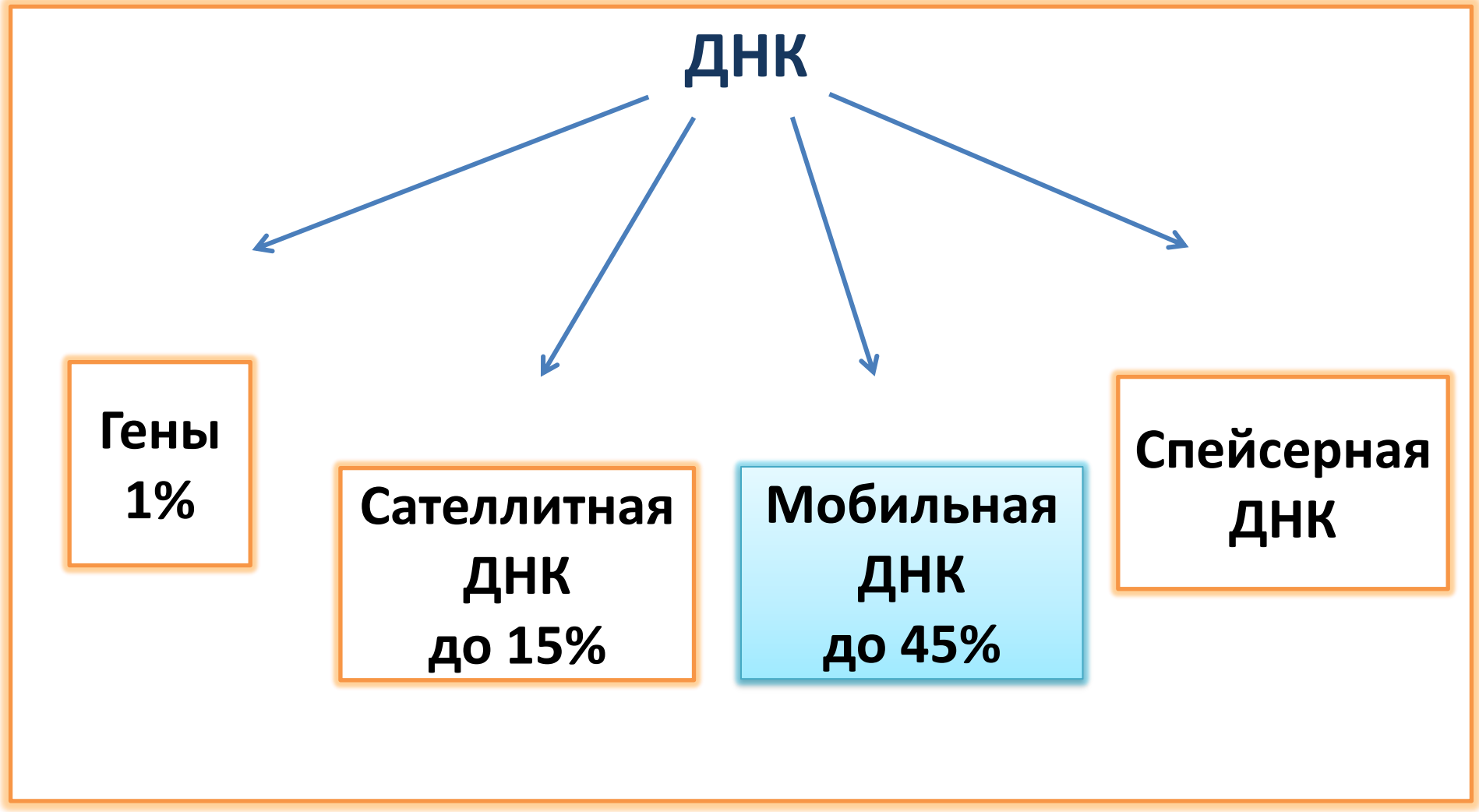
Геномика и протеомика

Лекция 3.
Мобильные элементы

(бакалавры)

Составитель: проф. М.Р. Шарипова

Соотношение сегментов ДНК в геноме эукариот



Мобильные элементы

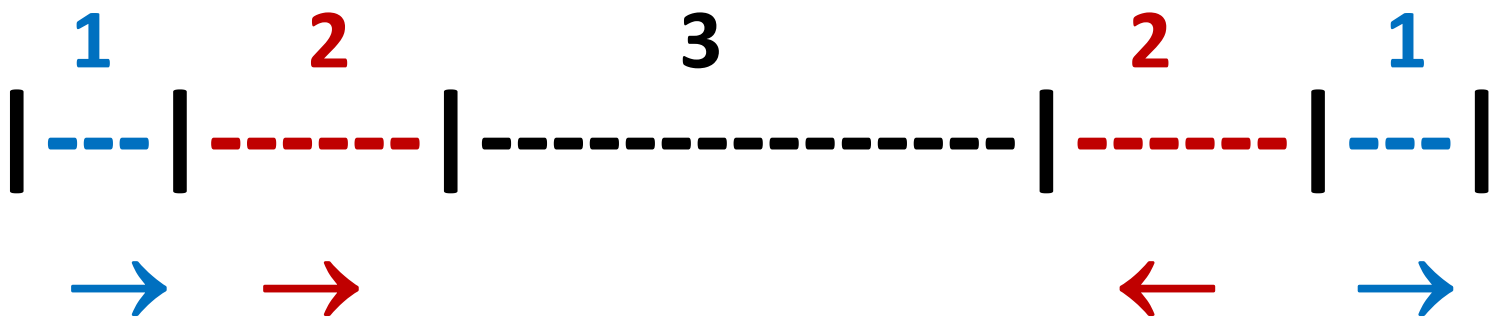
- **Мобильные элементы (МЭ)** – это участки ДНК, способные изменять свое положение в геноме, копироваться и включаться в специфические сайты
- **Мобильные элементы** образуют в геноме тандемы
- **Тандемы мобильных элементов** расположены в геноме случайно и могут присутствовать на любой из хромосом в отличие от сателлитной ДНК

Открытие МЭ:

Мобильные элементы - транспозоны были открыты в **40-х** годах **Барбарой Мак-Клинток** в опытах с кукурузой (Ac и Ds), американский учёный цитогенетик

- Признание её работы получили в **1960—1970**-е годы
- В **1983** году **Мак-Клинток** была удостоена Нобелевской премии по физиологии и медицине с формулировкой «За открытие мобильных генетических элементов»

Общая схема строения мобильных элементов



- **1 – короткие прямые повторы**, их длина уникальна и зависит от типа мобильных элементов. Эти короткие последовательности являются мишенью для узнавания/расщепления (**Сайт Мишень**)
- **2 – инвертированные фланкирующие повторы**, их длина варьирует в зависимости от класса и типа мобильных элементов
- **3 – кодирующий участок ДНК**, кодирует белки и ферменты, ответственные за перемещение мобильного элемента.

Общие свойства мобильных элементов в геномах

- **Мобильные элементы** присутствуют в геномах в виде похожих, но не идентичных копий последовательностей ДНК
- Подавляющее большинство копий являются не активными и не полными, несут мутации и не перемещаются
- **Мобильные элементы**, проявляющие активность называют «**мастер-копии**»
- Копии мобильных элементов распределены по геному неравномерно

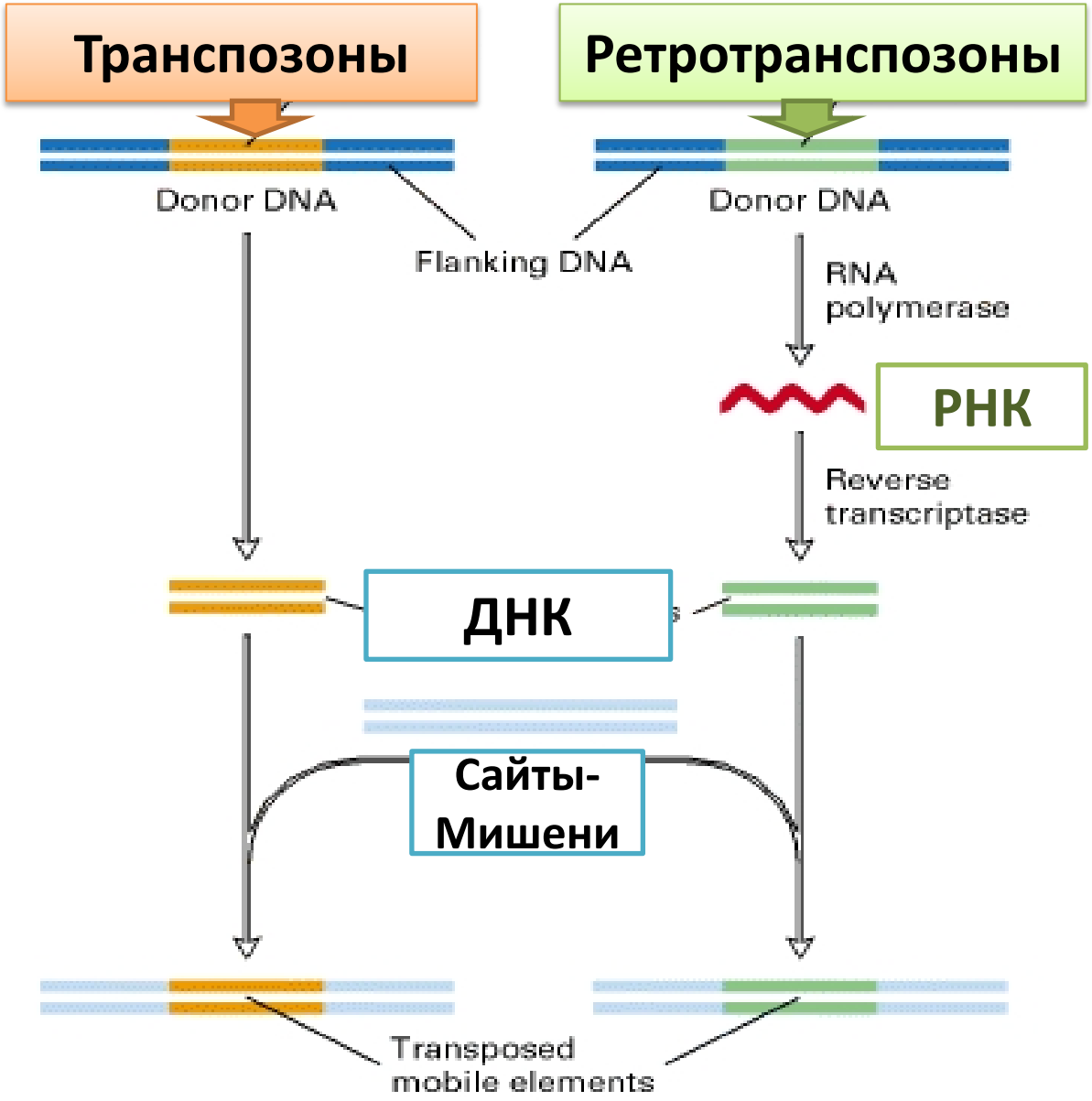
Повторяющиеся последовательности в геномах

