



Геннадий Чураков

# Мобильные элементы и ЭВОЛЮЦИЯ

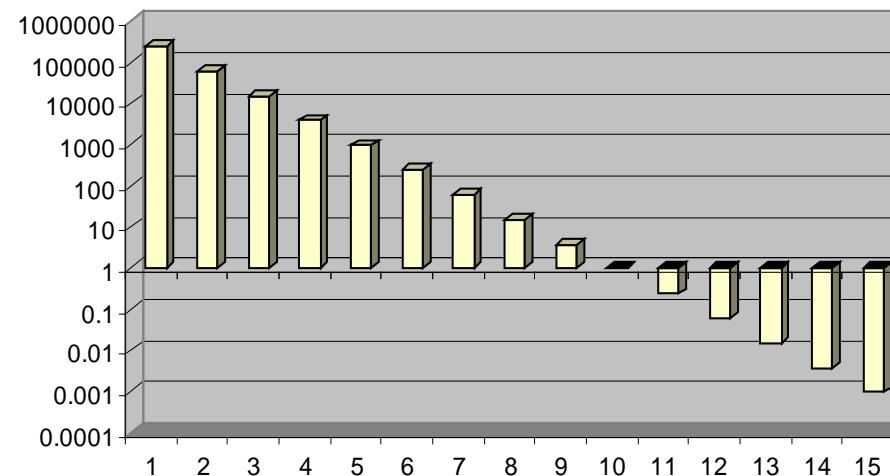
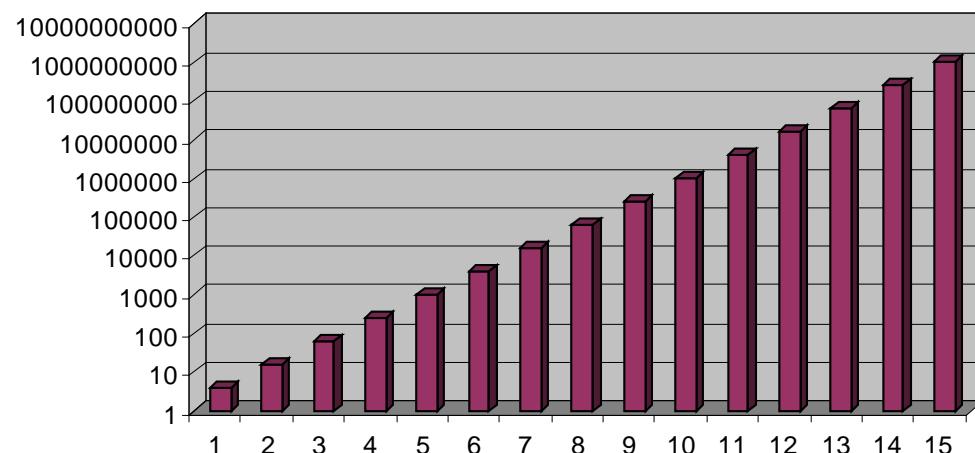
## Лекция 1

Институт Экспериментальной патологии/Молекулярной нейробиологии

Университетская клиника Мюнстера

# Повторяющиеся последовательности в геномах

## Периодичность геномов



Организм	Всего повторов в геноме	Сателлиты и простые повторы	Мобильные элементы
Кукуруза	70%	10%	60%
Рис	35%	9%	26%
Рожь	87%	15%	72%
Нематода	16%	7%	9%
Медовая пчела	8%	6%	2%
Дрозофила	16%	6%	10%
Москит	95%	11%	84%
Курица	16%	7%	9%
Мышь	62%	15%	47%
Человек	64%	17%	46%

# Открытие мобильных элементов

Барбара МакКлинток  
(1944-1951 гг., лаборатория  
Колд-Спринг Харбор)



Изучала мозаичную окраску эндосперма у кукурузы.

В линии кукурузы с бесцветным эндоспермом на хромосоме 9 был обнаружен участок, связанный с рецессивными мутациями соседних генов. Из него выделили два доминантных локуса: Активатор (Ac) и Диссоциатор (Ds).

Проявление мозаичной окраски зависит от наличия аллели гена – Диссоциатора (Ds),  
Выраженность мозаичной окраски зависит от дозы Активатора (Ac).



Обычная окраска



Мозаичная окраска



Мозаичная окраска

0-1Ac+

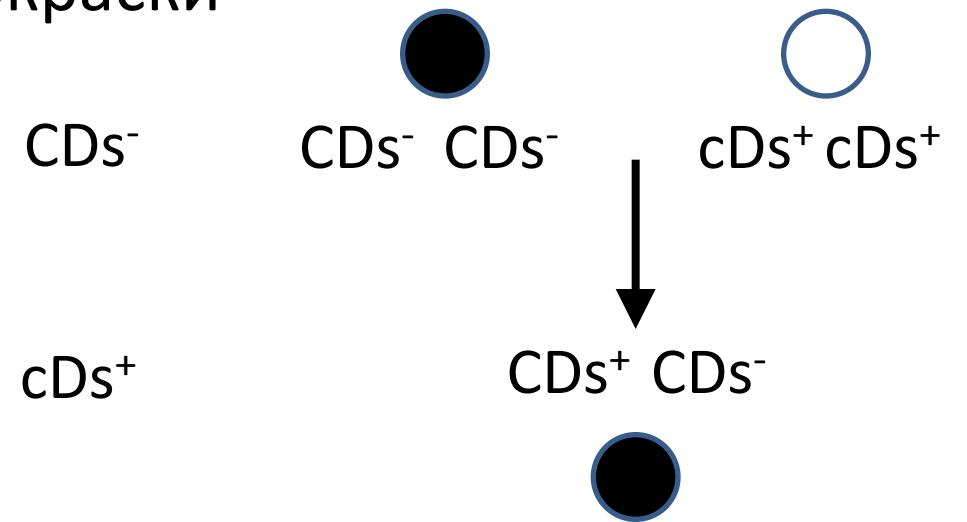
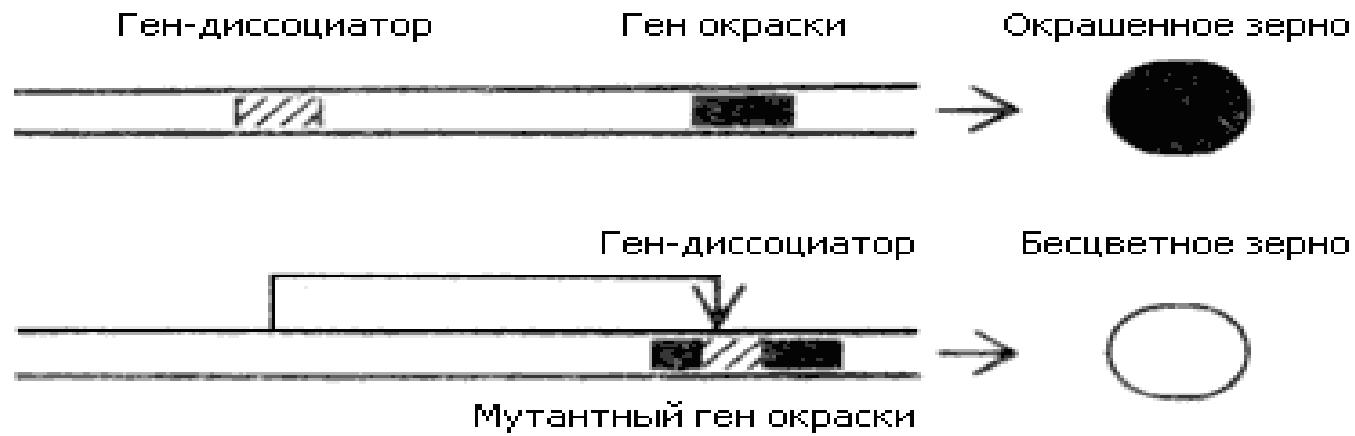
2Ac+

3Ac+

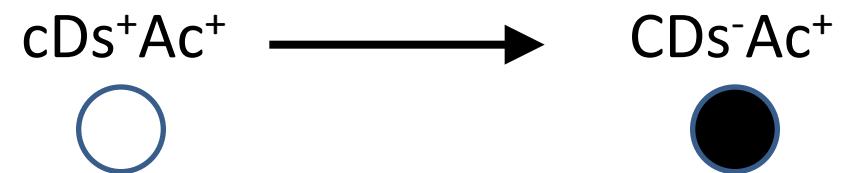
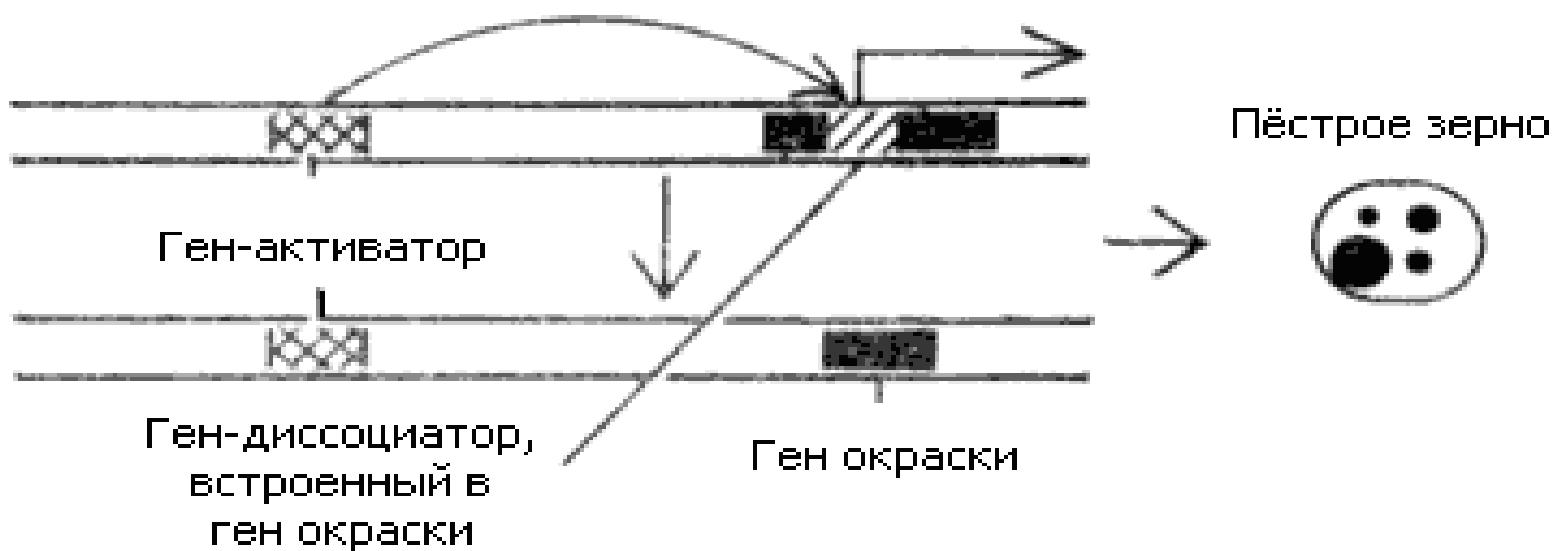


# Открытие мобильных элементов

Ген диссоциатор (Ds) может встраиваться в ген окраски

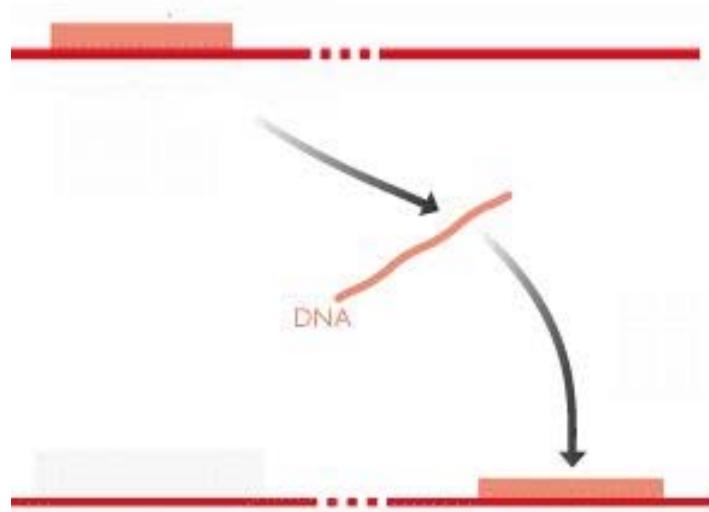


Под действием активатора (Ac), ген диссоциатор (Ds) производит переключение.

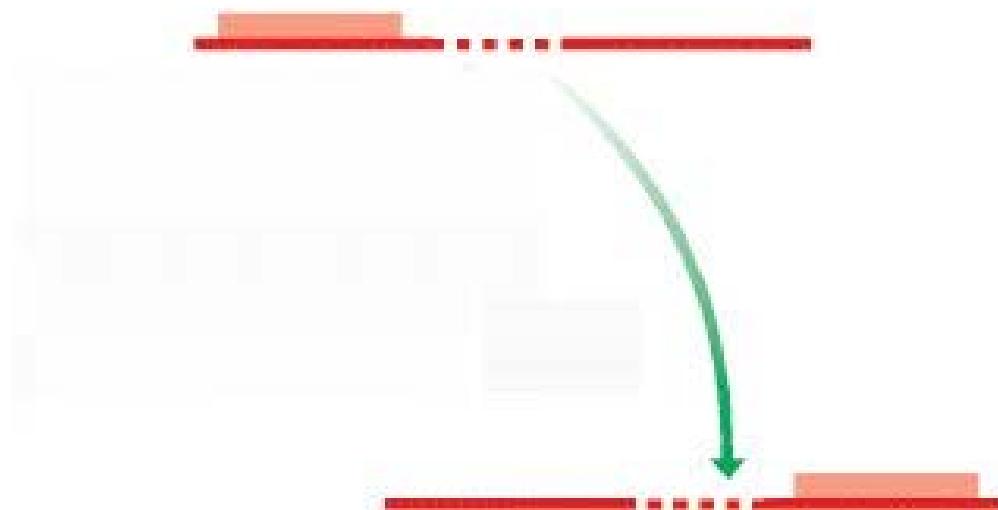


# Классификация мобильных элементов

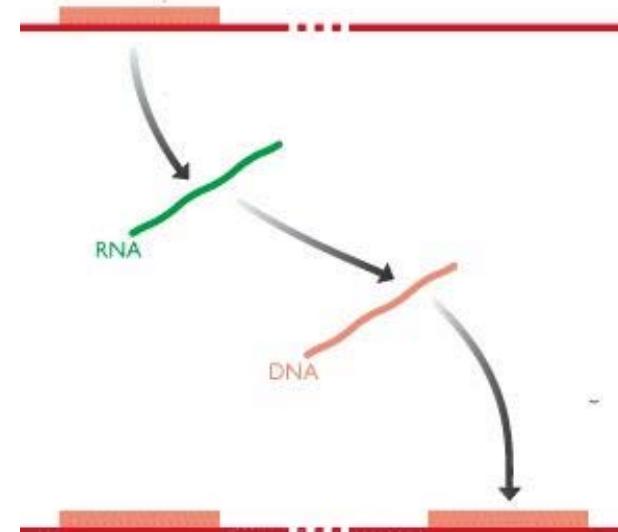
- Вырезание - встраивание  
(Транспозоны) (Тип II)



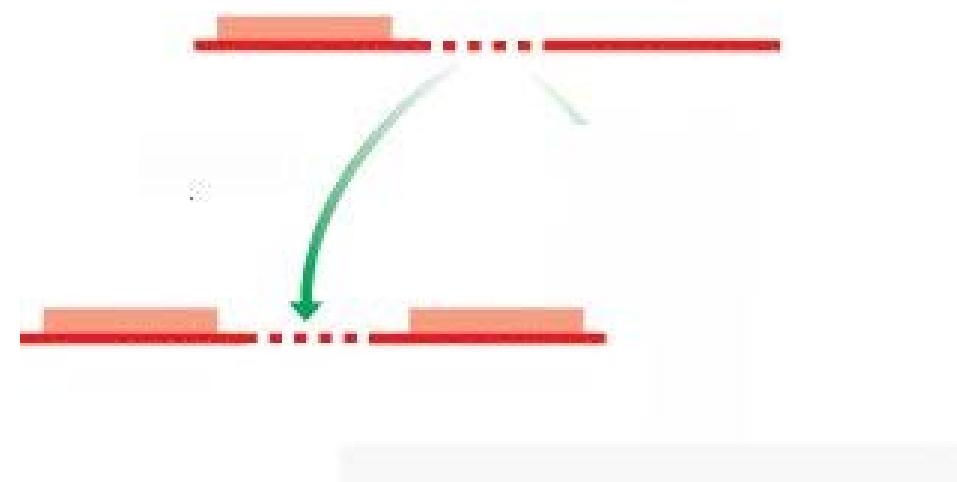
- Консервативная транспозиция



- Копирование - встраивание  
(Ретроэлементы) (Тип I)

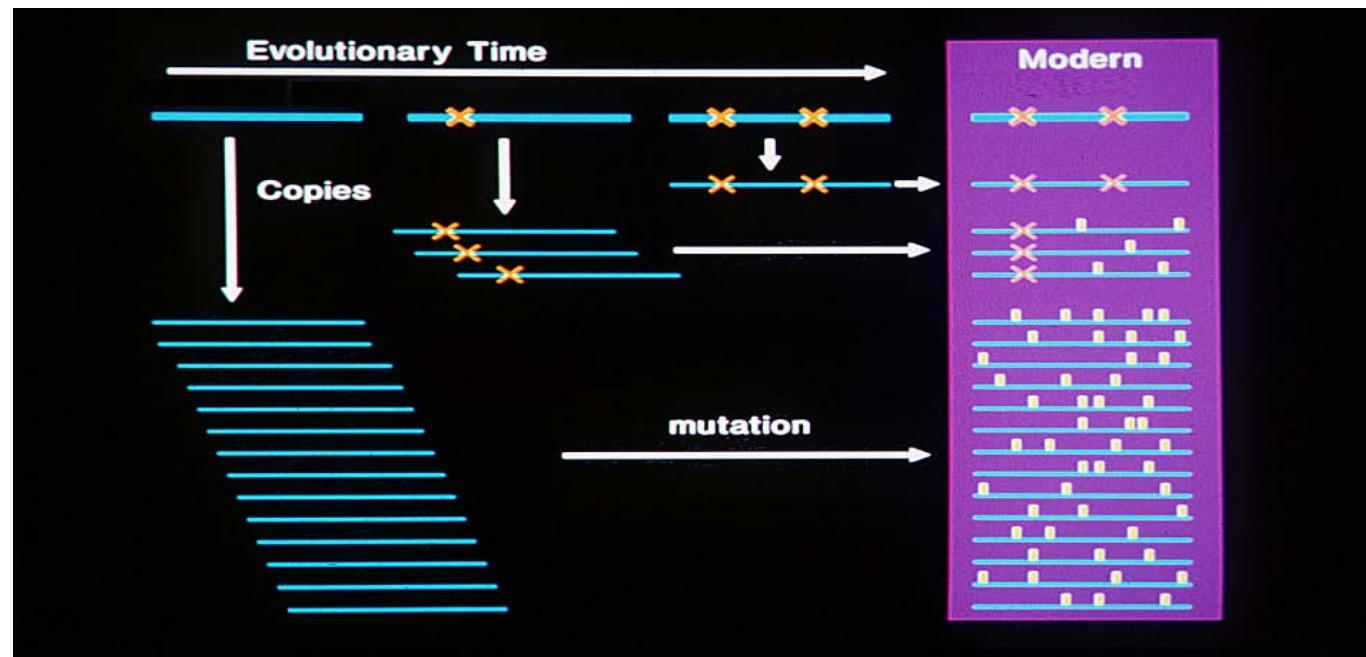


- Репликативная транспозиция/ретропозиция

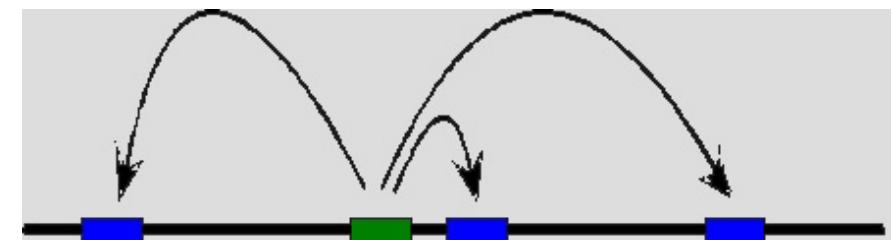


# Общие свойства мобильных элементов в геномах

Мобильные элементы присутствуют в геномах в виде похожих, но не идентичных копий последовательностей ДНК



Гипотеза «мастер-гена»



Большинство копий являются не активными и не полными.



