

Wykład 6.

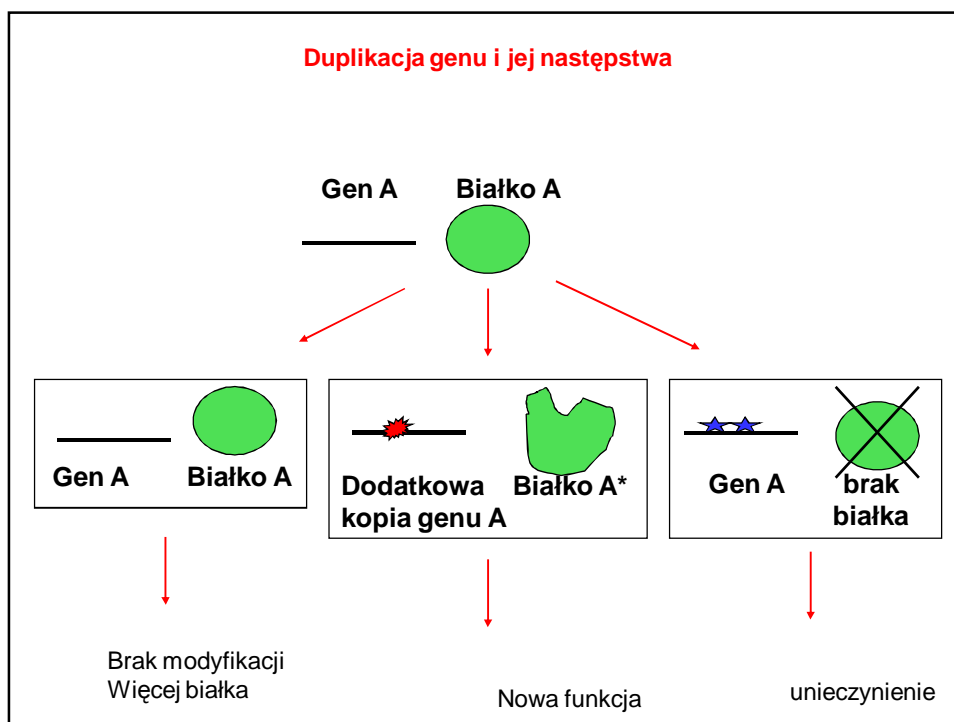
Powstawanie białek o nowych funkcjach

Molekularny mechanizm powstawania białek:

- I. Duplikacja genu i następnie jego stopniowa modyfikacja za pomocą mutacji punktowych
- II. Naturalna selekcja

Duplikacja genu:

- Ø całkowita – powstają identyczne kopie:
 - ▶ brak modyfikacji - zwiększona liczba określonego białka
 - ▶ modyfikacje – nowa funkcja
 - ▶ modyfikacje – unieczynnienie (pseudogen)
- Ø częściowa, wewnętrzna – duplikacja domen (duplikacja eksonu)



Koncepcja „zegara molekularnego”



- Zuckerkandl i Pauling 1965
- białka zachowują się jak zegary molekularne, ponieważ **częstość mutacji** punktowych (wyrażonych liczbą podstawionych aminokwasów) w czasie ewolucji jest **wartością stałą dla danego** białka,

Inaczej mówiąc hipoteza zegara molekularnego zakłada, że zmiany molekularne w procesie filogenezy zachodzą w stałym tempie, różnym dla różnych białek.

Zależy to od:

- * różnic w tempie ewolucji pomiędzy poszczególnymi białkami wynikającymi z pełnionej przez nie funkcji.
- * złożoności współdziałania z innymi białkami i cząsteczkami, które też ulegają ewolucji.

Im ważniejsza i bardziej złożona jest funkcja białka i im więcej partnerów białkowych potrzebuje ono do pełnienia swojej funkcji tym wolniej ewoluuje.

- ⌚ Pierwsze badania porównawcze sekwencji aminokwasów w homologicznych białkach wskazywały, że liczba podstawień aminokwasowych wzrasta wraz z odległością filogenetyczną porównywanych organizmów.
- ⌚ Często obserwuje się znaczne różnice w tempie ewolucji pomiędzy poszczególnymi białkami.

