

Мобильные элементы в геномах эукариот

доцент Замарин А. А.

Классификация мобильных элементов.

- **Транспозоны:**

ДНК автономные
элементы;

ДНК не автономные
элементы;

MITE;

Хелитроны;

Поллинтоны.

- **Ретроэлементы:**

LTR:

ретровирусы экзо- и
эндогенные;

Автономные LTR;

Не автономные LTR;

He LTR:

LINE;

SINE;

Penelope;

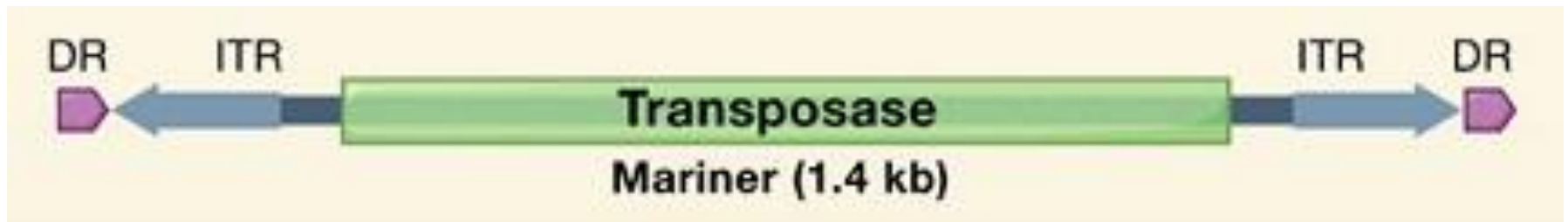
ретроинтроны;

DIRS.

Элементы жизненного цикла мобильных элементов.

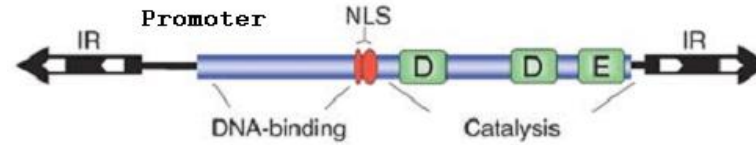
Процесс	Какие элементы используют
Транскрипция	Все автономные и все ретро-элементы.
Трансляция	Все автономные элементы.
Вырезание ДНК	Все транспозоны.
Встраивание ДНК	Все транспозоны, LTR элементы, DIRS.
Обратная транскрипция	Все ретроэлементы.
Репликация кольцевой ДНК	Некоторые ретровирусы, DIRS, Полинтоны.

Структура генома типичного автономного ДНК транспозона.

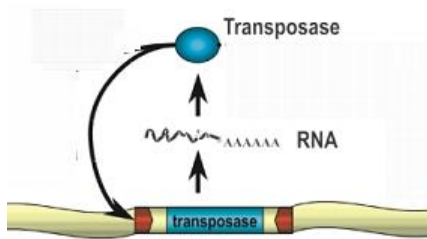


- **ITR** – инвертированные повторы
- **Transposase** – ДНК эндонуклеаза - ДНК лигаза.
- **DR** – дупликация сайта встраивания.

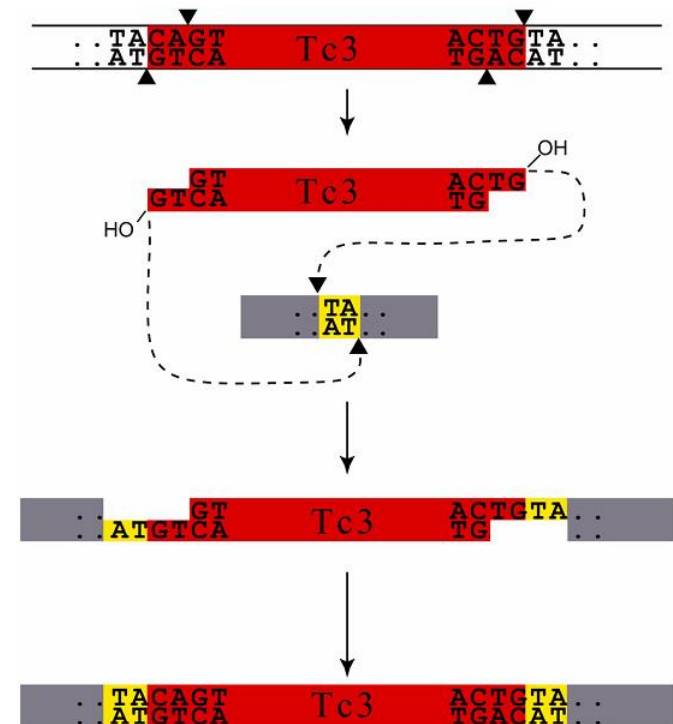
Этапы репликации автономных ДНК транспозонов.



