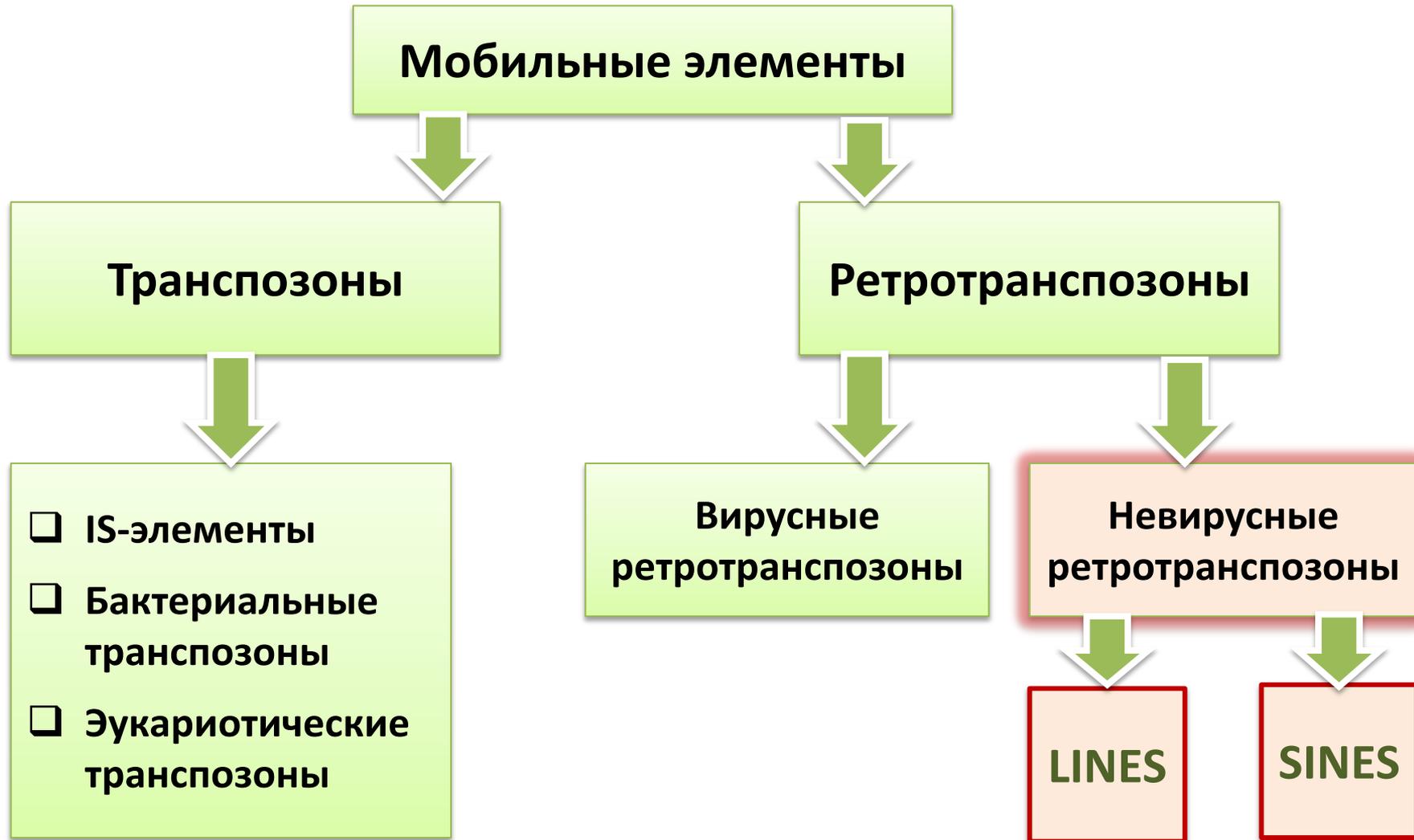


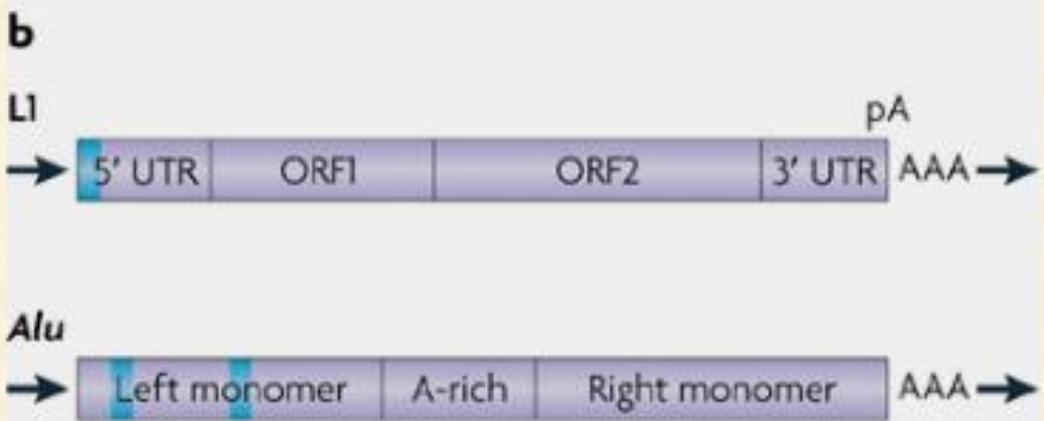
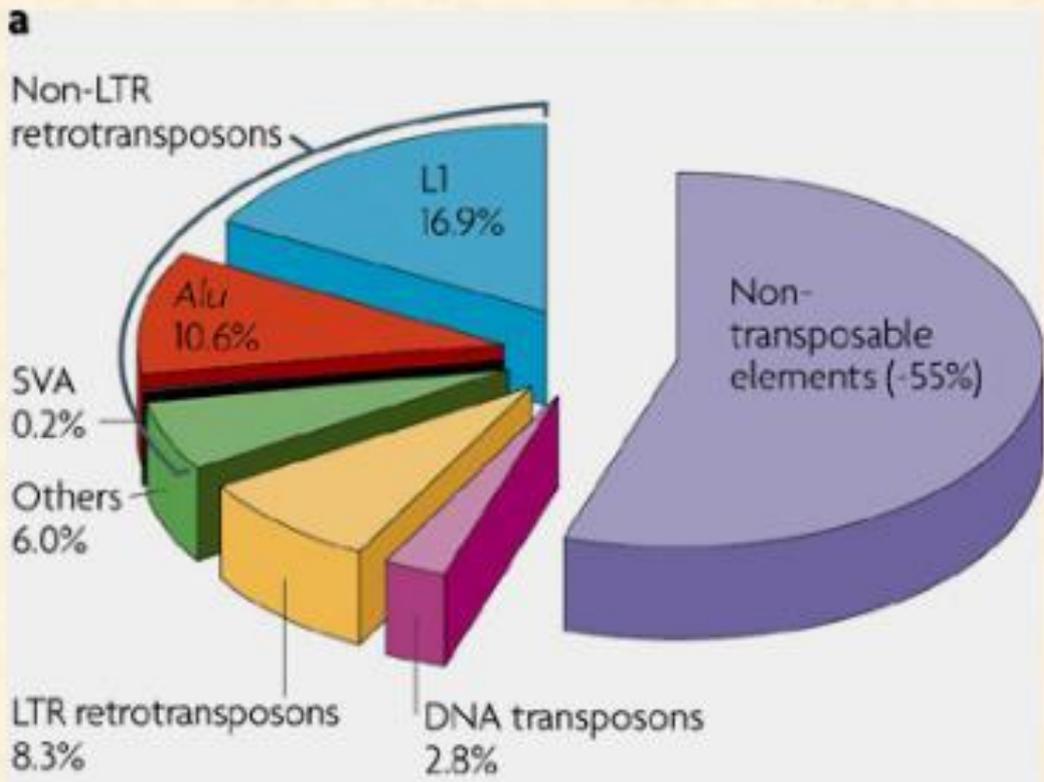
Геномика и протеомика

Лекция 4. Мобильные элементы: невирусные ретротранспозоны (бакалавры)

Составитель: проф. М.Р. Шарипова

Классификация мобильных элементов





Вклад мобильных элементов в геном человека

Невирусные ретротранспозоны

Невирусные ретротранспозоны в геноме млекопитающих: **LINE** и **SINE**

- **LINE: Long Interspersed Element** – длинные диспергированные элементы, длиной до 6 кб, образуют 10 подсемейств
(в геноме человека 600 000 сайтов LINE)
- **SINE: Short Interspersed Element** - короткие диспергированные элементы, длиной 300 п.о., образуют одно большое семейство
(в геноме человека 1 500 000 сайтов SINE)

Распространение в геномах

- **Невирусные ретротранспозоны** встречаются у простейших, насекомых и растений, но в изобилии - в геномах высших эукариот и являются характеристикой геномов высших
- **Невирусные ретротранспозоны** накапливались в геномах высших эукариот в процессе эволюции путем копирования последовательностей и включения их в новые сайты

Способность к перемещению в геноме

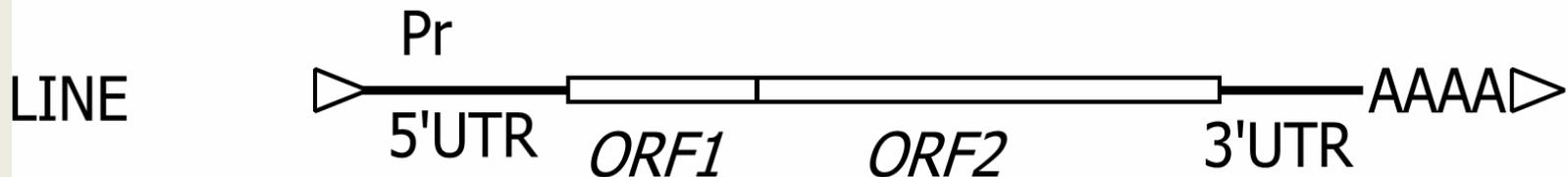
Невирусные ретротранспозоны подразделяют:

