▶ **Транспозон** — последовательность ДНК, способная перемещаться внутри генома в результате процесса, называемого транспозицией. Транспозоны — один из классов мобильных элементов генома которые, встраиваясь в геном, могут вызывать мутации, в том числе и такие значительные как хромосомные перестройки.
- ▶ 1. Ретротранспозоны, которые перемещаются по геному путём обратной транскрипции с их РНК;
- ▶ 2. ДНК-транспозоны, перемещается путём прямого вырезания и вставки с использованием кодируемого транспозоном фермента транспозазы.
- ▶ 3 LINE-ы и SINE-ы

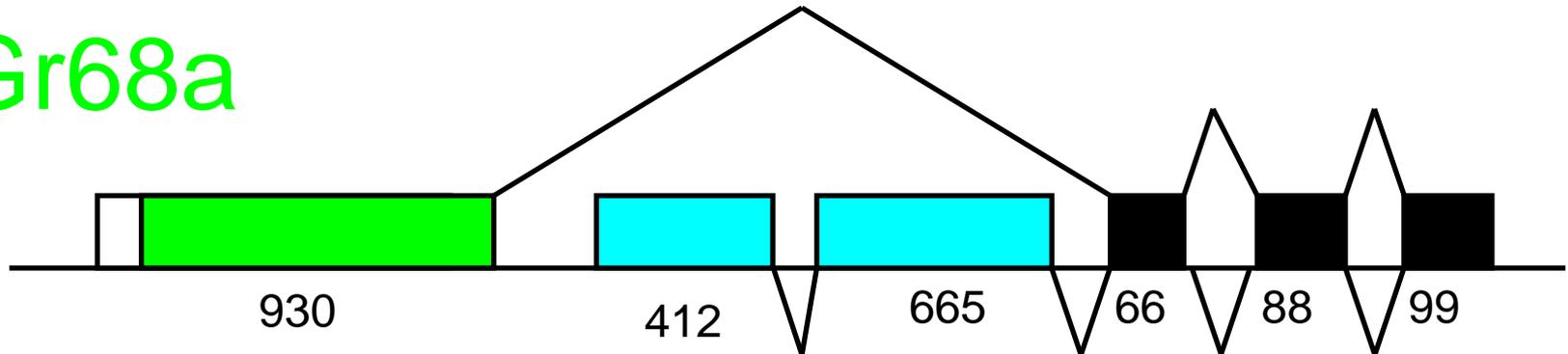


Пример ретротранспонированного гена

– Gr68a

Alternative splicing of Gr68a and Gr32a in D. virilis group