Копии мобильных элементов распределены по геному неравномерно.

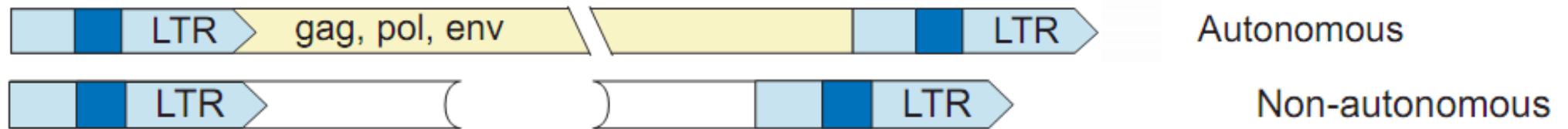


# Классификация мобильных элементов.

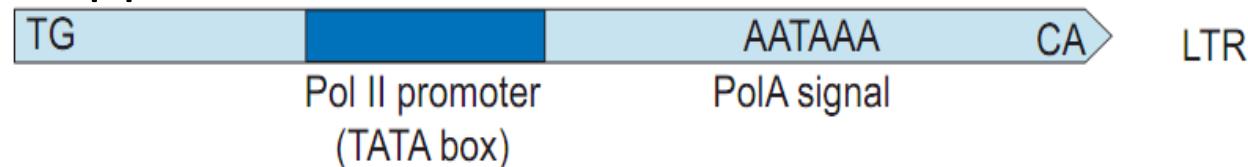
## Тип – Класс – Семейство – Вид

- Тип I – LTR ретроэлементы

- Класс - Экзогенные ретровирусы.
- Класс - Эндогенные ретровирусы.
- Класс – Автономные/не автономные LTR элементы.



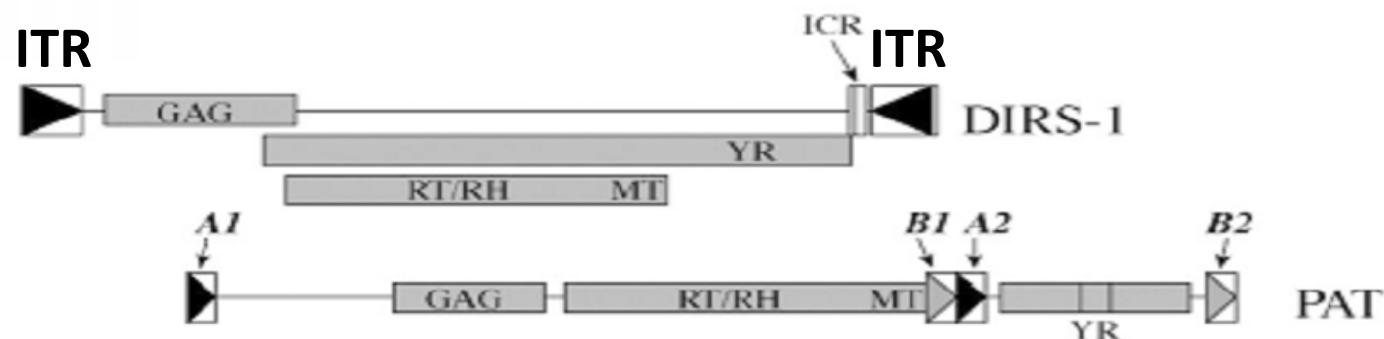
- Одиночные LTR.



- «Псевдогены» LTR.



- Класс - DIRS

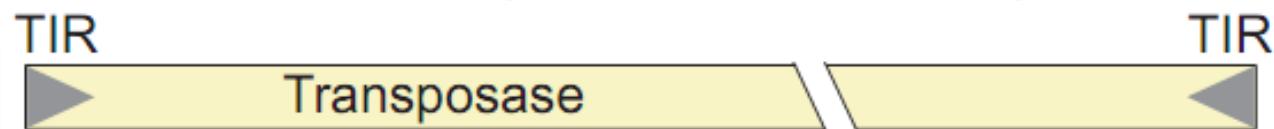


# Классификация мобильных элементов.

Тип – Класс – Семейство – Вид

- Тип II – ДНК транспозоны

- Класс – ДНК-транспозоны
- Класс MITE

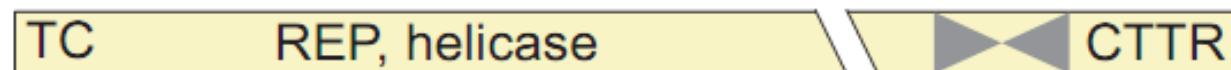


Autonomous



Non-autonomous

- Класс - Хелитроны

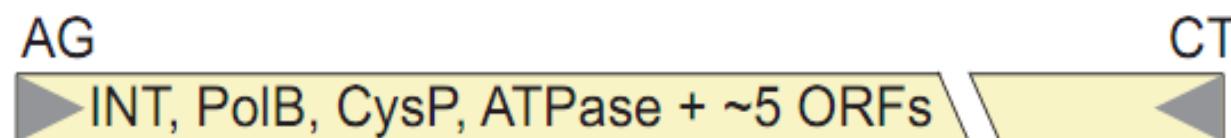


Autonomous



Non-autonomous

- Класс - Полинтоны



Autonomous



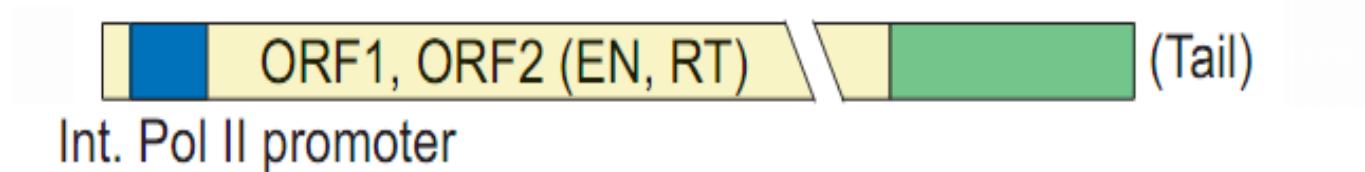
Non-autonomous

# Классификация мобильных элементов.

Тип – Класс – Семейство – Вид

- Тип III – Не LTR ретроэлементы

- Суперкласс – LINE



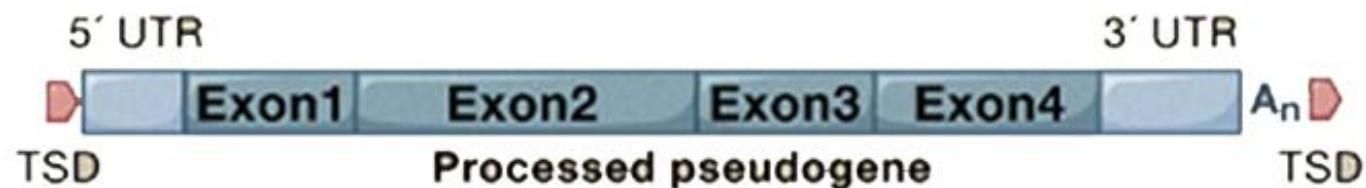
Autonomous

- Класс – SINE

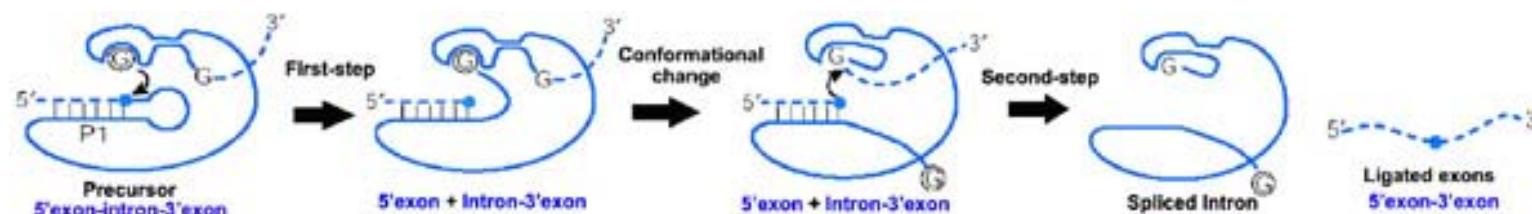


Non-autonomous

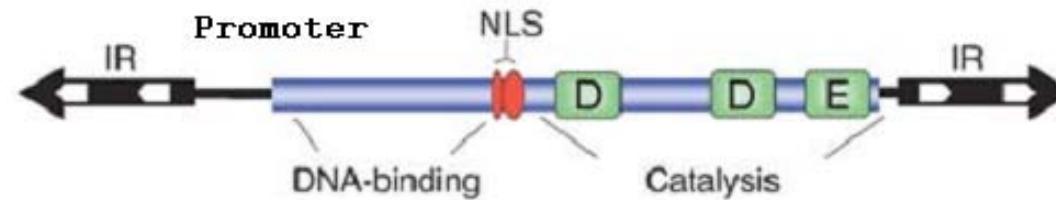
- Псевдогены



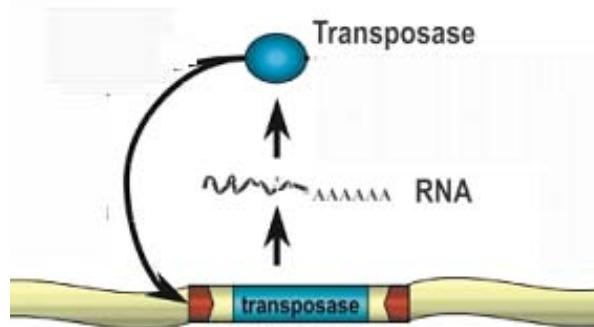
- Ретроинтроны



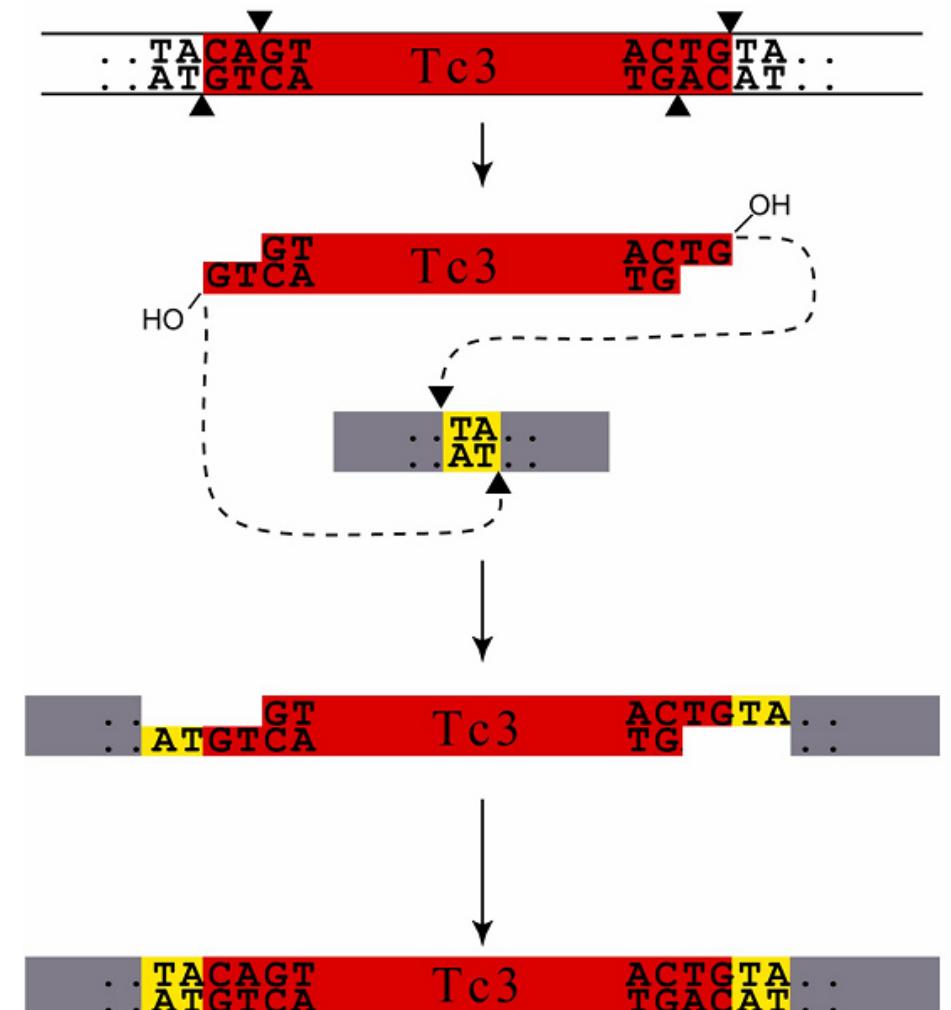
# Этапы репликации автономных ДНК транспозонов.



- Транскрипция.
- Трансляция на рибосомах клетки-хозяина.
- Возвращение транспозазы в ядро клетки-хозяина.

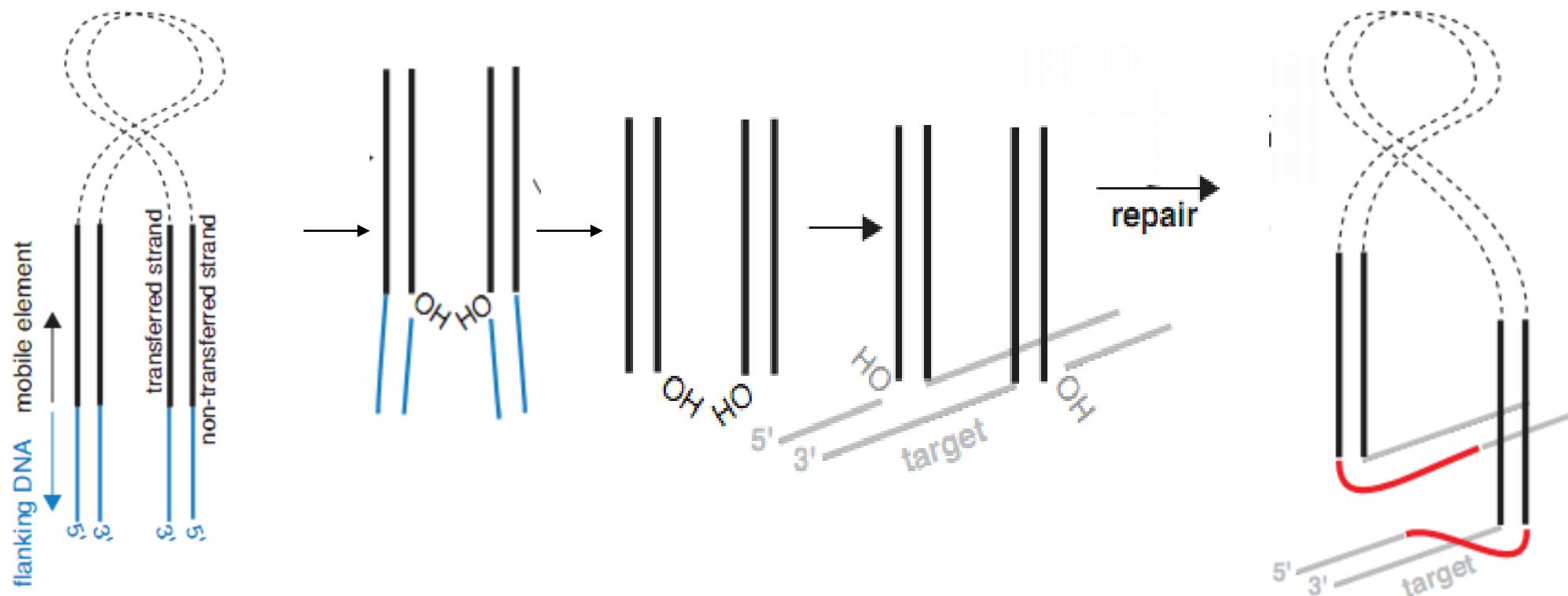


- Поиск специфичных для данного типа транспозона инвертированных повторов.
- Формирование «петли» и вырезание ДНК элемента, образование «липких концов».
- Лигирование ДНК хозяина.
- Репарация ДНК хозяина на обоих сайтах.



# Консервативная транспозиция.

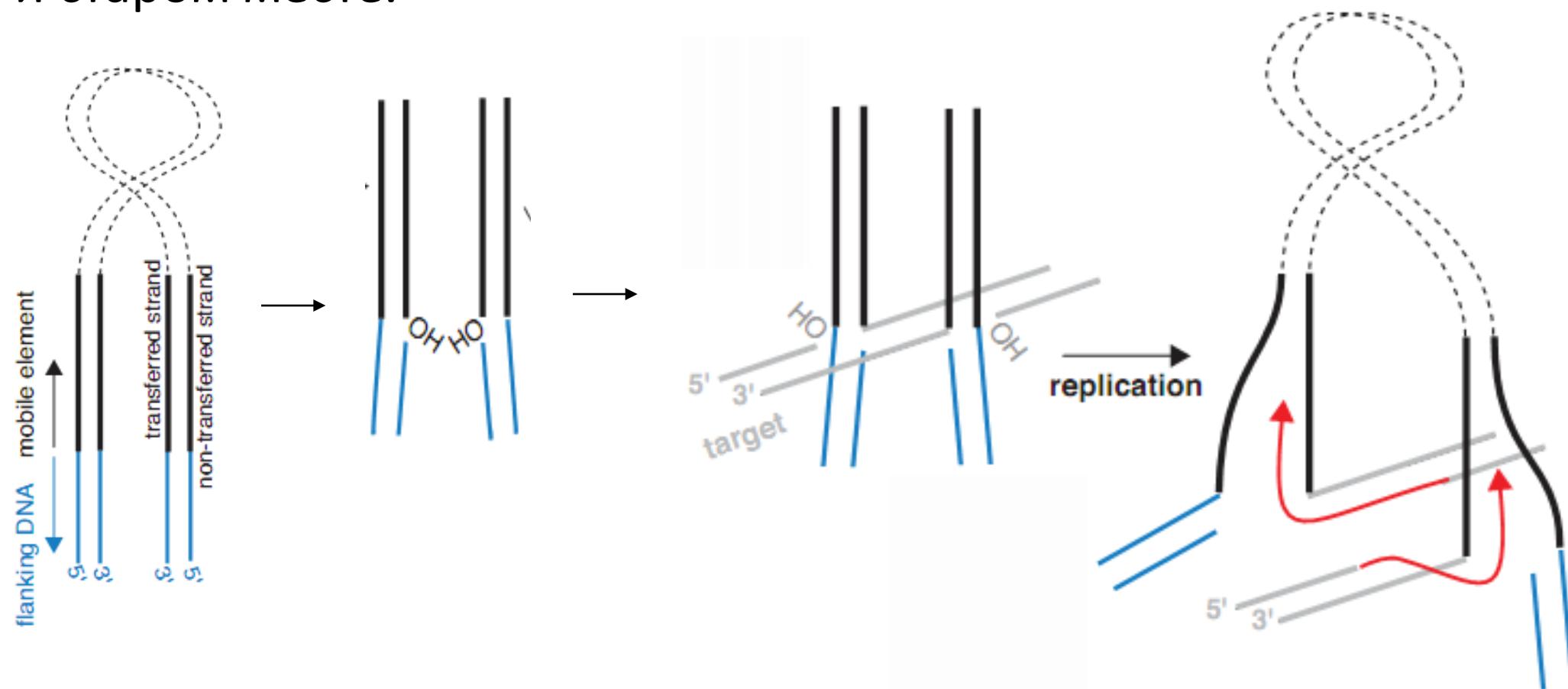
- Консервативная транспозиция осуществляет только перенос ДНК транспозона на новое место.
- Консервативная транспозиция не синхронизирована с делением клетки.
- Консервативная транспозиция осуществляется за счёт репарационной системы клетки.
- При консервативной транспозиции разрезаются обе нити ДНК и формируются «липкие концы».