автономные – кодируют ферменты, необходимые для ретротранспозиции

неавтономные – не кодируют ферменты для перемещения в геноме

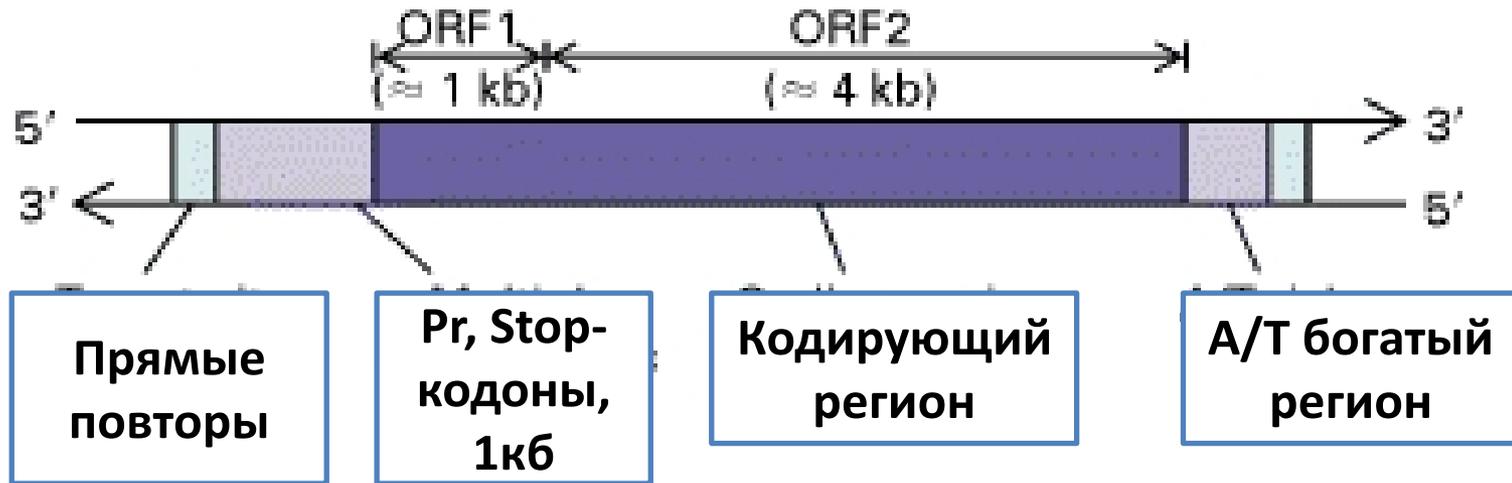
- **LINE** элементы являются автономными ретротранспозонами, которые кодируют ферменты для собственного передвижения
- **SINE** элементы принадлежат к неавтономным ретроэлементам и зависят от активности белков, кодируемых LINE элементами

- Общая схема LINE:



- Среди LINE наиболее известен **L1**, он впервые обнаружен при анализе ДНК человека с генетическим наследственным заболеванием
- Обычно **L1** у таких пациентов включен в ген, что вызывает отклонение, но отсутствует у обоих родителей

Структура L1



L1 - длина 6 kb:

5' нетранслируемый регион – Pr-промотор для РНКП II

Кодирующий регион включает 2 рамки считывания:

- **ORF1** кодирует РНК-связывающий белок
- **ORF2** кодирует эндонуклеазу с активностью обратной транскриптазы

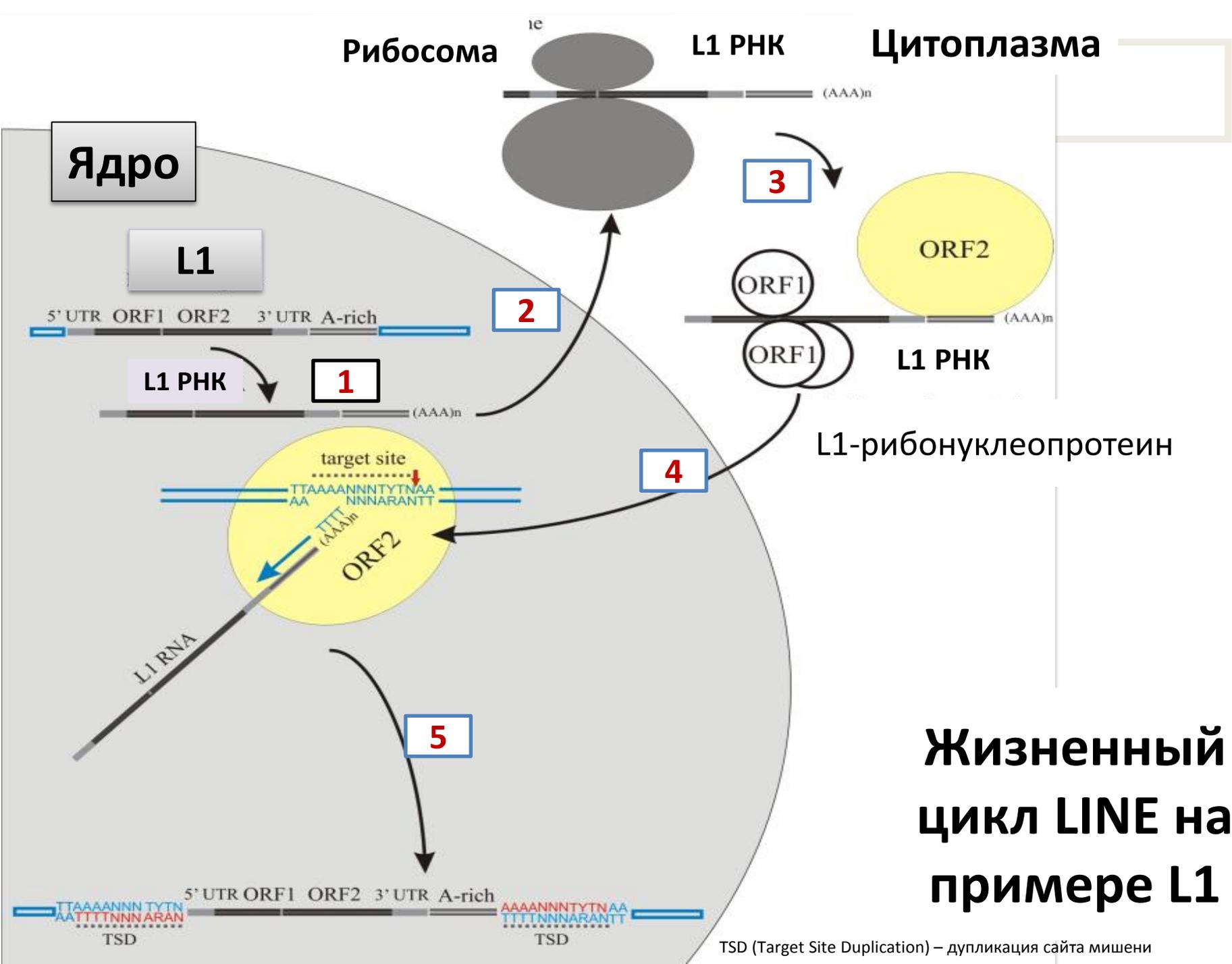
На 3'-конце - A/ T-богатая область

Ретротранспозон L1 :

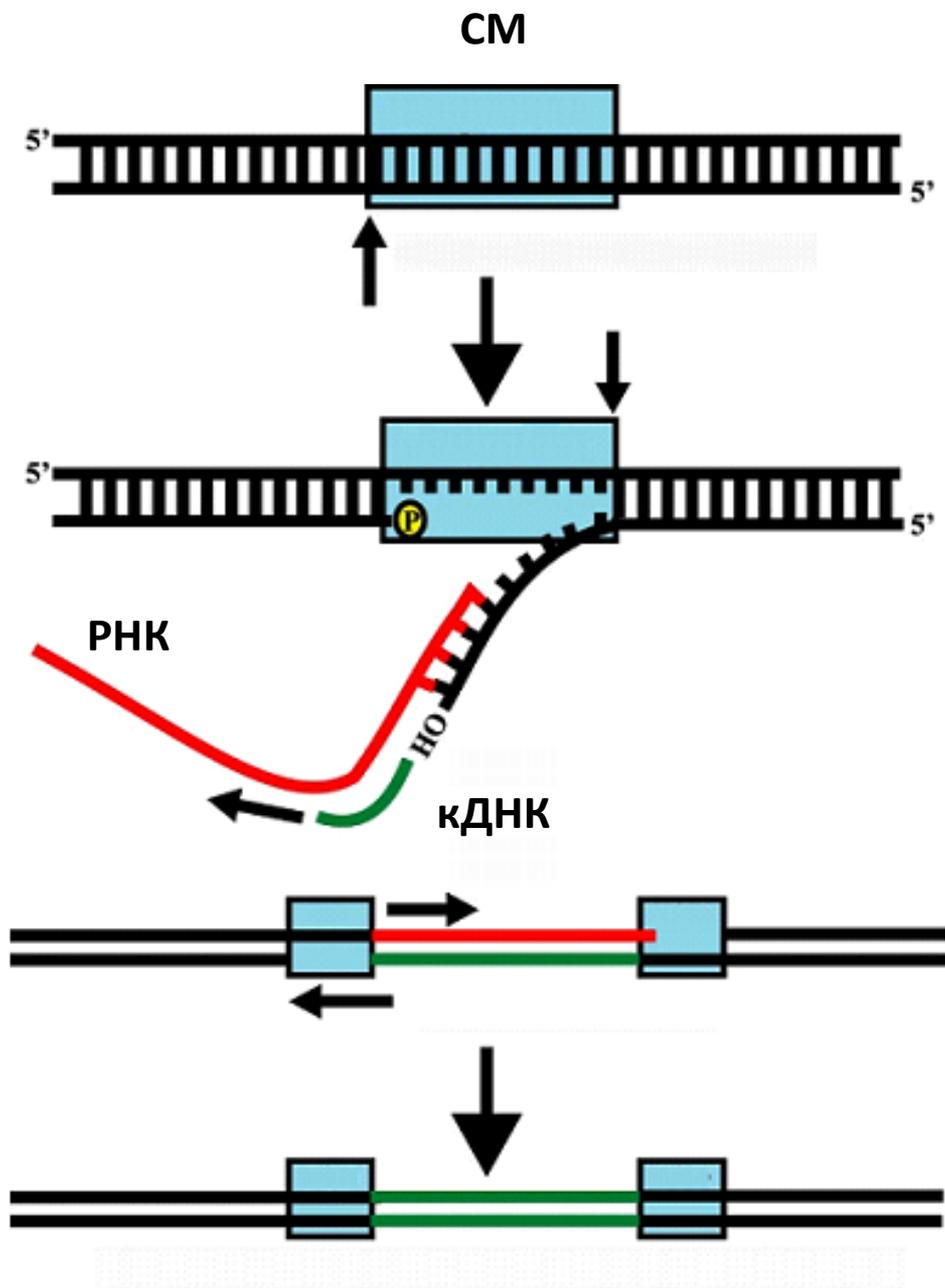
- **L1** - в геноме человека выявлены более 500 000 копий L1, что составляет до 17% от ДНК генома человека
- Большинство **L1** в геноме человека функционально не активны, они укорочены с 5'-конца, имеют внутренние перестановки или мутации, и только до 80 копий на 1 ядерный геном способны к перемещению
- **L1 является основным источником обратной транскриптазы в геноме человека**