Przykłady:

Fibrynogen	- podstawienie 1 aminokwasu średnio co 1,1 mln lat (szybko)
Hemoglobina	- 5,8
Cytochrom c	- 20,0
Histon H4	- 600,0

W wyniku różnych mechanizmów ewolucji powstały białka o różnym stopniu zależności pomiędzy strukturą a funkcją:

1. Białka o podobnej strukturze i podobnej funkcji
2. Białka o podobnej strukturze a różnej funkcji
3. Białka o podobnej funkcji a różnej strukturze

ewolucja

- Konwergentna (zbieżna) - członkowie danej rodziny białek nie spokrewnionych, niezależnie od siebie zmierzali do przybrania pewnej trwałej, podobnej struktury (i podobnej funkcji)
- Dywergentna (rozbieżna) – pochodzenie od wspólnego przodka (białka spokrewnione), brak wysokiej homologii sekwencji (w wyniku mutacji), ale zachowana została struktura III-rzędowa

Mitochondrialne cytochromy c

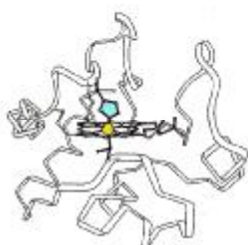
- Znajdują się we wszystkich organizmach mających mitochondrialny łańcuch oddechowy.
- Zbudowane są wg podobnego motywu strukturalnego: 1 łańcuch polipeptydowy (104-112 aa) zwinięty wokół hemu.
- Hem wiąże się z częścią białkową poprzez reszty cystein w pozycjach 14 i 17 oraz histydyny w pozycji 18 i metioniny w pozycji 80.
- Białko to pojawiło się ponad 1,5 miliarda lat temu przed wyodrębnieniem się roślin i zwierząt.

Funkcja jest wciąż zachowana:

- ▶ cyt c z jakiegokolwiek gatunku reaguje *in vitro* z oksydazą cytochromową każdego innego gatunku np. cyt c z zarodka pszenicy z oksydazą człowieka.
- ▶ wartość potencjałów redukcyjnych cząsteczek cyt c wszystkich badanych gatunków wynosi około +0,25V.
- ▶ spektra absorpcyjne cytochromów c wielu gatunków są w zasadzie nieodróżnialne.

Mitochondrialne cytochromy c

Po analizie sekwencji aminokwasowej cyt c z ponad 80 gatunków wykazano, że ze z 104 aa 26 wykazuje całkowitą niezmiennosć.



Cyt c z mit. serca
tuńczyka



Cyt c₂ z bakterii
Rhodospirillum



Cyt c₅₅₀ z bakterii
Paracoccus

Konformacja cytochromów c pozostała prawie niezmienniona

Mitochondrialne cytochromy c

		Różnica w aa
Drożdże	Człowiek	35
naczelnne	Inne ssaki	8-10
ssaki	ptaki	10
ssaki	Płazy i gady	14

Niezmienne są aminokwasy wiążące hem: 2 cysteiny (14 i 17), histydyna (18), metionina (80), a także 11 aa w położeniu 70-80 i większość reszt glicynowych.

Charakterystyczną cechą jest:

1. 11 aa (w pozycji 70-80) tworzy ścianę apolarnej kieszeni dla hemu,
2. niezmienna pozycja 2 cystein - istotna dla interakcji grupy prostetycznej z białkiem,
3. reszty kwaśne i zasadowe są od siebie oddzielone co jest rzadkością dla białek globularnych.