According to (Montano&Rice, CurOptStructBiol, 2011)

# Репликативная транспозиция. Сочетание репликации и «переброса нити»

- Транспозаза дважды надрезает только одну нить ДНК в спирали.
- В месте нового встраивания она так же создаёт один надрез.
- Транспозаза переносит концы нити ДНК транспозона в место надреза и лигирует с ДНК хозяина.
- Репликация создаёт копию транспозона по двум нитям на новом и старом месте.



According to (Montano&Rice, CurOptStructBiol, 2011)

# Репаративная транспозиция: конверсия за счёт гомологичной рекомбинации.

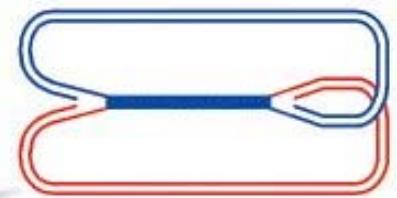
Репаративная транспозиция встречается у прокариот. У эукариот она возможна в геномах пластид и митохондрий



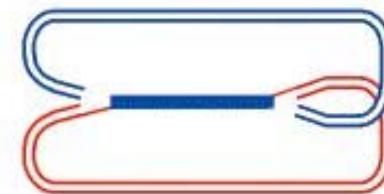
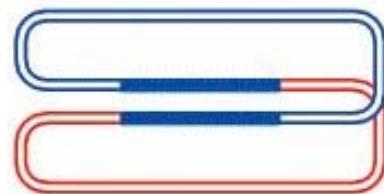
Распознавание гомологичных фланговых последовательностей



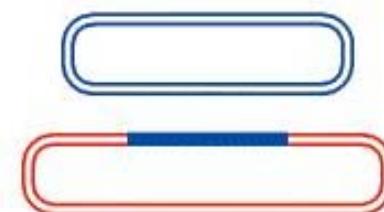
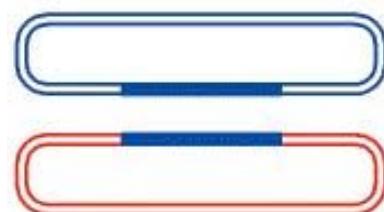
Создание «липких концов»



Включение системы репарации повреждений ДНК

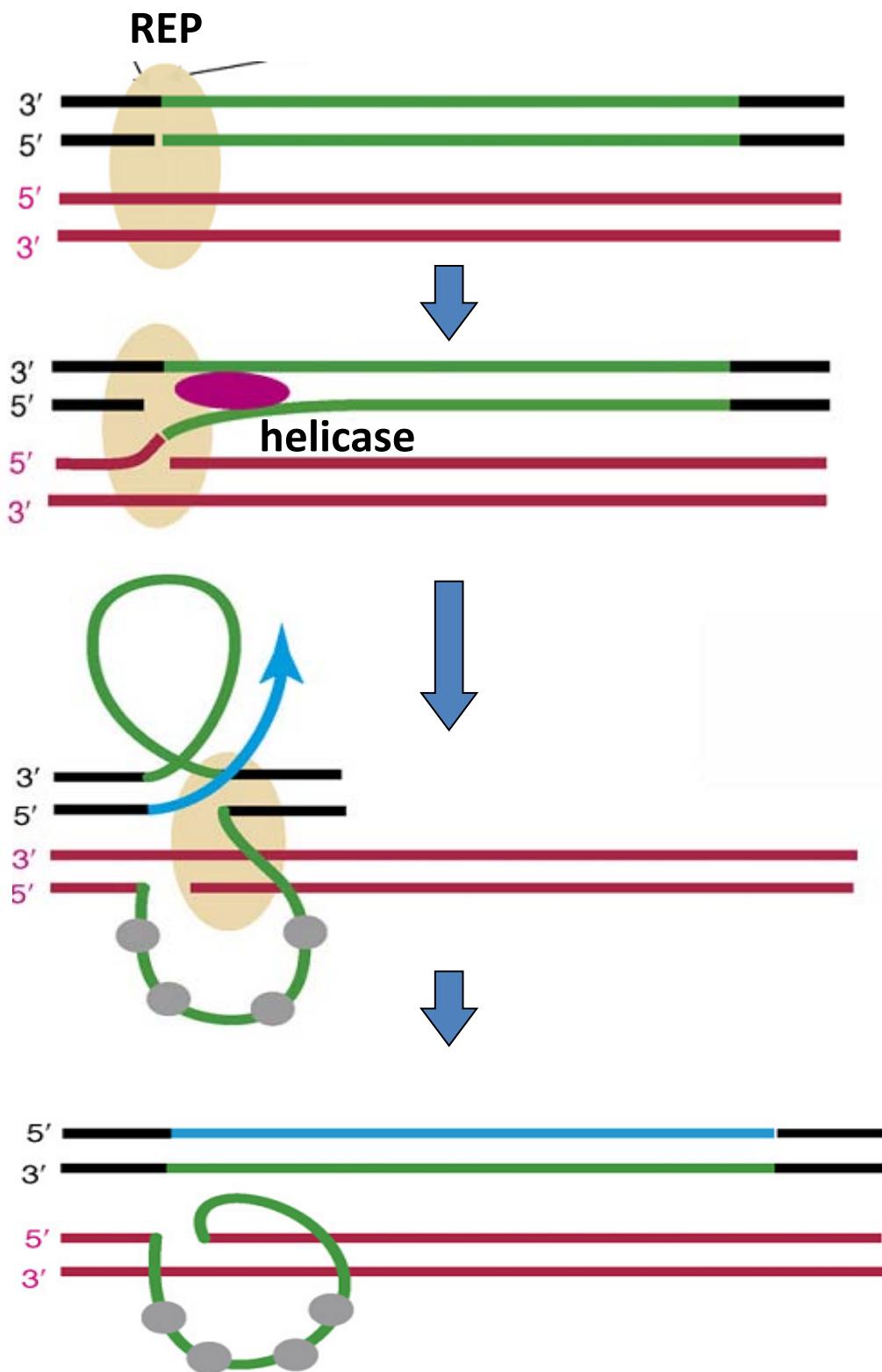


Репарация за счёт гомологичной рекомбинации



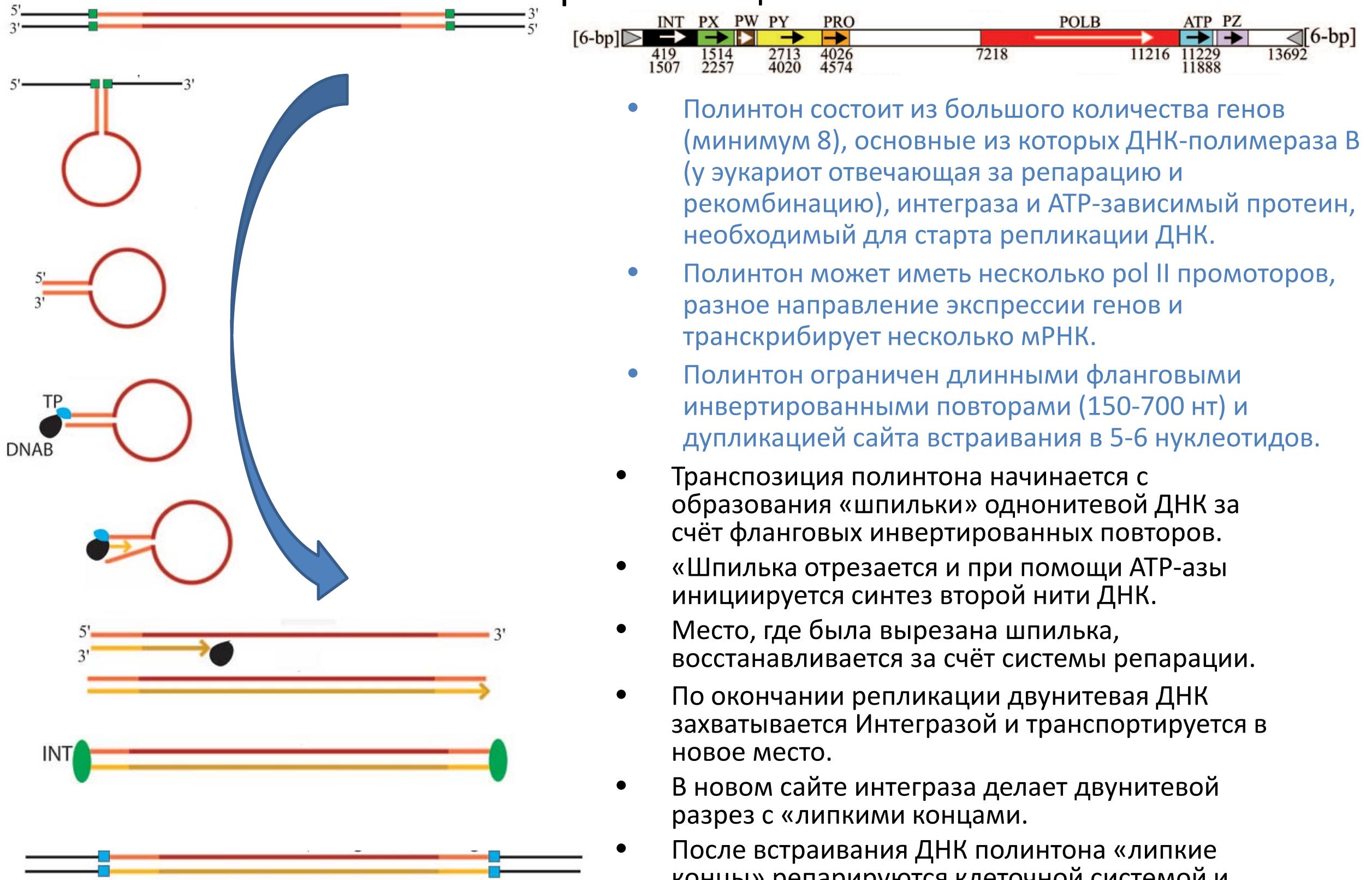
Перенос транспозона на парную хромосому

# Репликативная транспозиция хелитрона - «катящийся круг».



- **REP** – эндонуклеаза
  - **Helicase** – АТФ-зависимая хеликаза.
  - **А/Т** – сайт встраивания.
  - На 3' конце короткие инвертированные повторы на однонитевой ДНК образуют шпильку на расстоянии ~15 нт от конца.
- 
- REP надрезает только одну нить ДНК с 5' конца хелитрона.
  - В месте нового встраивания он так же создаёт один надрез между А и Т.
  - При достижении терминатора хелитрона REP производит разрезание сайта на 3' конце хелитрона и запускается система репарации.
  - Однонитевая ДНК защищена за счёт специального белка из хелитрона или за счёт клеточных механизмов.
  - Вторая копия хелитрона достраивается за счёт репарации.

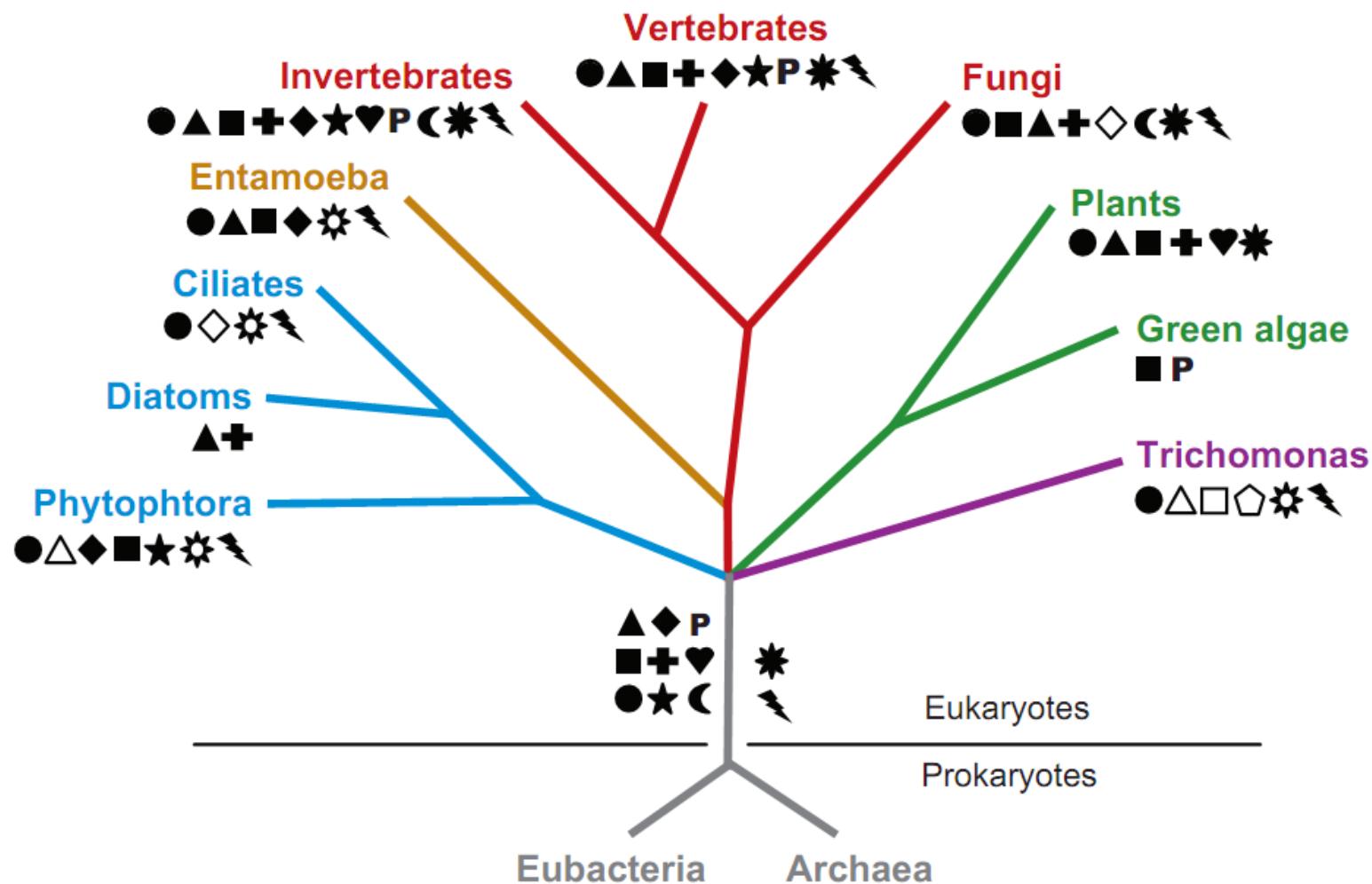
# Репликативная транспозиция полинтонна - «вирусный» тип транспозиции.



- Полинтон состоит из большого количества генов (минимум 8), основные из которых ДНК-полимераза В (у эукариот отвечающая за репарацию и рекомбинацию), интеграна и АТР-зависимый протеин, необходимый для старта репликации ДНК.
- Полинтон может иметь несколько *rol II* промоторов, разное направление экспрессии генов и транскрибирует несколько мРНК.
- Полинтон ограничен длинными фланговыми инвертированными повторами (150-700 нт) и дубликацией сайта встраивания в 5-6 нуклеотидов.
- Транспозиция полинтонна начинается с образования «шпильки» однонитевой ДНК за счёт фланговых инвертированных повторов.
- «Шпилька» отрезается и при помощи АТР-азы инициируется синтез второй нити ДНК.
- Место, где была вырезана шпилька, восстанавливается за счёт системы репарации.
- По окончании репликации двунитевая ДНК захватывается Интегразой и транспортируется в новое место.
- В новом сайте интеграна делает двунитевой разрез с «липкими концами».
- После встраивания ДНК полинтонна «липкие концы» репарируются клеточной системой и образуется дубликация сайта встраивания.

According to (Kapitonov&Jurka, PNAS, 2006)

# Распространенность ДНК транспозонов.



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 САСТА транспозоны найдены у насекомых и у цветковых растений.