L1/Homo sapiens (L1/Hs):

- Клонированы полноразмерные "активные" копии **L1/Hs** и определены их структурные характеристики
- Активные L1 способны вызывать мутации, наследственные заболевания
- Неактивные копии обеспечивают полиморфизм ДНК и являются сайтами для рекомбинации, приводящей к перестройкам - делециям или вставкам



TSD (Target Site Duplication) – дупликация сайта мишени



Обратная транскрипция сопряжена с узнаванием места встраивания L1

Транспорт

L1-рибонуклеопротеина

в ядро:

- Диссоциация ORF1 белка

- Поиск сайта встраивания

- Разрезание сайта

встраивания, гибридизация

polyA хвоста РНК с олигоТ

сайта встраивания

- Старт ОТ, элонгация кДНК

- Разрезание верхней нити

в CM

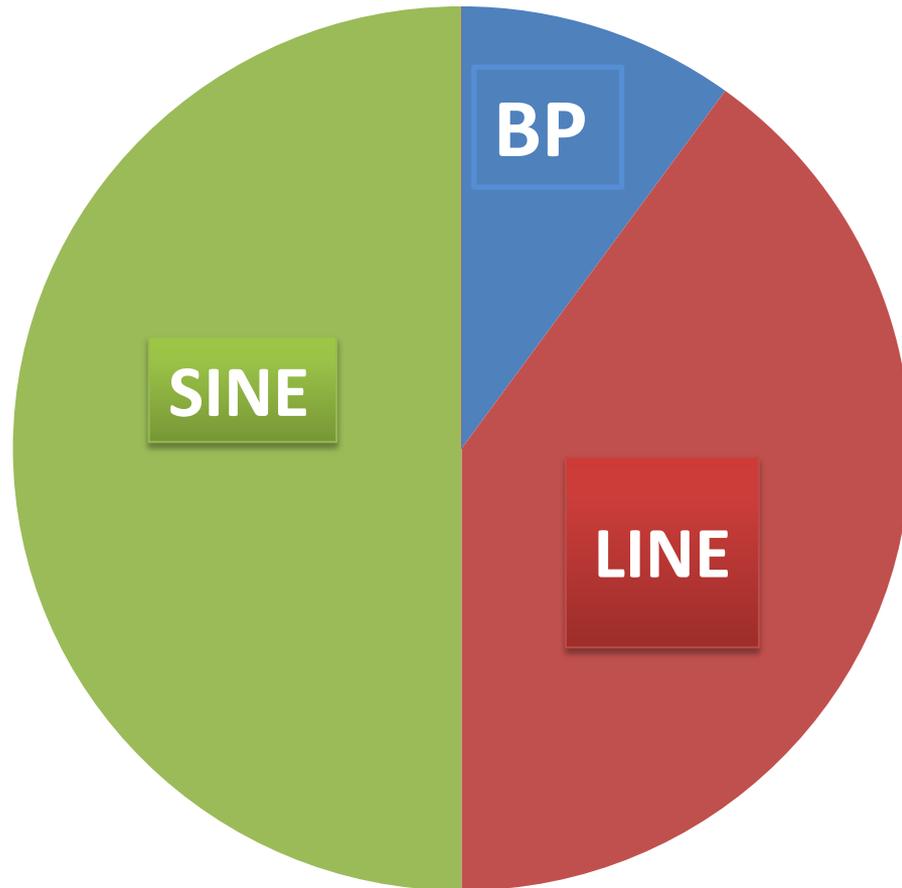
- Завершение синтеза

второй цепи кДНК,

репарация дупликации

сайта встраивания.

Соотношение между ретротранспозонами в геноме человека



Сиквенс показывает преимущественное распространение невирусных ретротранспозонов в геномах высших

Количественное преимущество невирусных ретротранспозонов должно отражаться на структуре и функции генома

L1 в геноме человека:

- **L1 максимально активен в нервных клетках головного мозга (86,1 млрд нейронов и 84,6 млрд нейроглии)**
- Регионы мозга характеризуются высоким содержанием соматических вставок **L1** - количество достигает **до 800 копий на 1 клетку мозга**
- Передвижение **L1** происходит в активно транскрибируемых областях ДНК головного мозга (гены рецепторов и регуляторов синаптической передачи)
- От ретротранспозиции мобильных элементов в тканях головного мозга могут зависеть индивидуальные личностные характеристики, особенности характера, адаптивные реакции
- Активные **L1** обнаружены в соматических тканях человека: скелетных мышцах, сердце и печени,

Новая концепция молекулярных основ высшей нервной деятельности

Ретротранспозиция L1 обеспечит каждому нейрону индивидуальный транскриптом в зависимости от места встраивания в геноме



Это приведет к уникальной комбинации нейронов для каждого индивида



Формирование уникальных нейронных сетей лежит в основе индивидуальности поведения

Активность L1 связана с патологией:

- Это показано для ряда неврологических заболеваний (включая шизофрению)
- Высокая активность L1 характерна для линий раковых клеток

Механизмы в основе L1-патологии:

- Активные L1 способны встраиваться в новые сайты и вызывать мутации
- Эндонуклеаза ретротранспозона L1 может вызывать одноцепочечные разрывы ДНК
- Нетранслируемая область L1 способна влиять на транскрипцию соседних генов
- Тандемы из неактивных копий L1 могут приводить к ошибкам в рекомбинации

LINE связывают со старением организма

- Повышение активности L1 наблюдается в стареющих тканях: увеличивается частота повреждений ДНК и мутагенеза, вызванных L1
- Активность L1 повышается в стареющем мозге и способствует развитию возрастных патологий, связанных со старческим слабоумием

Защита генома от L1:

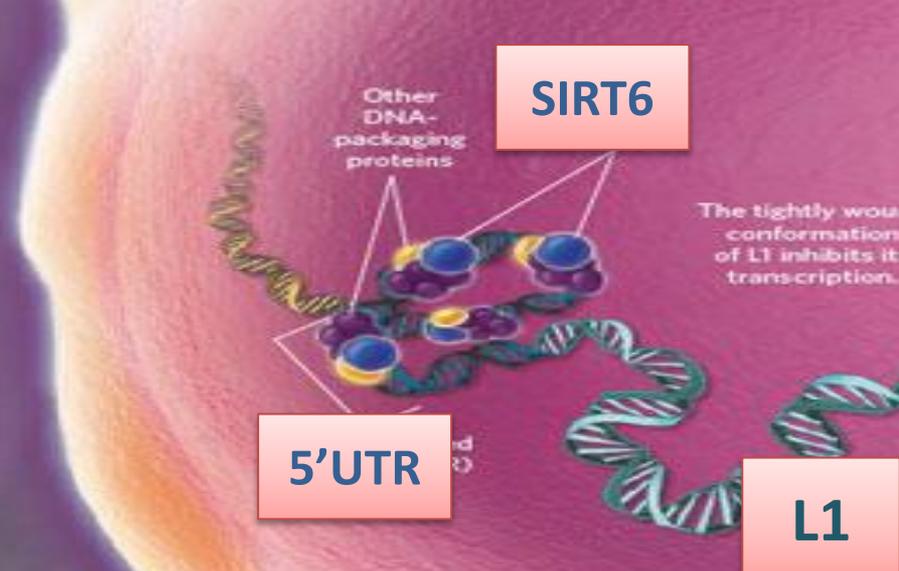
- В клетках имеются механизмы для подавления ретротранспозиции и активности L1
- Каждому из этапов жизненного цикла L1 препятствуют факторы генома-хозяина:
 - подавление экспрессии генов
 - механизмы защиты от вирусов
 - miРНК
 - активация аутофагии

Подавление экспрессии L1:

- В молодых клетках белок SIRT6 играет ключевую роль в поддержании неактивного состояния L1 путем упаковки ретротранспозонов в недоступный для транскрипции гетерохроматин
- Белок SIRT6 связывается с промотором L1 и запускает сборку белков гетерохроматина в этом регионе
- Дополнительно хроматин подвергается эпигенетическим модификациям, которые также блокируют экспрессию L1
- Когда белок SIRT6 покидает L1, промотор освобождается и начинается экспрессия ретротранспозона

nuclear element-1 (LINE-1 or L1) retrotransposons, with more than 500,000 copies throughout its length. While most of these are inactivated as a result of mutation, some 100 or so L1 elements retain their ability to copy and paste themselves among the chromosomes, posing diverse dangers to our cells and possibly contributing to age-related deterioration.

SIRT6, an enzyme encoded by a well-known longevity-related gene, represses the expression of L1 by binding to the 5' untranslated region (5' UTR) of the retrotransposons and packaging them into transcriptionally repressive heterochromatin.