Gr68a



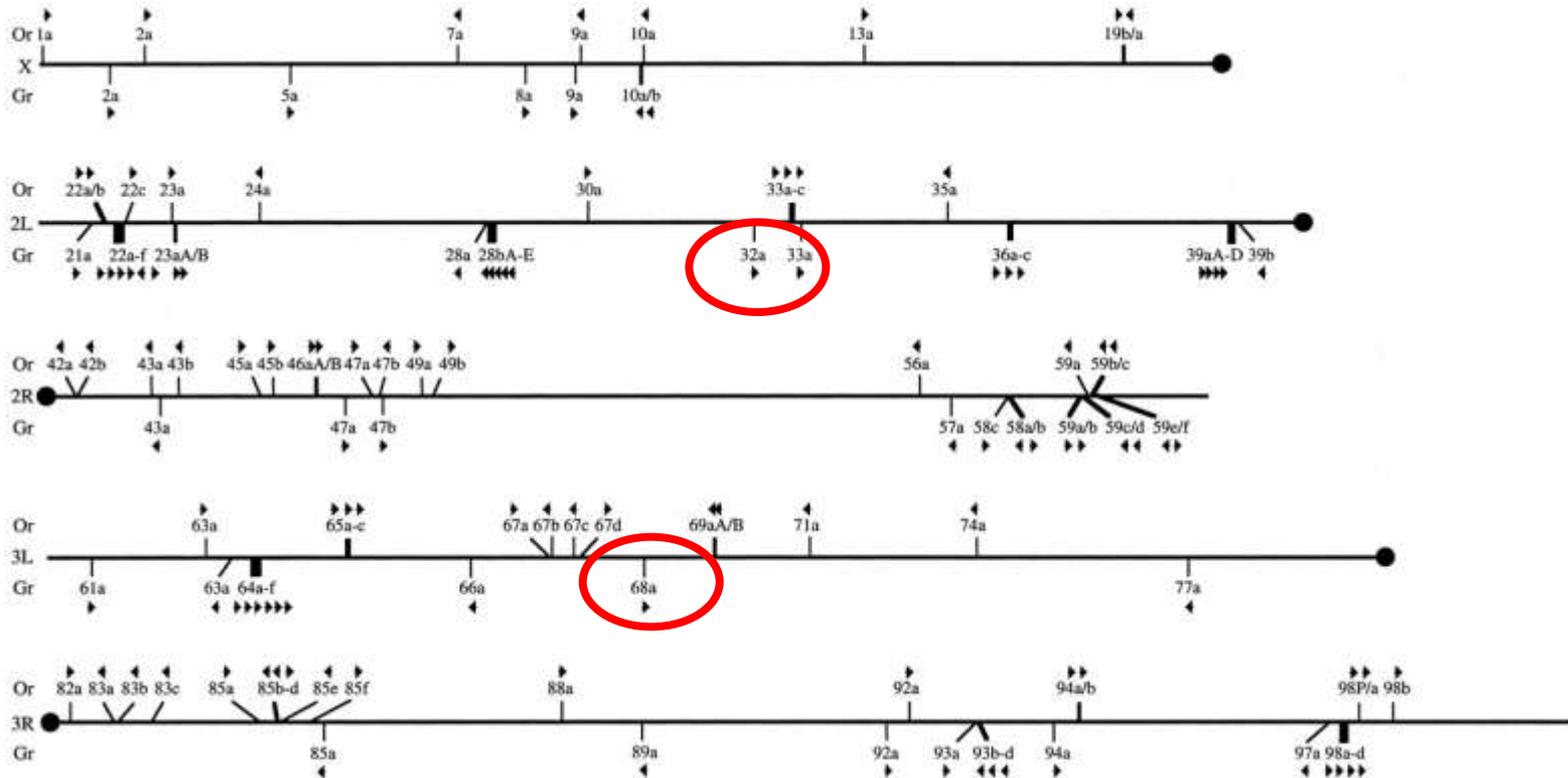
Gr32a

D. virilis.scaffold_12963

pos. 7917243 - 7920736

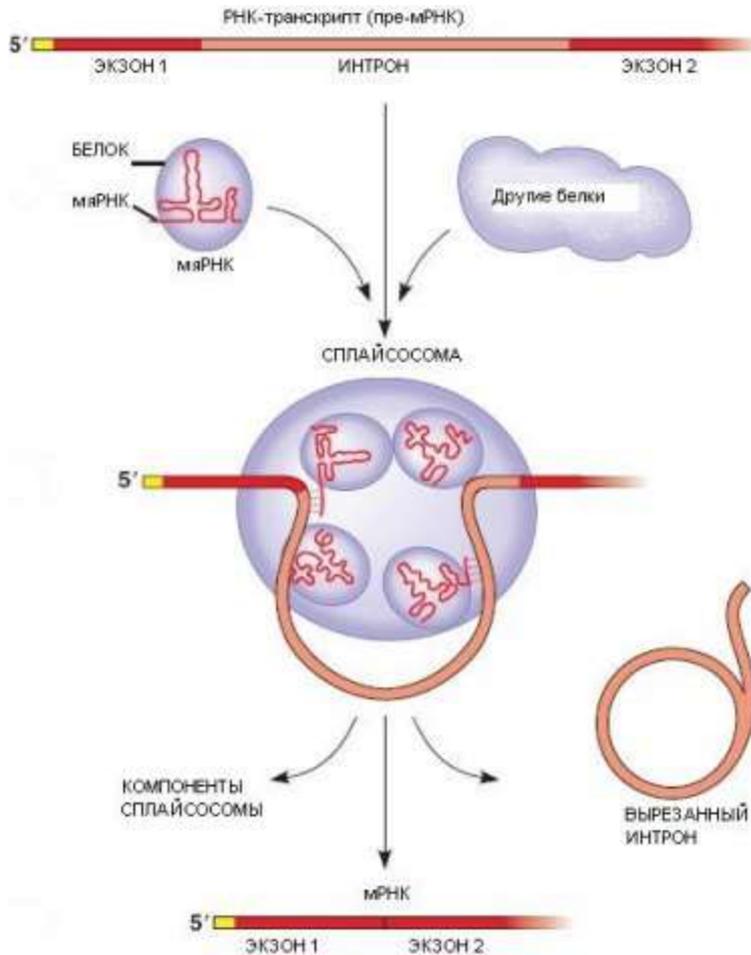


Genomic locations of the Or and Gr genes in *D. melanogaster*



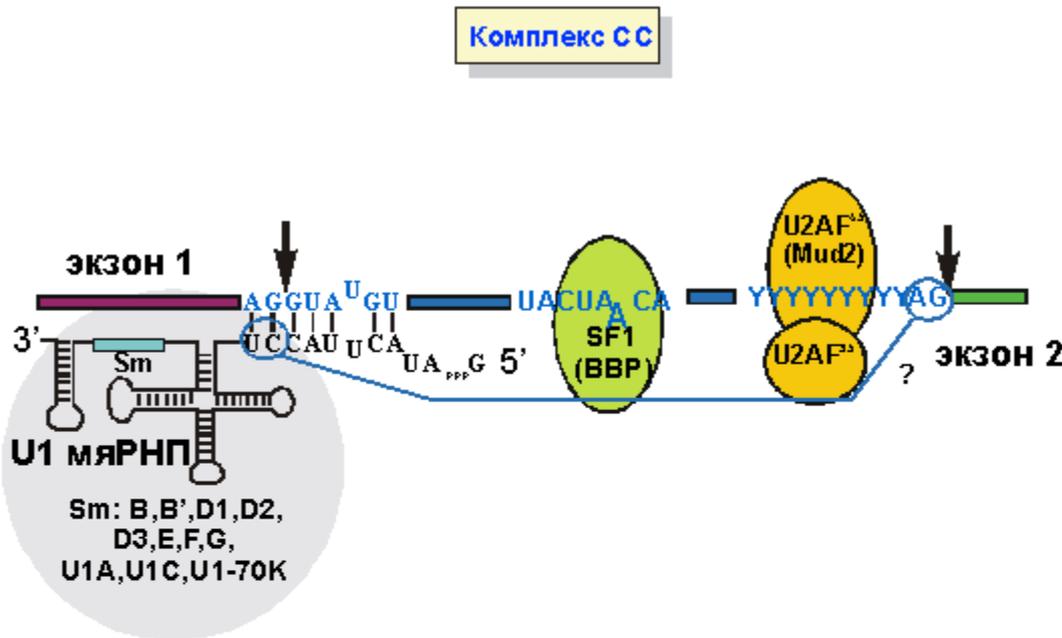
Robertson, Hugh M. et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 14537-14542

Механизм сплайсинга



Сплайсинг – это процесс вырезания внутренних участков пре-мРНК, называемых интронами. Бывает несколько разновидностей сплайсинга. Наиболее распространенный тип – это вырезание интронов с помощью малых ядерных РНП (мяРНП). Эти небольшие РНК, связанные с белками имеют ряд особенностей. Их 5'-конец закрыт кепом, причем в отличие от мРНК остаток гуанозина на 5'-конце не моно-, а триметилирован (по N7 и дважды по N2). Кроме того, мяРНК как правило содержат Sm последовательность, к которой присоединяется набор из семи Sm белков. Эти маркеры мяРНК нужны для направленного транспорта их в ядро и прикрепления к фосфорилированному CTD РНК полимеразы II.

Распознавание сайта сплайсинга

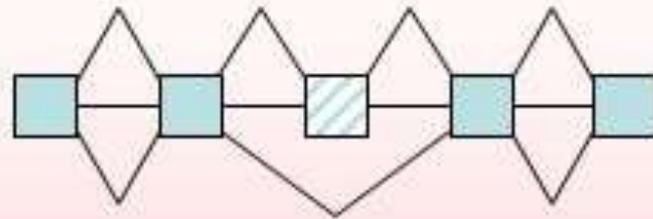


- ▶ Сначала U1 мЯРНП узнает 5'-место сплайсинга, а возможно и 3'-место сплайсинга. Место разветвления узнается белком SF1, а полипиримидиновая последовательность, предшествующая 3'SS - гетеродимером U2AF. При этом образуется комплекс СС (commitment complex) – комплекс определяющий вырезание данного интрона.