## Cut-and-paste DNA transposons:

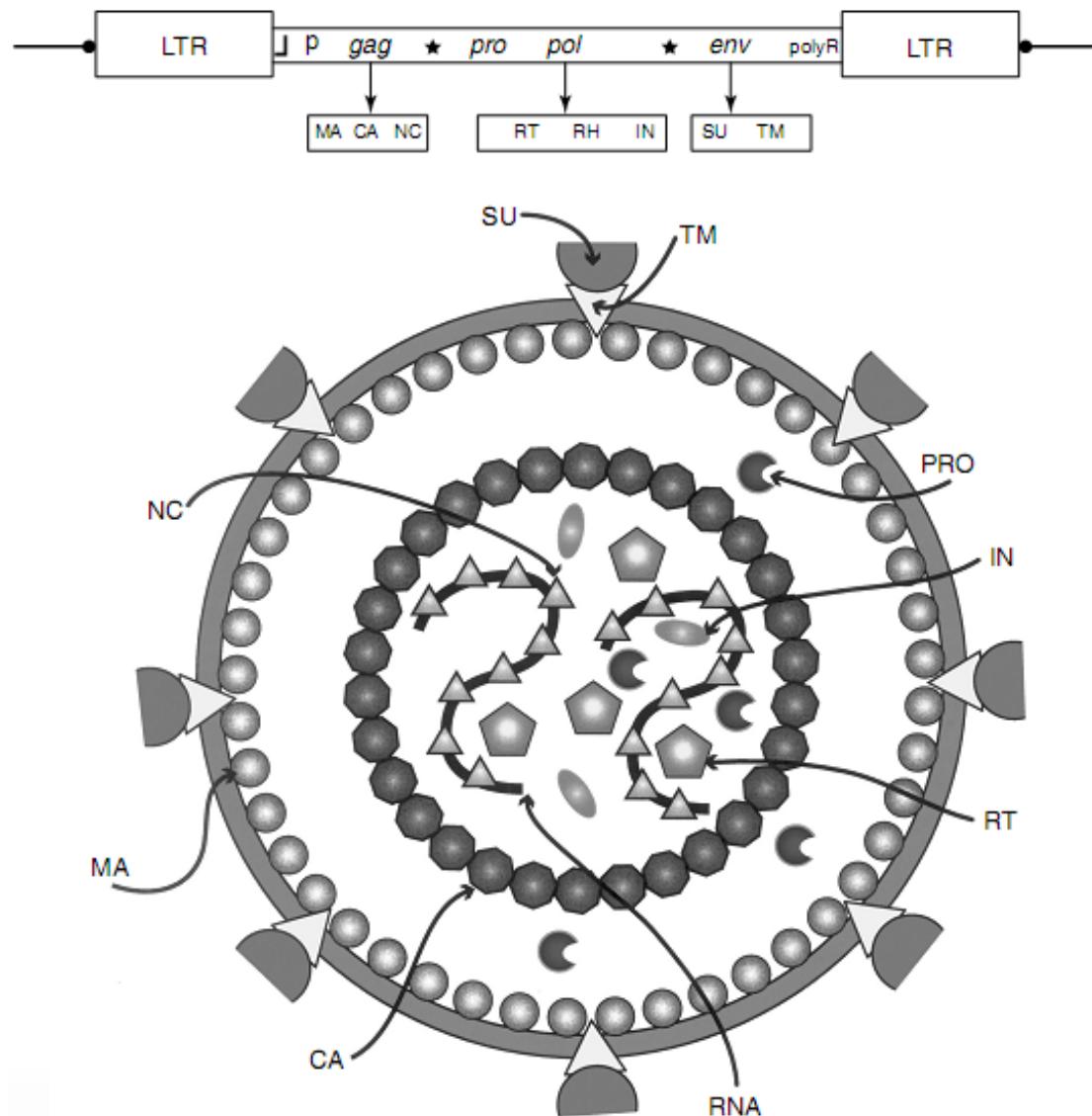
- |                              |                          |
|------------------------------|--------------------------|
| ● <i>Tc1/mariner</i> (5/5)   | ★ <i>Merlin</i> (2/5)    |
| ▲ <i>MuDR/Foldback</i> (5/5) | ♥ <i>CACTA</i> (2/5)     |
| ■ <i>hAT</i> (5/5)           | P <i>P element</i> (2/5) |
| ◆ <i>piggyBac</i> (4/5)      | ☾ <i>Transib</i> (1/5)   |
| + <i>PIF</i> (3/5)           | ◊ <i>Banshee</i> (1/5)   |

## Other subclasses:

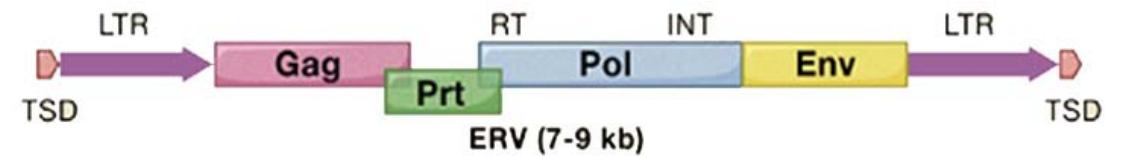
- ✨ *Helitrons* (5/5)
- ⚡ *Mavericks* (4/5)

# Жизненные циклы: ретровирусы и LTR ретроэлементы

## Строение классического ретровируса

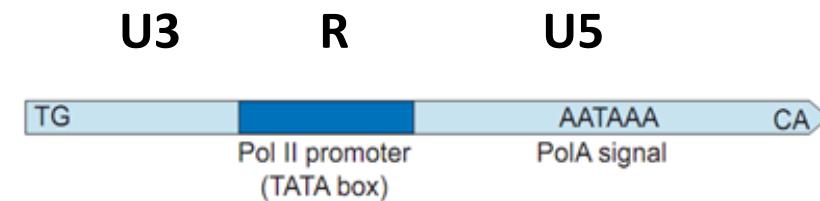


## Структура генома LTR элементов



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

## Структура LTR



- U3 – не транскрибирующаяся часть LTR
- R – старт транскрипции
- U5 – зона связывания tRNA праймера

# Жизненные циклы: ретровирусы и LTR р

Трансляция и сборка частицы

Перенос праймера

Деструкция РНК до С/Т области

Праймирование и синтез 5' LTR

Перенос праймера и старт синтеза "+" цепи ДНК

Удаление остатков РНК

Транскрипция

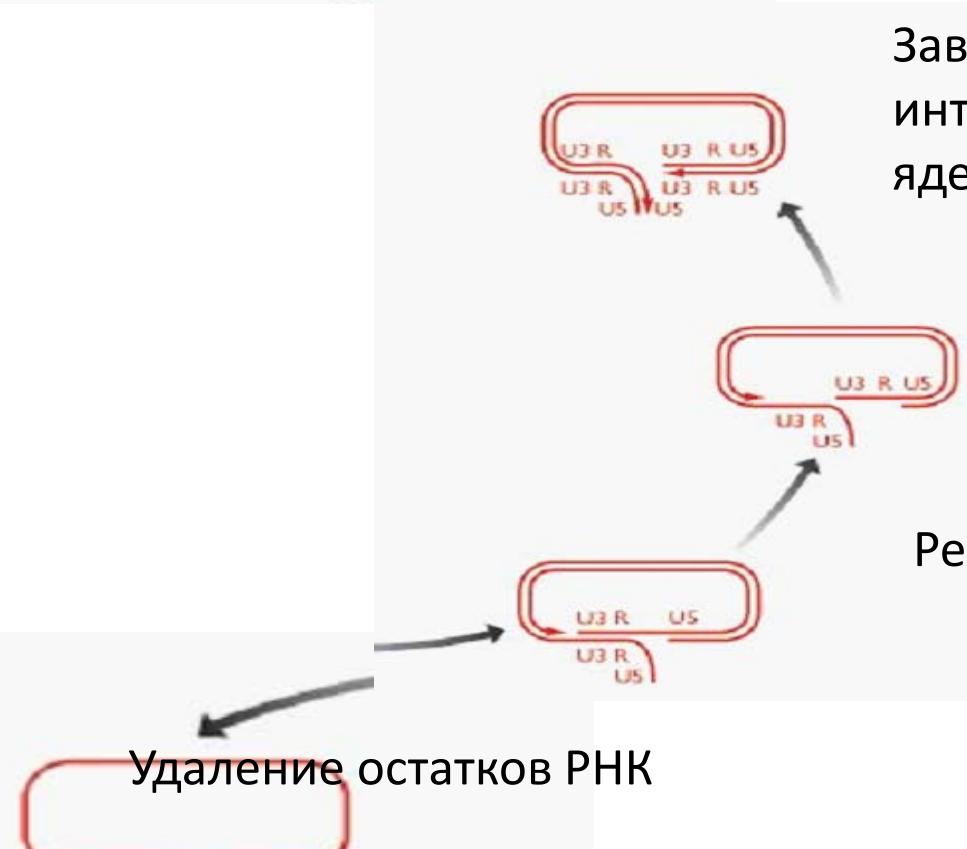
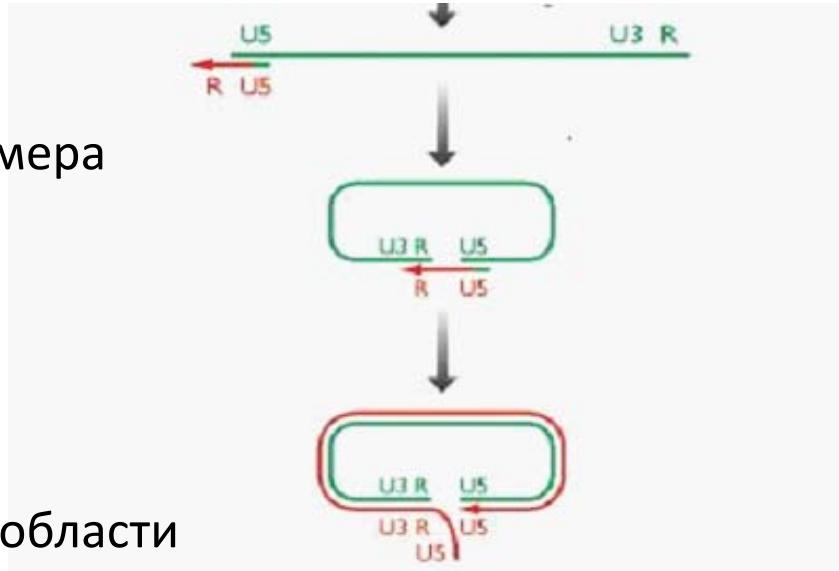
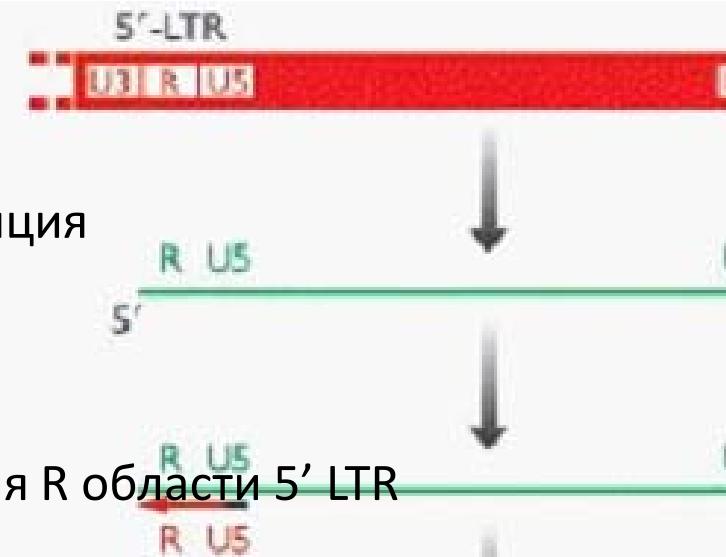
Деструкция R области 5' LTR

Инициация обратной транскрипции

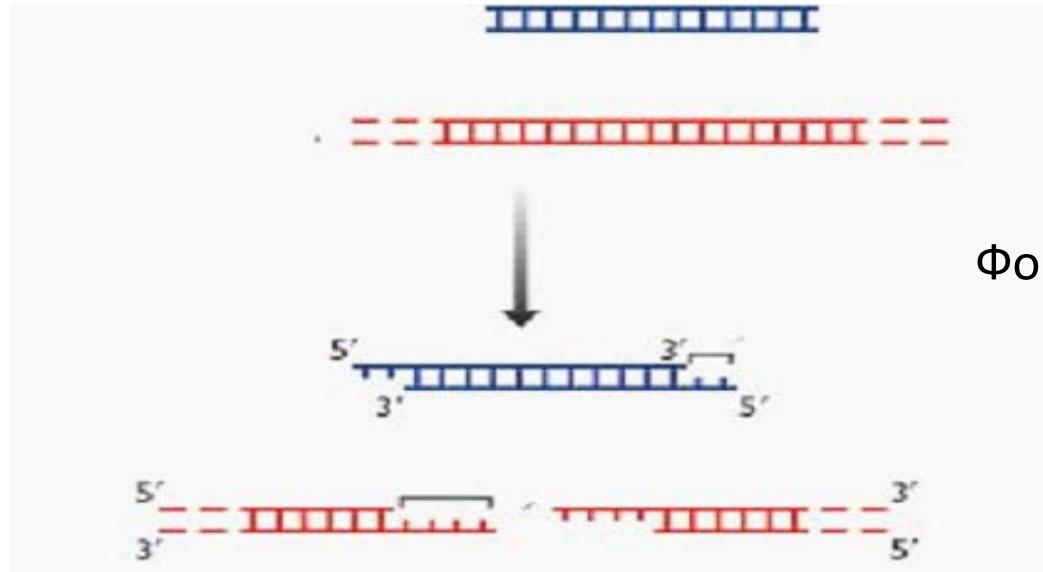
Обратная транскрипция "-" цепи ДНК

Завершение синтеза и старт интеграции ДНК вируса в ядерную ДНК

Ресинтез 5' LTR

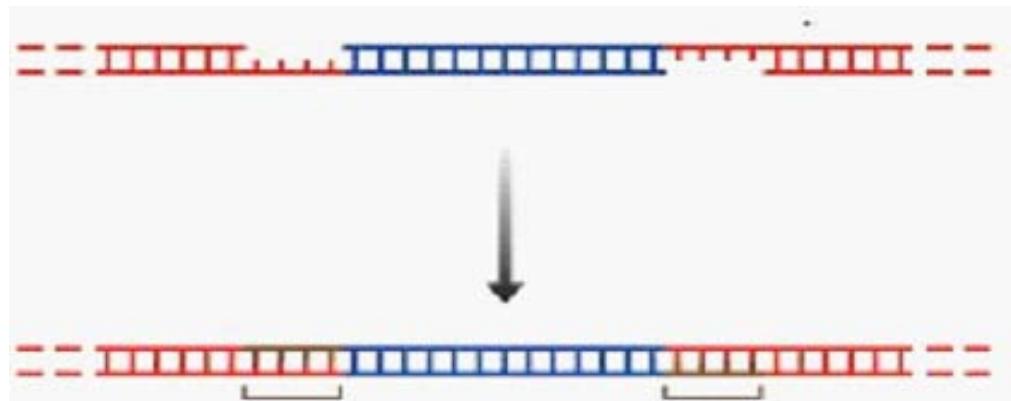


# Интеграция: ретровирусы и LTR ретроэлементы



Формирование липких концов вирусной ДНК

Разрезание ДНК хозяина и формирование липких концов

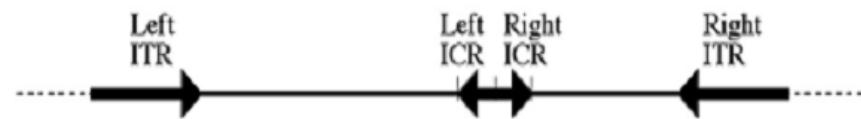


Интеграция вирусной ДНК в геном клетки хозяина

- Gag – белки вирусного компартмента
  - RT/RN – обратная транскриптаза/РНКазы-Н
  - MT – вспомогательный протеин.
  - YR – тирозиновая рекомбиназа.
  - ITR – фланговые инвертированные повторы.
  - ICR – участок, комплиментарный к ITR.
- Репарация однонитевой ДНК и дупликация сайта встраивания

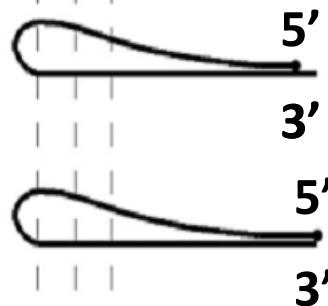
# Жизненный цикл DIRS элементов

## Репликация основанная на ITR

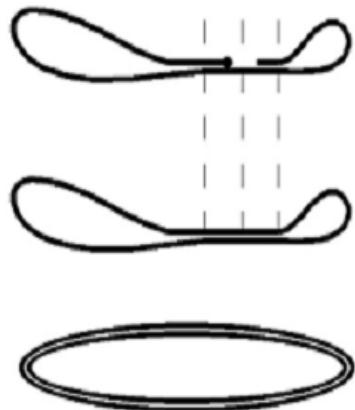


Фолдинг однонитевой ДНК при помощи МТ

Достройка ITR по ICR



Замыкание кольца однонитевой ДНК

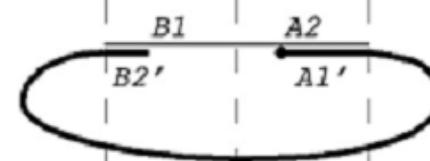


Достройка двунитевой кольцевой ДНК

## Репликация основанная на DTR



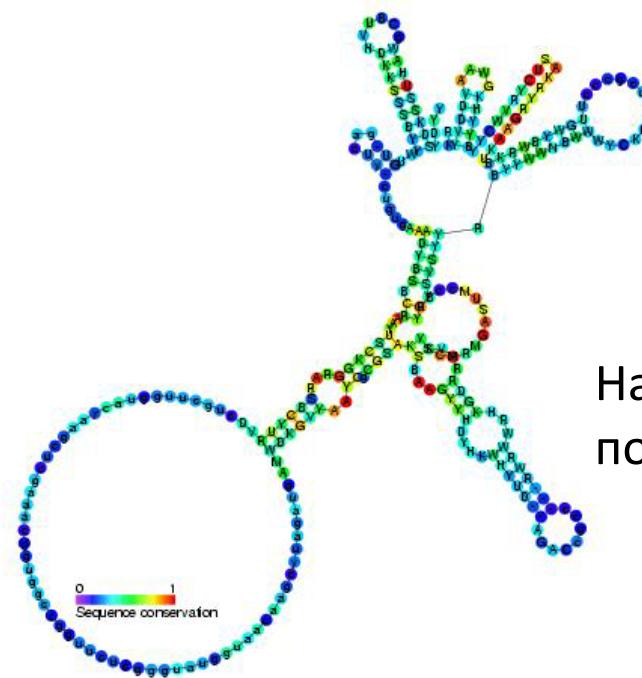
Достройка DTR по mRNA



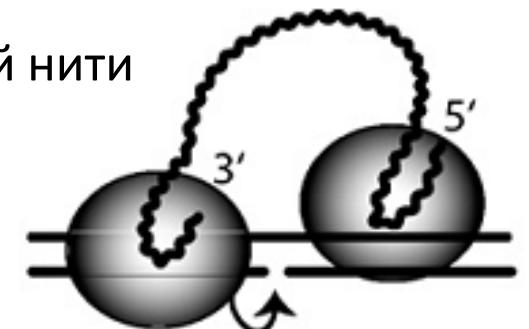
# Жизненные циклы LINE: R2 (пример TPRT)



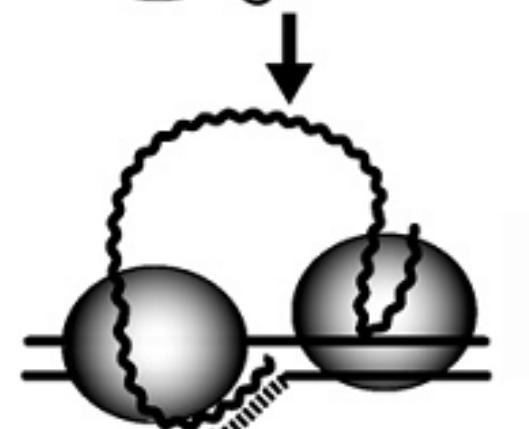
- R2 – специфический LINE. Он «паразитирует» на 28S рибосомальной РНК, и представляет собой самосплайсирующийся интрон II типа.
- R2 кодирует одну ORF, несущую эндонуклеазную активность и обратную транскриптазу.
- R2 имеет высокую специфичность к сайту встраивания в гене 12S рРНК.
- R2 утилизирует заимствованный pol I промотр от гена рибосомальной РНК.