Старые клетки

Молодые клетки



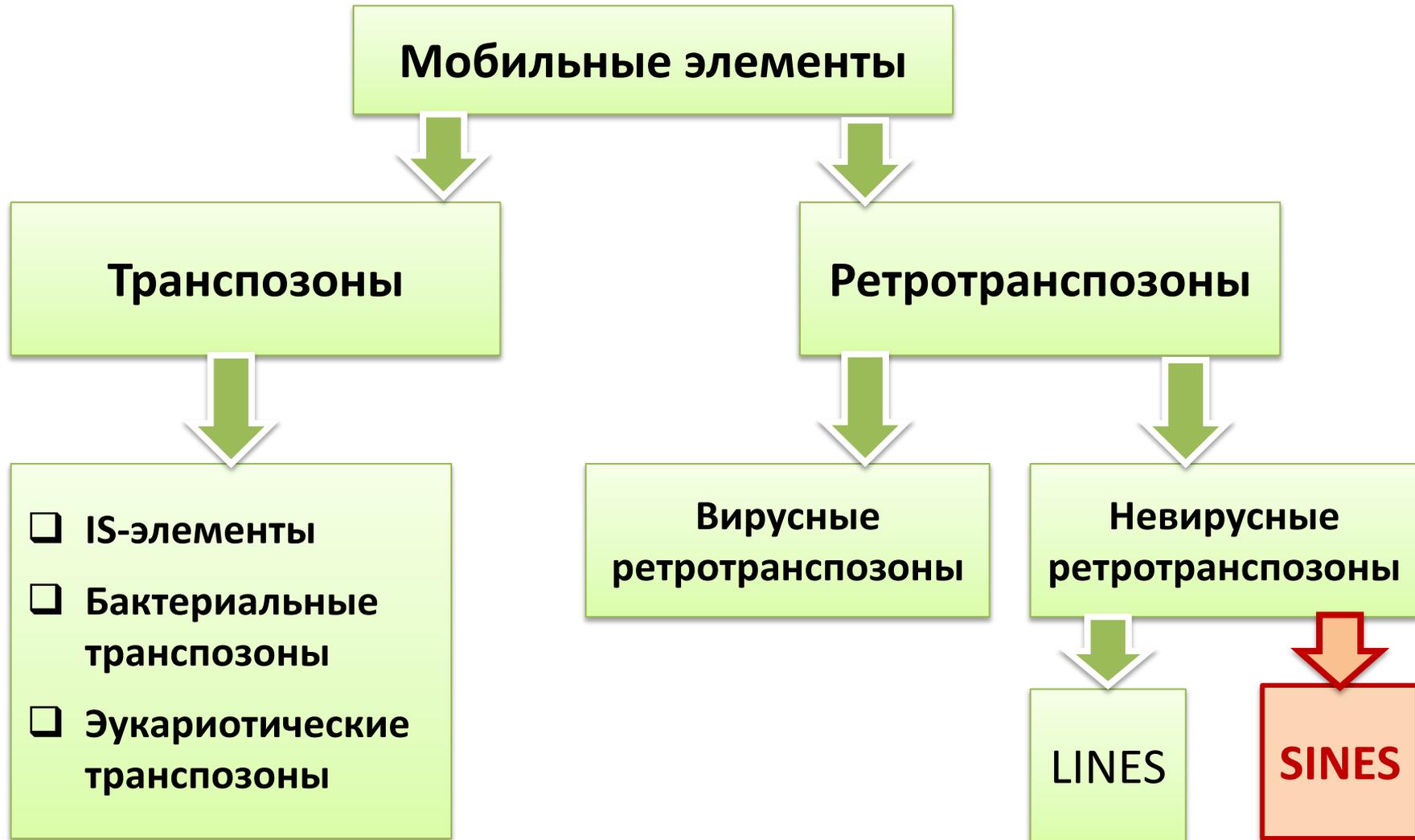
SIRT6 освобождает L1

In older cells, SIRT6 levels are depleted from the genome, perhaps as a result of the damage to the site of DNA damage. In the repair process, the repair becomes transcriptionally active.

Поиск путей для подавления ретротранспозиции L1

- Гиперэкспрессия гена белка **SIRT6**
- Использование **ингибиторов** обратной транскриптазы
- Повышение активности белка **SIRT6** на терапевтическом уровне - низкокалорийная диета, снижение употребления глюкозы, повышение биодоступности NAD⁺ (никотин-амид-адениндинуклеотид)

Классификация мобильных элементов

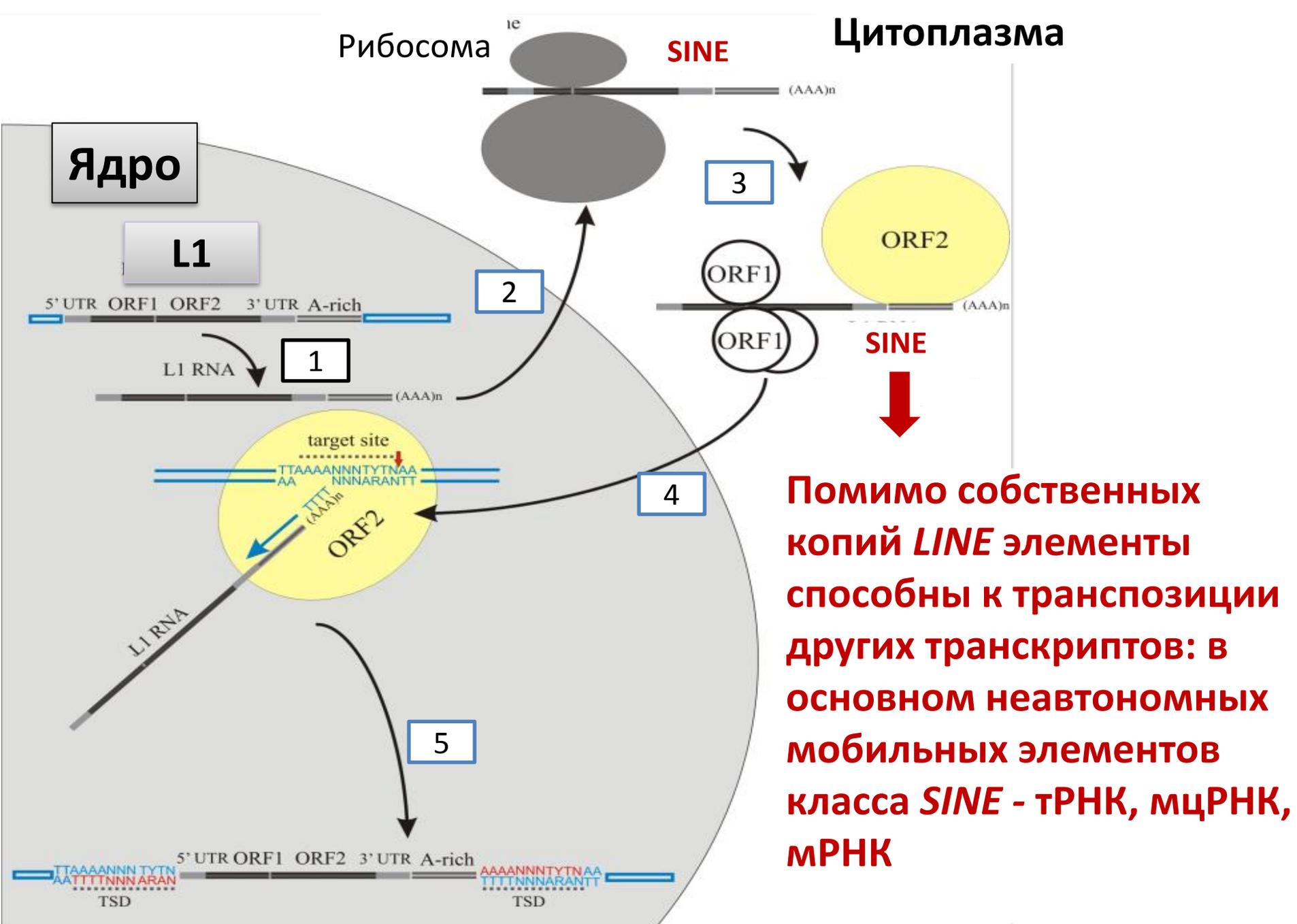


SINE - ретротранспозоны

- В геномах эукариот обнаружены передвигающиеся ДНК-копии разных типов клеточных РНК – это **SINE-ретротранспозоны**:

тРНК, мцРНК (7SL РНК, 4.5S РНК), мРНК

- В геномах эукариот наряду с переносом информации от ДНК к РНК происходит обратный процесс, от РНК к ДНК, т.е. ее возвращение в геном в виде ретротранспозонов
- У млекопитающих мощность встречного потока информации от РНК к ДНК составляет >10% от геномной ДНК



Помимо собственных копий *LINE* элементы способны к транспозиции других транскриптов: в основном неавтономных мобильных элементов класса *SINE* - тРНК, мцРНК, мРНК

Гомология SINEs и мц РНК у грызунов



Соотношение длины различных типов ретротранспозонов

Ty1 / copia retrotransposon



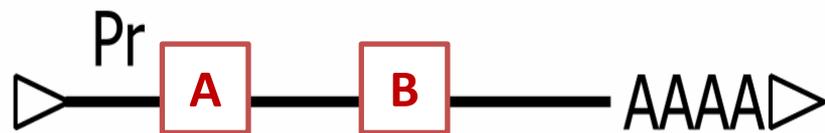
LINE



SINE



- **SINE** относятся к наиболее высококопийным диспергированным повторам в геноме (**1.5 млн**)
- Структура **SINE** отличается вариабельностью, т.к. для обратной транскрипции используются различные РНК – тРНК, мРНК, рРНК, мцРНК
- Общая схема строения **SINE**:

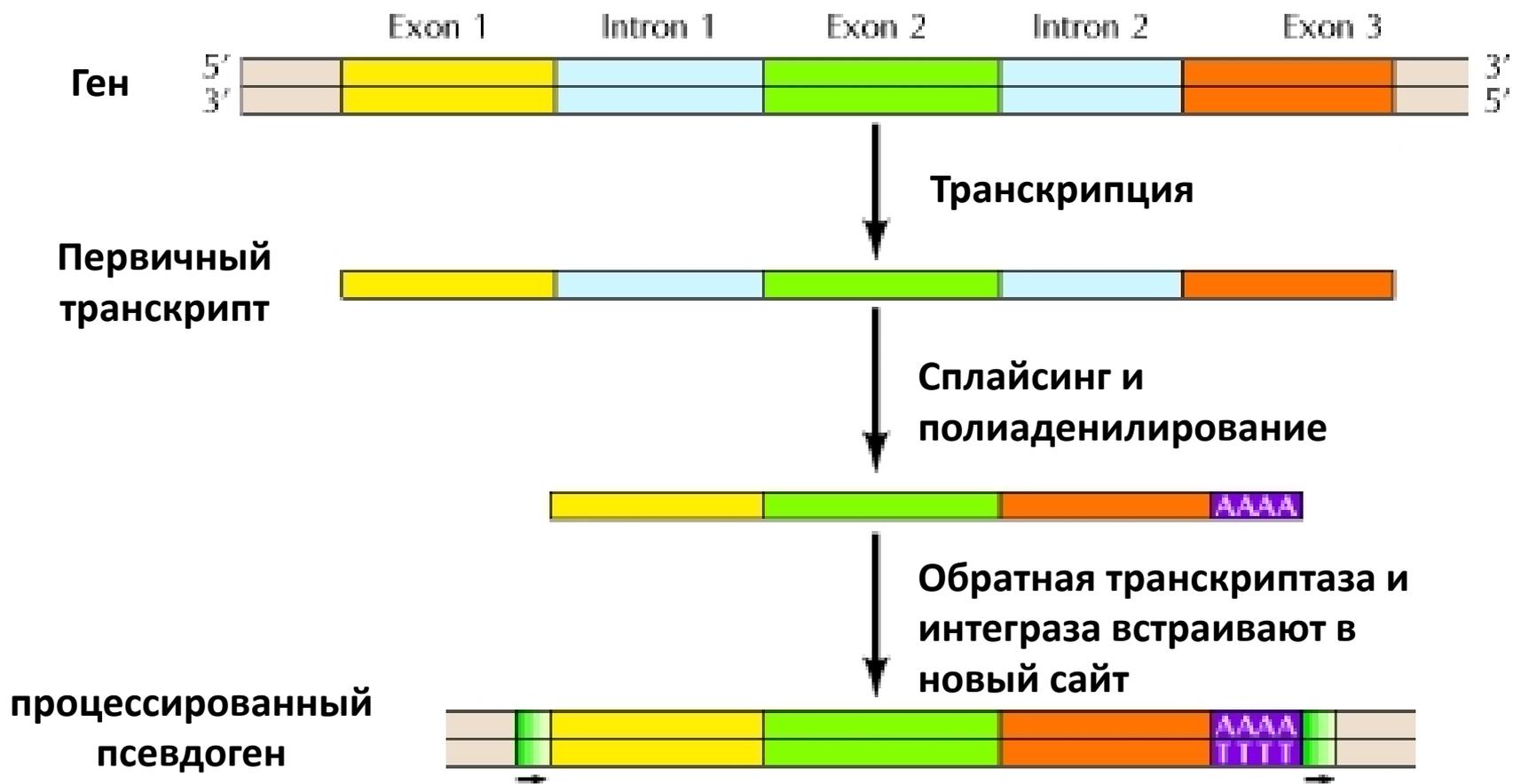


- ✓ **SINE** окружены прямыми повторами: - ▷
- ✓ Содержат A/T область на 3'-конце
- ✓ Не содержат генов белков для транспозиции
- ✓ Содержат внутренние промоторы **A**- и **B**- области