Организм	Всего повторов в геноме	Мобильные элементы
Нематода	16%	9%
Дрозофила	16%	10%
Москит	95%	84%
Рожь	87%	72%
Кукуруза	70%	60%
Мышь	62%	47%
Человек	64%	46%

Основные определения

- **Транспозиция** – это процесс, с помощью которого мобильные элементы копируются, передвигаются в геноме и включаются в новые сайты-мишени (**СМ**)
- **Транспозаза** – это фермент, который катализирует перемещение **МЭ** или транспозицию
- В зависимости от механизма транспозиции все мобильные элементы классифицируют на **транспозоны** **(Tn)** и **ретротранспозоны**

Классификация мобильных элементов



- **Транспозоны** - это мобильные элементы, которые перемещаются в геноме к новым сайтам-мишеням как фрагменты ДНК

- **Ретротранспозоны** – это мобильные элементы, которые вначале транскрибируются РНК-полимеразой и затем в процессе обратной транскрипции образуют двуспиральную ДНК, которая встраивается в новый сайт в геноме

Тип → Класс → Семейство → Вид

Мобильные элементы

Транспозоны

- **IS-элементы**
- **Бактериальные транспозоны**
- **Эукариотические транспозоны**

Ретротранспозоны

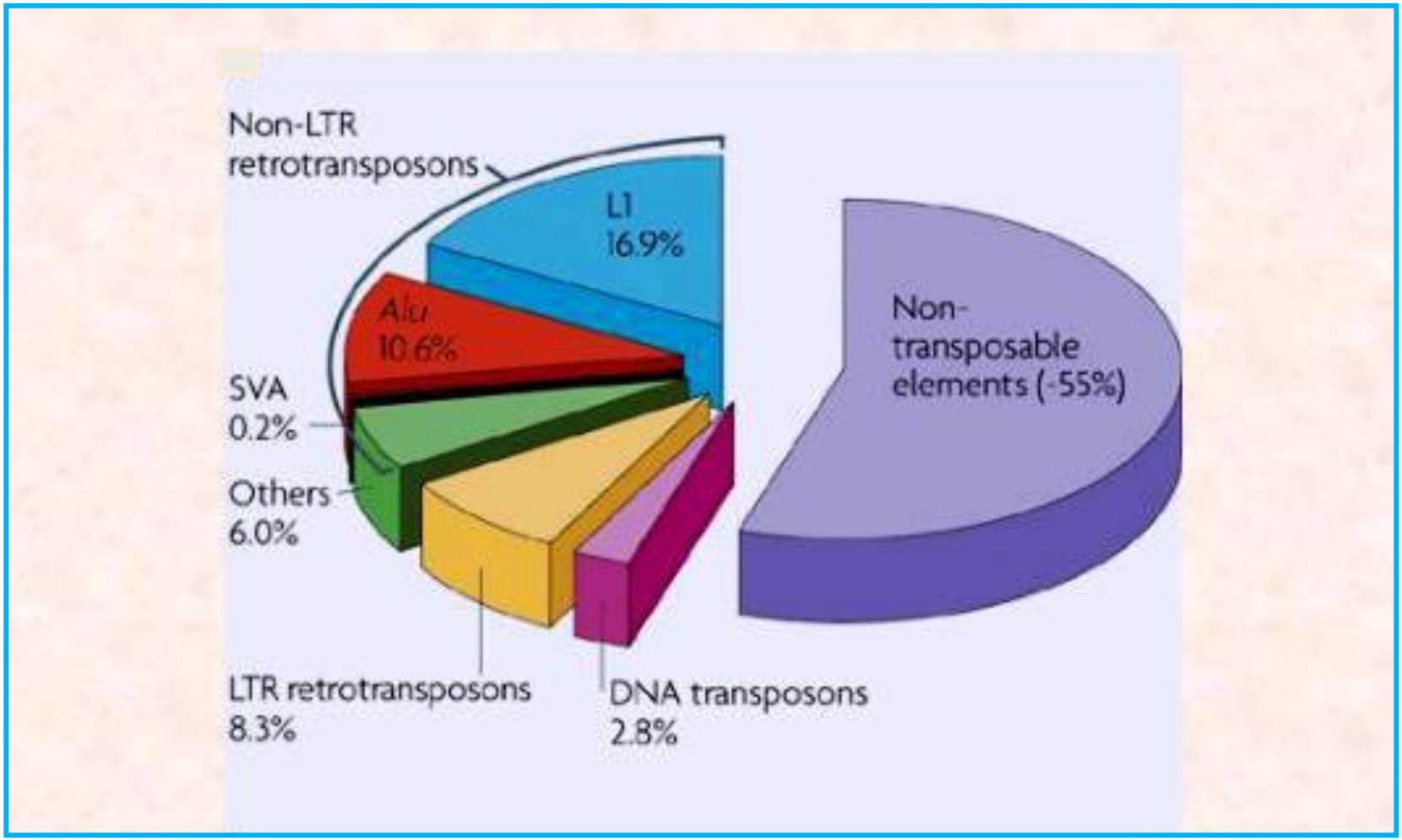
Вирусные ретротранспозоны

Невирусные ретротранспозоны

LINES

SINES

Вклад мобильных элементов в геном человека

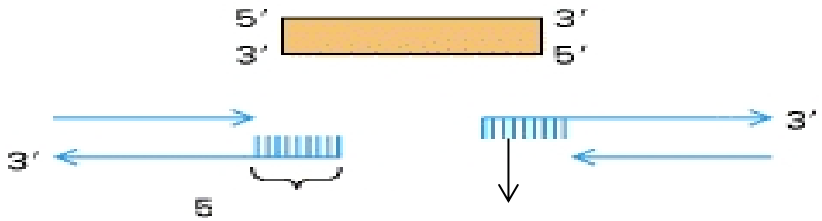


Механизм Транспозиции:

МЭ

Сайт Мишень

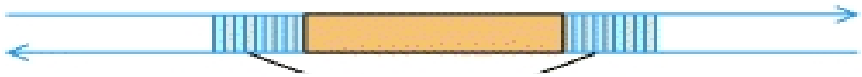
① Транспозаза



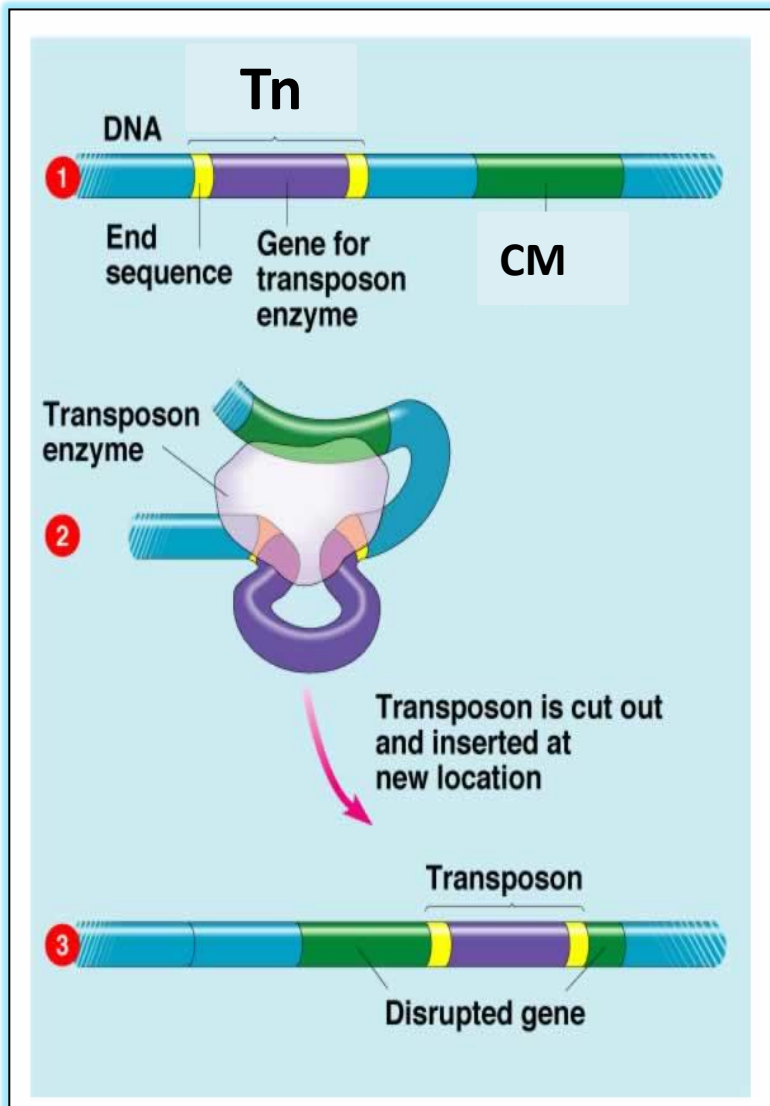
Липкие концы

② Лигирование МЭ

③ клДНКП + клЛигаза



2 СМ + МЭ



Позиция МЭ в геноме

- **Сайт-мишень** в геноме, содержащий мобильный элемент, называется **заполненным**, не содержащий мобильный элемент называется **свободным**.
- Транспозиция может идти по прилегающим сайтам-мишеням с образованием в геноме **тандемов** из мобильных элементов.

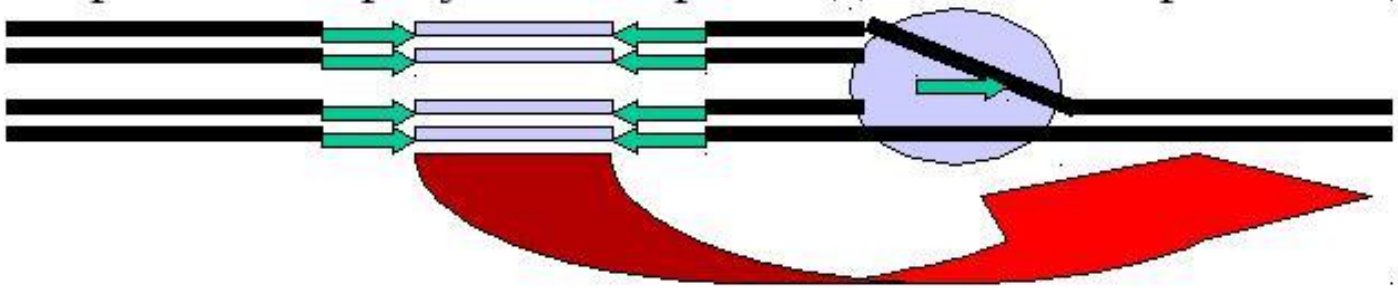
Механизмы транспозиции

- Транспозиция может происходить по **репликативному** и **нерепликативному** пути
- **Нерепликативная или консервативная** транспозиция – мобильный элемент вырезается из одной позиции в геноме и включается в другую, не синхронизирована с клеточным делением
- **Репликативная** транспозиция – мобильный элемент сохраняется в сайте-доноре и перемещается в реципиентный сайт-мишень, синхронизирована с клеточным делением