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

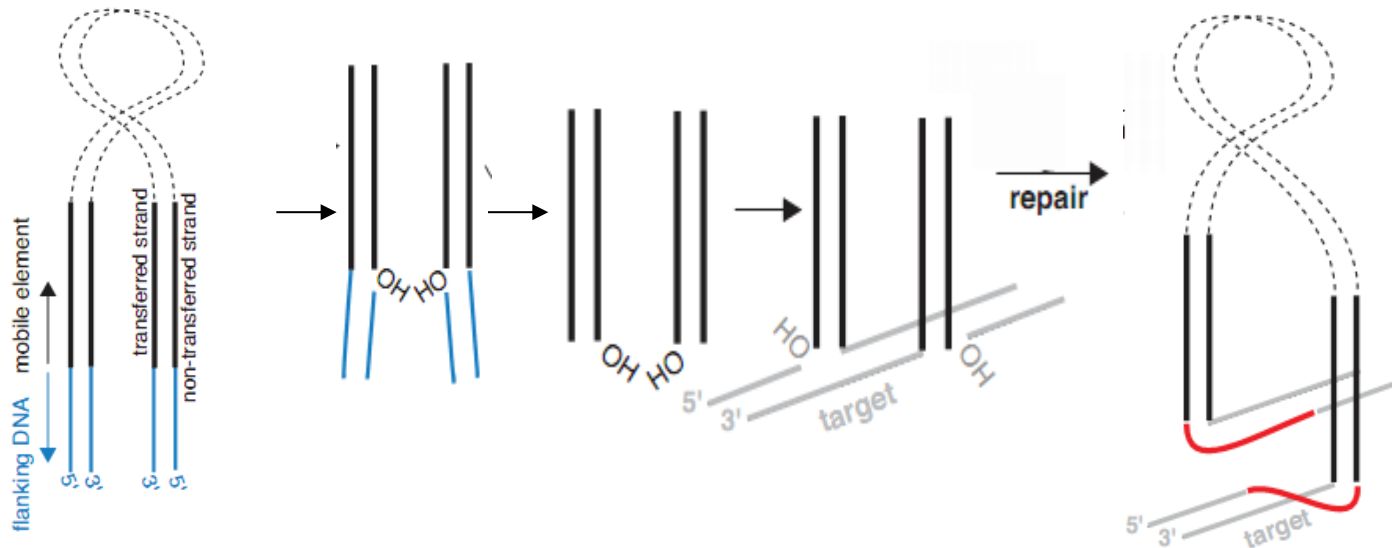


- Поиск специфичных для данного типа транспозона инвертированных повторов.
- Формирование «петли» и вырезание ДНК элемента, образование «липких концов».
- Лигирование ДНК хозяина.
- Репарация ДНК хозяина на обоих сайтах.



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».