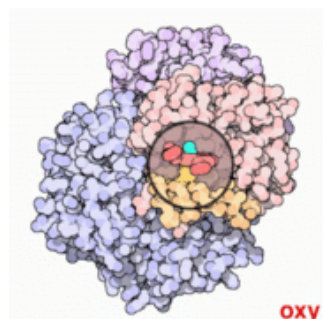
Mitochondrialne cytochromy c

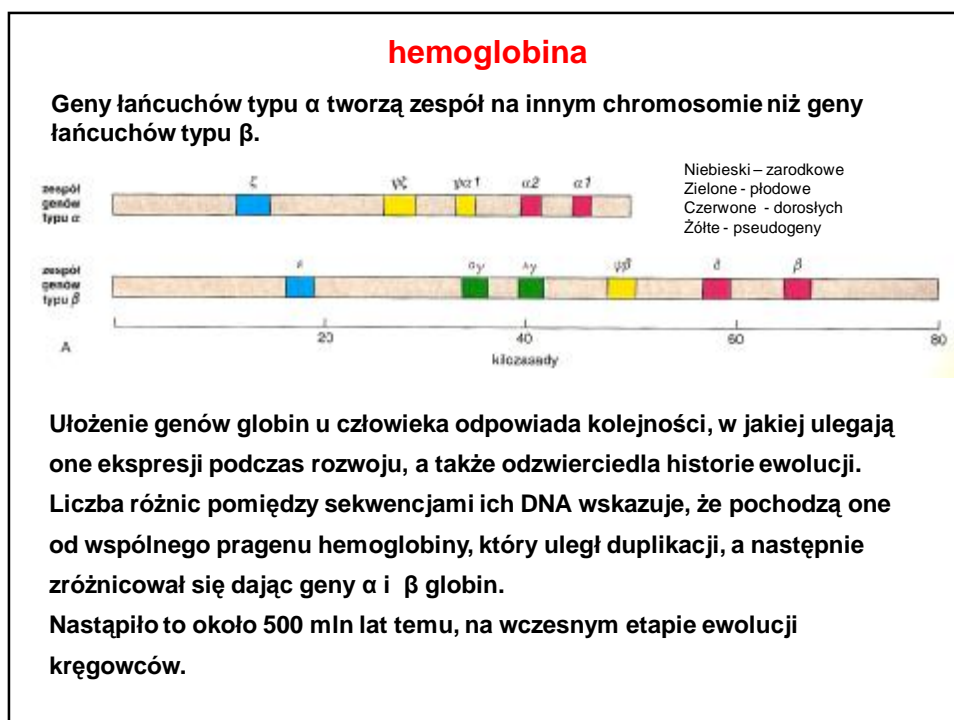
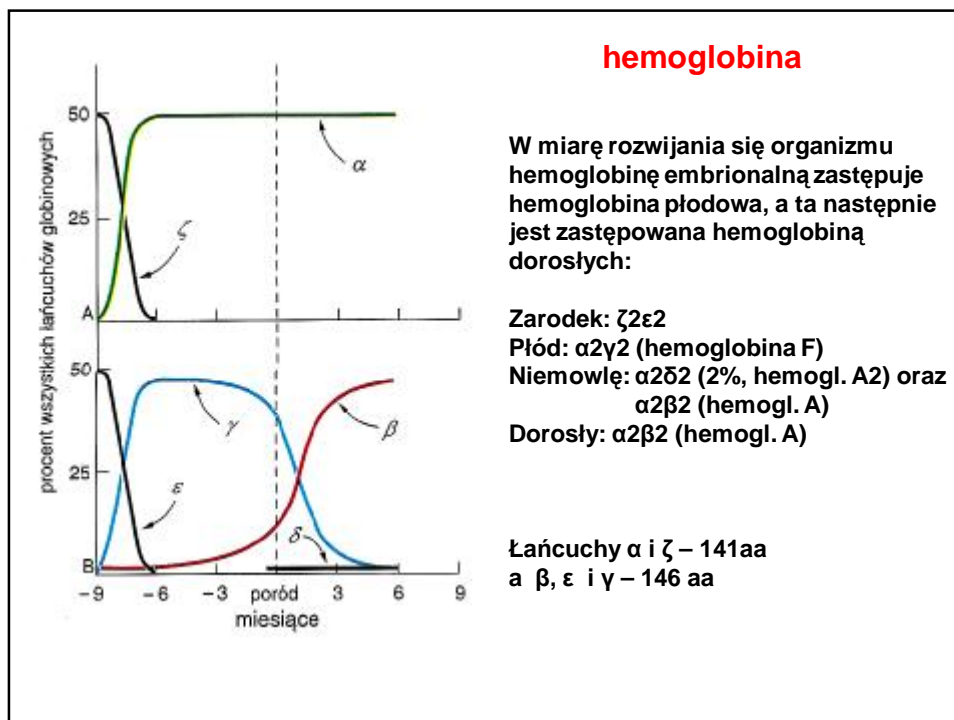
		Różnica w nt
człowiek	rezus	1
	królik	12
	gołąb	16
	żółw	19
	motyl	36
	drożdże	56

HEMOGLOBINA

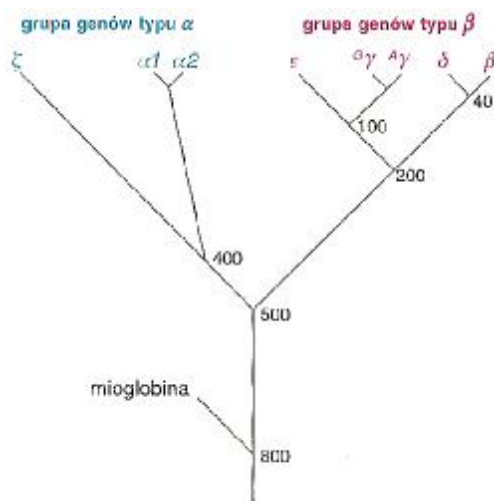
Każda hemoglobina zbudowana jest z dwóch łańcuchów typu α i dwóch łańcuchów typu β .