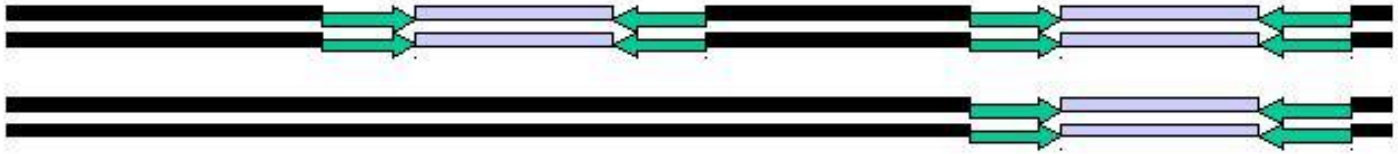
Репликативная транспозиция: синхронизация с репликацией ДНК

Активный транспозон

Вырезание - сразу после прохождения вилки репликации

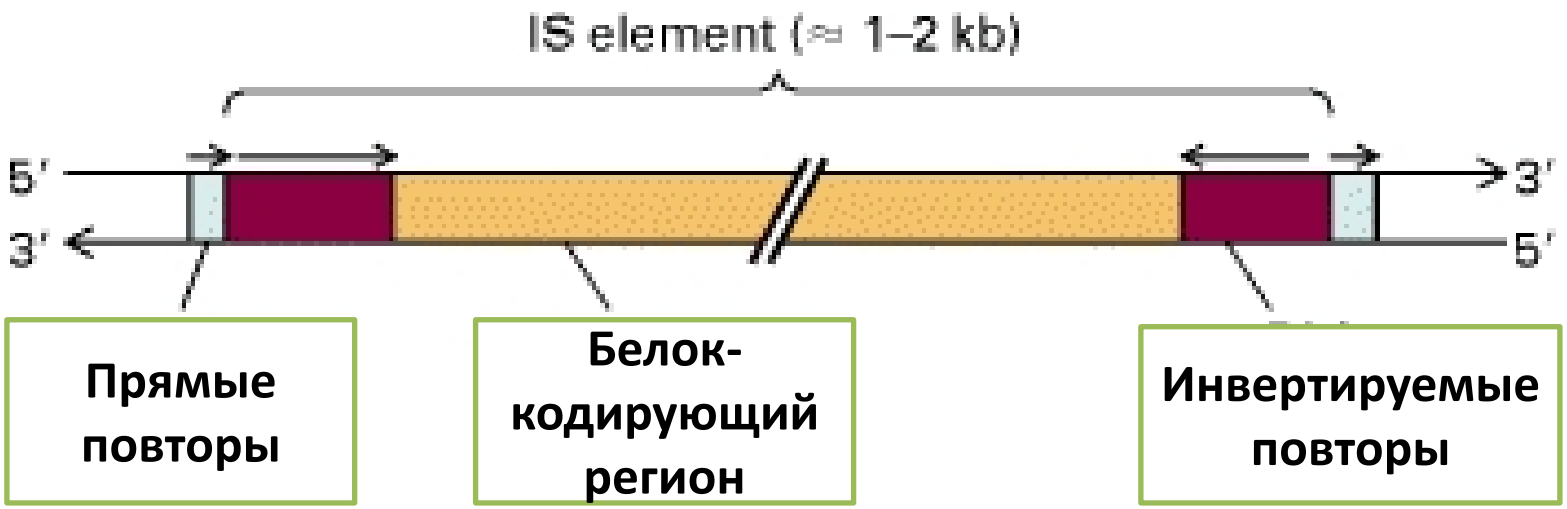


Встраивание перед вилкой репликации



Повторная репликация транспозона

Структура бактериального IS-элемента



- **Короткие прямые повторы** длиной 5-20 п.н. являются характеристикой каждого вида IS-элементов
- **Инвертируемые повторы** содержат около 50 п.н.
- **Белок-кодирующий регион** содержит фермент для перемещения IS-элемента к новому сайту в геноме

Инсерционные последовательности – IS-элементы

- **IS-элементы** идентифицированы в бактериальных хромосомах и плазмидах
- **IS-элементы** – самые простые МЭ, выявлено более 20 различных IS-элементов у *E.coli* и других бактерий
- **IS-элементы** в геноме представлены разным количеством копий
- Их размеры от 700 до 1800 н.п. Они содержат ген транспозазы (***tnp***)

- Транспозиция **IS-элементов** встречается в одной из 10^5-10^7 клеток на генерацию
- Транспозиция **IS-элементов** в геноме может привести к следующим результатам:

- **инактивировать существенные для выживания гены и клетка погибнет**
- **вызвать мутацию при встраивании в структурную или регуляторную области гена или оперона, но клетки выживают**
- **включиться в межгенные регионы генома, что не отразится на жизнедеятельности клеток**
- **промоторы, расположенные в IS-элементах, могут влиять на экспрессию соседних генов**

Значение IS элементов

- **1.** Участвуют в генетической изменчивости микроорганизмов – инсерциях и делециях
- **2.** Являются генетическими маркерами вида или рода бактерий
- **3.** Являются местом встраивания плазмид в бактериальную хромосому в области IS-последовательностей
- **4.** Влияют на регуляцию генов, так как несут в составе промоторы и репрессоры или их компоненты

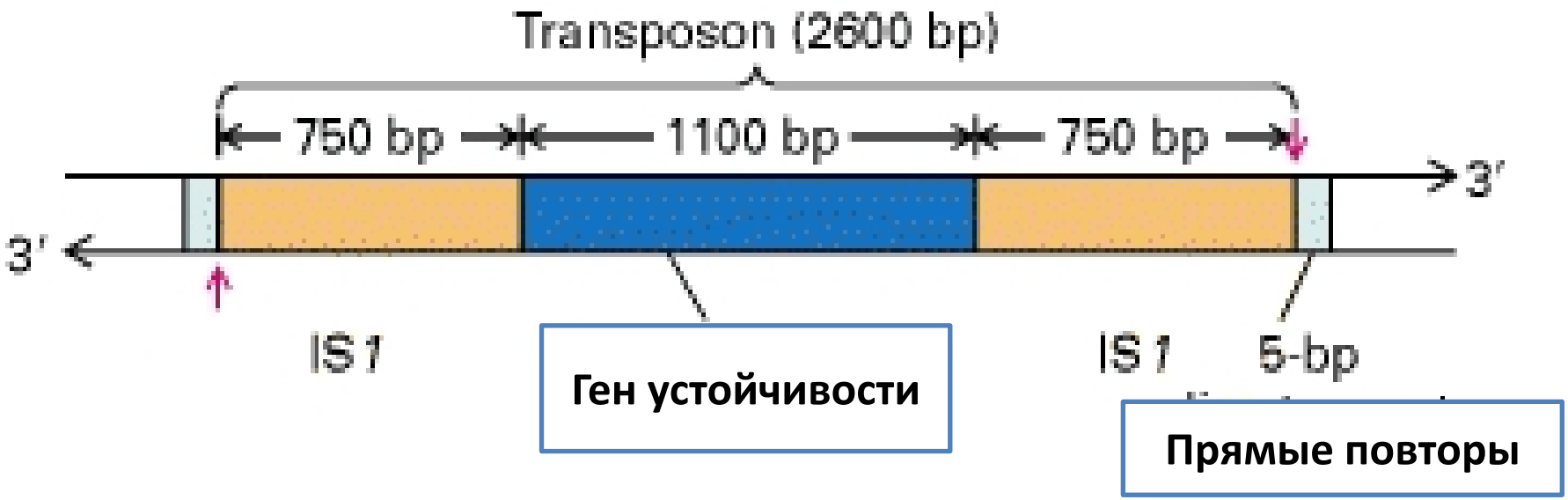
Структура островков патогенности в геномах патогенных бактерий

- Содержат мобильные элементы (IS), гены подвижности (интегразу, транспозазу), гены вирулентности (V1-V4);
- По обоим концам имеются прямые повторы (DR) (распознаются ферментами и вырезаются);
- Располагаются вблизи генов тРНК.

Транспозоны

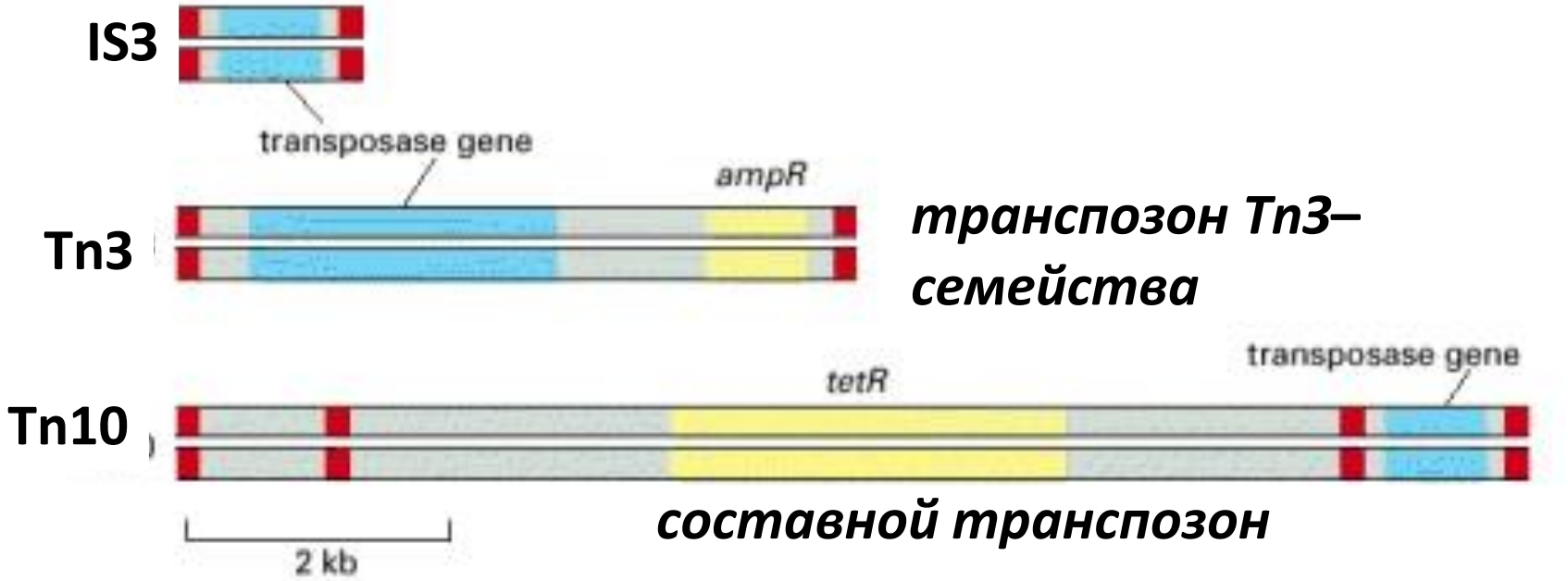
- Когда два IS-элемента расположены в геноме близко, они могут перемещаться как единое целое, захватывая лежащие между ними гены – это **транспозоны**.
- **Tn** широко распространены в клетках прокариот, их фагах и плазмидах
- **Транспозоны (Tn)** устроены более сложно, включают гены, которые не относятся к транспозиции: гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов и другим ингибиторам.
- Частота перемещения **транспозонов** регулируется и зависит от промоторов генов в составе МЭ
- Размер **Tn** от 2000 п.н. и выше, бактерии могут содержать по несколько копий каждого из них

Структура транспозона Tn9 *E.coli*



- **Tn9** состоит из гена устойчивости к хлорамфениколу по краям которого IS1-элементы. Транспозаза распознает наружные повторы и делает разрывы (указаны красными стрелками).
- **Перемещение Tn происходит также как для IS-элементов и заканчивается дупликацией сайтов-мишеней с двух сторон**

Примеры мобильных элементов бактерий



- Каждый МЭ содержит ген транспозазы, прямые повторы (СМ), которые распознает транспозаза. Два элемента несут гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину.
- **Tn10** произошел при встраивании двух IS-элементов по обе стороны от гена устойчивости к тетрациклину, а широкое использование тетрациклина помогло распространению **Tn10** в бактериальных популяциях.