- К **SINE** относят процессированные псевдогены, ДНК-копии мРНК после сплайсинга и полиаденилирования. **Они не содержат интроны и содержат poly(A) на 3'-конце.**
- Матрица для копирования – зрелая мРНК, которая часто содержит стоп-кодоны и делеции
- Фланкированы короткими прямыми повторами- это СМ для встраивания в геном

**процессированные
псевдогены**





Формирование процессированного псевдогена. Ген содержит три экзона и два интрона, которые удаляются при сплайсинге и к 3'-концу мРНК добавляется поли(А)-последовательность.

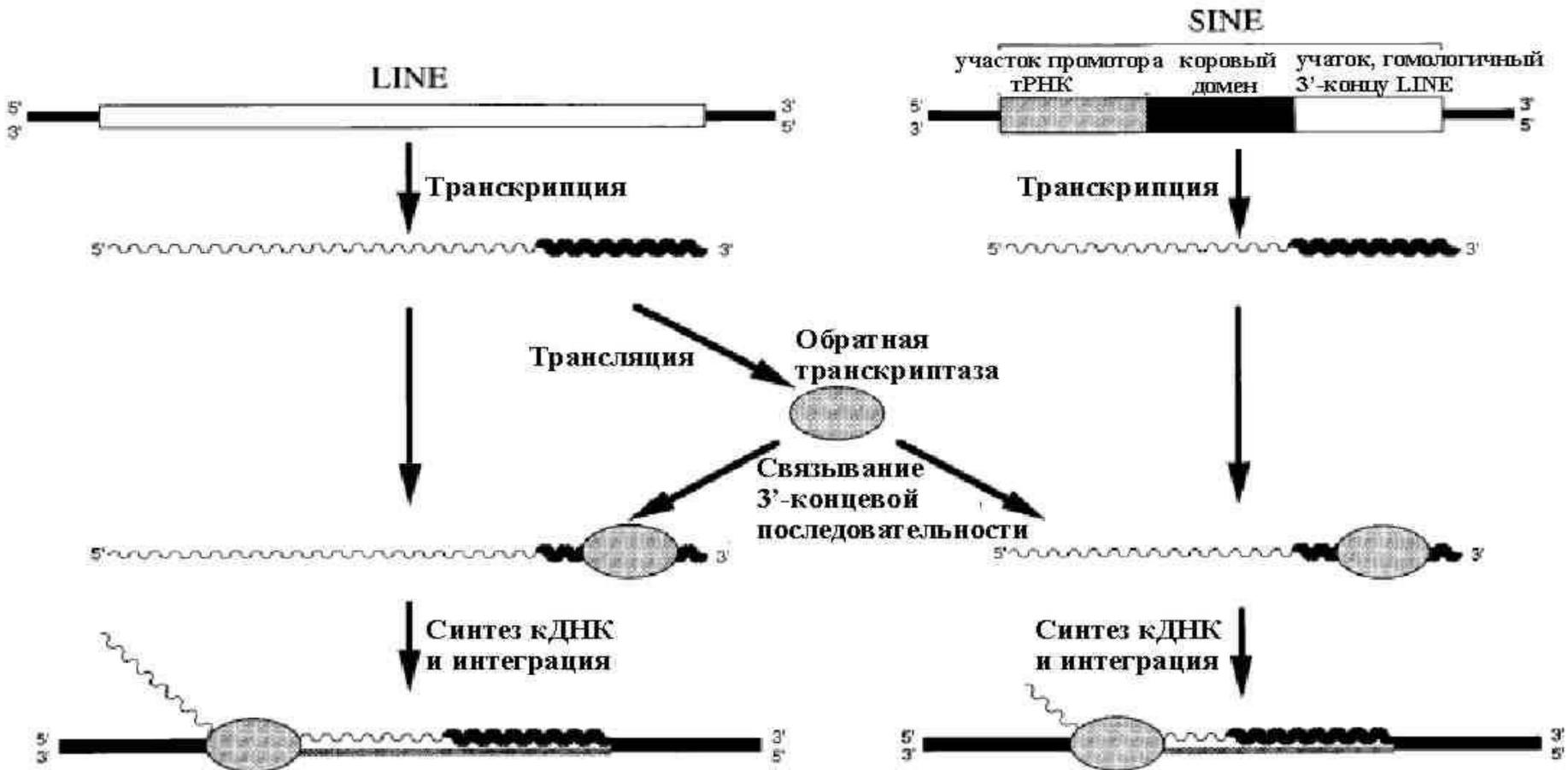
Обратная транскрипция и интеграция способствуют встраиванию псевдогена в геном, короткие прямые повторы в сайте встраивания образуются во время интеграции.

Ретрогены

- Если SINE-ретротранспозон правильно процессирован и его ДНК-копия содержит открытую рамку считывания, то после транскрипции и трансляции возможна его экспрессия
- Такие SINE-ретротранспозоны называют ретрогенами

Транспозиция SINE

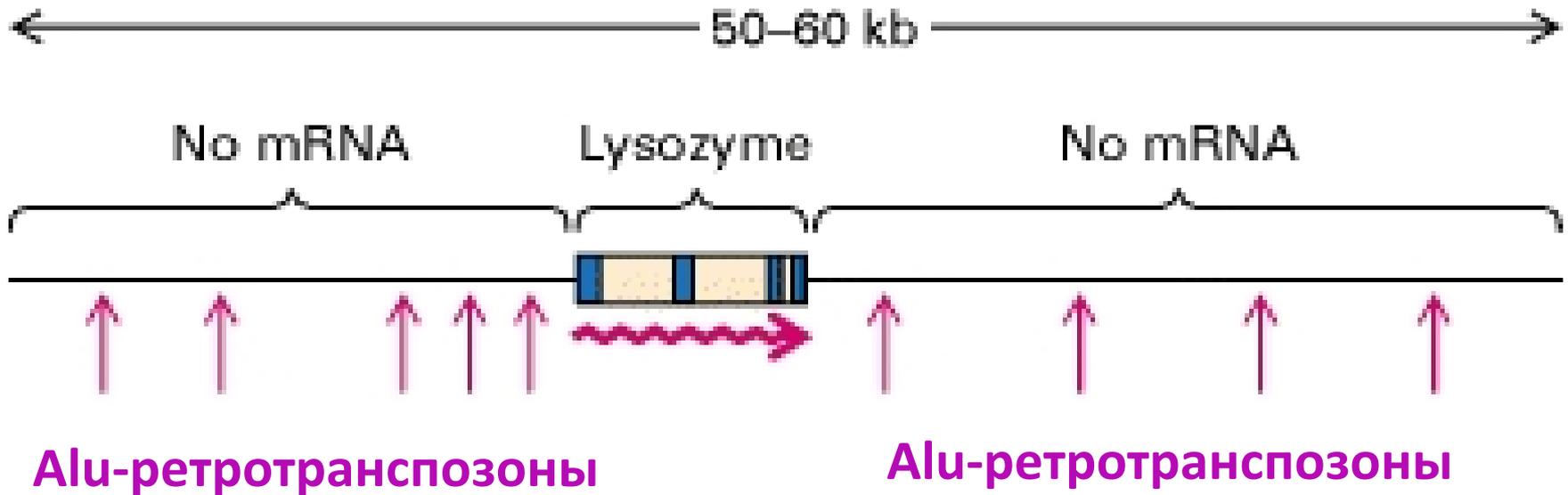
1. **SINE – это** неавтономные элементы, используют жизненный цикл LINE для транспозиции
2. В отличие от **LINE**-элементов **SINE** транскрибируются РНКП III (А и В промоторы).



Alu-элементы (SINE)

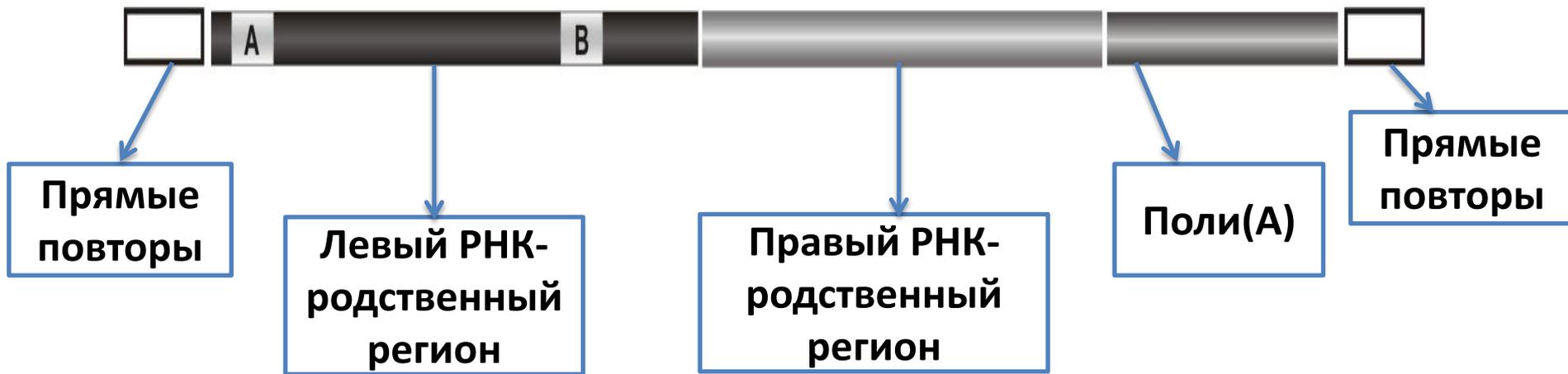
- ❑ **Alu** широко представлены в геноме человека - **1 000 000 сайтов (10% от генома)**
- ❑ **Alu** содержат сайт для рестриктазы **Alu 1**
- ❑ **Alu** локализованы преимущественно рядом с генами, в интронах, сателлитах, в кластерах генных семейств в межгенных участках
- ❑ **Все Alu-элементы гомологичны генам 7SL РНК**, в геноме человека 3 функционально-активных генов 7SL РНК
- ❑ **Alu** впервые обнаружены при анализе ДНК пациента с нейрофиброматозом, у которого произошла мутация в NF-гене