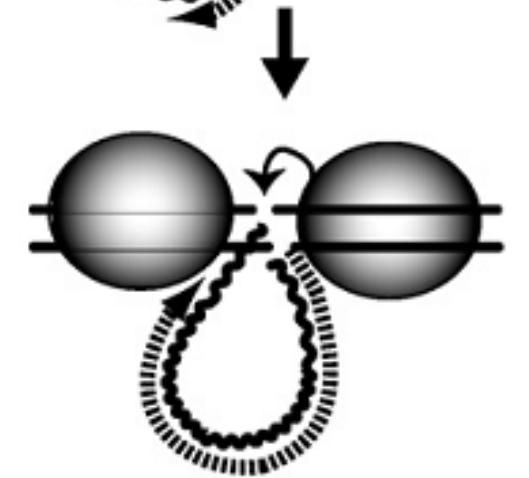
Разрез первой нити



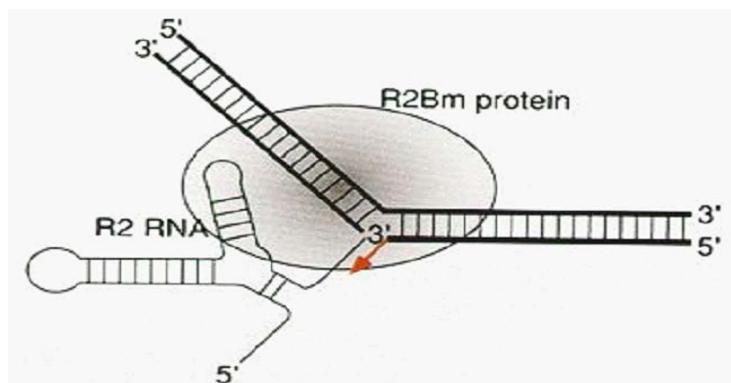
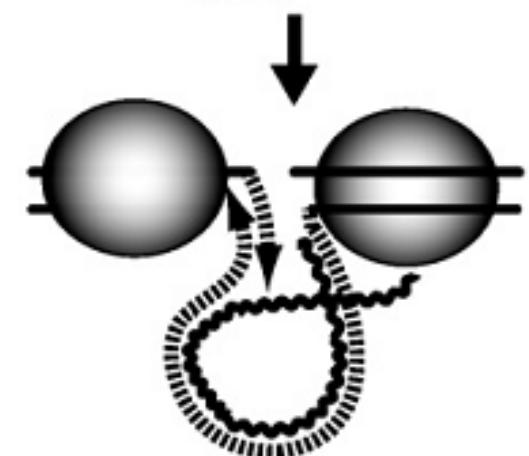
Начало RT по R2 РНК



Разрезание второй нити



Старт синтеза второй нити R2 ДНК

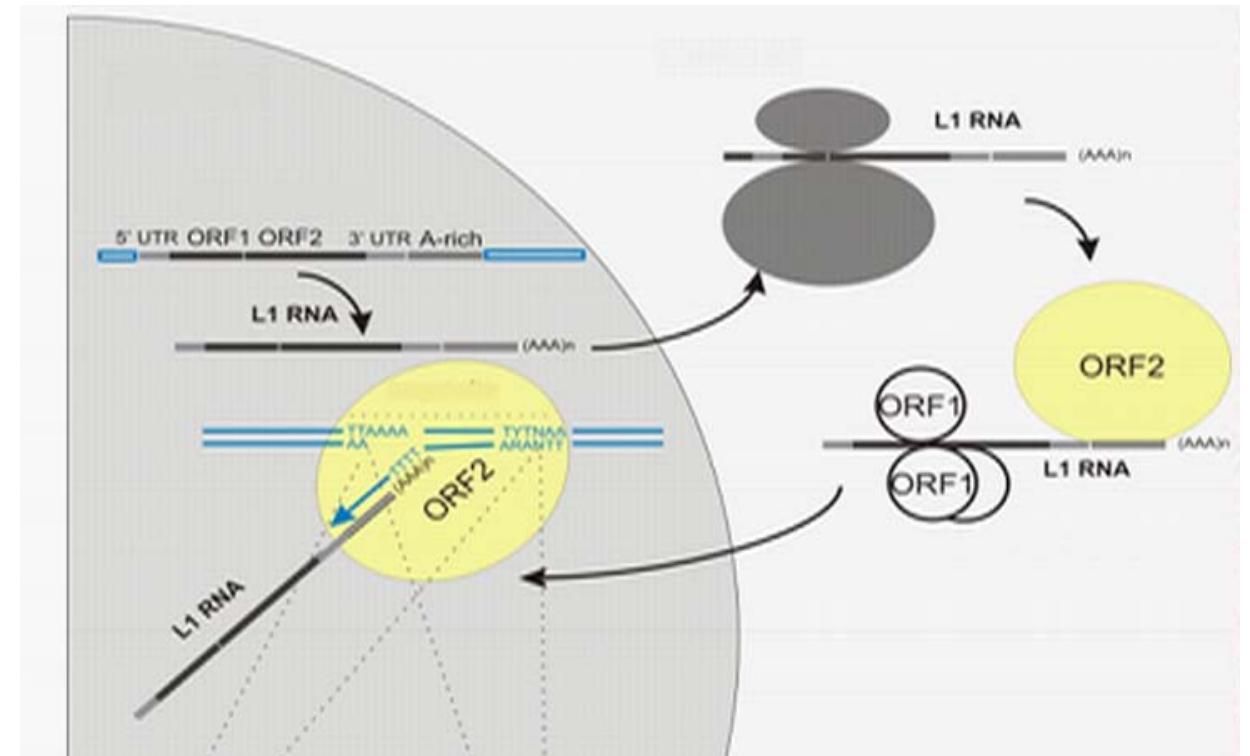


R2-LINE: Разрезание ДНК клетки и старт обратной транскрипции от свободной «-ОН» группы.

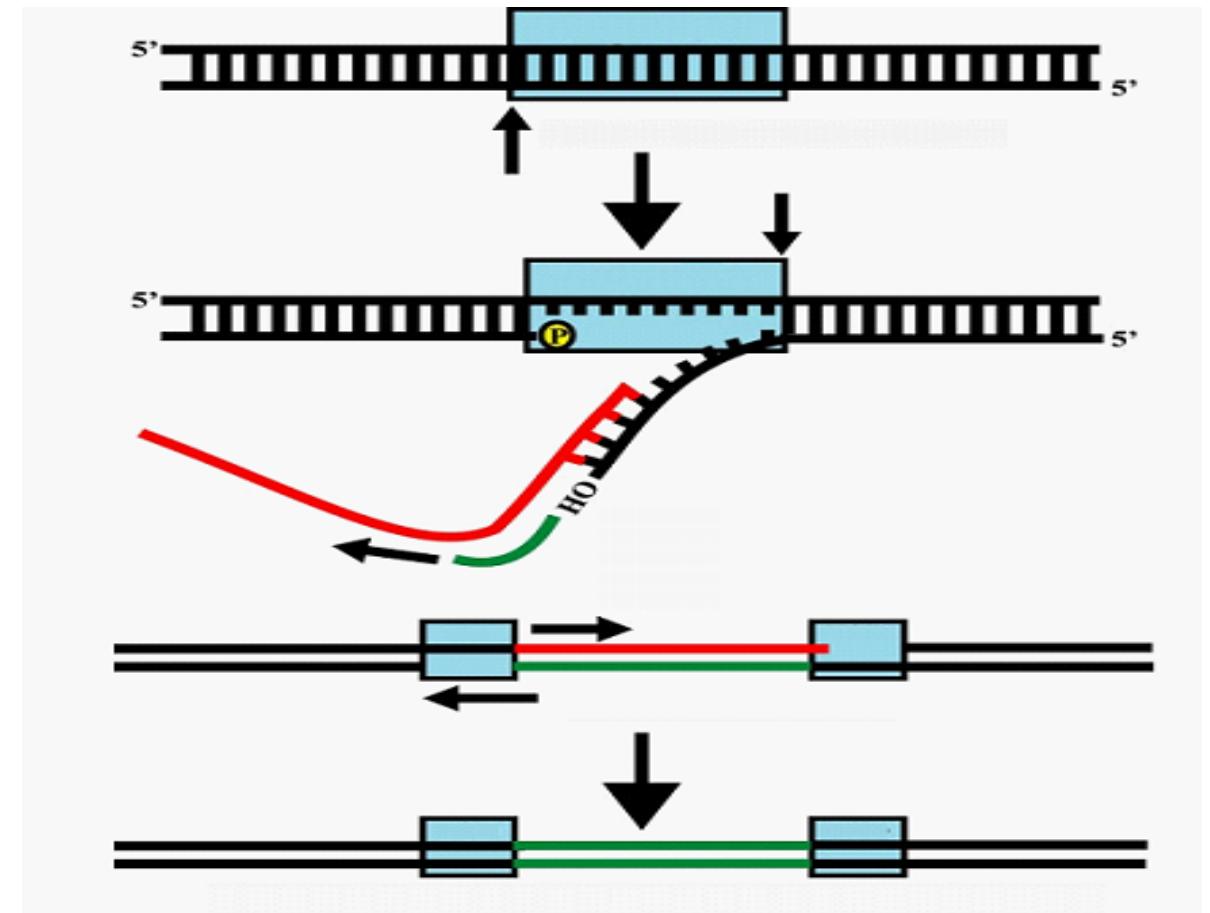
# Жизненные циклы: LINE1



- TSD – дупликация сайта встраивания
- ORF1 = транспортный протеин
- ORF2 = EN + RT + C – ДНК-эндонуклеаза + обратная транскриптаза + домен распознавания нуклеиновых кислот
- UTR – 5'- и 3'- не транслируемые последовательности.



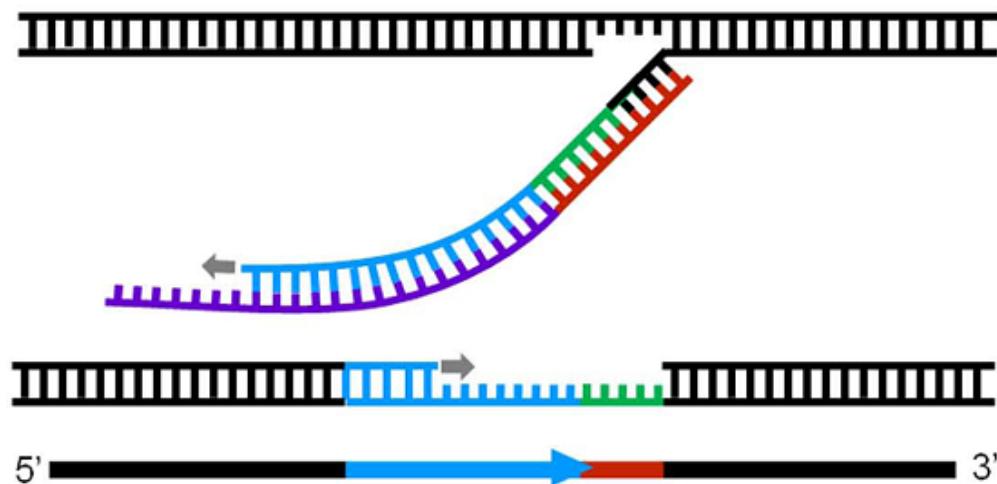
- Транскрипция, трансляция на рибосоме, захват свой мРНК и формирование L1 рибопротейна
- Транспорт комплекса в ядро.
- Диссоциация ORF1 белков.
- Поиск подходящего участка.
- Разрезание нижней нити в консенсусе AA/TTTT, расплетание сайта встраивания, гибридизация polyA хвоста РНК с олиго-Т сайта встраивания.
- Старт RT, элонгация ДНК.
- Разрезание верхней нити в консенсусе TYTN/AA.
- Достройка ДНК до начала мРНА, разворот синтеза.
- Завершение синтеза второй цепи ДНК, репарация дупликации сайта встраивания.



# Жизненные циклы: LINE1

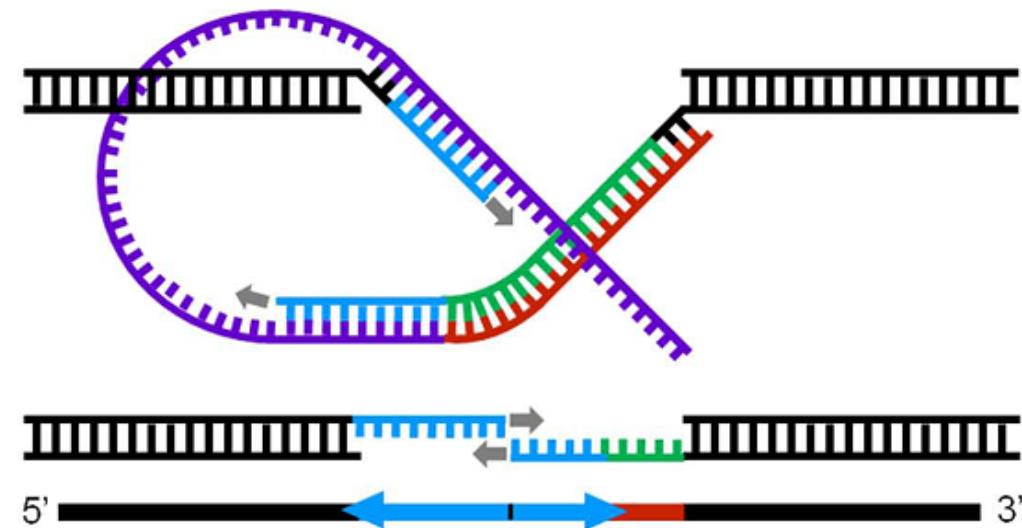
TPRT является особенно уязвимой с точки зрения «смены матриц». У LINE1 это явление может происходить даже внутри самого элемента.

Нормальный процесс TPRT



Двойной процесс TPRT.

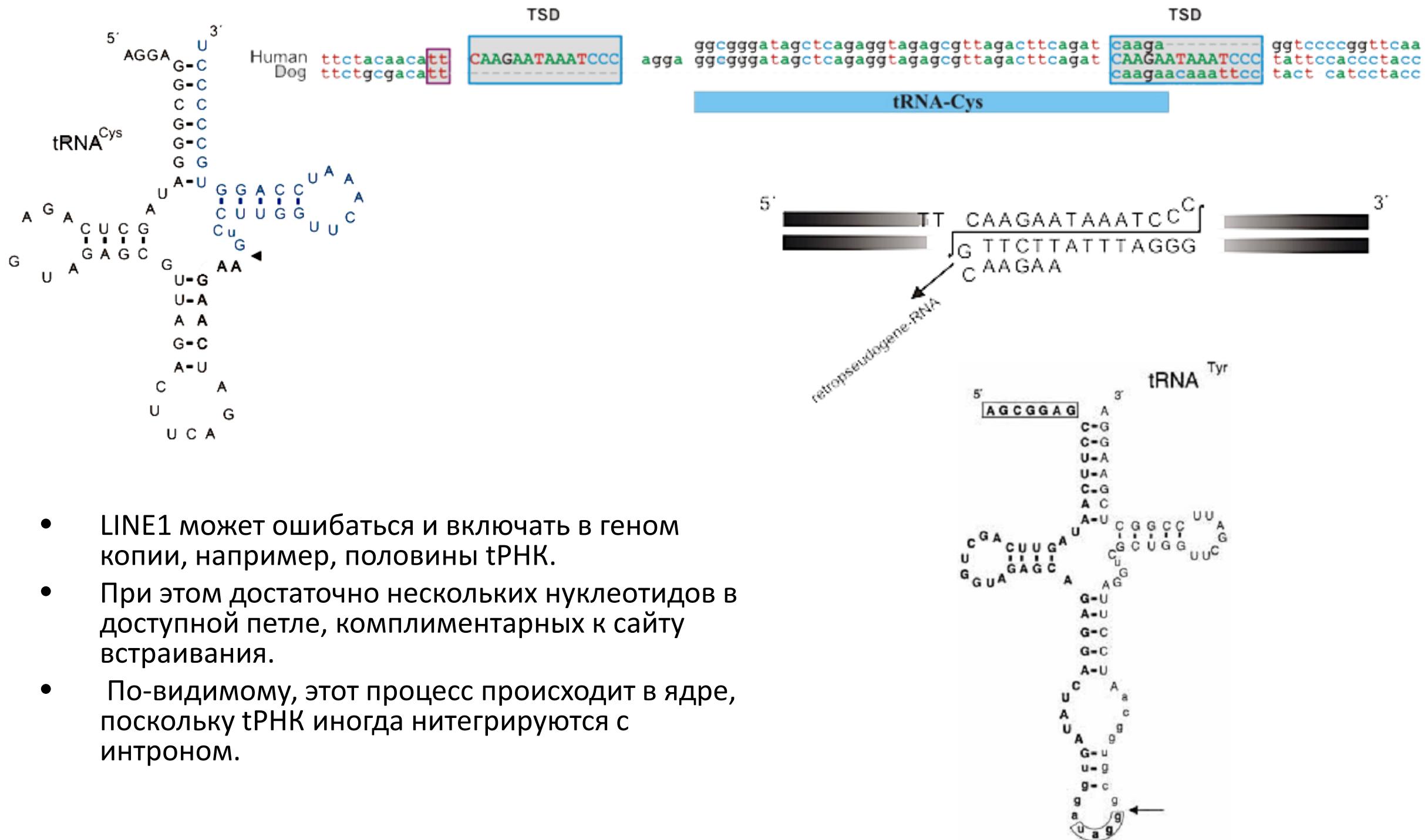
Приводит к формированию дефектной интеграции



- LINE1 в силу крайне простого механизма распознавания своей мРНК часто делает «ошибки», захватывая и интегрируя в геном иные полиаденилированные РНК - псевдогены.
- Активность LINE1 зависит, в том числе, и от длины polyA хвоста в сайте интеграции.
- Поскольку интегрировавшаяся копия LINE1 не содержит терминатора транскрипции, при считывании мРНК захватывается, так же прилежащая область генома – явление называется трансдукцией.
- L1 встречается во многих группах позвоночных и высших растений, однако у плацентарных, активность L1 LINE обуславливает 50% инсерционного мутагенеза.

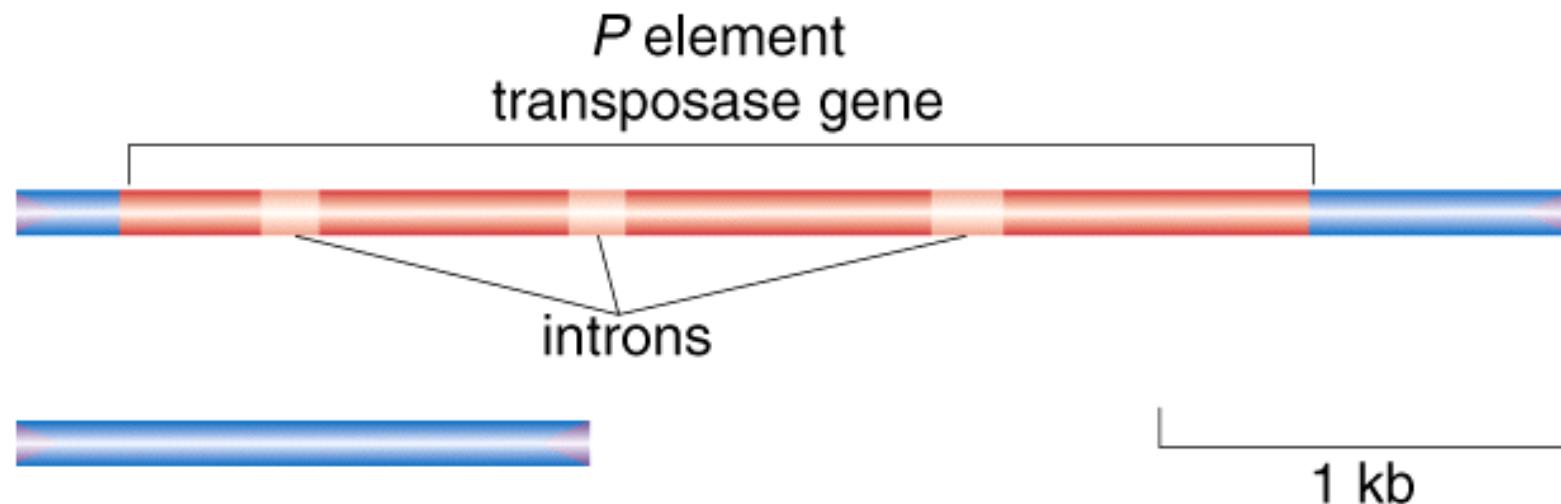
# Жизненные циклы: LINE1 и псевдогены.