Результаты секвенирования:

- Сложные транспозоны - центральная область содержит несколько генов устойчивости к антибиотикам и на концах несколько IS-элементов, могут быть разные

- Транспозоны могут иметь асимметричную структуру:

1) могут отсутствуют прямые или инвертированные терминальные повторы (**Tn554** из *Staphilococcus aureus*)
2) IS-элементы могут находиться только на одном конце

Эукариотические транспозоны

Эукариотические транспозоны во многом схожи с прокариотическими:

- транспозоны дрожжей - Ту-элементы
- транспозоны дрозофилы - Р-элемент
- транспозоны кукурузы - Ds и Ас - элементы Ds-элемент является частично делетированной формой Ас-элемента.

Они схожи по строению и структуре с бактериальными МЭ и передвигаются в геноме как IS-элементы бактерий по механизму **нерепликативной транспозиции**.

Структура Р-элемента дрозофилы

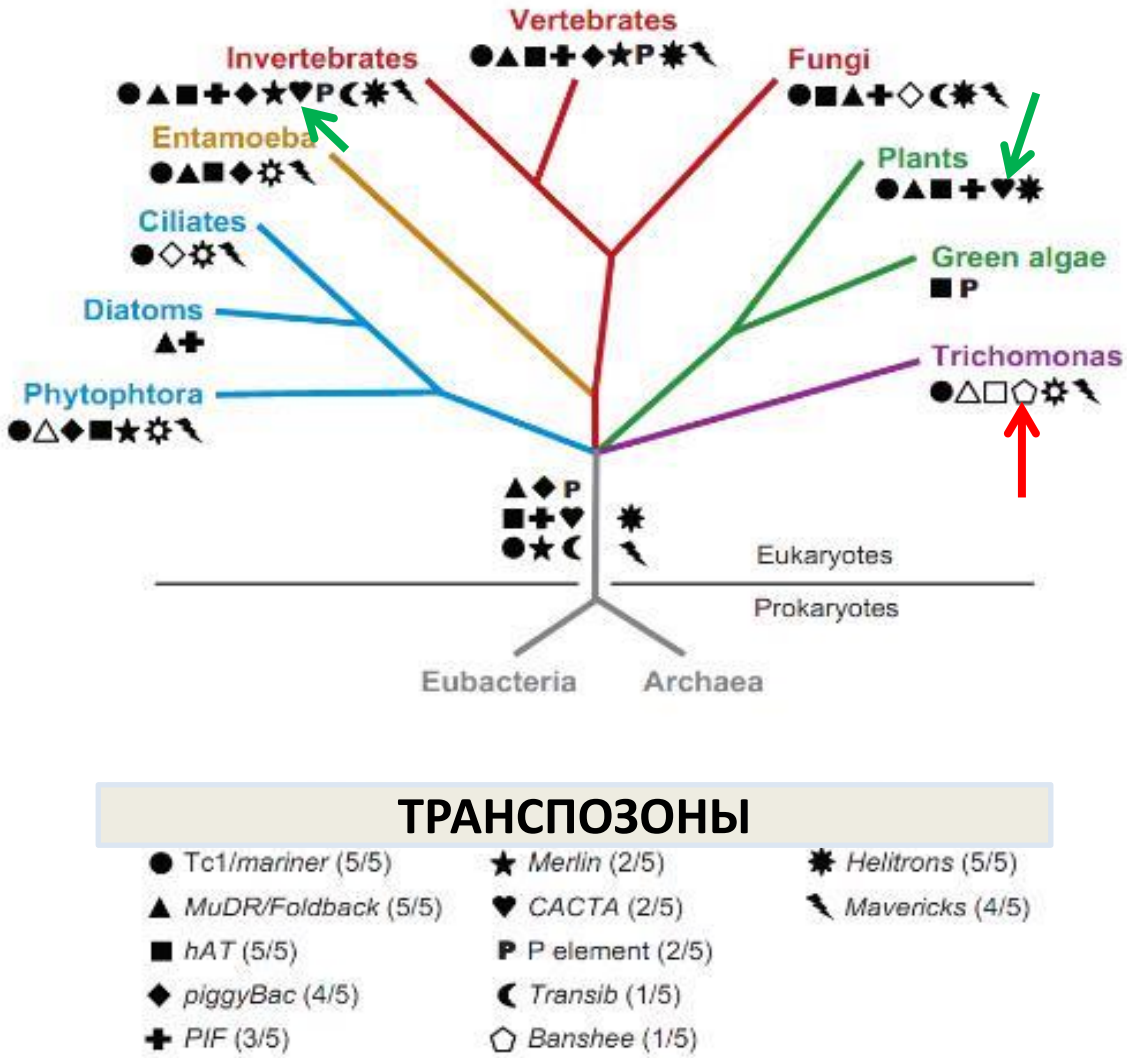
- Ген транспозазы состоит из 4 экзонов и 3 интронов. Белые стрелки – прямые повторы **СМ** длиной 8пн, синие стрелки - инвертированные повторы.
- **Р-элемент** функционирует как транспозон . Половина всех спонтанных мутаций в дрозофиле соответствует включению в гены мобильных элементов. Получение всех трансгенных дрозофил основано на использовании **Р-элемента**.

Разновидности транспозонов

- **Хелитрон** – ДНК-транспозон, содержащий ген хеликазы, обнаружены у эукариот, вовлечены в горизонтальный перенос генетического материала между удаленными таксонами
- **Полинто́ны**— крупные и сложно устроенные ДНК-транспозоны, кодируют до 10 различных белков, включая ДНК-полимеразу и интегразу, обнаружены у эукариот.

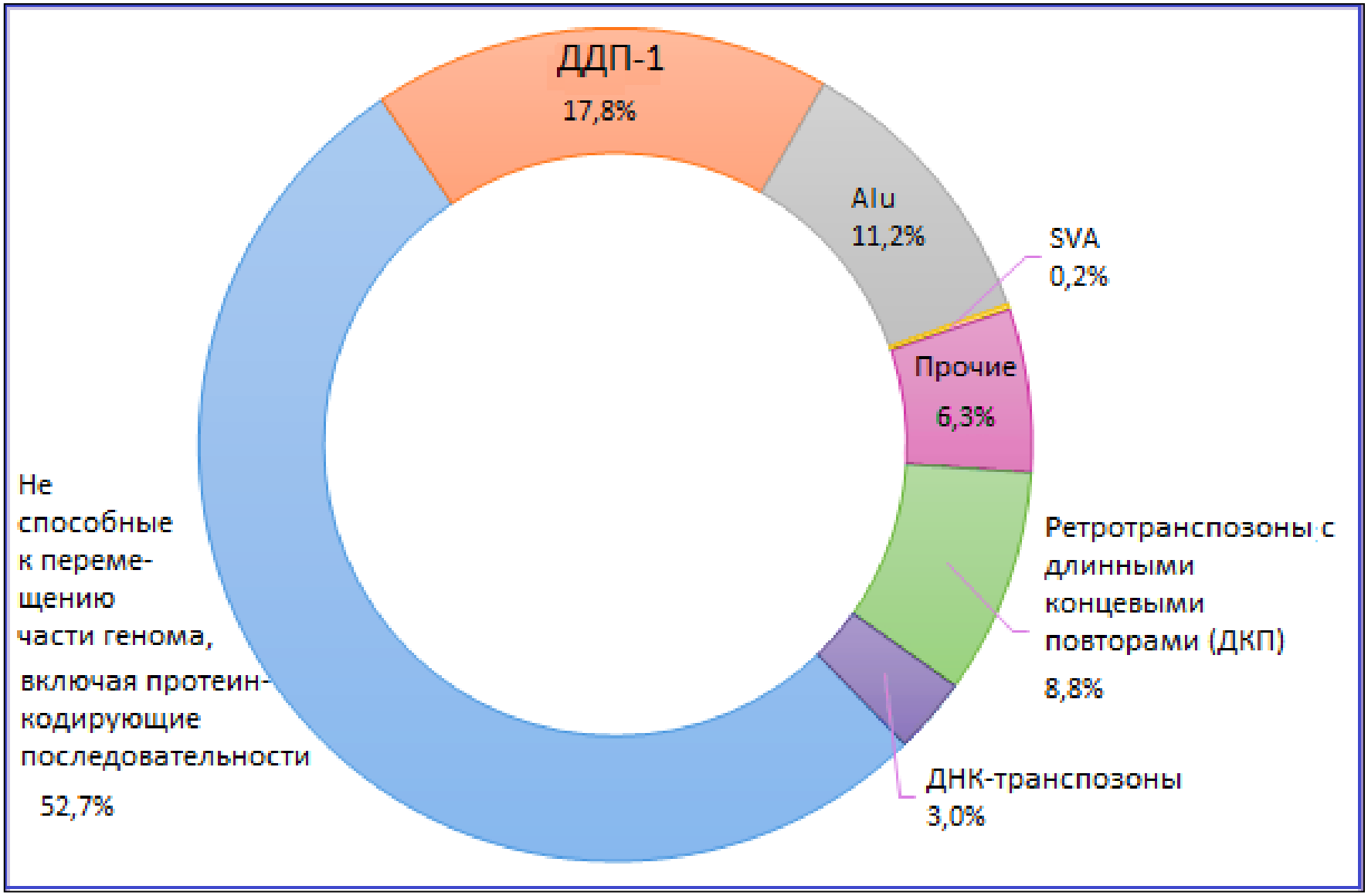
Размер до 40 кб

Распространение ДНК-транспозонов в геномах



Большинство групп ДНК транспозонов могут быть найдены в основных классах ныне существующих эукариот. Интересно, что некоторые, не повсеместно распространенные классы ДНК транспозонов присутствуют в не связанных с первого взгляда группах, например CACTA транспозоны найдены у насекомых и у цветковых растений.