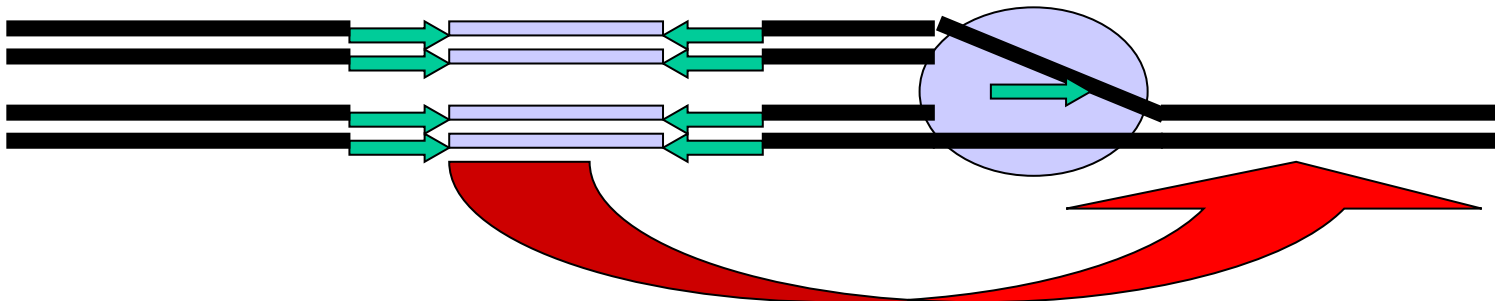


Репликативная транспозиция: синхронизация с репликацией ДНК.