Ген лизоцима и его окружение

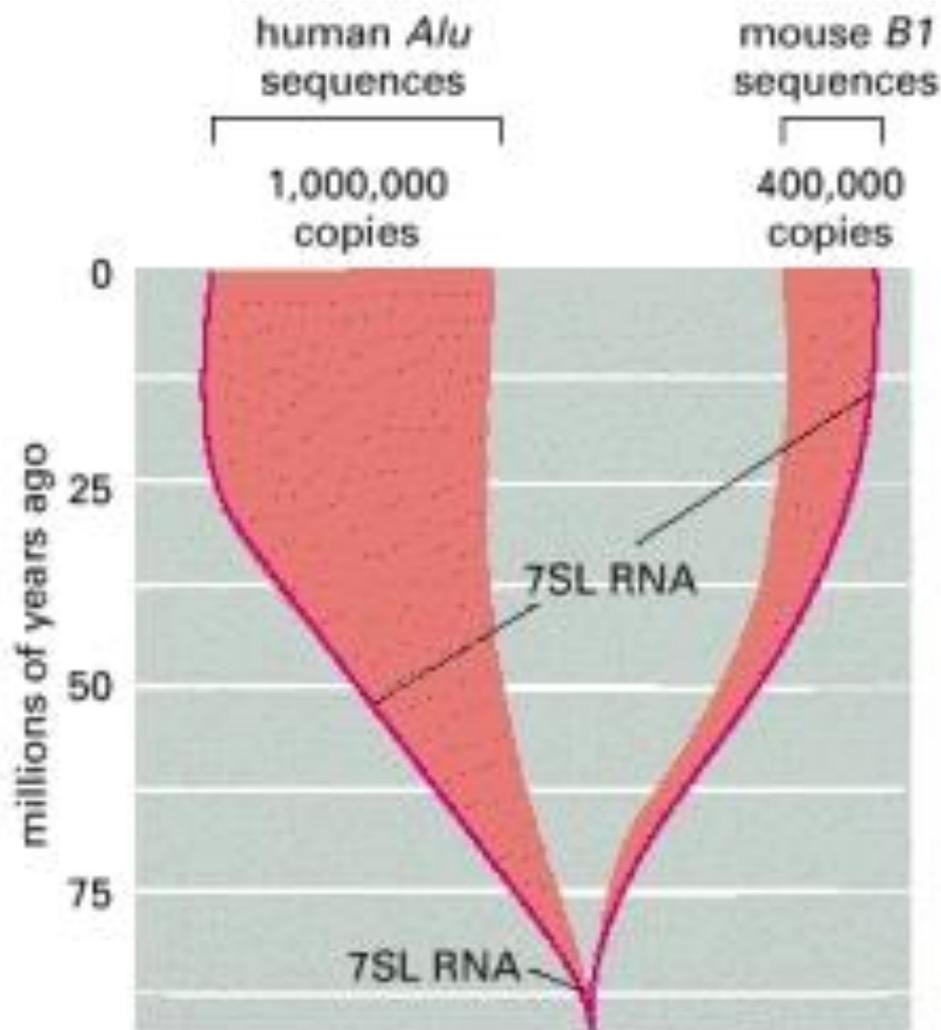


Одиночный ген лизоцима (15 kb) и его окружение в геноме цыпленка, состоит из 4-х экзонов (синие) и 3-х интронов (светлые), красные стрелки указывают на повторы Alu-ретротранспозонов в окружении гена

Alu-элемент



Alu-элемент состоит из двух 7SL РНК-подобных, но различающихся мономеров (левое и правое плечи), соединенных А-богатым линкером, который образовался при слиянии «голова к хвосту» двух различных **Alu**-мономеров



Экспансия геномов

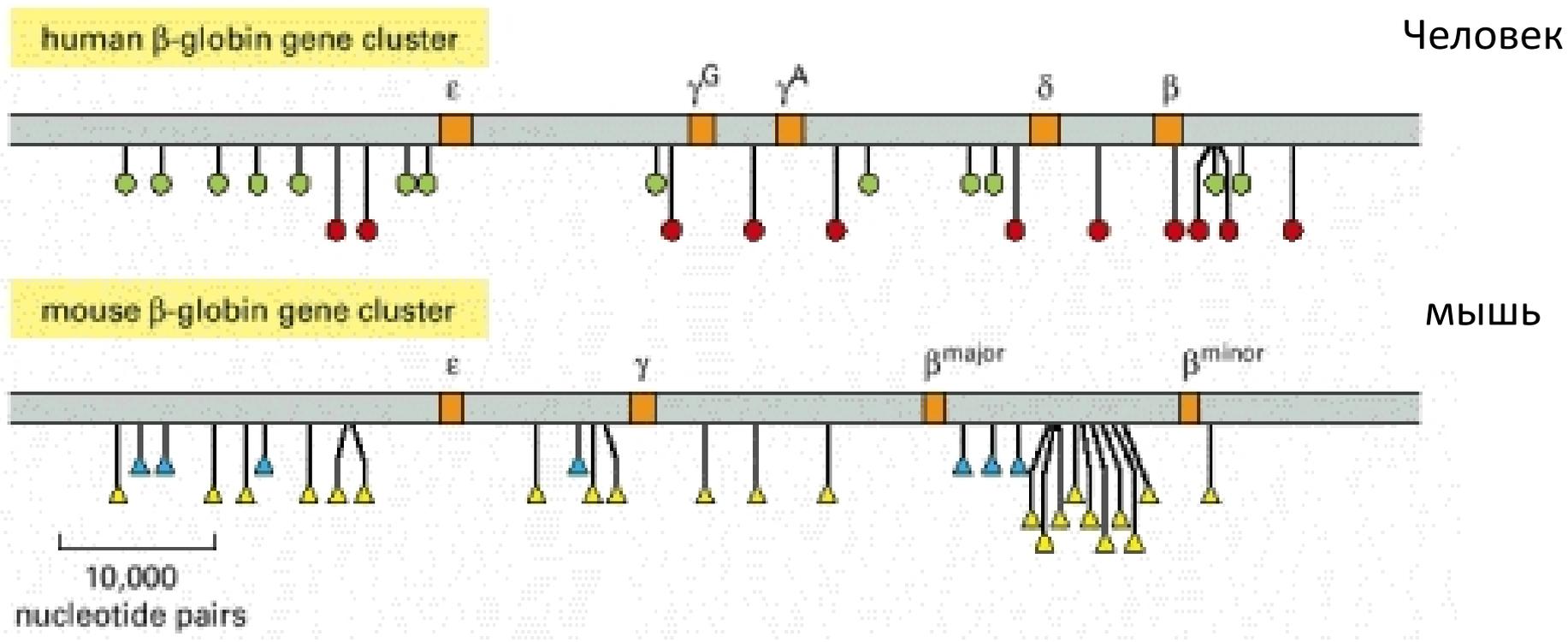
человека и мыши

Alu and **B1** элементами, оба эволюционируют от гена 7SL РНК, который кодирует мц РНК.

Оба, **Alu** and **B1** элементы, многократно копируются независимо от природы генома

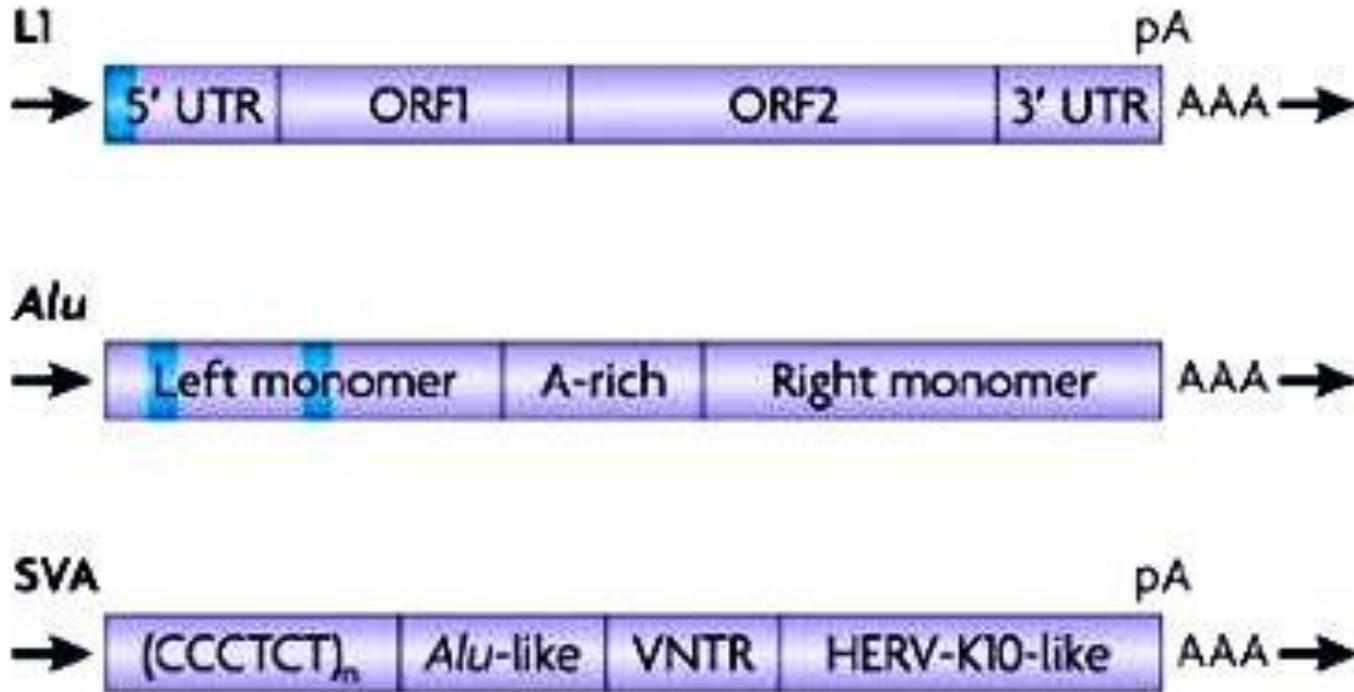
Alu-элементы de novo появляются с высокой частотой: геном одного из 20 новорожденных будет нести новую инсерцию **Alu**, в то время как новая инсерция **LINE (L1)** появляется в геноме одного из 50 новорожденных.