Транспозоны в геноме человека



Транспозоны – это удобный инструмент для генетиков

- Они обладают сильным мутагенным эффектом и легко изолируются по признаку приобретенной устойчивости к антибиотику
- Сайт включения транспозона в ДНК определяют <u>картированием</u> с помощью рестриктаз: при разгонке рестриктов на электрофорезе обнаруживают полосу с большим включением фрагмента ДНК
- Картирование можно провести с помощью <u>гибридизационных зондов</u>, комплементарных инвертированным повторам на концах транспозона

Тип → Класс → Семейство → Вид

Мобильные элементы

Транспозоны

- **IS-элементы**
- **Бактериальные транспозоны**
- **Эукариотические транспозоны**

Ретротранспозоны

Вирусные ретротранспозоны

Невирусные ретротранспозоны

LINES

SINES

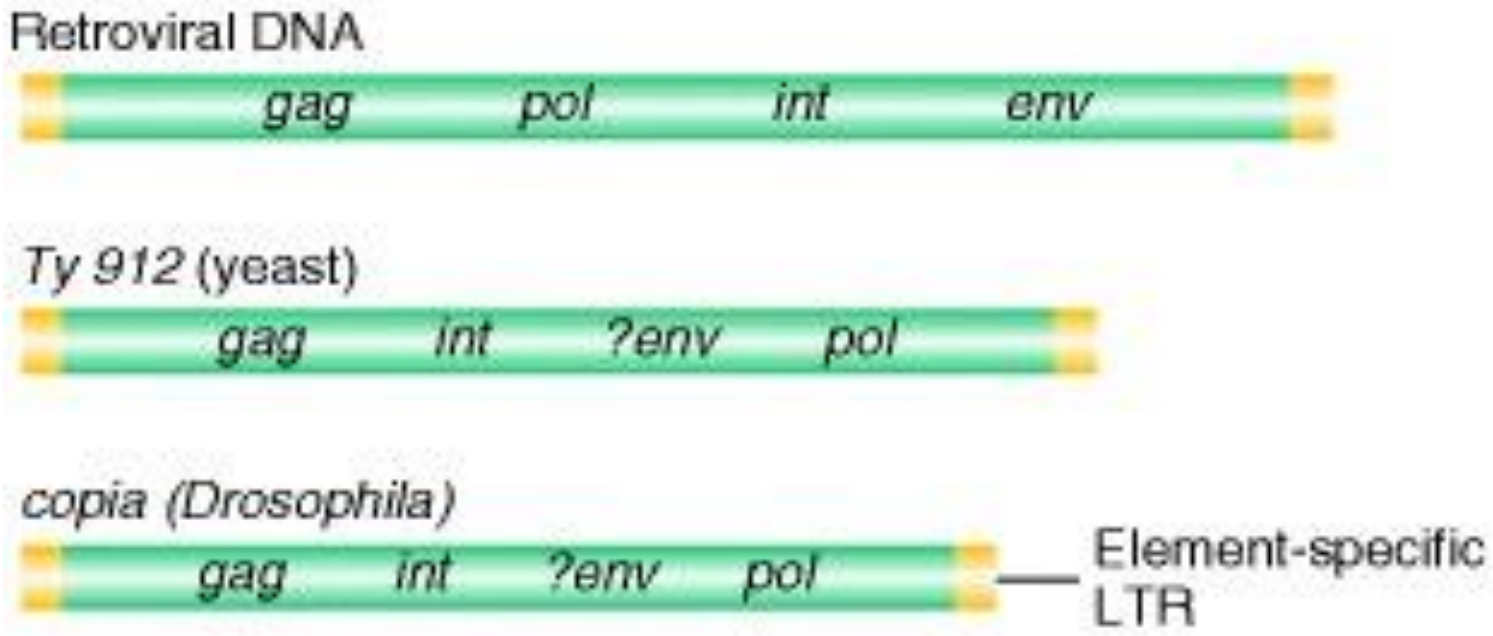
Ретротранспозоны

- Большинство мобильных элементов эукариот в геномах от дрожжей до человека – это **ретротранспозоны**
- **Ретротранспозоны** – внутригеномные, неинфекционные элементы, способные к передвижению внутри генома
- Ретротранспозоны разделены на две категории:
  - **вирусные ретротранспозоны**
  - **невирусные ретротранспозоны**
- Ретротранспозоны не имеет аналогов среди прокариот.
- Центральный сегмент ретротранспозонов содержит ген, кодирующий обратную транскриптазу

Вирусные ретротранспозоны (ВР)

- Геномы вирусных ретротранспозонов схожи с геномами ретровирусов (эндогенные вирусы)
- В отличие от ретровирусов мобильные элементы не экспрессируют белки капсиды и вирусной оболочки, необходимые для самосборки и лизиса клетки-хозяина.
- Механизм транспозиции ретротранспозонов схож с механизмом интеграции ретровирусов, в основе обоих процессов - **обратная транскрипция**.

Сравнение геномов ретровируса и ретротранспозонов



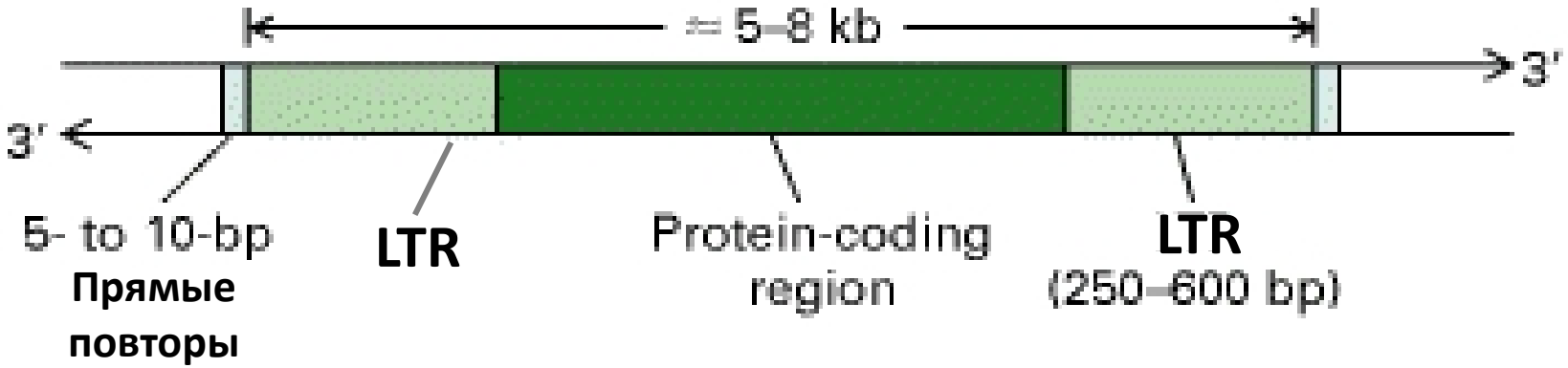
Ген *pol* кодирует обратную транскриптазу

Ген *gag* кодирует капсидный белок для упаковки РНК вируса

Ген *env* кодирует гликопротеин для сборки вирусной оболочки

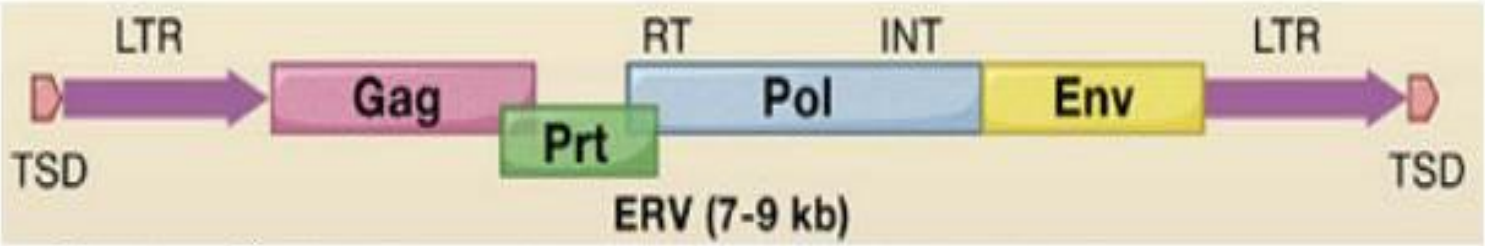
Ген *int* кодирует интегразу

Структура вирусных ретротранспозонов эукариот

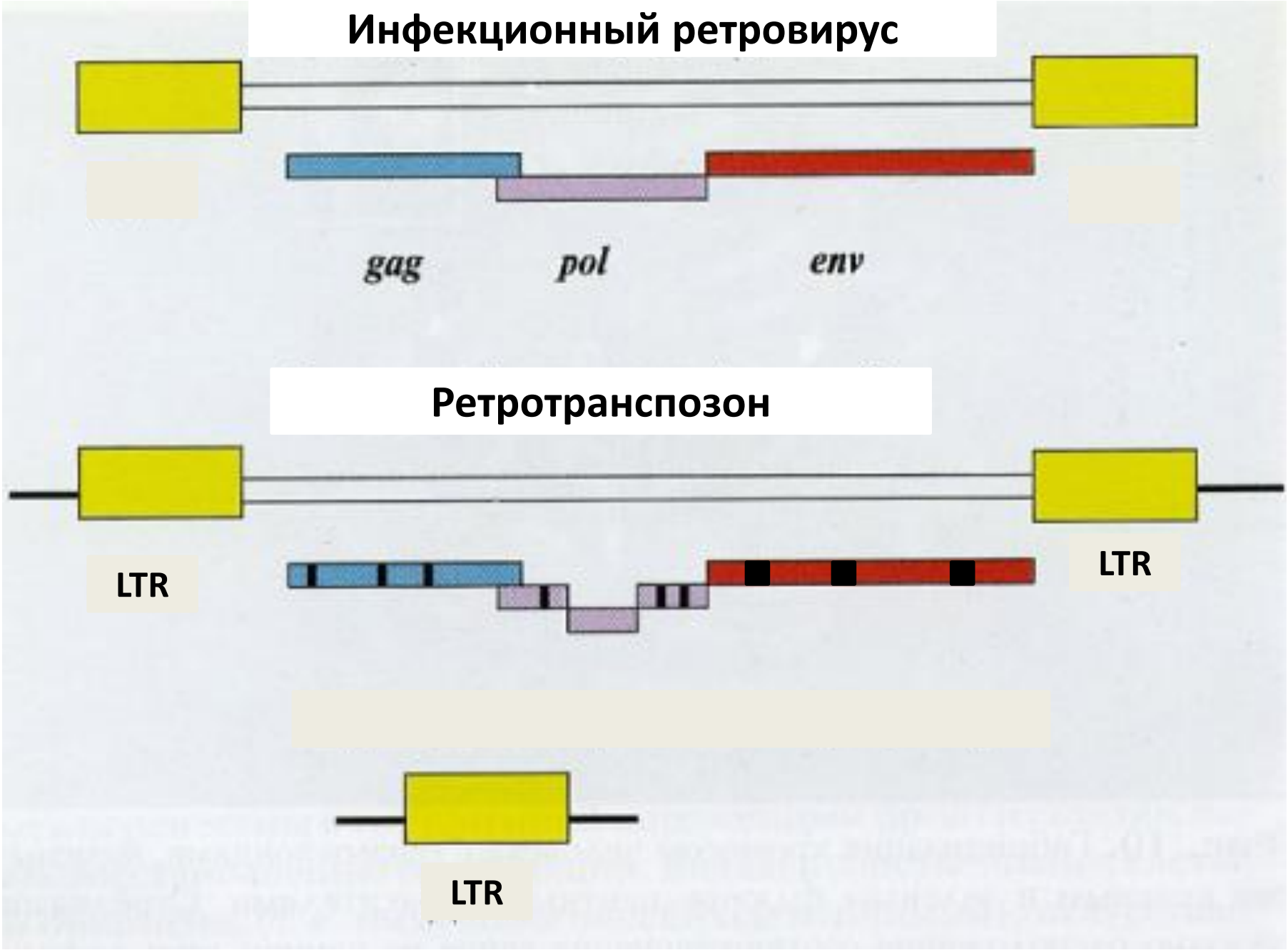


Кодирующая последовательность вирусного ретротранспозона ограничена длинными концевыми повторами **LTR (Long Terminal Repeats)** и короткими прямыми повторами в участке интеграции в геном