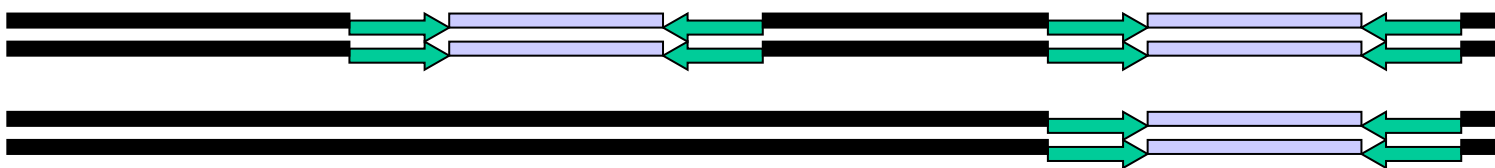
Активный транспозон



Вырезание - сразу после прохождения вилки репликации



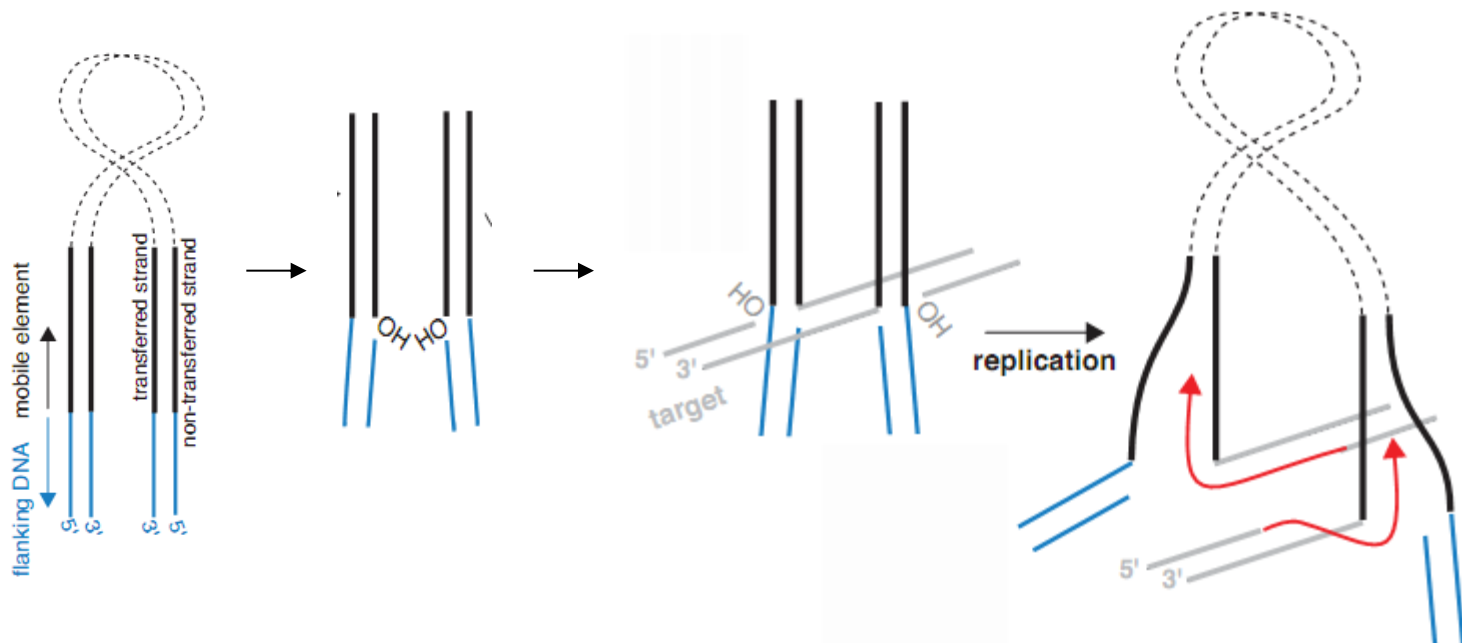
Встраивание перед вилкой репликации



Повторная репликация транспозона

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.



Репаративная транспозиция: конверсия за счёт гомологичной рекомбинации.