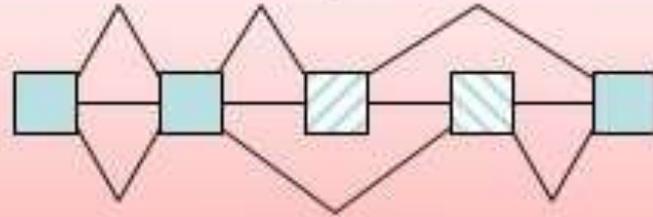
Конформационные перестройки

Связывание U1 мЯРНП:
SR белки
(Prp39p, Prp40p?)

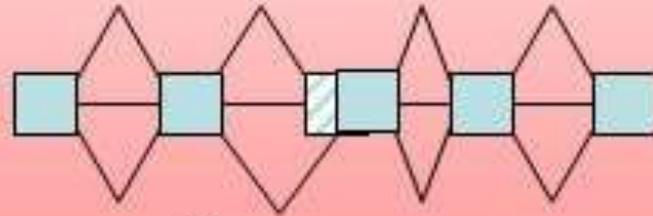
Типы альтернативного сплайсинга



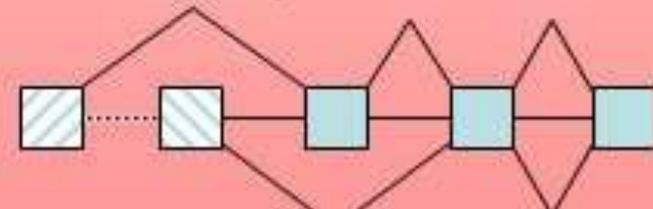
кассетный



взаимоисключающий



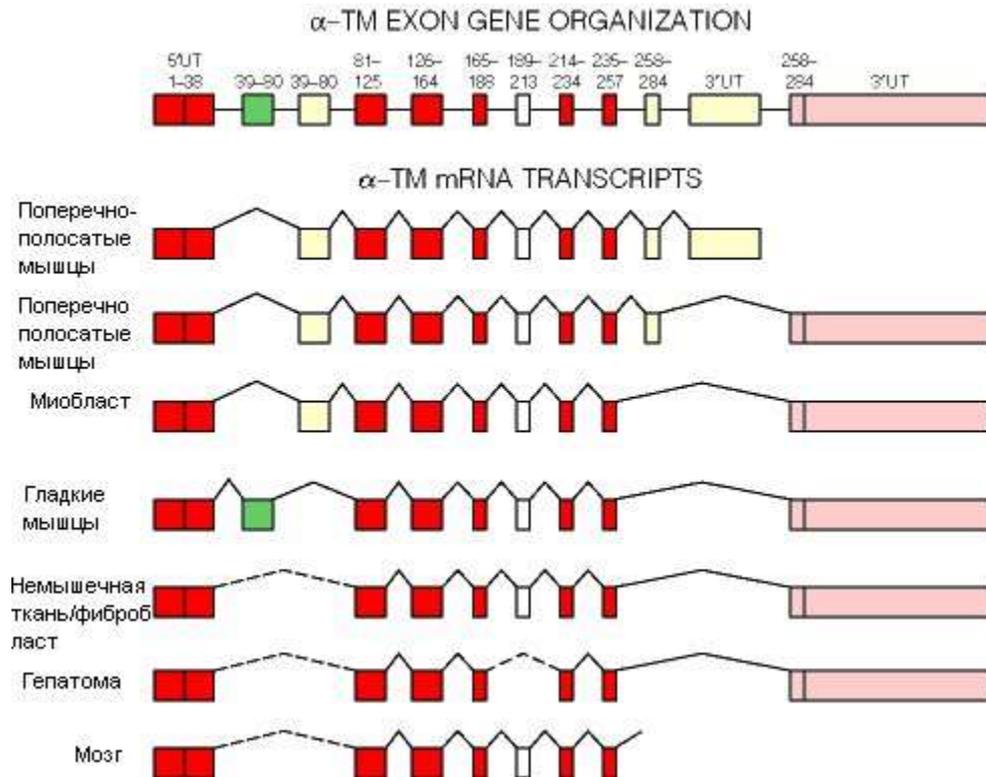
с внутренним акцепторным сайтом



альтернативные промоторы



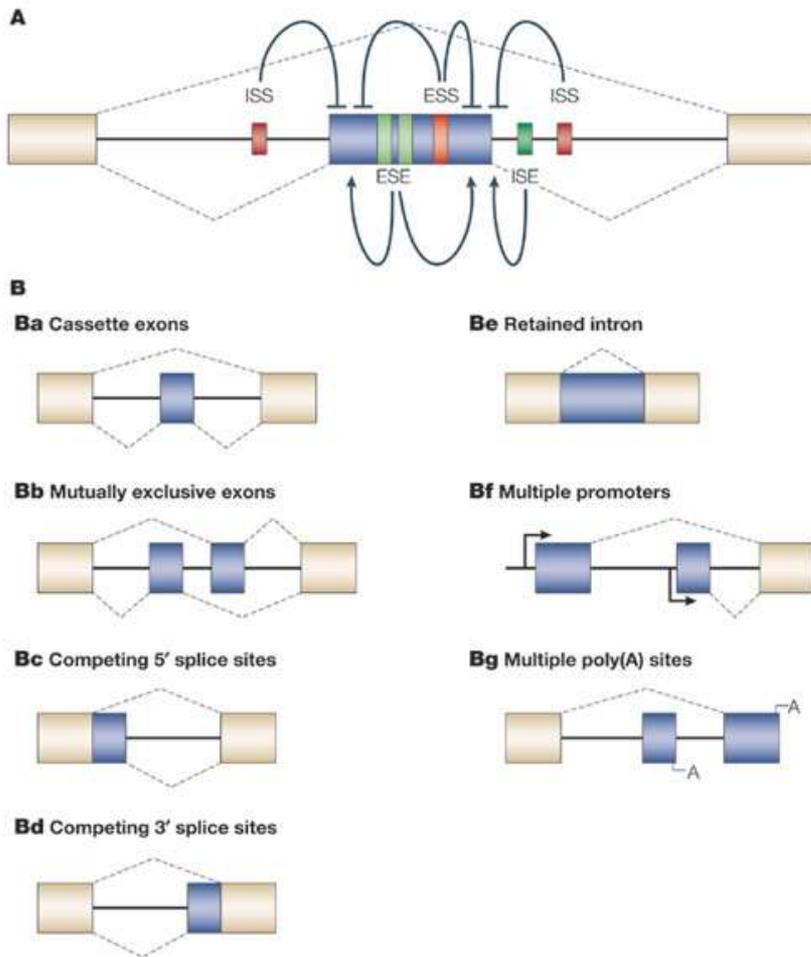
Альтернативный сплайсинг



- ▶ Альтернативный сплайсинг позволяет индивидуальным генам продуцировать множественные изоформы белков - играя тем самым центральную роль в генерации сложных протеомов (пример – тропомиозин).



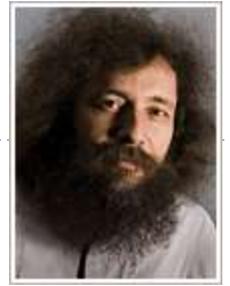
cellular codes альтернативного сплайсинга



Регуляция сплайсинга как правило осуществляется с помощью модуляции ранних ступеней сборки сплайсосомы. Цис-элементы представляют собой энхансеры и сайленсеры сплайсинга, которые могут быть локализованы или в экзонах или в интронах и которые связывают активаторные и репрессорные белки. Иногда присутствие или отсутствие одиночного регулятора достаточно, чтобы предопределить пути альтернативного сплайсинга.

Комбинации наиболее широко распространённых факторов вовлекаются в выбор путей сплайсинга. Это привело к концепции 'cellular codes', которые состоят за счёт определенных комбинаций регуляторных факторов.

Альтернативный сплайсинг – полигон для апробации новых генов без потери старых (М.С.Гельфанд *etc.*)



- ▶ Сайты альтернативного сплайсинга чаще возникают или утрачиваются чем сайты конститутивного сплайсинга.
- ▶ Альтернативные геномы эволюционируют быстрее (по числу и синонимичных, и несинонимичных мутаций)
- ▶ Сравнение шимпанзе и человека показало наличие движущего отбора в альтернативных экзонах. ($K_n/K_s > 1$)