Обычно, псевдогены образуются из мРНК, имеющих поли-А хвост. Однако, поли-А хвост не является обязательным условием для возникновения псевдогена.



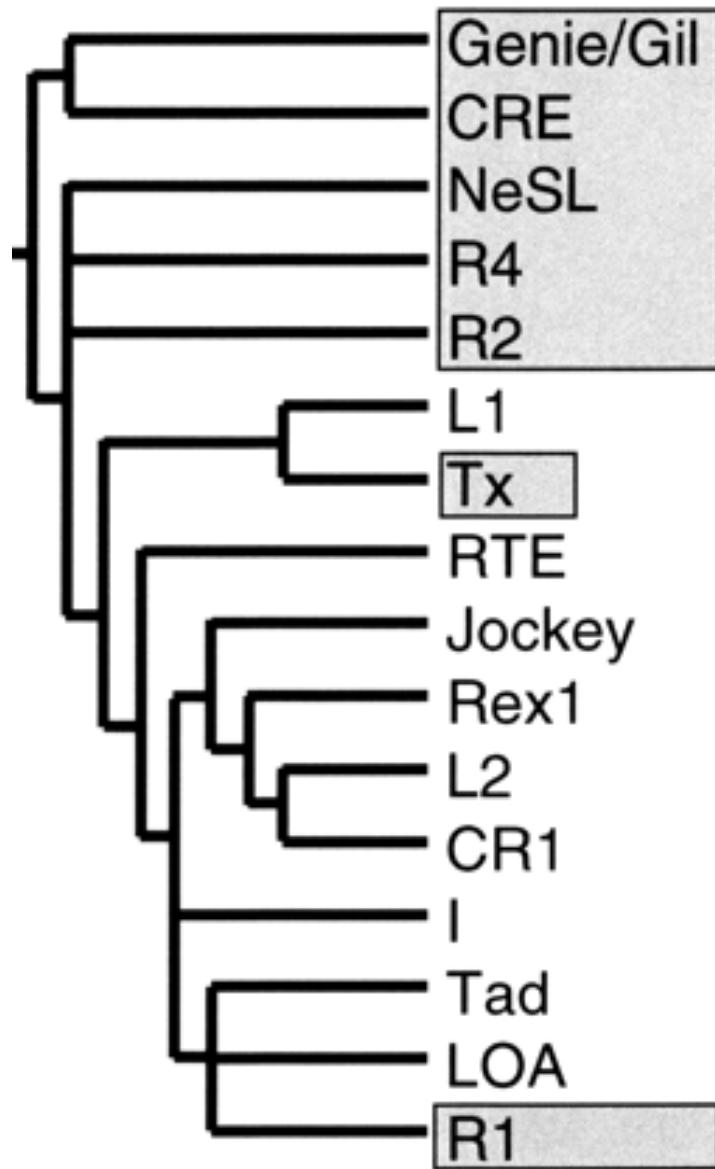
- LINE1 может ошибаться и включать в геном копии, например, половины tРНК.
- При этом достаточно нескольких нуклеотидов в доступной петле, комплиментарных к сайту встраивания.
- По-видимому, этот процесс происходит в ядре, поскольку tРНК иногда нитегрируются с интроном.

# Особенности репликации Репелоре элементов.



- В отличие от LINE элементов Р-элементы содержат длинные терминальные прямые или инвертированные повторы.
- Промотор у Р-элементов внутренний, похожий на промотор LINE элементов.
- Ген транспозазы (EN+RT+Hel) ближе всего по структуре и продукту к эволюционно древней, теломеразной RT.
- Р-элементы содержат классические интроны, которые должны быть сплайсированы, для того чтобы синтезировать Транспозазу.
- По-видимому, транспозаза возвращается в ядро и там, по какому-то признаку находит и блокирует не сплайсированные варианты своей мРНК, а после этого осуществляет реакцию обратной транскрипции ( по-видимому TPRT).
- Терминальные повторы могут указывать на частичное восстановление РНК Р-элемента в процессе обратной транскрипции.

## Суперсемейства мобильных элементов (LINE).



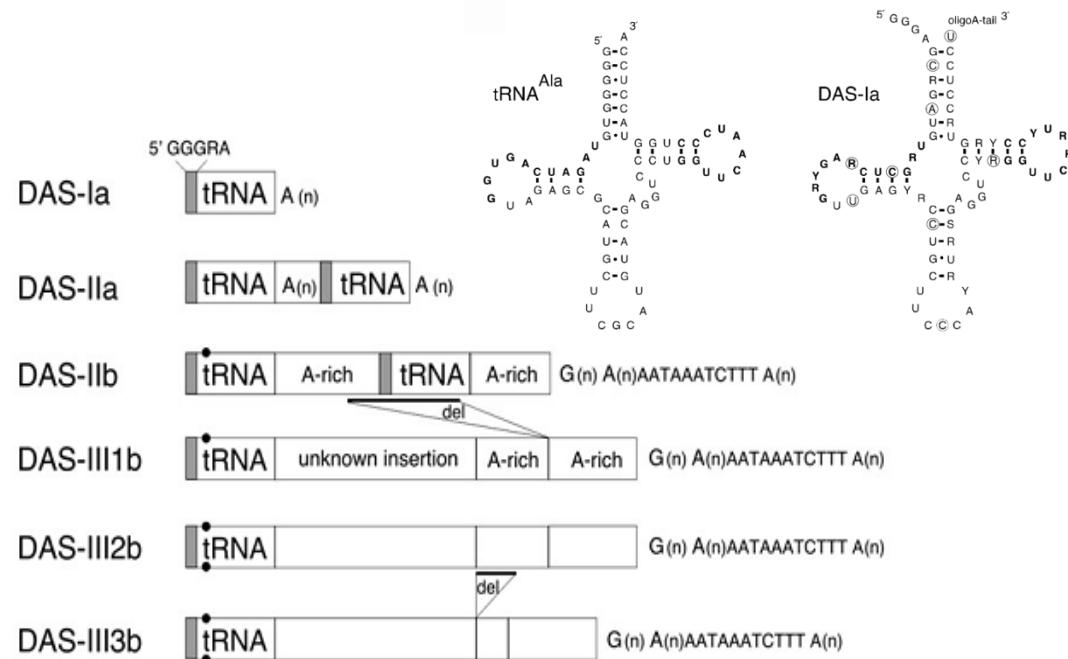
Группа LINE	Семейство LINE	ORF (Домены)	TSD
<b>R2</b>	<b>CRE, NeSL, R2, R4</b>	<b>1 (RT,EN,C)</b>	<b>2-6</b>
<b>L1</b>	<b>L1, Tx</b>	<b>2 (Zf)(RT,EN)</b>	<b>8-36</b>
<b>RTE</b>	<b>RTE</b>	<b>2 (Zf)(RT,APE)</b>	<b>4-120</b>
<b>I</b>	<b>I, Ingi, LOA, R1, Tad1</b>	<b>2 (Zf)(RT,APE,RH)</b>	<b>4-8</b>
<b>Jokey</b>	<b>Jokey, Rex1, L2, CR1</b>	<b>2(Zf)(RT,EN)</b>	<b>0-12</b>

Классификация, основанная на строении и жизненных циклах.

Филогенетическая классификация, основанная на аминокислотной последовательности обратной транскриптазы

# Не автономные элементы SINE и MITE

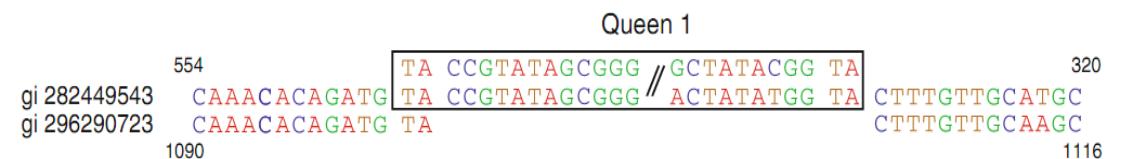
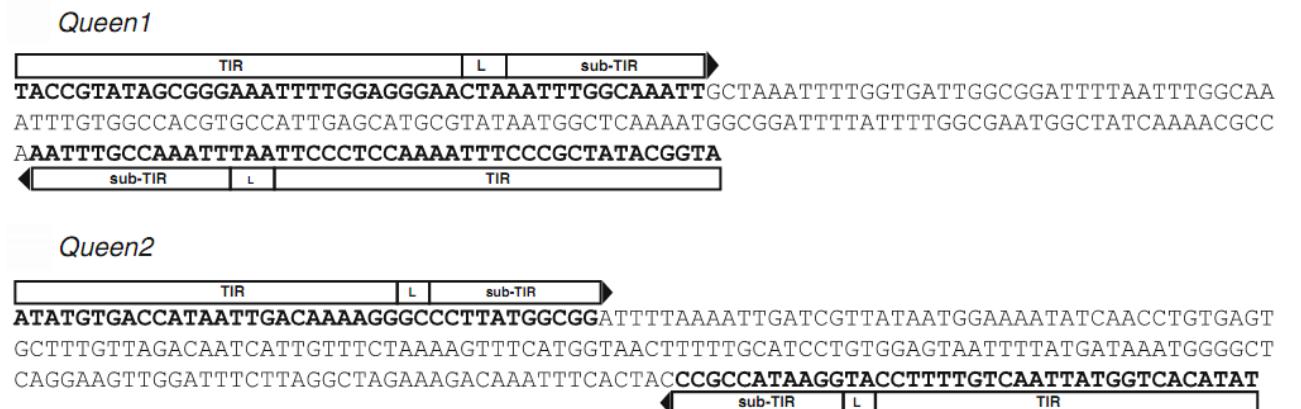
- SINE – короткие элементы, включающие часть или целую функциональную РНК с внутренним роl-III промотором.
- В качестве функциональной РНК известны различные tРНК, 5S-рРНК и 7SL-SRP РНК.
- Второй необходимой частью SINE является 3'-регион, который должен быть похож по структуре и/или консенсусу на 3'-регион ассоциированного LINE.
- SINE и LINE существуют в паре, активность LINE обеспечивает транспозицию SINE.



Система DAS-SINE у броненосца

According to (Churkov et al, MBE, 2005)

- MITE – короткие элементы, фланкированные инвертированными повторами и содержащие не смысловую А/Т богатую последовательность.
- Инвертированные повторы MITE похожи на повторы автономного ДНК транспозона и распознаются транспозазой.
- MITE не активны без ассоциированного ДНК транспозона.



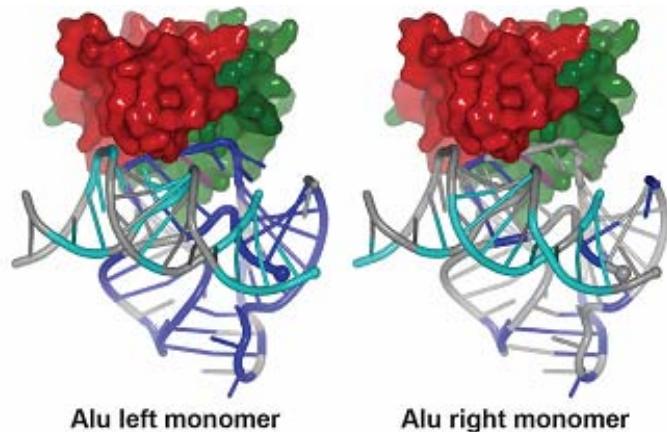
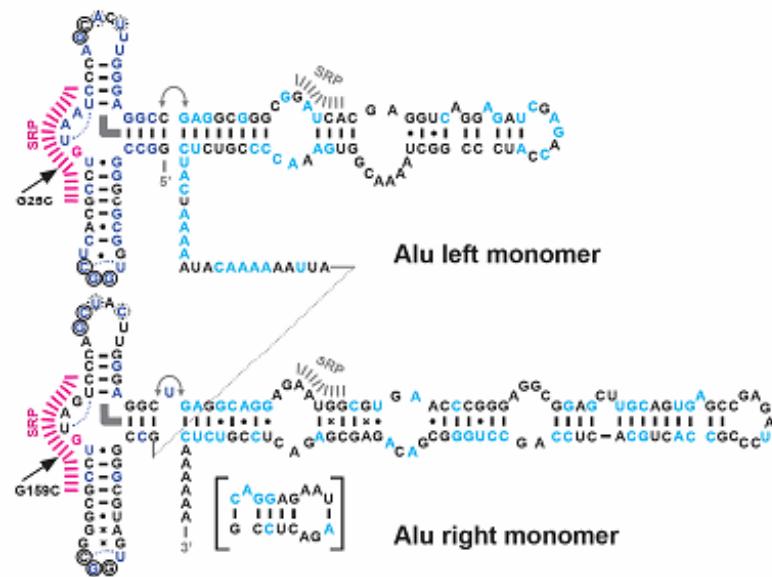
Активные Queen MITE в геноме губки.

(Erpenbeck et al, Hydriobiologia, 2011)

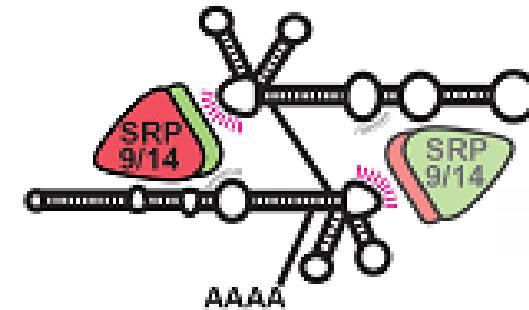
# Не автономные ретроэлементы: Alu повторы.

Alu повторы: неавтономный SINE элемент, в настоящее время активный у приматов и человека.

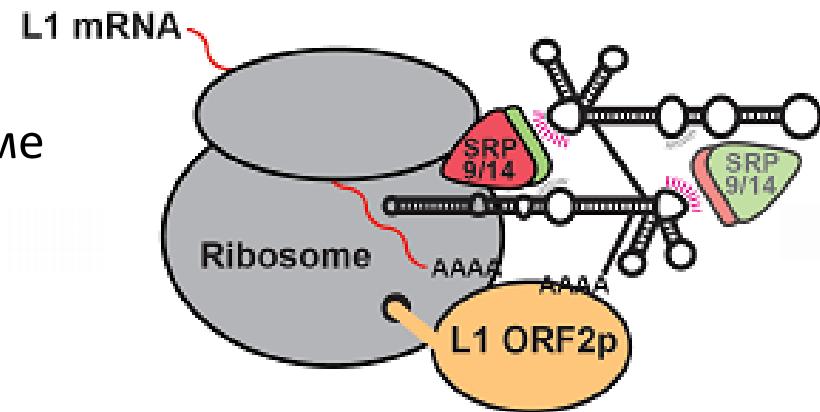
Подстановка Alu вместо L1 мРНК.



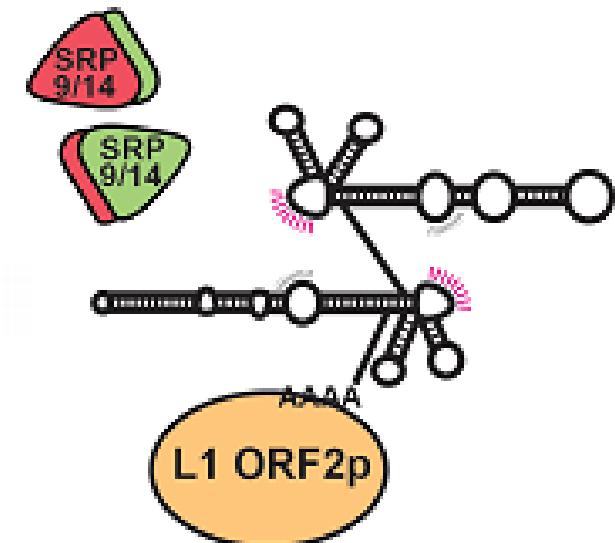
Alu в цитоплазме



Alu в на рибосоме

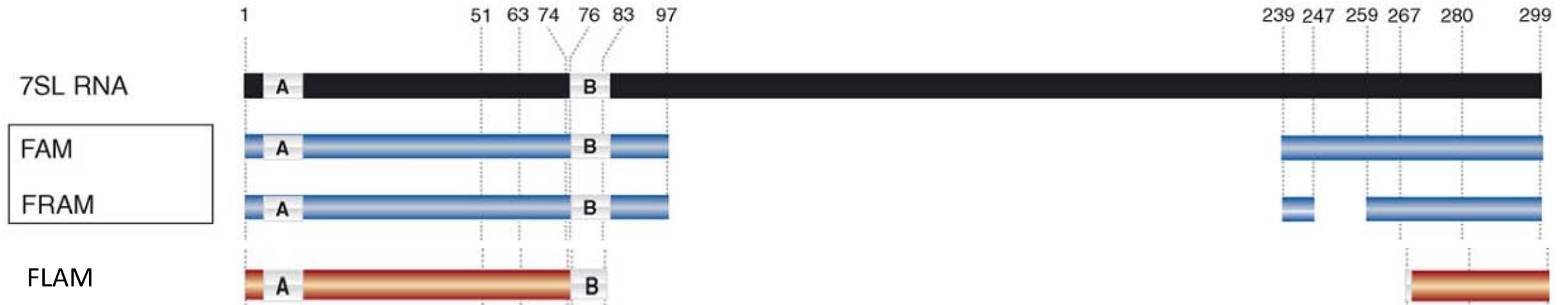


Alu вместо L1

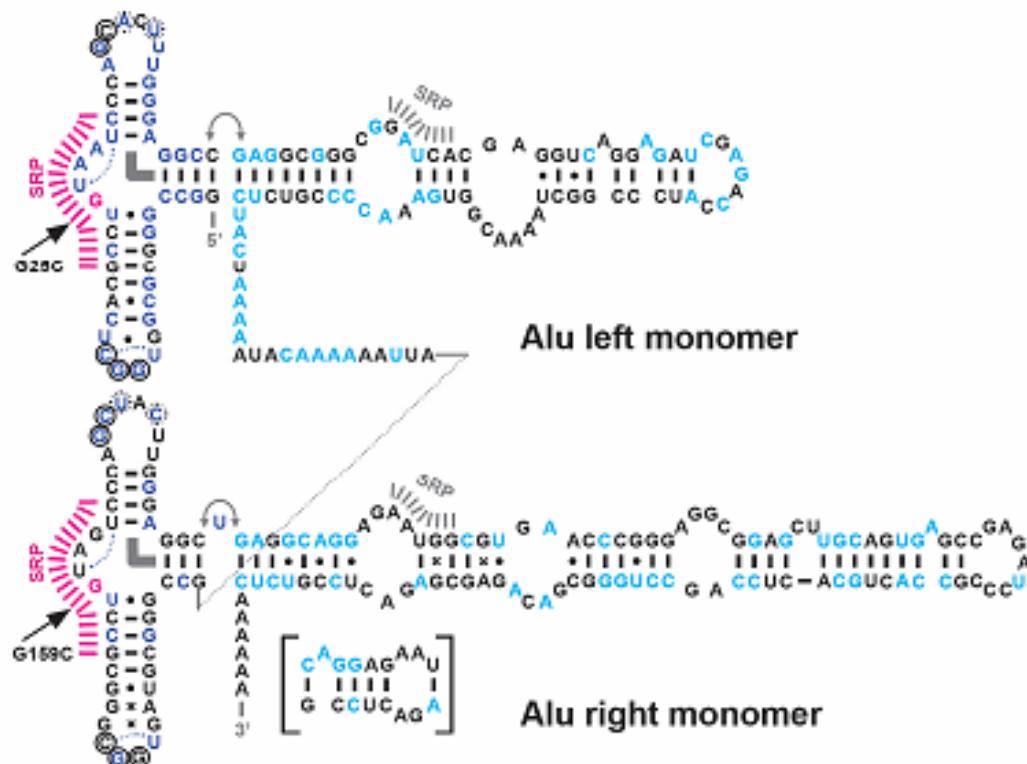


Димер. Состоит из двух мономеров: FRAM и FLAM. Произшли от 7SL РНК и могут взаимодействовать с SRP протеином.