Łańcuchy te powiązane są ze sobą wiązaniami niekowalencyjnymi, każdy z nich zawiera grupę hemową oraz jedno miejsce wiązania tlenu.





hemoglobina

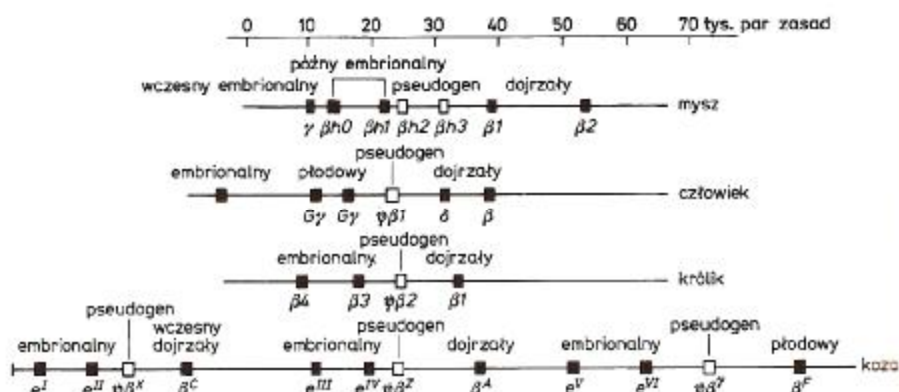


Mioglobina, która różni się od obu podjednostek α i β oddzieliła się zanim powstały geny α i β . Ssaki, ptaki, gady, płazy i ryby kostnoszkieletowe mają oddzielne podjednostki α i β , natomiast najstarsze kręgowce mają tylko jeden rodzaj podjednostek.

Drzewo ewolucyjne genów globin.

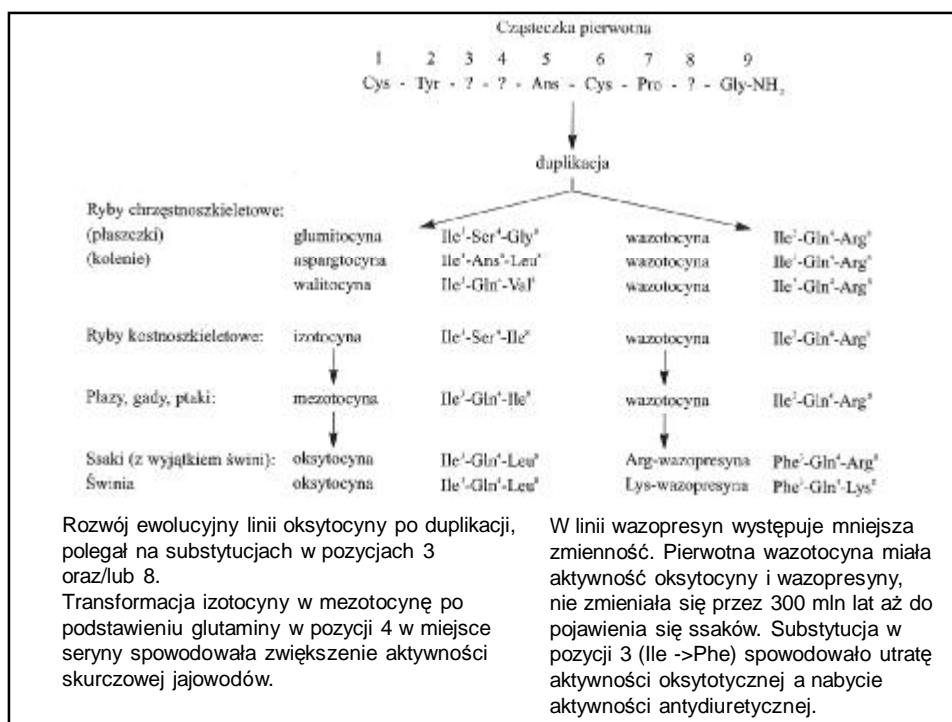
Liczby – oszacowany czas dywergencji w mln lat