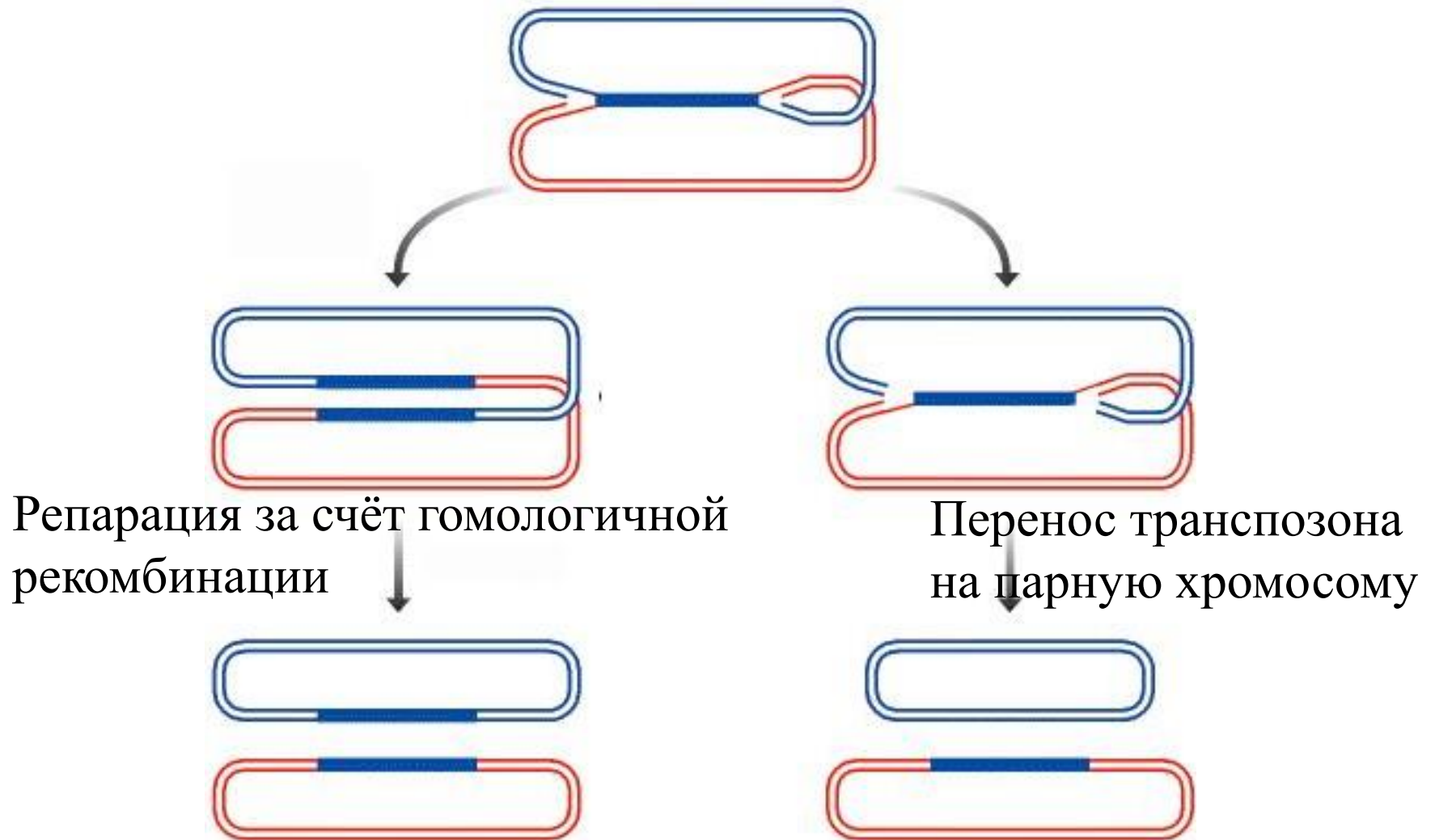


Распознавание гомологичных фланговых последовательностей

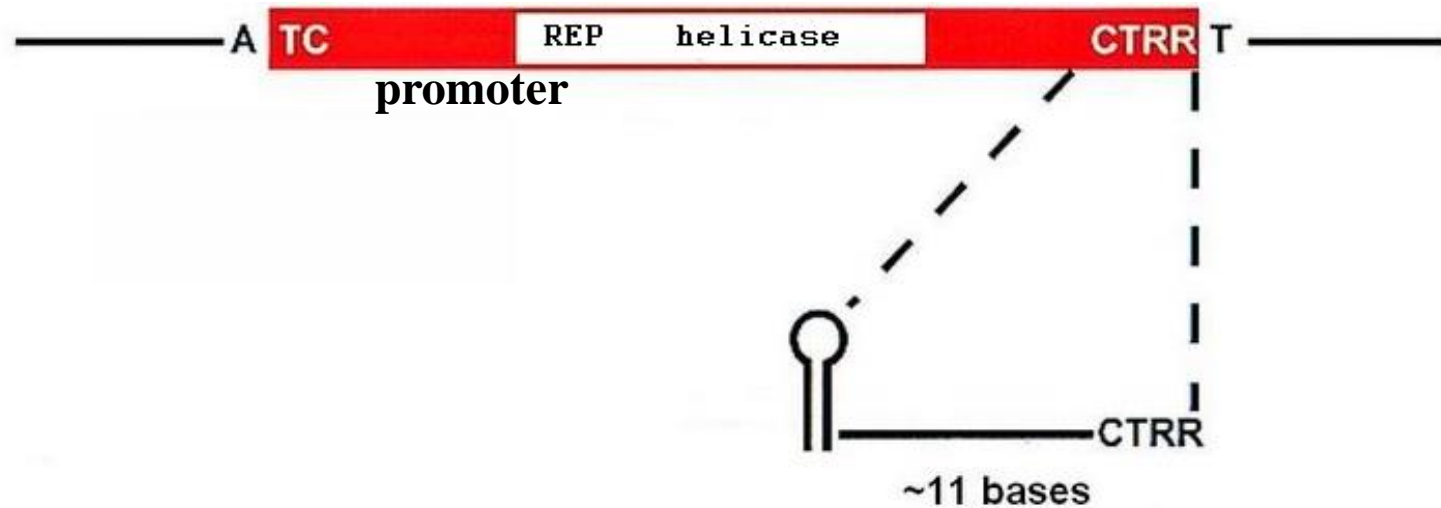


Создание «липких концов»

Репаративная транспозиция: конверсия за счёт гомологичной рекомбинации.