Геном вирусного ретротранспозона

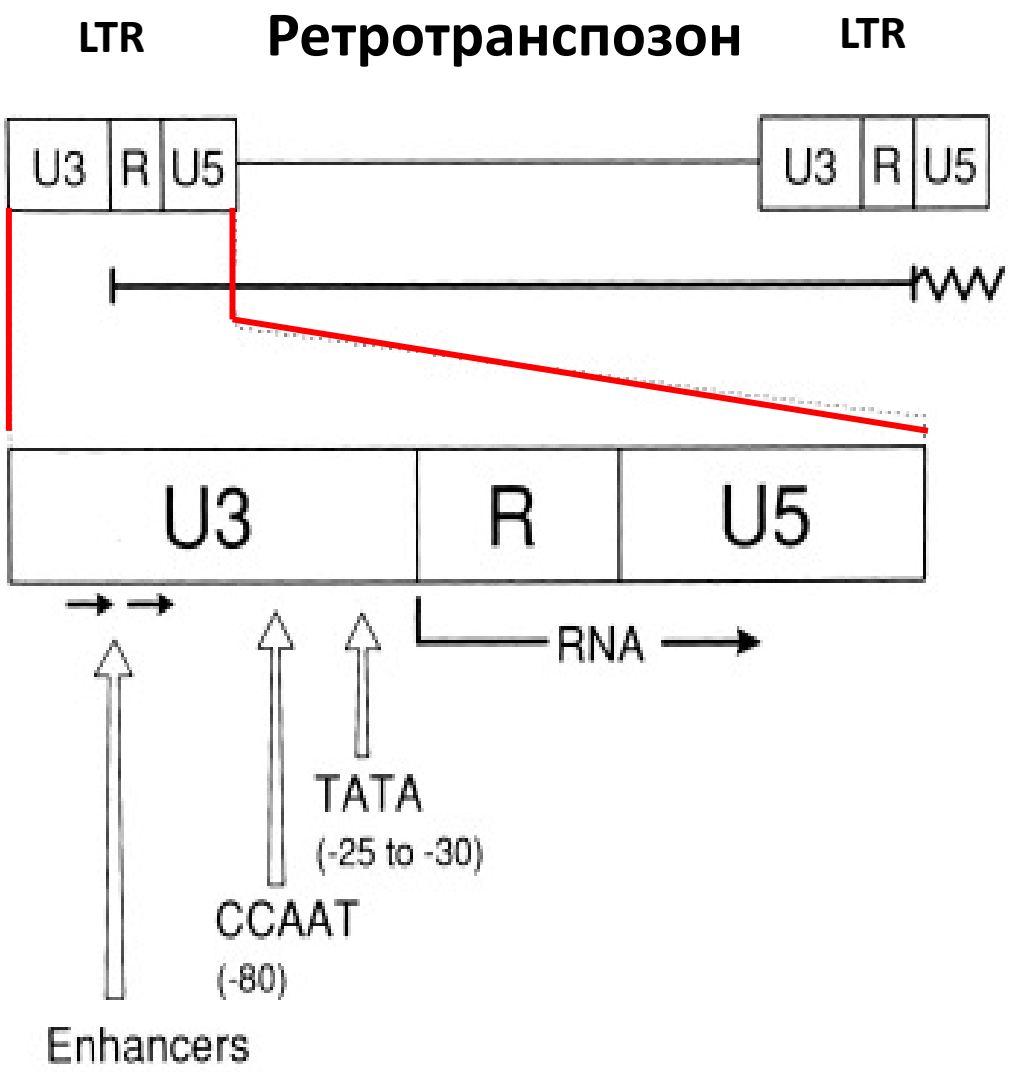


- Gag – белки вирусного компартмента
- Prt = Pro - протеаза
- Pol = RT + IN (+RH)– РНК зависимая ДНК полимераза + Интеграза (+РНКаза Н)
- Env – белки оболочки вируса.
- LTR – длинные терминальные повторы


Инфекционный ретровирус
gag
pol
env
Ретротранспозон
LTR
LTR
LTR

LTR – длиные терминальные повторы (Long Terminal Repeats)

- **LTR** являются маркерами вирусных ретротранспозонов (**LTR-характеристика**)
- **LTR** - это промоторы и регуляторные сайты:
  - промоторы, узнаваемые клеточной РНКП и ФТ
  - энхансеры транскрипции
  - сигналы полиаденилирования
  - участки связывания гормонов
  - с **LTR** способны взаимодействовать многие специфические клеточные факторы, которые участвуют в регуляции клеточного деления, пролиферации и дифференцировки

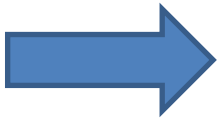
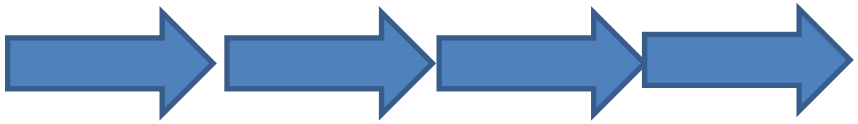


Структура LTR уникальна для каждого из семейств вирусных ретротранспозонов

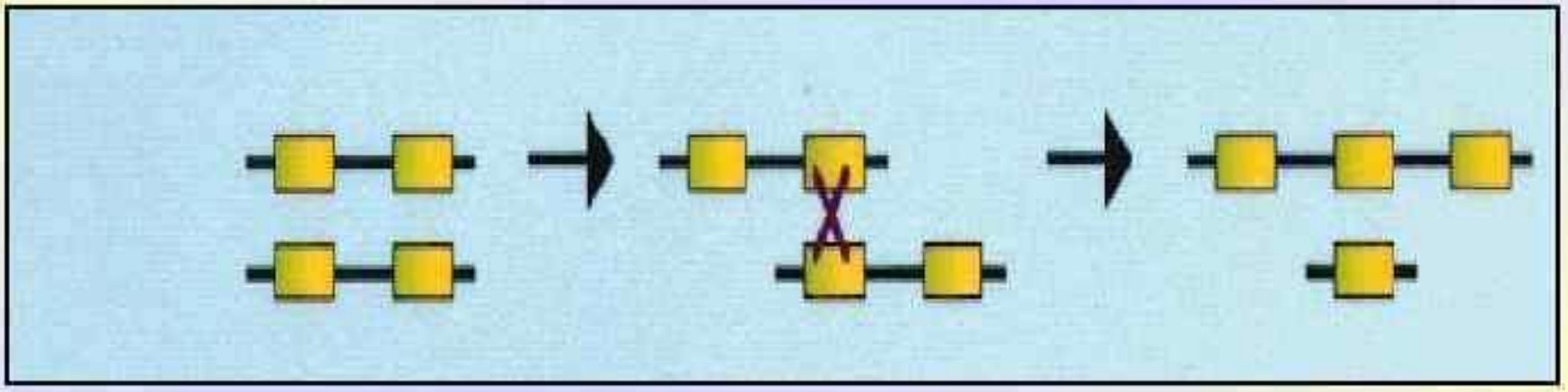
Структура LTR

В составе фрагмента U3-область включает промотор, узнаваемый клеточной РНКП и энхансер транскрипции; R-область содержит сигнал о старте транскрипции и сигнал полиаденилирования, U5-область – другие регуляторные сайты.

Тандемы из одиночных LTR

- Ретротранспозиция может сопровождаться гомологичной рекомбинацией и в результате неравного кроссинговера в геноме образуются одиночные LTR.
- В свою очередь одиночные LTR способны образовывать тандемы за счет ретротранспозиции по прилегающим сайтам встраивания (**СМ**)
- Образование одиночных LTR и их тандемов характерно для всех семейств ретротранспозонов
-  одиночный LTR
-  тандемы из LTR

