

Téma: Evoluční historie, struktura a funkce genů kódujících proteiny tubulinové superrodiny u hub

Úvod

Mikrotubuly eukaryotického cytoskeletu jsou tvořeny heterodimery α - a β -tubulinu. γ -tubulin je potřebný pro započítí formování mikrotubulů. Většina mnohobuněčných organismů má více kopií těchto genů ve svém genomu. Další čtyři zástupci členů této superrodiny byly odhaleni v nedávné době (Dutscher et al. 1998, Ruiz et al. 2000, Chang et al. 2000, Vaughn et al. 2000), ale na rozdíl od předchozích základních tří typů nemají příslušné homology v genomech houbových organismů. Pro α - i β -tubulinové geny je známa řada izotypů. Část z této heterogenity je výsledkem post-translačních modifikací. Nejvýznamnějším mechanismem vzniku genových rodin, je genová duplikace. Nové geny pak vznikají postupným rozrůzněním funkcí jednotlivých kopií jako je získání nové funkce, její ztráta či rozdělení (subfunkcionalizace). Procesem subfunkcionalizace pravděpodobně vznikly i paralogy tubulinových genů. Tento proces je zajištěn komplementárními degenerativními mutacemi u obou genů (Lynch et Force 2000). β -tubulin (benA) patří v současnosti k nejvíce využívaným genům při taxonomických a fylogenetických studiích u hub i jiných skupin organismů. Gen pro β -tubulin se u většiny hub vyskytuje ve dvou izoformách (benA a tubC). Jejich charakterizaci u rodu *Aspergillus* se věnovala má diplomová práce. Bylo zjištěno, že obě izoformy mají v závislosti na druhu různou strukturu exonů a intronů, přičemž tubC může u některých druhů chybět, dále se liší v divergenci a bývají zaměňovány, což vede k mylným taxonomickým závěrům. Významnou skutečností je, že běžně používané PCR primery nejsou striktně benA specifické a u určitých druhů dokonce preferují tubC izoformu. Funkce produktů genu benA jsou významné během celého vegetativního růstu, účastní se mitózy a pohybu jádra. Funkce genu tubC byla zkoumána u *Aspergillus nidulans*, kde participuje v procesu konidiogeneze, ale není esenciální pro tento proces (May et al. 1989). Oba paralogy jsou u *A. nidulans* vysoce divergentní 18,2 %. U jiných druhů rodu *Aspergillus* nacházíme divergence podobné úrovně, vyšší i výrazně nižší (11-21 %). Je možné, že funkce tubC bude u jistých druhů rodu *Aspergillus* naprosto postradatelná bez vlivů na vitalitu, nebo naopak významější než u *A. nidulans*. Studium evoluce, struktury a funkce β -tubulinových paralogů může mít významný přínos pro taxonomii hub, která geny kódující cytoskeletární proteiny s oblibou využívá. Neméně důležité jsou možné implikace v proteomice, kde cytoskeletární proteiny patří k vůbec nejstudovanějším proteinům.

Cíle a metodika:

- 1) Zjistit funkce genů kódujících β -tubulin u hub. Expresí paralogů benA a tubC bude stanovena na vybraném spektru druhů rodu *Aspergillus* (druhy asexuální, druhy tvořící sexuální stádium v kultuře, druhy s různou divergencí obou paralogů) v několika fázích ontogeneze (mladé nesporulující mycelium, kultura produkující asexuální konidie, u sexuálních druhů též v době produkce plodnic) a z mycelia rostoucího při 37 °C (důležité cytoskeletární změny, dimorfní houby, patogeni). Kvantita exprese paralogů budou stanoveny relativně vzhledem k sobě a k referenčnímu single-copy genu metodou semikvantitativní RT-PCR. Podmínkou pro takovou analýzu bude sestavení specifických primerů pro oba paralogy.
- 2) Charakterizovat geny pro tubulin napříč houbovou říší. Z publikovaných celogenomických sekvencí získat a anotovat sekvence celých genů náležejících do tubulinové rodiny u druhů reprezentujících fylogenetickou diverzitu říše hub. Anotované sekvence poslouží k zjištění divergence mezi paralogy a orthology. Z konečného alignmentu bude zkonstruován fylogenetický strom, který by měl v ideálním případě oddělit jednotlivé paralogy. Pomocí základní charakterizace anotovaných sekvencí budou zjištěny rozdíly mezi paralogy (zastoupení bazí v DNA sekvenci, spektrum vyžívaných kodonů,

rozložení a délka intronů apod.), které poskytnou zatím chybějící nástroj pro spolehlivé rozlišení těchto paralogů u genů pro α - a β -tubulin. Budou navrženy a testovány primery specifické pro izoformy α - a β -tubulinu, které by měly nahradit stávající primery, které mají nedostatečnou specifitu. Testování možné koevoluce (např. Sato's Mirror-Tree test) bude provedeno mezi α - a β -tubulinovými protějšky, aby byla nalezena případná konzervovaná místa, jejichž neměnnost je vysvětlitelná funkční závislostí kooperujících proteinů. Pozornost bude věnována i hledání sekvenčních motivů, které následně slouží v proteinu jako místa pro post-translační modifikace. Ty hrají významnou úlohu např. při funkční specializaci buněk.

3) Odhadnout dobu vzniku jednotlivých paralogů α - a β -tubulinu. Sekvence paralogů budou testovány metodou molekulárních hodin pro odhadnutí doby jejich vzniku. Metoda molekulární hodiny také poskytne informaci, zda se tubulinové orthology vyvíjely stejnou rychlostí. Mapování distribuce, počtu a délky intronů je dalším nástrojem, který pomáhá predikovat konzervovanost sekvencí a přináší dodatečné údaje použitelné k datování událostí v evoluční historii genů.

Shrnutí

Disertační práce bude vyhodnocovat rozdíly ve funkci, struktuře, divergenci a zastoupení kodonů u tubulinových paralogů, což bylo započato v diplomové práci na příkladu β -tubulinových paralogů *benA* a *tubC* u rodu *Aspergillus*. Evoluce tubulinových paralogů bude hodnocena napříč říší hub - budou vytvořeny závěry o předpokládané době oddělení jednotlivých paralogů, možné koevoluci α - a β - izoform, hodnocena bude ztráta/získání intronů, přítomnost motivů predikujících posttranslační modifikace, aj. Budou navrženy primery s větší specificitou pro konkrétné izoformy α - a β -tubulinu. Stanovení kvantity genové exprese paralogů v průběhu životního cyklu u druhů s různou divergencí paralogů přispěje k lepšímu pochopení funkce těchto genů. Přínosem může být odhalení případů neadekvátního použití kombinace paralogních genů v taxonomických studiích u hub, jak se tomu stalo u rodu *Aspergillus* (viz diplomová práce).

Vyjádření školitele ke krytí finančních nákladů: Výzkumný záměr MŠMT 0021620828: Ekologické procesy v evoluci modelových skupin organismů. Bioinformatická část projektu vyžaduje minimální finanční podporu.