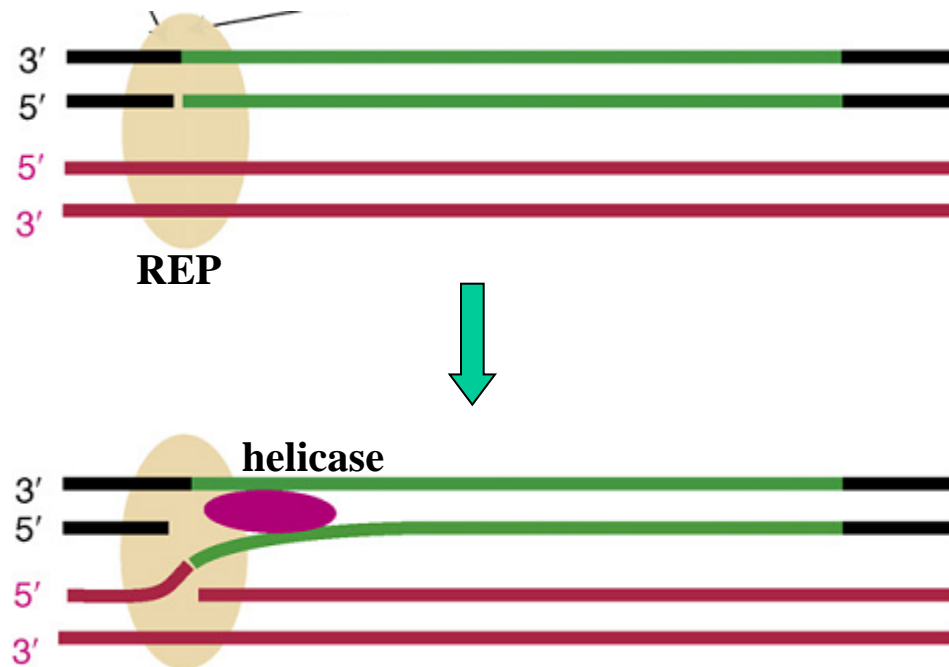
Структура генома типичного хелитрона.



- **REP** – эндонуклеаза
- **Helicase** – АТР-зависимая хеликаза.
- **А/Т** – сайт встраивания.
- На 3' конце короткие инвертированные повторы на однонитевой ДНК образуют шпильку на расстоянии ~15 нт от конца.

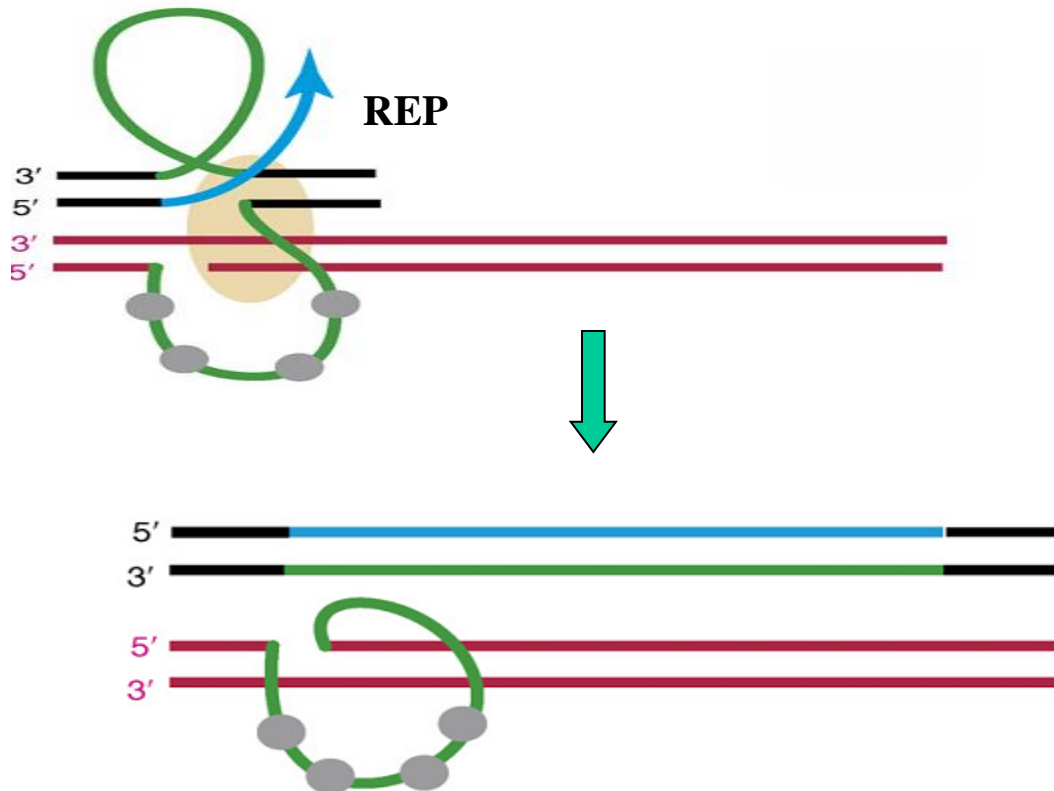
Репликативная транспозиция хелитрона - «катящийся круг».