Duplikacje genów w rodzinie β -globin u ssaków

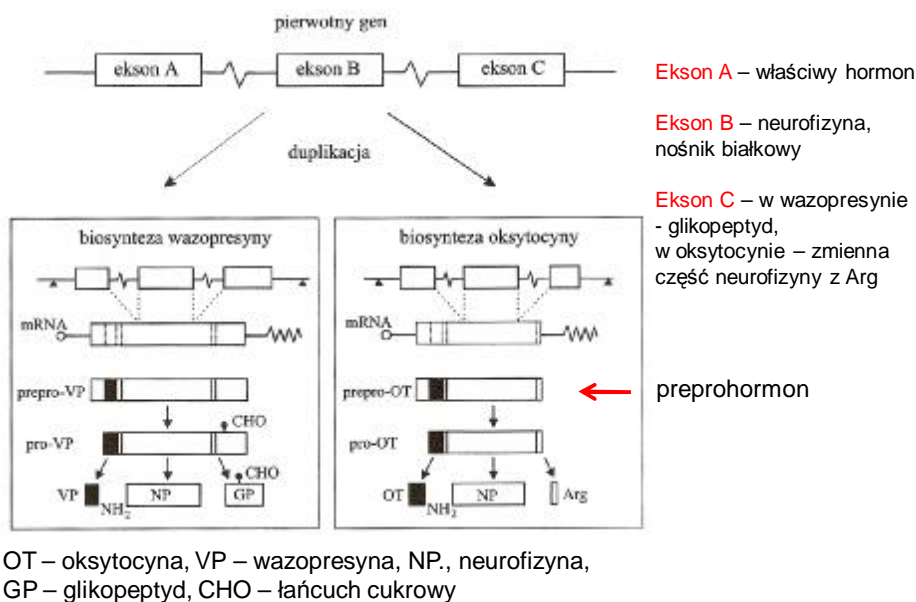


Wazopresyny i oksytocyny kręgowców

- Nadrodzina hormonów tylnego płata przysadki mózgowej,
- Wazopresyna i oksytocyna różnią się tylko 2 aminokwasami (pozycja 3 i 8),
- Duplikacje genów, podobieństwo struktury (znaczna homologia aminokwasów), zmiana funkcji:
 oksytocyna – związana z reprodukcją,
 wazopresyna – regulacja gospodarki wodnej i ciśnienia osmotycznego.



Organizacja struktury genów wazopresyny i oksytocyny



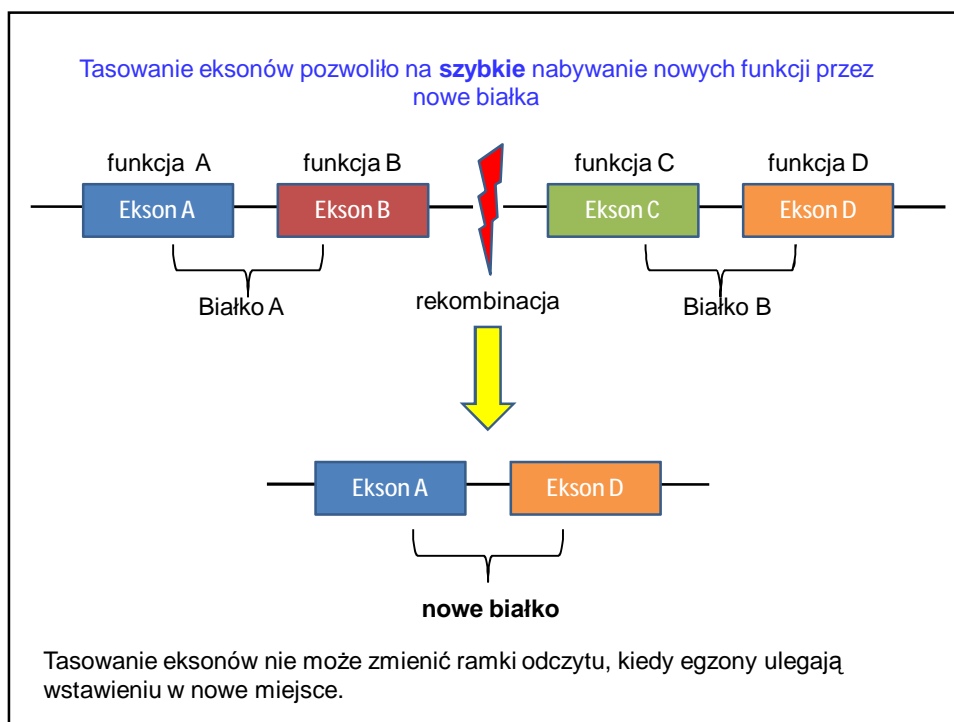
Tasowanie eksonów (exon shuffling)