Сравнение локализации Alu и L1 в бета-глобиновом кластере генов человека и мыши



- У человека: Alu зеленые, L1 красные (13:11)
- У мыши: B1 (Alu) голубые, L1 желтые (7:22)

SVA — ретротранспозоны



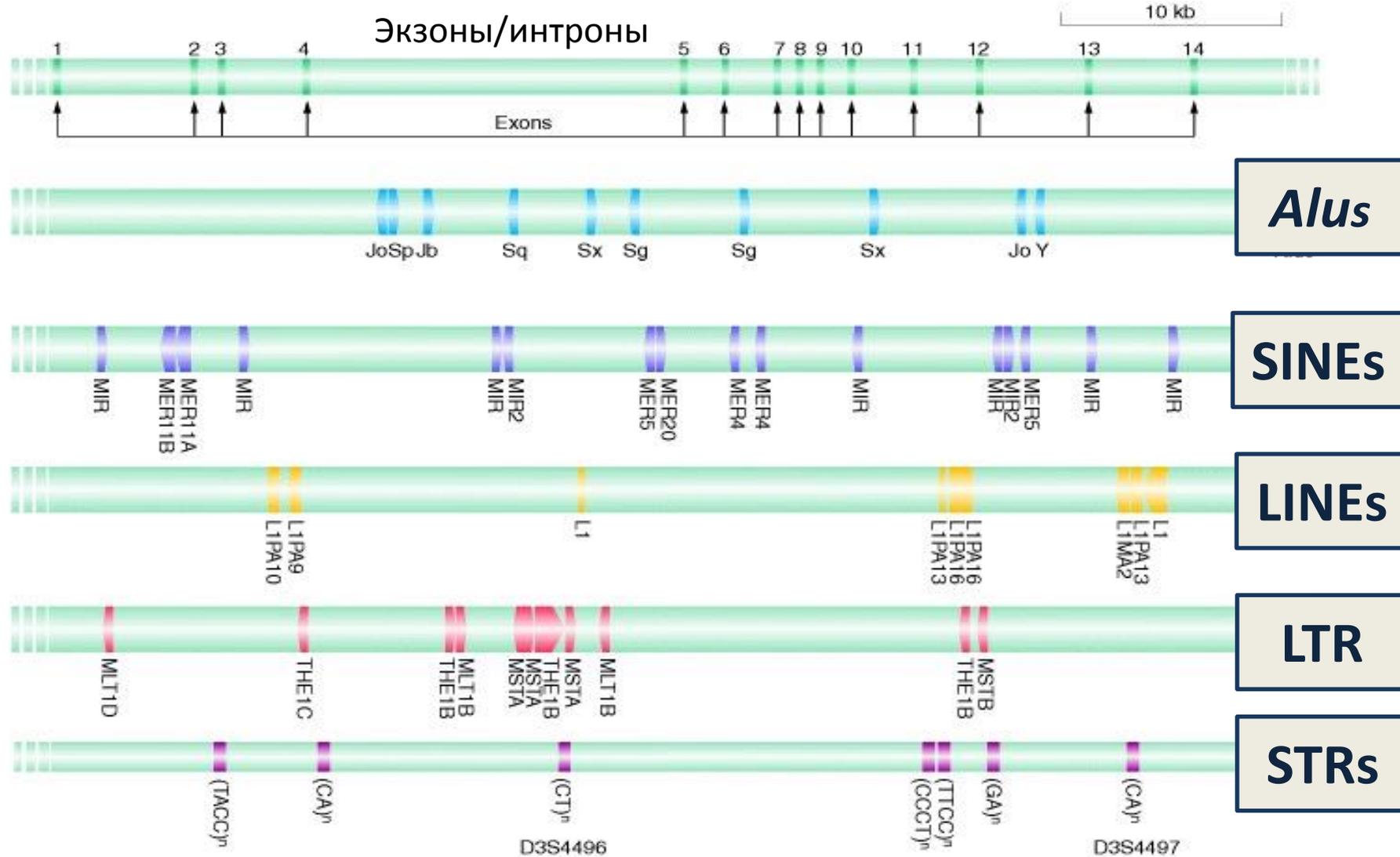
SVA-ретротранспозоны включают СТ-богатый повтор, Alu-последовательности, тандемные повторы (*Variable number of tandem repeat, VNTR*) и короткие элементы SINE

Роль SINE в геноме

- **SINE в геноме** – это источник miРНК, которые являются ключевыми регуляторами экспрессии генов
- **SINE** в 5'- области генов могут влиять на транскрипцию генов хозяина за счет внутренних промоторов
- **SINE** в 3'-нетранслируемой области генов также могут влиять на регуляцию транскрипции, ограничивая уровень синтеза белка
- **SINE** – это компоненты механизмов транскрипции, важные функциональные составляющие аппарата регуляции генома млекопитающих

Соотношение различных типов МЭ, от которых произошли гены miRNA





Повторяющиеся элементы в структуре гена HGO, кодирующего диоксигеназу: **14 экзонах, 13 интронах, 10 Alu, 16 SINE, 10 LINE, 12 LTR, 7 сателлитов = 82 компонента**

Значимость для медицины

- По состоянию на 2012 год задокументировано 96 различных заболеваний человека, причиной которых является встраивание *de novo* мобильных генетических элементов.
- Alu-повторы часто вызывают хромосомные aberrации и является причиной 50 разновидностей заболеваний.

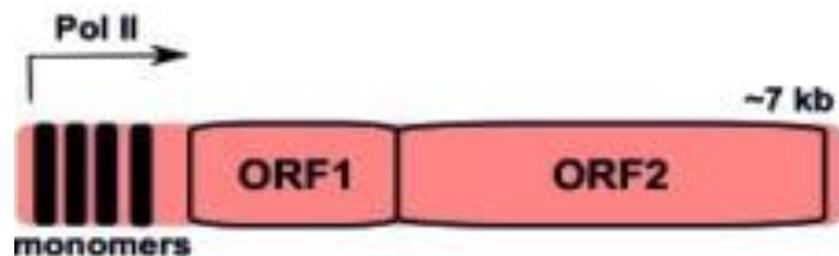
Доля мобильных элементов в геномах

Мобильные элементы накапливаются в геномах и становятся структурными элементами геномов:

- у нематод ~10% генома
- у рыб ~15% генома
- у курицы ~23% генома
- у мыши ~45% генома
- у приматов ~ 50% генома
- человека ~ 50% генома
- у высших растений до 90% генома может состоять из мобильных элементов

LINE retrotransposons

Mouse LINE-1

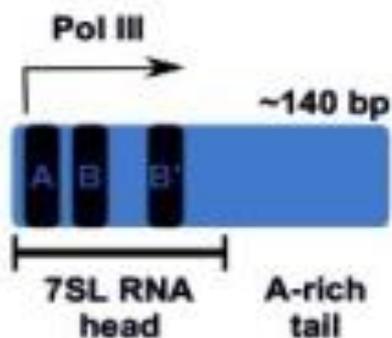


Human LINE-1

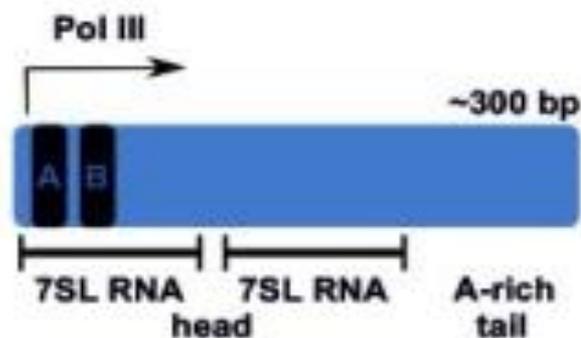


SINE retrotransposons

Mouse B1

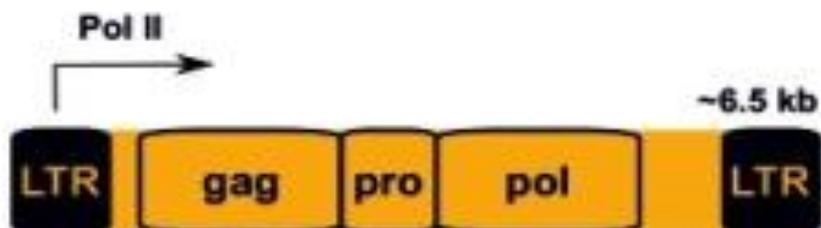


Human Alu

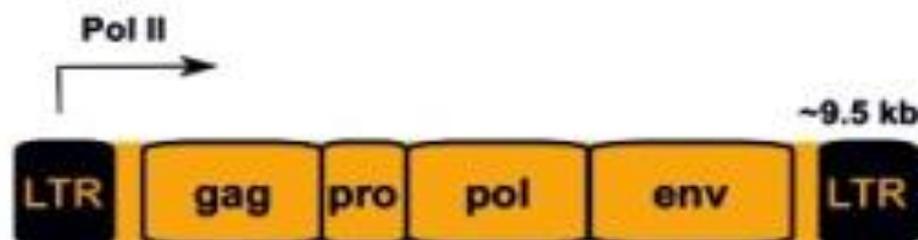


LTR retrotransposons

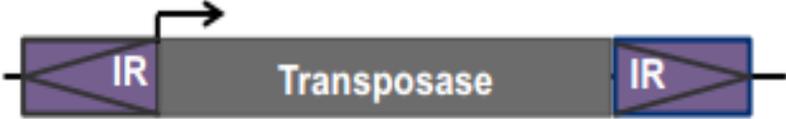
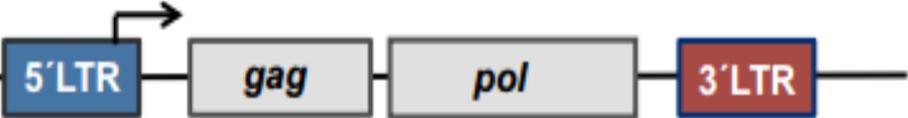
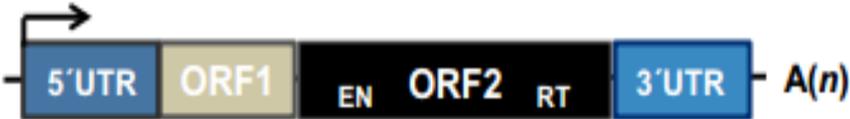
Mouse IAP