- REP надрезает только одну нить ДНК с 5' конца хелитрона.
- В месте нового встраивания он так же создаёт один надрез между А и Т.

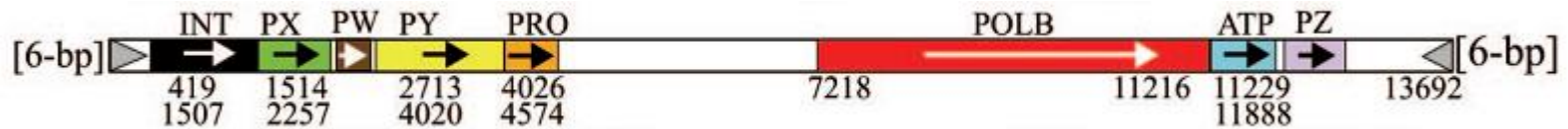


Репликативная транспозиция хелитрона - «катящийся круг».

- 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.



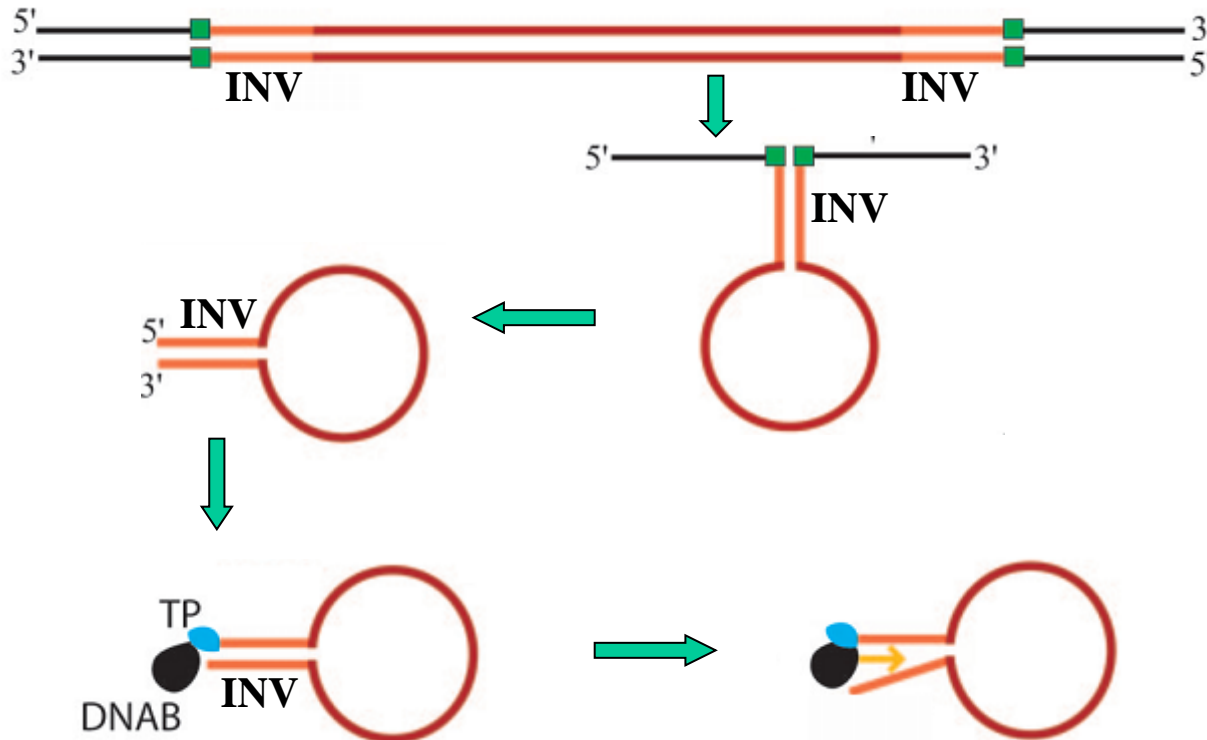
Структура генома типичного Полинтон.