1978 – hipoteza o roli intronów i eksonów w ewolucji białek:

Eksony pochodzące z różnych genów mogły łączyć się ze sobą w trakcie ewolucji w różne kombinacje, dając podstawę do powstawania nowych genów kodujących białka o nowych funkcjach, ponieważ w wielu genach eksony kodują domeny funkcjonalne białka.

Przykłady:

**Białka plazmatyczne,
Białka mięśniowe,
Białka uczestniczące w adhezji komórek,
Receptory błonowe.**

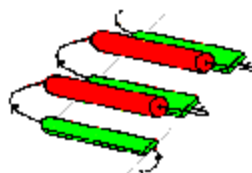


Występowanie domen o podobnej strukturze i podobnej funkcji w różnych białkach

Domeny wiążące dinukleotydy w NAD⁺-zależnych dehydrogenazach.

Enzymy te pod względem strukturalnym są mało ze sobą spokrewnione, mają odmienne struktury I, II, III i IV-rzędowe, jedne są dimerami, inne tetramerami, np. dehydrogenaza mleczanowa, alkoholowa, jabłczanowa, aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Drugą domeną w tych białkach, inną dla każdego jest domena wiążąca substrat.

The Rossmann fold



Domena wiążąca

NAD⁺:

charakterystyczne naprzemienne struktury α oraz β o układzie $\beta/\alpha/\beta/\alpha/\beta$.

Białka te powstały prawdopodobnie przez fuzję genu kodującego pierwotną domenę wiążącą kofaktor z genem kodującym domenę wiążącą protosubstrat, prawdopodobnie jeszcze w stadium przedkomórkowym.

<http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section10/alphabeta.html>

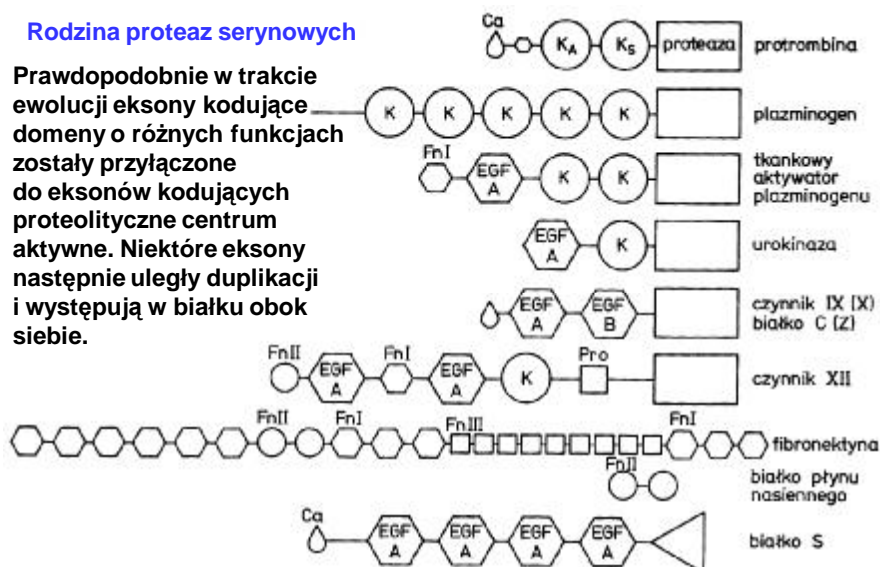
<http://www.icsg.org/images/stim/115o-TM1643.html>

Białka wielodomenowe

Są to białka kodowane przez geny będące kombinacją eksonów pochodzących z innych genów.