Неравный кроссинговер



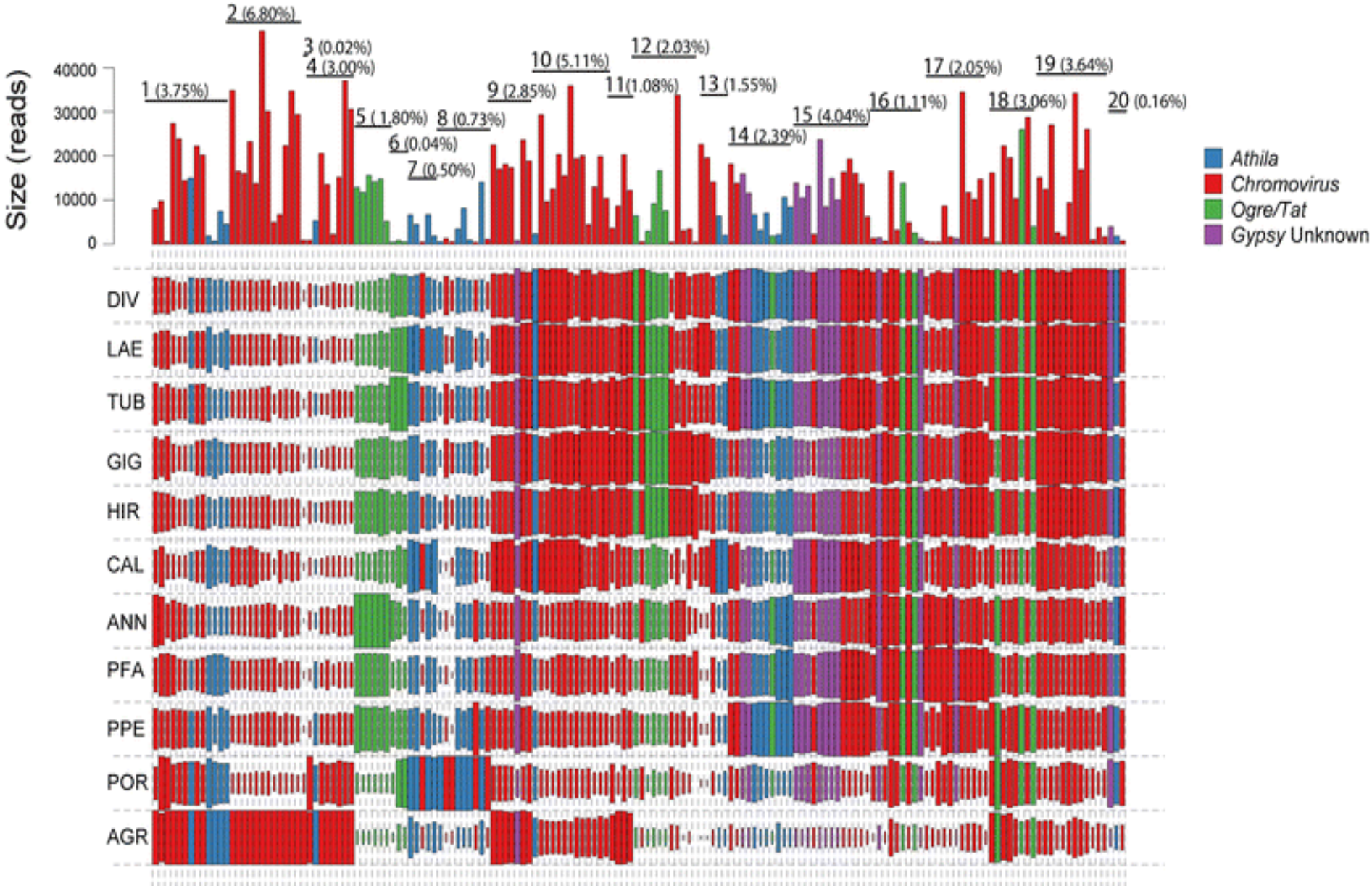
- Обычно обмен участками между хроматидами гомологичных хромосом происходит в строго идентичных точках путем обмена равными участками хромосом
- В редких случаях наблюдается разрывы в несимметричных точках и хроматиды обмениваются неравными участками

- Вирусные ретротранспозоны распространены в геномах низших эукариот (**Ту-элементы** дрожжей, **copia-элементы** дрозофилы), существенно реже у высших эукариот
- Вирусные ретротранспозоны составляют до 8% от геномной ДНК человека
- В геноме человека идентифицируют семейства **HERV** (**H**uman **E**ndogenous **R**etro **V**irus, сокращенно **ERV**), члены которых отличаются по нуклеотидной последовательности и свойствам
- Число семейств **ERV** вирусных ретротранспозонов, обнаруженных в геноме человека, достигло 30 и продолжает расти

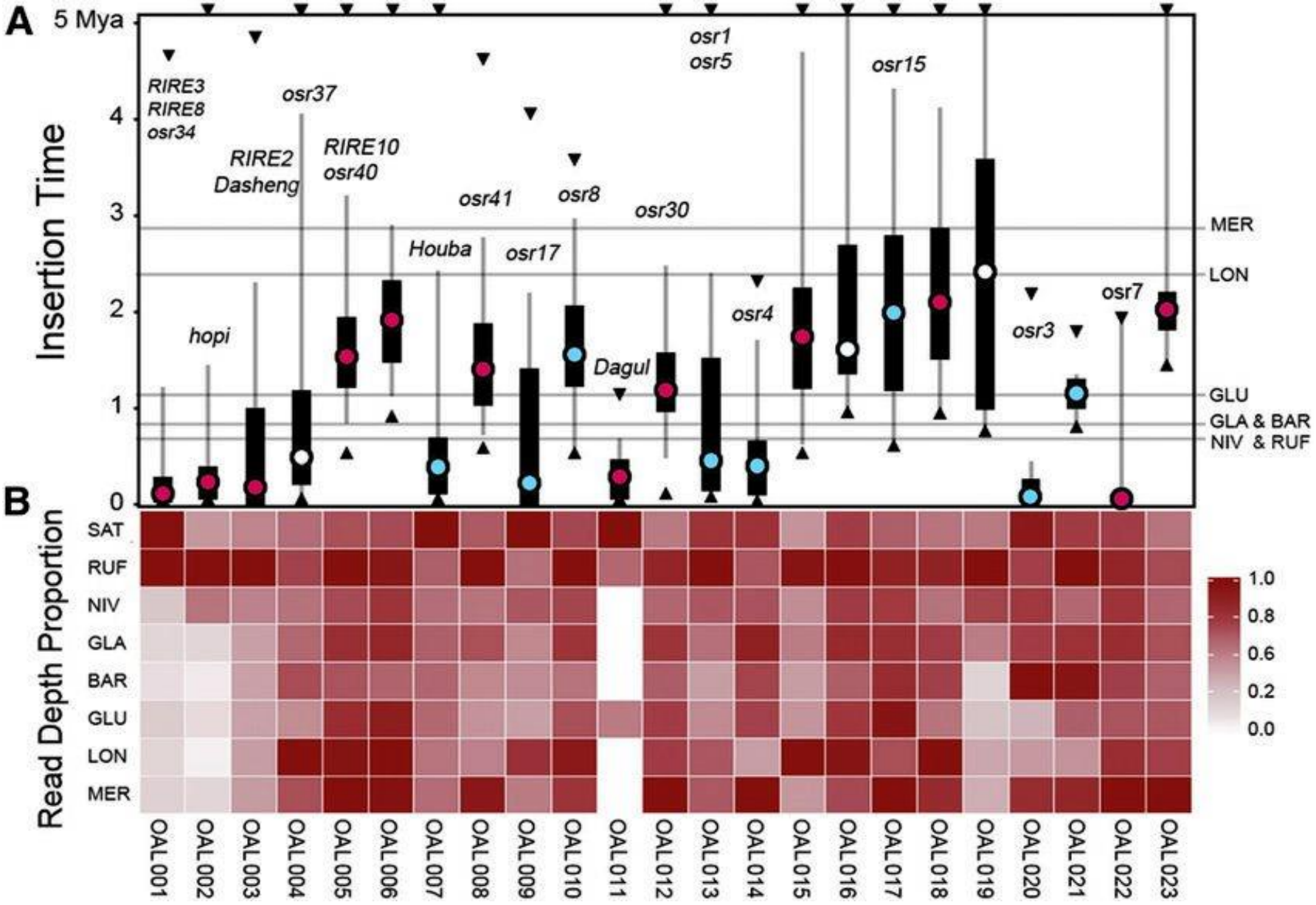
Вирусные ретротранспозоны в геноме человека

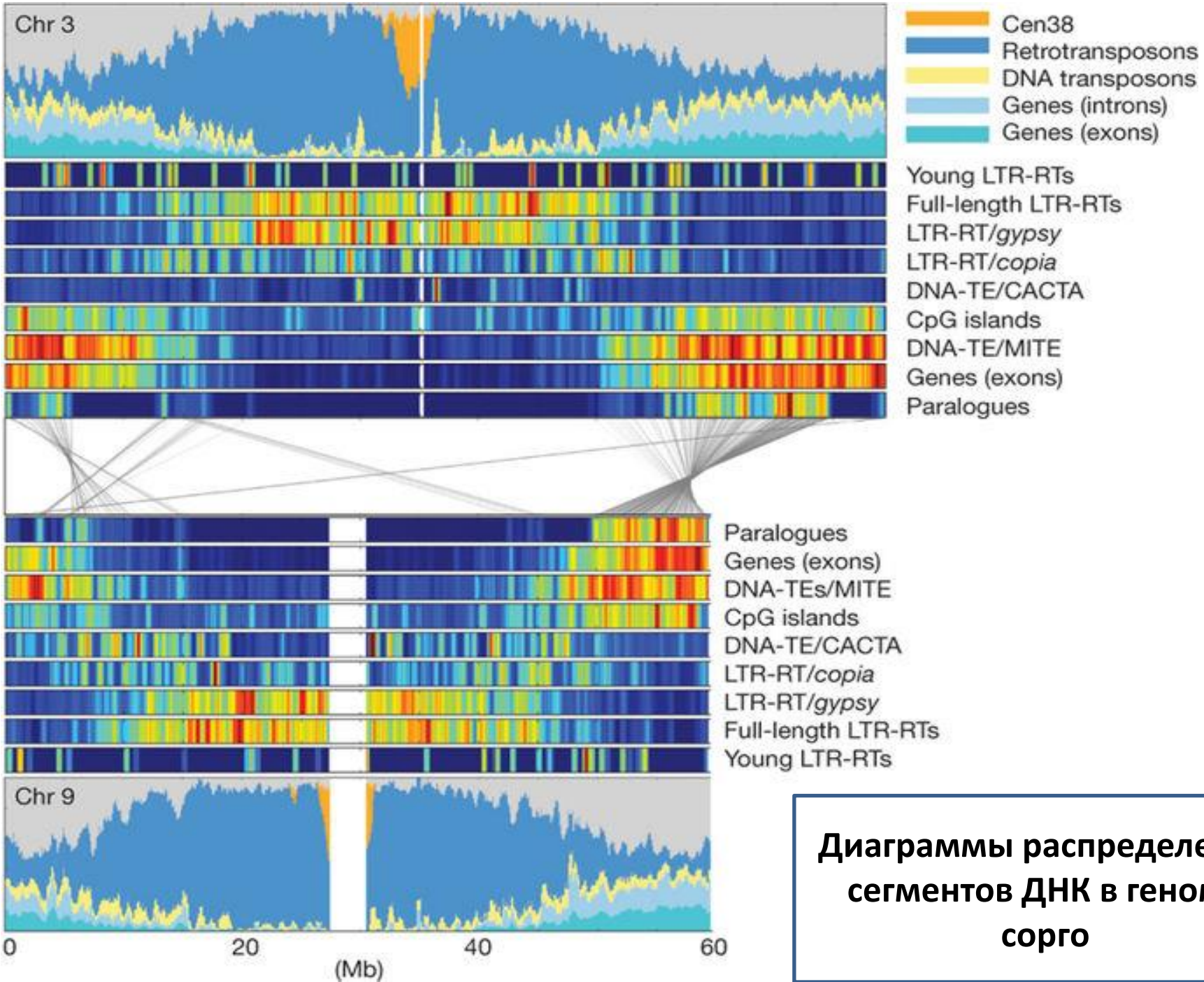
Семейство	Представители	Количество копий
HERV-ER1	HERV-E LTR-HERV-E 51-1 ERV1	100 600 50 15
S71	S71 LTR-S71	20 100
ERV9	ERV9 LTR-ERV9	40 4000
HML	HERV-K10 LTR-HERV-K10	50 25000
HRES	HRES-1	2
Не классифицирован	LTR-Spm	19