# Происхождение Alu повторов.

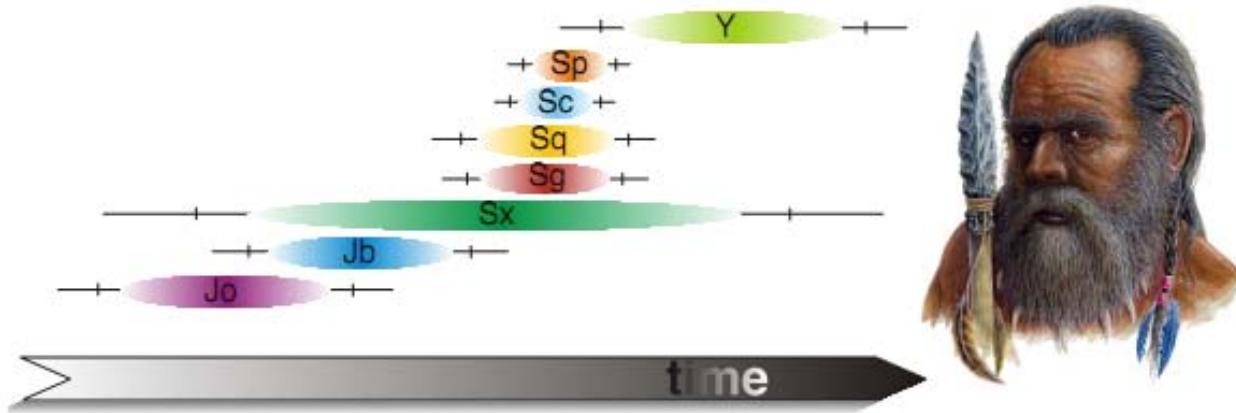


Alu повтор представляет собой комбинацию из двух остатков 7SL РНК: FLAM и FRAM, соединённых олиго-А линкером.

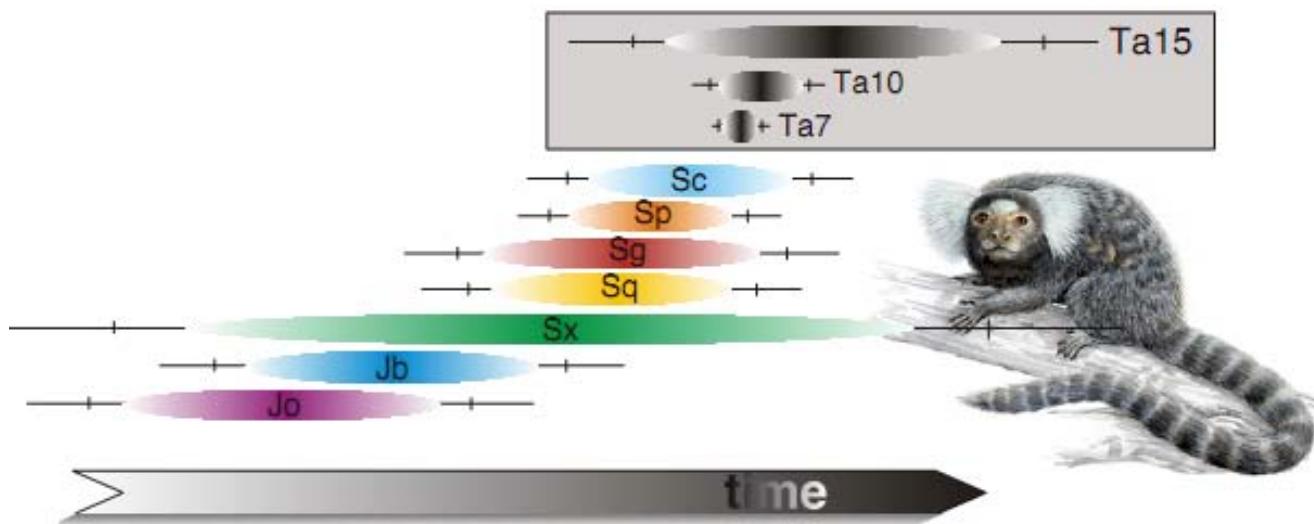
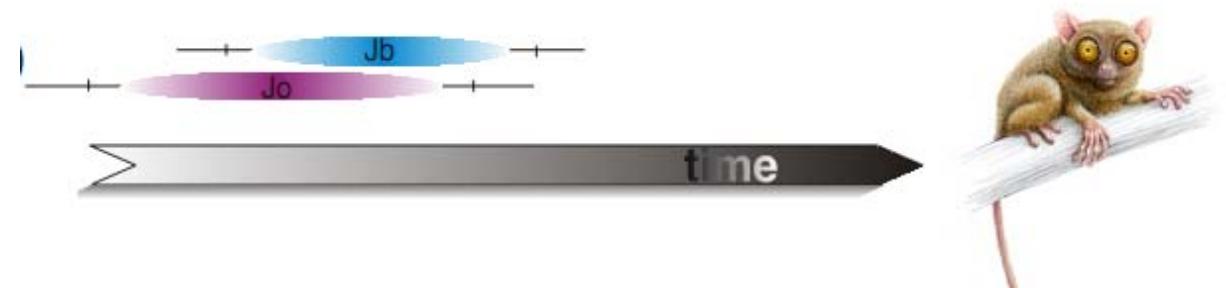
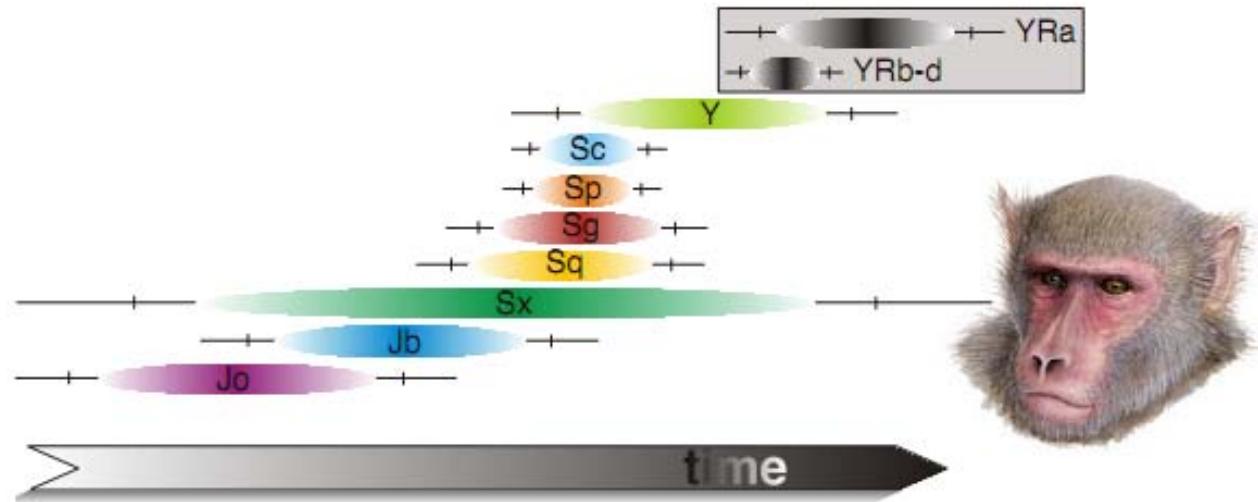


Несмотря на то, что FLAM и FRAM появились у общего предка грызунов и человека, Alu повторы образовались у предков приматов, а у грызунов FRAM, по-видимому был инактивирован, а FLAM породил большое разнообразие мономерных производных.

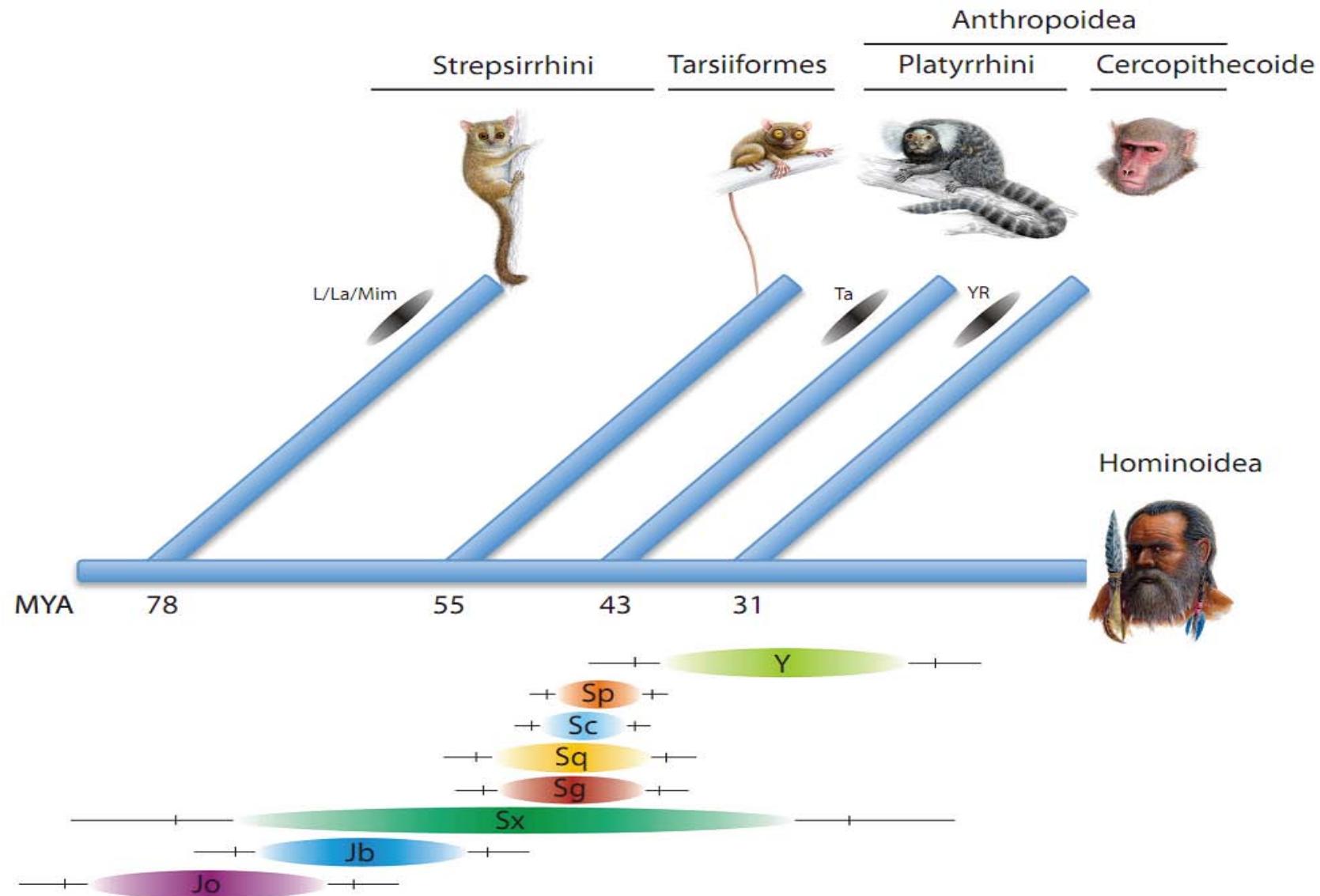
# Эволюция *Alu* повторов у разных приматов.



*Alu* широко распространены в геномах всех приматов. Многие приматы имеют свои собственные специфичные формы *Alu*.

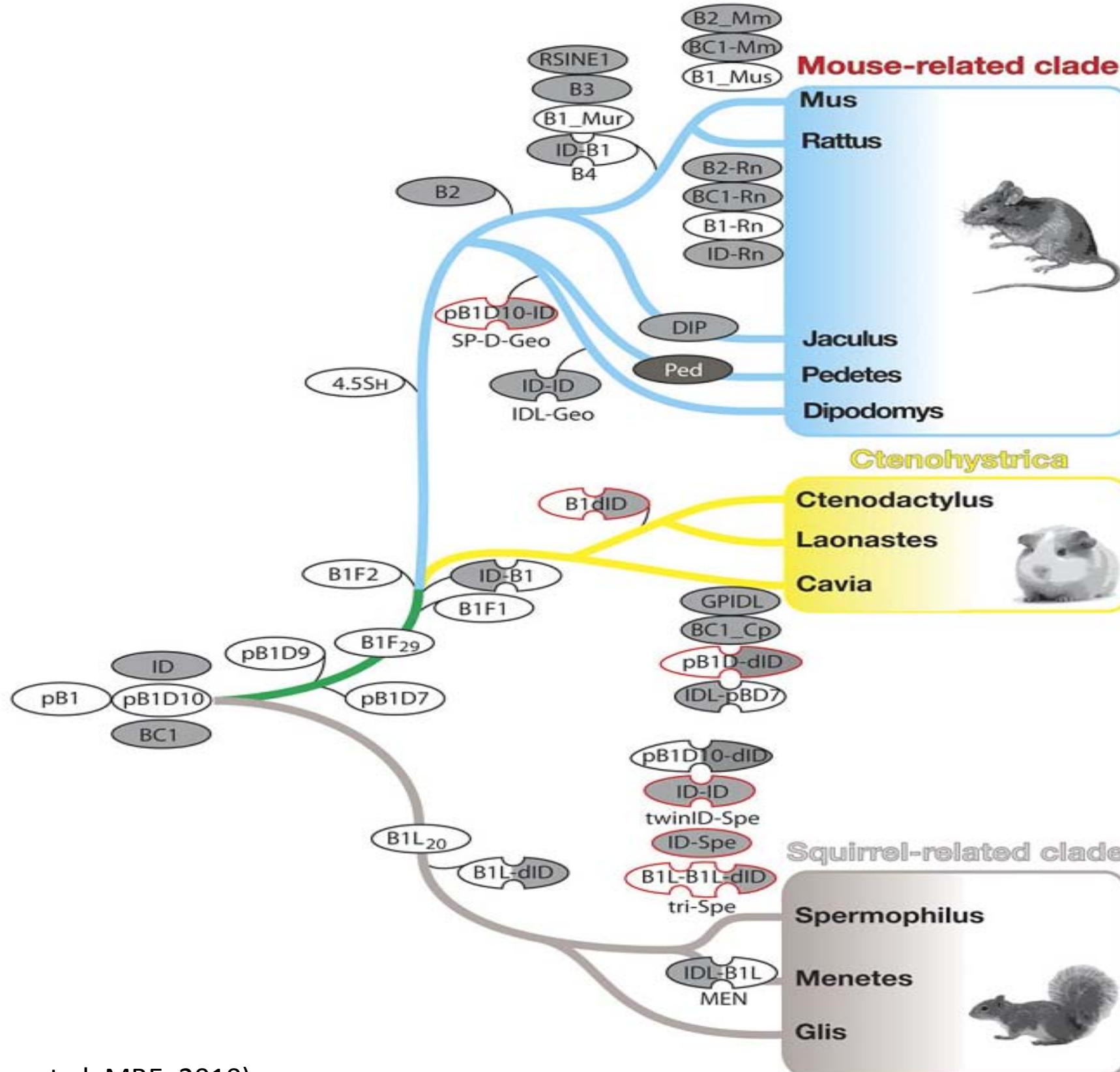


# Эволюция *Alu* повторов у разных приматов.

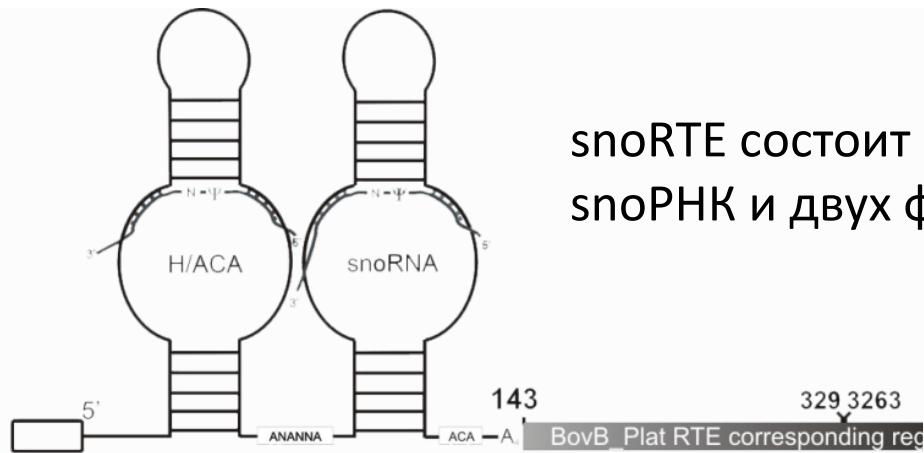


- Несколько типов *Alu* повторов были активны в одно время.
- Значительное изменение активности *Alu* повторов произошло вскоре после разделения на Обезьян Старого света и Обезьян Нового света.