Rodzina proteaz serynowych

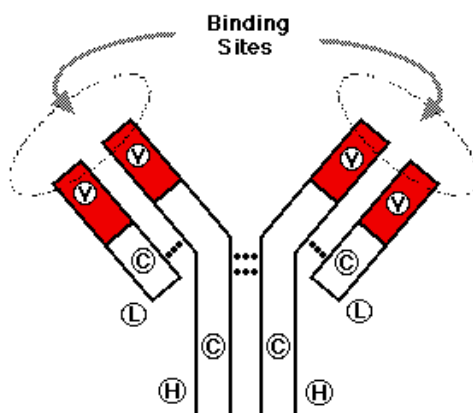
Prawdopodobnie w trakcie ewolucji eksony kodujące domeny o różnych funkcjach zostały przyłączone do eksonów kodujących proteolityczne centrum aktywne. Niektóre eksony następnie uległy duplikacji i występują w białku obok siebie.



Immunoglobuliny

Są to białka zbudowane z 2 identycznych łańcuchów lekkich L oraz 2 identycznych łańcuchów ciężkich H, połączonych ze sobą wiązaniami disiarczkowymi.

N-końce obu łańcuchów są bardzo zróżnicowane i stanowią region zmienny, który odpowiada za wiązanie antygenu i warunkuje swoistość przeciwciała.



Obszar zmienny jest kodowany przez sekwencję obszaru zmiennego, która podlega mutacjom, rearanżacjom i splicingowi.

Umożliwia to produkcję dużej liczby różnych przeciwciał z ograniczonej sekwencji DNA.

Immunoglobuliny są kodowane przez wielogenowy system, który podlega somatycznym przegrupowaniom i innym zmianom genetycznym podczas różnicowania się limfocytów.

Łańcuch ciężki jest kodowany przez 4 różne geny:

V_H - *variable*,

D_H - *diversity*,

J_H - *joining*,

C_H - *constant*,

A łańcuch lekki przez 3 różne geny: V_L , J_L , C_L .

Geny V w linii zarodkowej limfocytów B są oddalone znacznie od genów kodujących region C, a w komórkach wytwarzających przeciwciała są one położone blisko siebie.

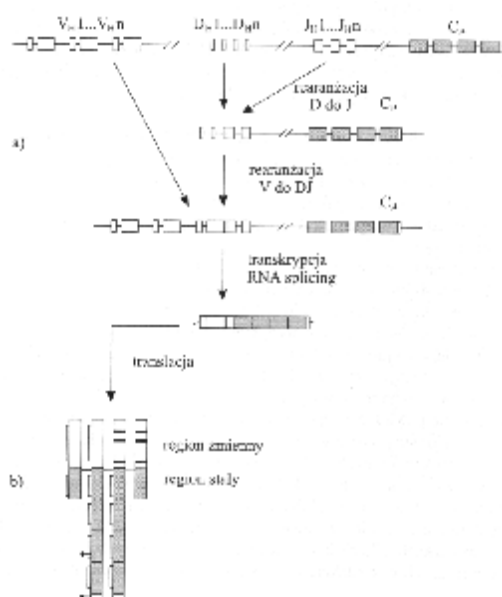
W czasie różnicowania się limfocytów B geny immunoglobulin ulegają translokacji.

Wyewoluowanie **systemu rearanżacji genów** było konieczne do produkowania dużej liczby przeciwciał z ograniczonej ilości materiału genetycznego.

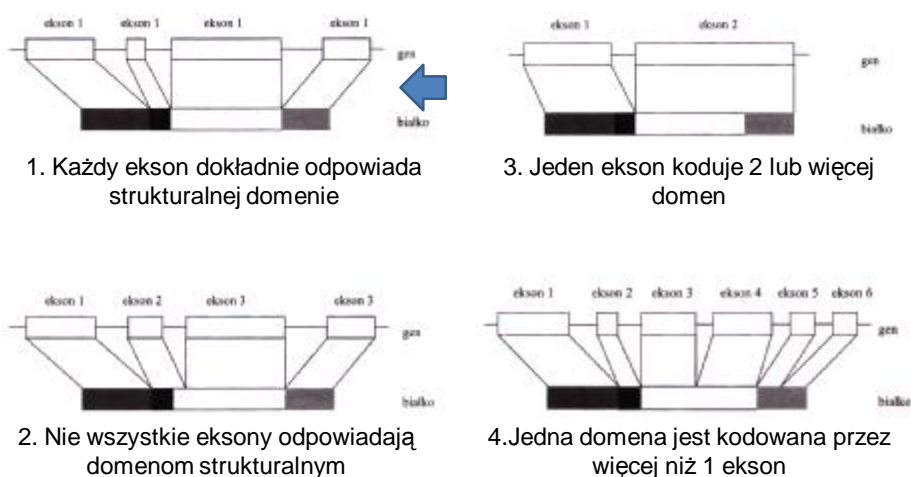
Pierwszym wydarzeniem w toku ewolucji przeciwciał była więc prawdopodobnie **segmentacja pojedynczego egzonu** kodującego białko, które miało cechy domeny immunoglobulinowej.