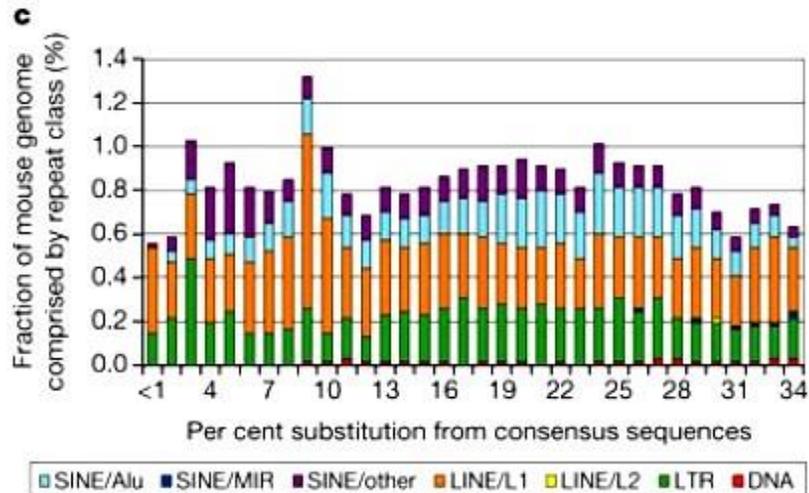
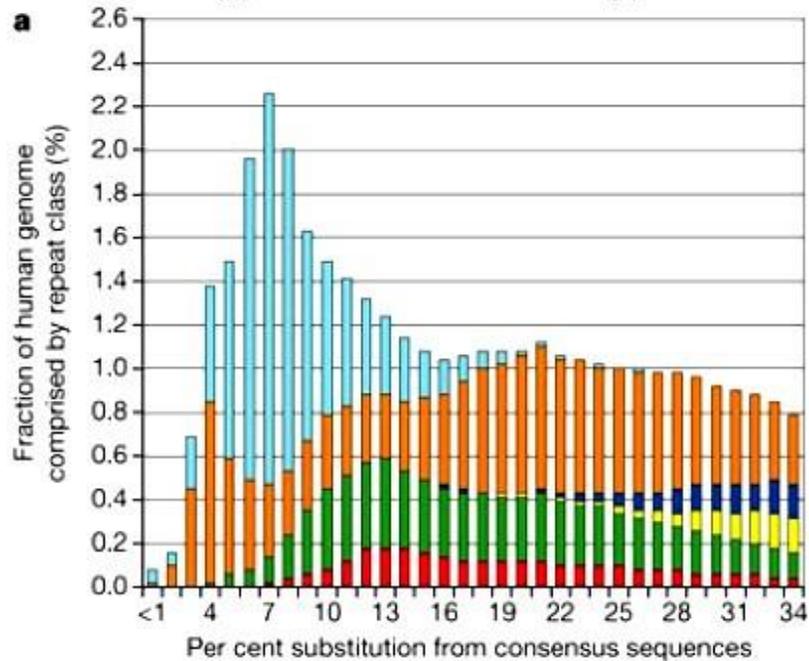
Human HERVK (HML2)



Соотношение разных типов мобильных элементов в геномах человека и мыши

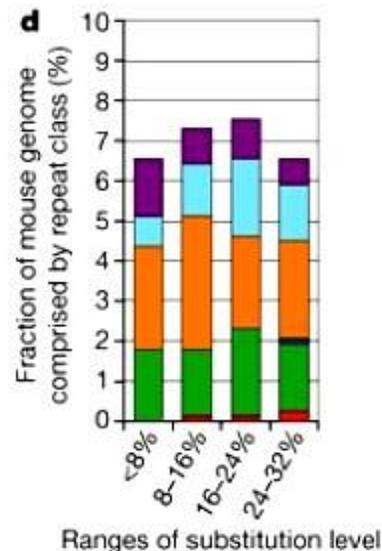
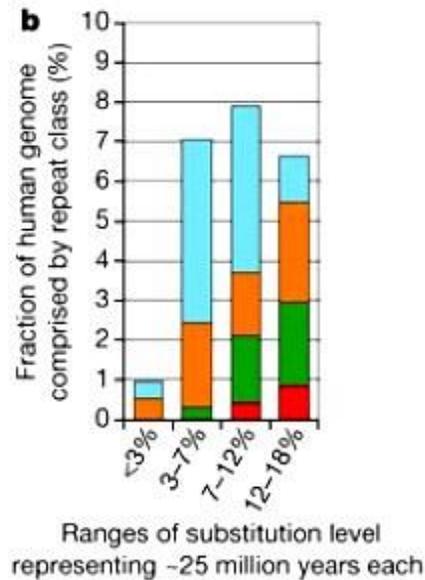
		% Human genome	% Mouse genome
DNA transposons		3	1
LTR retrotransposons (ERVs)		8	10
Non-LTR retrotransposons			
LINE-1		17	19
SINE		13	8
		<hr/> 41%	<hr/> 38%

Человек



Мышь

Человек



Мышь

Мобильные элементы в геноме человека и мыши

- Состав и количество мобильных элементов сильно варьирует не только между различными таксонами, но и между близкородственными видами и даже между представителям и одного и того же вида.

Контроль мобильных элементов клеткой

В дифференцированных соматических клетках активность мобильных элементов находится под жестким контролем со стороны различных клеточных систем:

- **Метилирование CpG** - блокируется транскрипция
- **Незавершённая транскрипция** - нефункциональная РНК
- **Гетерохроматинизация** - блокируется транскрипция
- **РНК-интерференция** - деградация РНК
- **Деградация однонитевой ДНК** - деградация продуктов обратной транскрипции
- **Отсутствие сигнала полиаденилирования** - не стабильная РНК

Значимость МЭ:

1)

Ретротранспозиция ведет к увеличению генома и формированию некодирующей части генома

Наиболее «древние» неактивные ретротранспозоны являются структурными компонентами геномов

Размеры геномов растений и доля мобильных элементов в них

Вид растений	Размер генома, п.н. (× 10 ⁶)	Содержание МЭ, %
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125	14
<i>Oryza sativa</i> (рис)	389	34
<i>Vitis vinifera</i> (виноград)	487	41
<i>Glycine max</i> (соя)	1100	59
<i>Triticum aestivum</i> (пшеница)	17000	88

- У растений с большим размером генома, как пшеница, гены организованы в виде генных островков, окруженных МЭ.
- Генные островки не обнаружены у растений с маленьким размером генома – *Arabidopsis thaliana*
- В основе увеличения размеров геномов растений лежит амплификация мобильных элементов
- LTR-ретротранспозоны являются наиболее представленным семейством МЭ в геноме растений

Взаимосвязь между МЭ и стрессовыми условиями

- Накапливаются данные об индукции МЭ в стрессовых условиях: уф-облучение, температура, химические соединения, вирусные, бактериальные и грибковые инфекции, голодание и рост на бедных средах - «вспышки транспозиций».
- Описаны молекулярные каскады клеточных стрессовых ответов, в которых особая роль принадлежит L1-элементу
- L1 активируется появлением повреждений ДНК, вызываемых генотоксическими факторами, и участвует в репарации таких повреждений.

Значимость МЭ:

2) МЭ участвуют в эволюции геномной регуляции

- Динамика включения соответствующих миРНК человека в базу данных **mirBase** свидетельствует о том, что МЭ являются главным и до сих пор недооцененным резервуаром миРНК
- РНК и белки МЭ, их промоторы и регуляторные сайты, miРНК-содержащие фрагменты способны влиять на экспрессию генов, модулировать регуляторные каскады и участвовать в эволюции путей регуляции

Значимость МЭ:

3) МЭ участвуют в образовании новых генов

Опыты по клонированию бета-глобиновых генов приматов позволили установить, что гены G_{γ} и A_{γ} произошли в результате неравного гомологичного кроссинговера между двумя L1 последовательностями

Значимость МЭ:

4) МЭ являются сайтами для гомологичной рекомбинации и участвуют в хромосомных перестройках

- Рекомбинации между двумя копиями одного и того же мобильного элемента в ДНК приводят к делециям, инверсиям, транслокации, дубликации.
- В эволюционном аспекте мобильные элементы добавляют пластичности геному

Значимость МЭ:

5) Стабилизирующая функция:

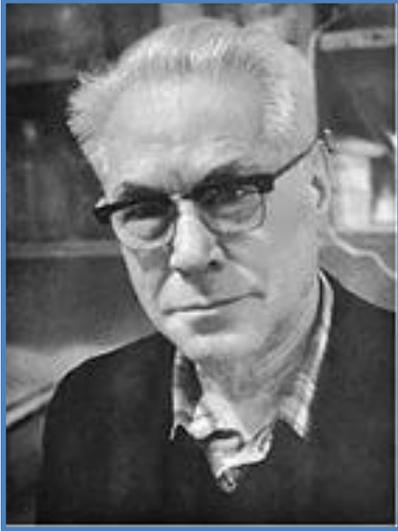
- выполняют роль теломер у дрозофилы
- участвуют в пространственной организации хроматина
- участвуют в формировании ядерных компартментов
- .
- участвуют в ликвидации двунитевых разрывов ДНК, способствуют сохранению целостности генома

Заключение

- Ранее сформировалось мировоззрение, что МЭ являются молекулярными паразитами. Они не имеют биологической функции в клетках хозяина, за что были определены Френсисом Криком как «ДНК-эгоисты»
- Секвенирование и аннотация генома, новые экспериментальные данные привели к противоположному заключению

Заключение

- Изобилие мобильных элементов в геноме пополняется за счет механизма обратной транскрипции
- **Мобильные элементы играют существенную роль в организации, функционировании и эволюции генома**



ХЕСИН Роман Бениаминович
(1922-1985 гг.)

Советский биохимик и генетик,
член корреспондент АН СССР,
автор труда «Непостоянство генома»



СВЕРДЛОВ Евгений Давидович
1938 г.р.

Советский и российский биохимик,
профессор, член-корреспондент АН
СССР, академик РАСХН, действительный
член РАН, доктор химических наук.

Гипотеза Патрушева

Для объяснения главной функции «избыточной ДНК» в геноме эукариот предложена **гипотеза «альтруистической» ДНК** (Л.И.Патрушев, 1997):

- Избыточные ДНК оказывают стабилизирующее влияние на генетическую информацию. Они разбавляют кодирующие последовательности и выполняют роль ловушек для мутагенов любого вида
- Организмы, у которых гены максимально защищены от мутагенов, обладают эволюционным преимуществом при естественном отборе
- Таким образом, избыточные последовательности принимают удар на себя и защищают жизненно важные участки ДНК от мутаций