# Пример: мономеры, димеры и тримеры у грызунов – эволюция SINE

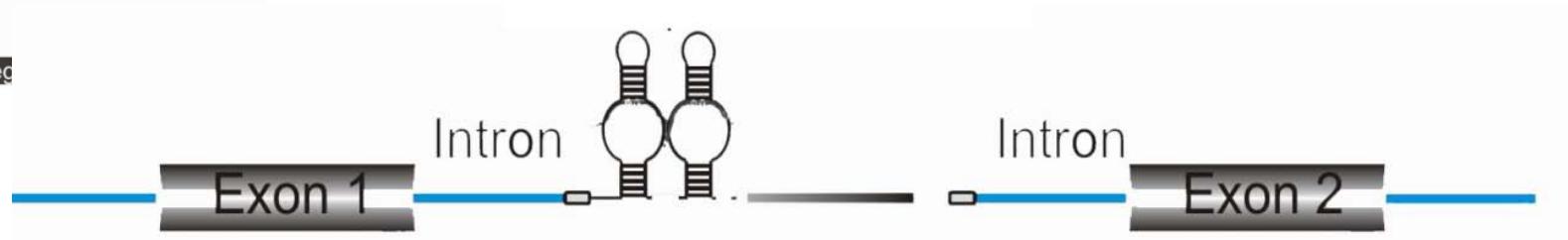


# snoRTE – неавтономный элемент с заимствованным промотором у Утконоса.

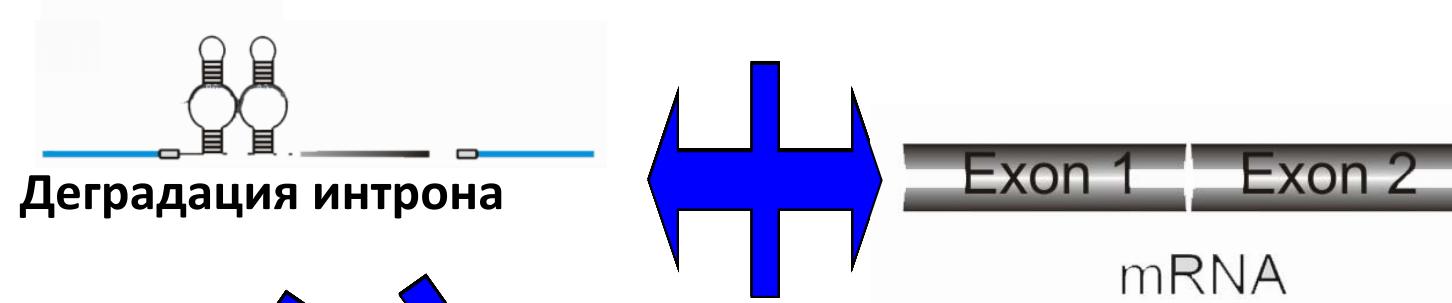


snoRTE состоит из функциональной snoРНК и двух фрагментов RTE LINE.

snoRTE не содержит промотор в своём составе и использует промотор гена, в интроне которого он расположен.



Сплайсинг



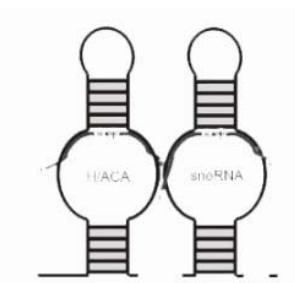
Деградация интрона



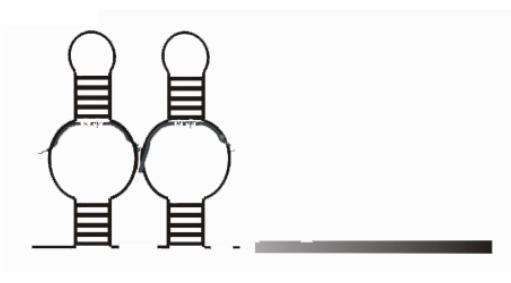
mRNA

Тримминг snoRNA

5'тримминг snoRNA



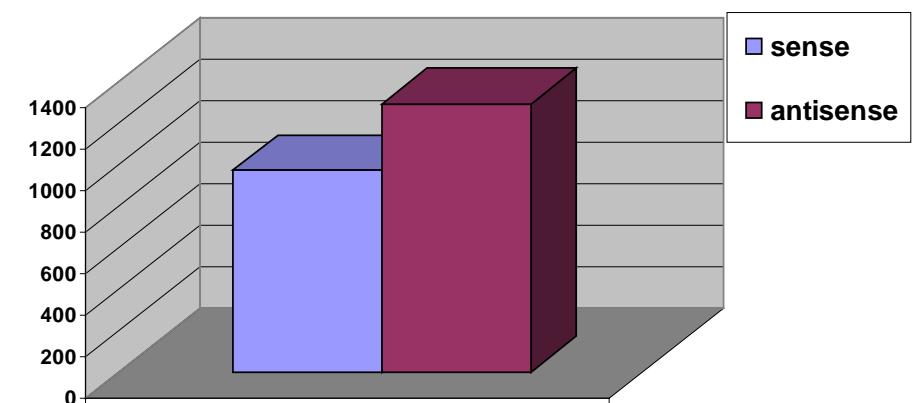
Функциональная snoRNA



snoRTE



ретропозиция

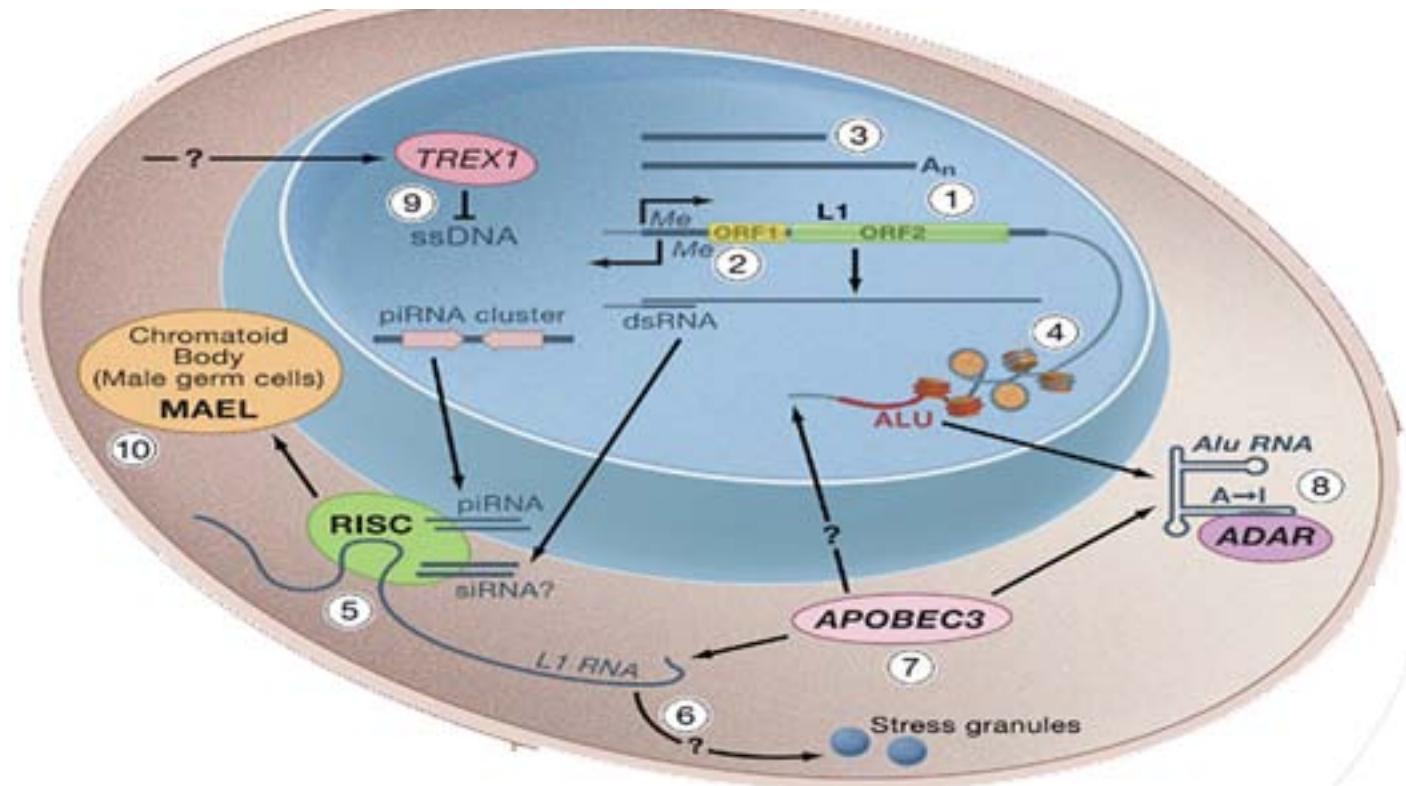


Из-за сохранения snoРНК своей функции, отбор препятствует накоплению snoRTE в сенс-ориентации в интронах.

According to (Schmitz et al, GR, 2008)

# Контроль мобильных элементов клеткой

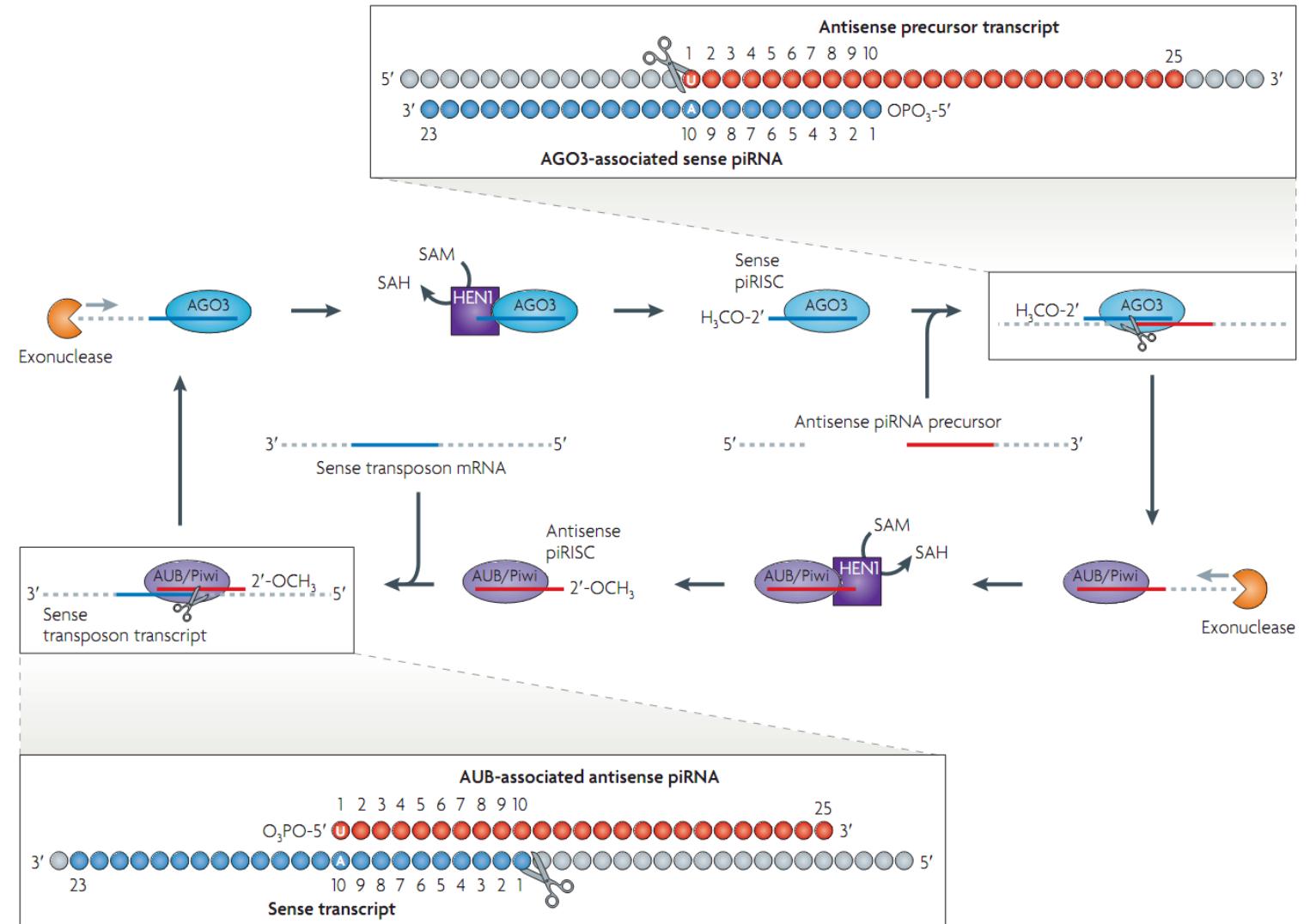
В дифференцированных соматических клетках активность мобильных элементов находится под жестким контролем со стороны различных клеточных систем.



1		Метилирование CpG	Блок транскрипции
2		Незавершённая транскрипция	Нефункциональная РНК
3		Отсутствие сигнала полиаденилирования	Не стабильная РНК, не распознаётся ORF2 LINE1.
4		Гетерохроматинизация	Блок транскрипции
5	RISC	РНК-интерференция	Деградация РНК
6		Выведение продуктов синтеза в стресс-гранулах	Нарушение формирования РНП комплекса
7	TREX1	Деградация однонитевой ДНК.	Деградация продуктов обратной транскрипции
8	ADAR	РНК-эдитинг	Нарушение формирования РНП комплекса
9	APOBEC3	Механизм неизвестен	Блокирует ретропозицию в клеточных культурах.
10	MAEL	Механизм неизвестен	Защита от ретропозиции во время мейоза

# Рiwi-РНК - специфический защитный механизм против транспозиции при генерации гамет

- Рiwi-РНК, как правило, получается из кластера Рiwi генов, имеющих двунаправленную экспрессию.
- Первичные Рiwi-РНК транскрибируются и созревают в клетках герминативного пути.
- Помимо стандартного для miRNA пути созревания, Рiwi РНК имеет свой собственный путь, основанный на последовательном расщеплении сенс- и антисенс-транскриптов.
- Рiwi-РНК часто образуются из генов бывших транспозонов, транскрибирующихся в антисенс ориентации. В этом случае путь Рiwi амплификации включает активные транспозоны.
- У дрозофилы, специализированный ген *flamenco* содержит РНК составленную из кусочков активных мобильных элементов. и продуцирует первичную Рiwi-РНК. Связываясь с РНК мобильных элементов она запускает накопление Рiwi РНК, которые в дальнейшем могут блокировать транспозоны на разных уровнях.

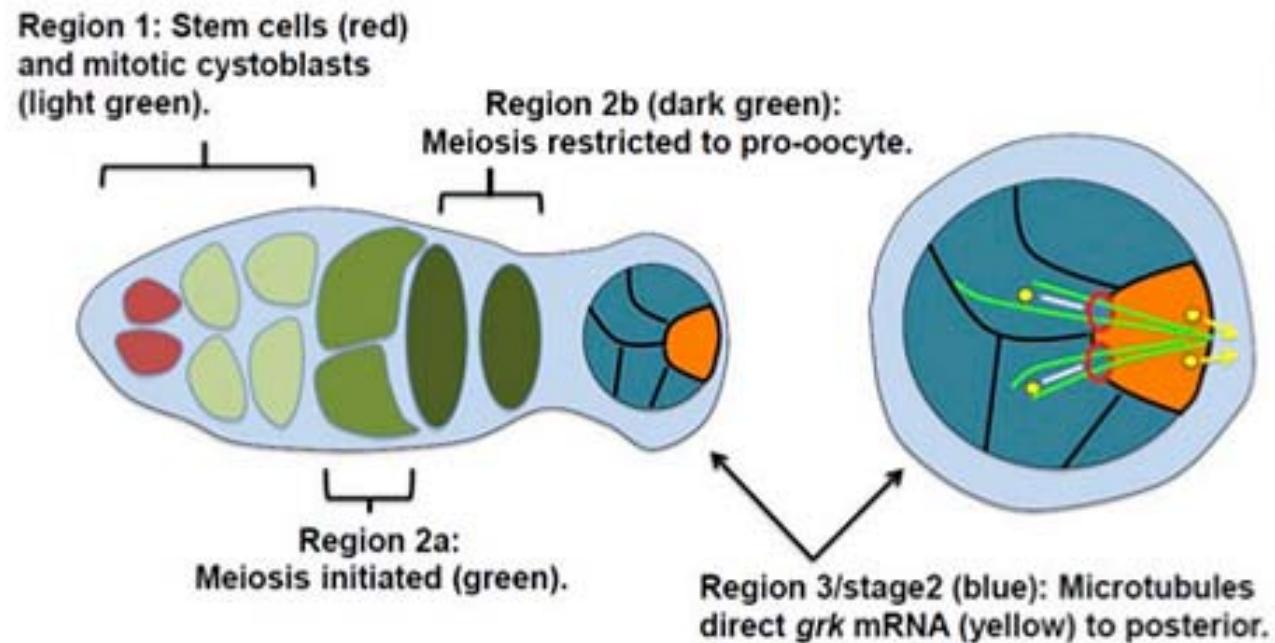


According to (Ghildiyal&Zamore, NatGen, 2009)

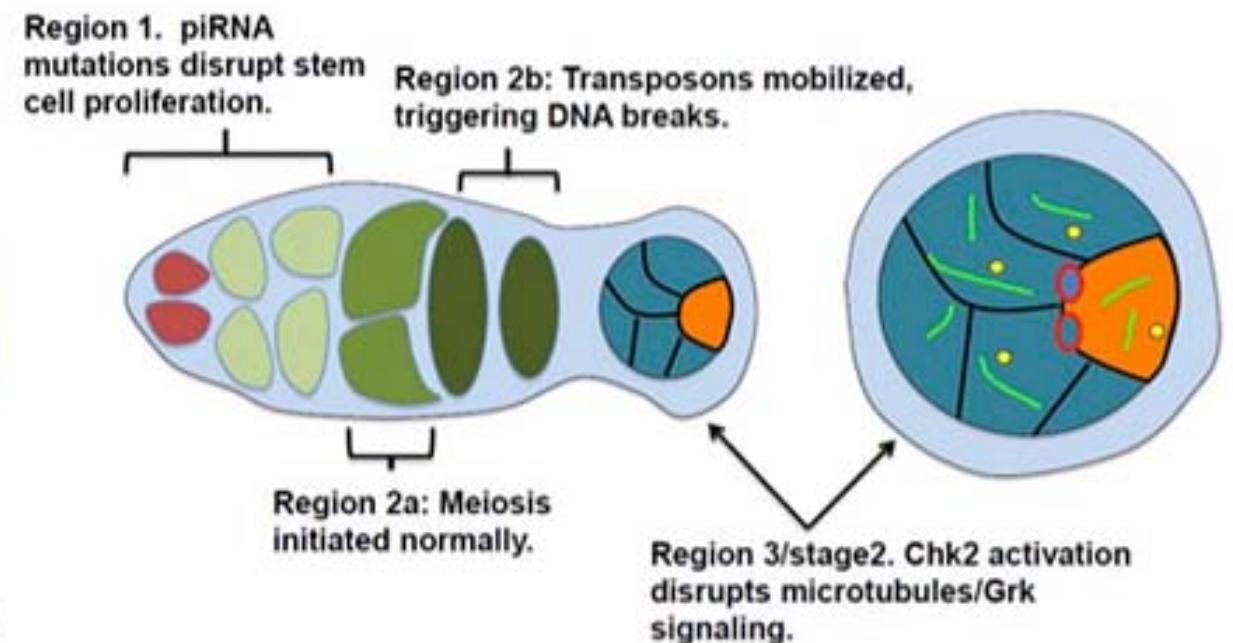
# Нокаут системы Piwi-RНК вызывает стерильность у самок дрозофилы.

- Для правильного формирования ооцита Дрозофилы необходима определённая субклеточная локализация мРНК гена *osk*, определяющая в дальнейшем ось личинки.
- Нарушение системы Piwi приводит к тому, что, через каскад событий, блокируется формирование системы микротрубочек, направляющих *osk* РНК в нужный компартмент ооцита и личинка гибнет на начальных этапах развития.

Формирование нормального ооцита



Нарушение транспорта *osk* РНК в мутанте по Piwi системе



According to (Khurana&Theurkauf, JCB, 2011)

**Спасибо за внимание!**