Posegmentowany ekson mógł ewoluować w kierunku struktur typu V, J i C lub V, D, J i C poprzez **duplikacje** oraz/lub **rekombinacje**.

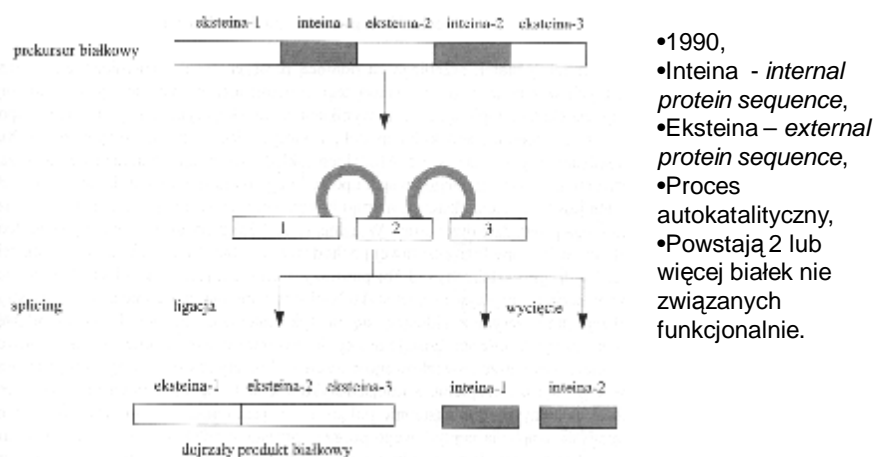
Rearanżacje genu immunoglobuliny



Relacje między eksonami a domenami strukturalnymi i funkcjonalnymi.



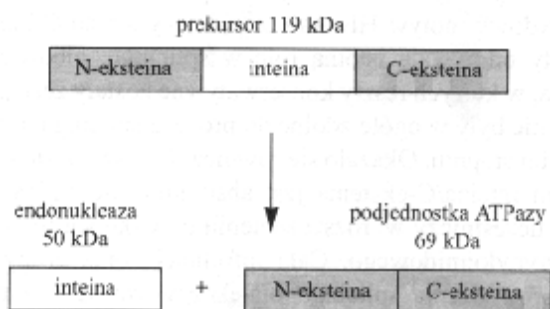
Splicing białek – możliwość powstawania nowych białek



Inteiny

- Cała informacja oraz grupy potrzebne do splicingu zawarte są w inteinie i w dwóch oskrzydłających ją aminokwasach,
- Inteiny działają na reszty aminokwasowe znajdujące się na ich własnych końcach, czyli są same dla siebie substratami,
- Mogą pośredniczyć w rearanzacji informacji genetycznej, wiele z nich to specyficzne endonukleazy, które przecinają docelowe DNA (allel, który nie zawiera inteiny), w miejscu gdzie zostanie wstawiona sekwencja kodująca inteinę.
- Są to więc białkowe mobilne elementy genetyczne, katalizują mobilność genetyczną swoich sekwencji kodujących.

Gen TFP1 (VMA1) – koduje katalityczną podjednostkę wakuolarną HATPazy u drożdży



Liczba poznanych przypadków splicingu białek nie jest duża, ale inteiny zidentyfikowano w komórkach drożdży, bakterii i *Archea*.

Ewolucja splicingu białek

Czy jest to proces stary czy nowy?

Hipoteza 1 – białka ulegające splicingowi są bardzo stare, pojawiły się przed rozjęściem się 3 głównych domen życia.

Hipoteza 2 – pojawiły się stosunkowo niedawno, jako mobilne elementy mogły w sposób horyzontalny przekroczyć bariery filogenetyczne (Shub i Goodrich-Blair 1992).

Droga powstania intein:

- pojawienie się specyficznych endonukleaz, które stopniowo rozpowszechniły się w genomie,
- nabycie aktywności peptydazowej,
- nabycie możliwości transpozycji do obszaru kodującego białko.