Анализ LTR-кластеров в геномах подсолнечника

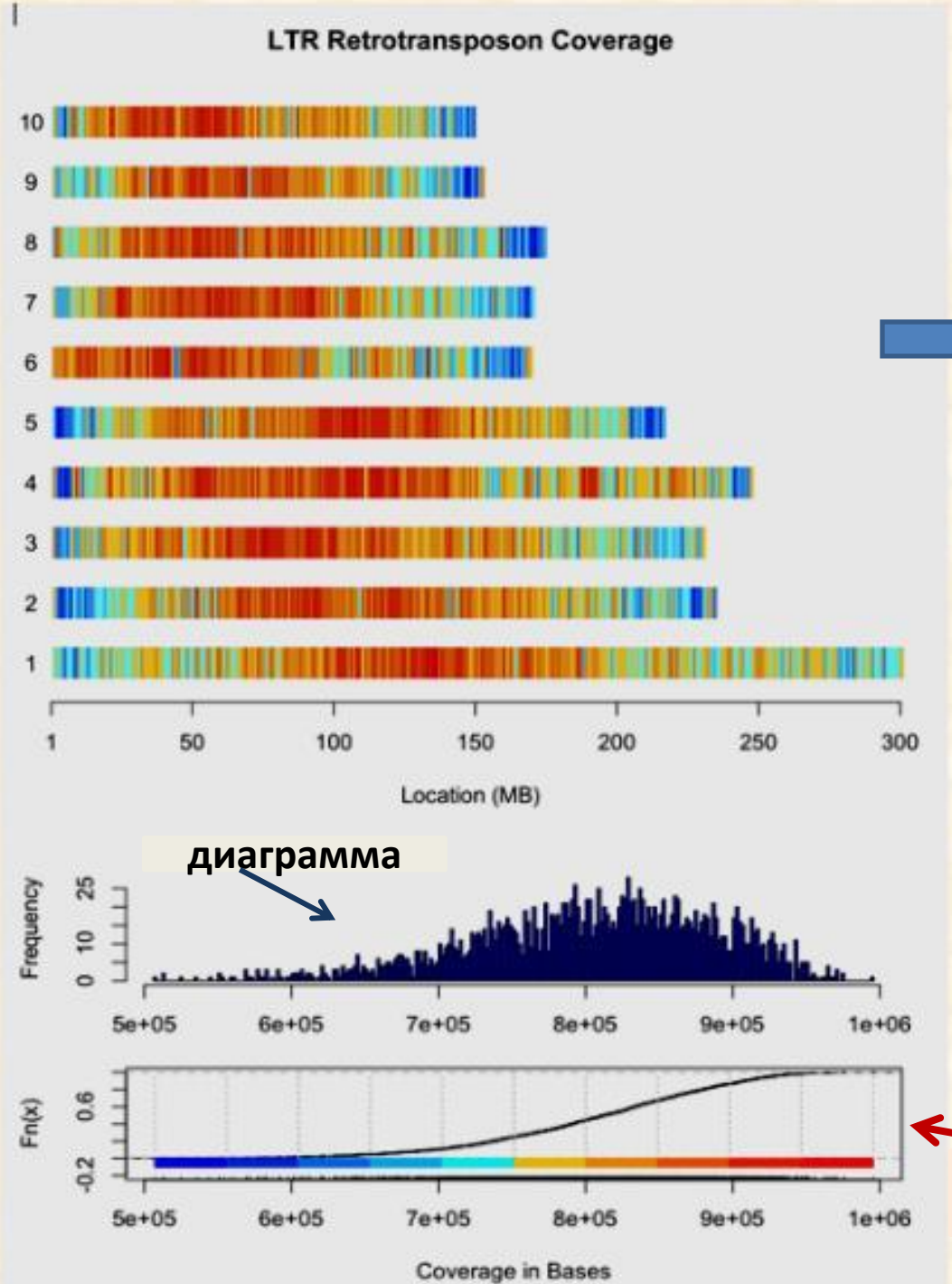


Хронология распространения 23 семейств вирусных ретротранспозонов в геноме риса





Диаграммы распределения сегментов ДНК в геноме сорго

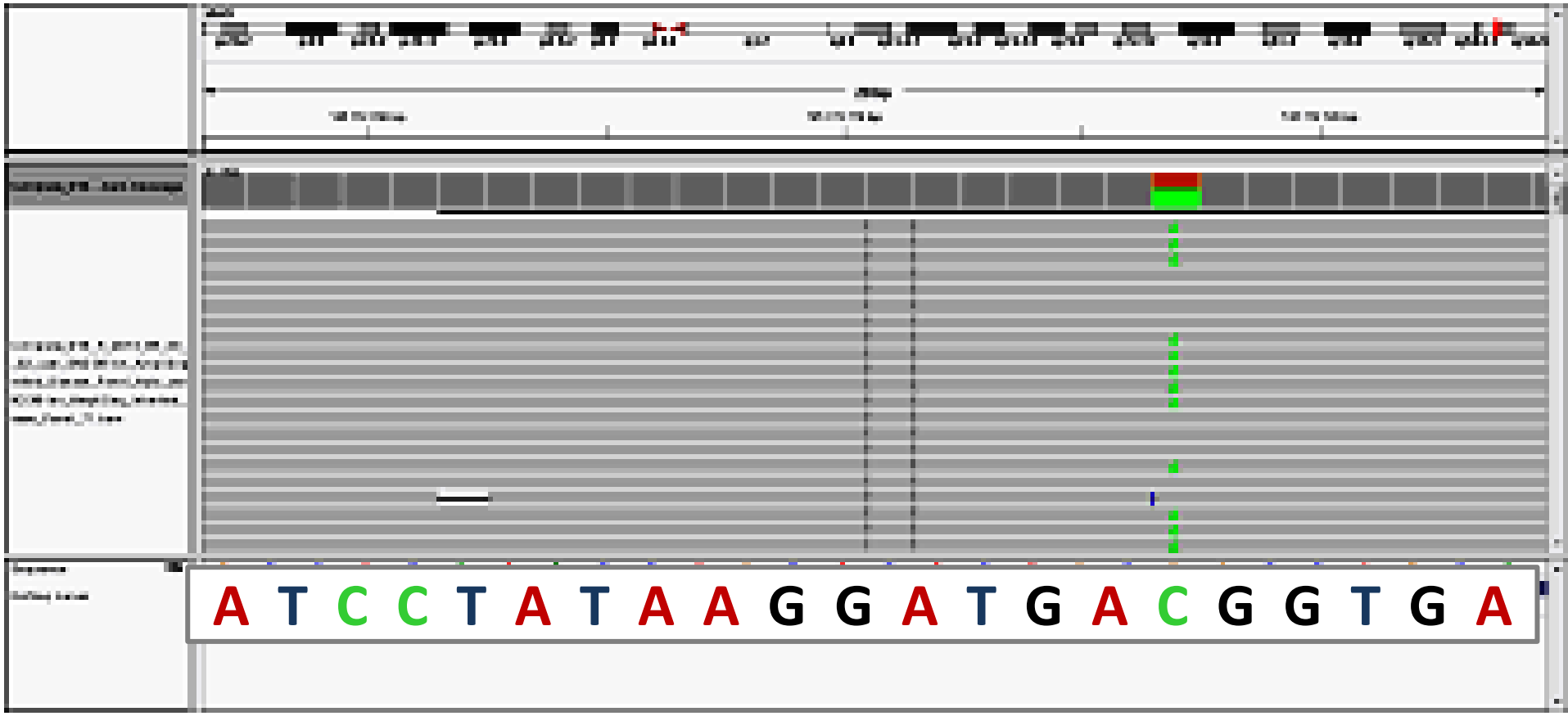


Распределение LTR-ретротранспозонов по геному кукурузы 10 хромосом
(LTR-покрытие)

<u>Покрытие</u> – количество прочтений определенного нуклеотида из секвенируемой области нуклеиновой кислоты

Кластеризация на основе цвета

Выход секвенирования – суммарный размер произведенных сиквенс-данных



Закономерности в локализации LTR

- Распределение **LTR** повторяет распределение генов в геноме
- **LTR** локализованы преимущественно в регуляторных областях генов
- Около половины **LTR** локализованы в генах факторов транскрипции и влияют на их регуляцию
- Взаимодействие **LTR** и клеточных факторов транскрипции приводит к регуляторному каскаду, в котором важную роль выполняет ретротранспозон

Вирусные ретротранспозоны (ВР) в геноме человека

ВР присутствуют в геноме человека 60 млн лет, взаимная адаптация геномов выражается в следующем:

- происходила инактивация **ВР** клеточными системами
- продукты **ВР** (белки и РНК) вовлекались в жизненно важные процессы хозяина
- регуляторные элементы генома **ВР** использовались для экспрессии клеточных генов хозяина
- Участие **ВР** в эволюции генома хозяина

Роль вирусных ретротранспозонов

- **Участие в регуляции эмбриогенеза**: на модельных системах установлено образование мРНК различных семейств **ВР** в тканях зародыша и плаценты при дифференцировке и морфогенезе
- **Препятствуют ретровирусной инфекции**: *gag*-ген **ВР** мыши препятствовал интеграции вируса лейкоза в ДНК и обуславливал устойчивость к заражению у мышей
- Низкий уровень транскрипции **ВР** обнаружен в клетках головного мозга, молочных желез, лейкоцитах человека, клетках коры надпочечников, в клетках, участвующих в иммунных процессах или продукции гормонов.

Взаимосвязь активности ВР с заболеваниями человека

- Активность **ВР** возрастает при

  рассеянном склерозе

  ревматоидном артрите

  сахарном диабете I типа
- Причины повышения уровня экспрессии остаются невыясненными
- Активация ретротранспозонов стала диагностикумом аутоиммунных паталогий
- Повышается активность **ВР** в линиях онкотрансформированных клеток

Задачи анализа:

- Идентифицировать и систематизировать все **ВР** в геноме человека, выявить структуру путем таргетного секвенирования
- Определить гены, рядом с которыми встроены вирусные ретротранспозоны (**ВР**)
- Выявить все сайты для интеграции **ВР** в геноме
- Определить специфичность интеграции **ВР**

Цель: Путем поиска, идентификации, описания ВР и сайтов их локализации в геноме закладывается база для понимания глобальной регуляции функционирования генома

Результаты секвенирования:

- Таргетное секвенирование показало, что МЭ являются главным резервуаром генов микроРНК и играют ведущую роль в распространении микроРНК по геному человека
- Хронология включения и распространения МЭ указывает на важную роль в формировании геномов
- Доместикация МЭ заключается в использовании их в качестве регуляторных элементов, важных для формирования генных сетей
- После миллионов лет эволюции МЭ стали способом перенастройки генных сетей путем размножения микроРНК

Значимость МЭ

- МЭ в геноме – это сайты для рекомбинации или основа для геномных перестроек
- Рекомбинации между двумя копиями одного и того же мобильного элемента в ДНК приводят к делециям, инверсии, транслокации, дубликации.
- IS-элементы и транспозоны могут перемещаться в хромосомной ДНК и между хромосомной ДНК и плазмидной ДНК
- МЭ обеспечивают пластичность генома, важную для эволюции хромосом и плазмид
- МЭ влияют на экспрессию соседних генов