- 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.

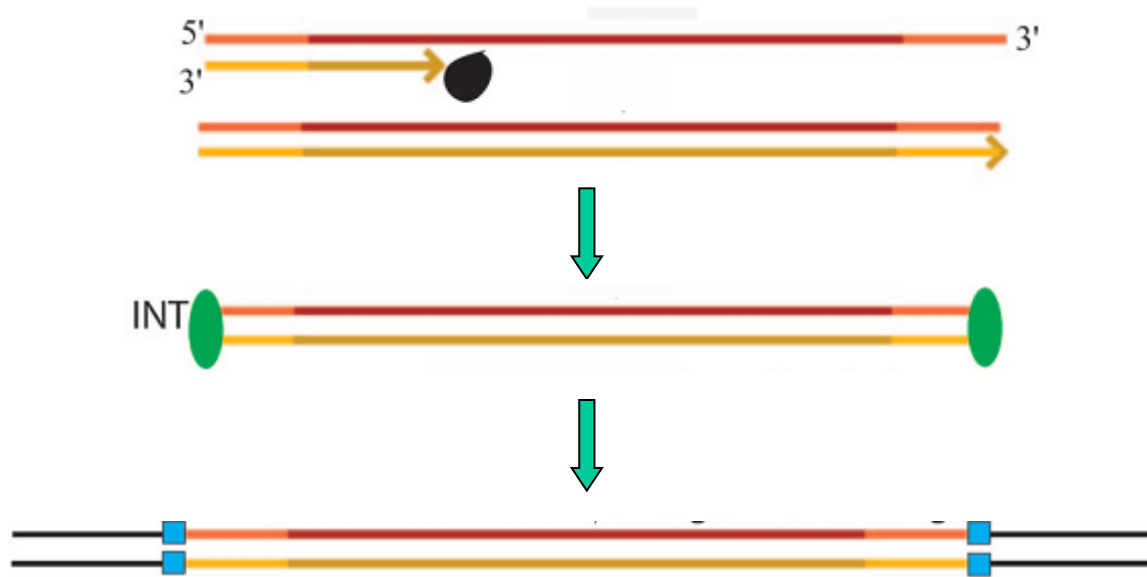
Репликативная транспозиция полиинтона - «вирусный» тип транспозиции.

- Транспозиция полиинтона начинается с образования «шпильки» однонитевой ДНК за счёт фланговых инвертированных повторов.
- «Шпилька отрывается и при помощи АТР-азы инициируется синтез второй нити ДНК.
- Место, где была вырезана шпилька, восстанавливается за счёт системы репарации.



Репликативная транспозиция полинтона - «вирусный» тип транспозиции.

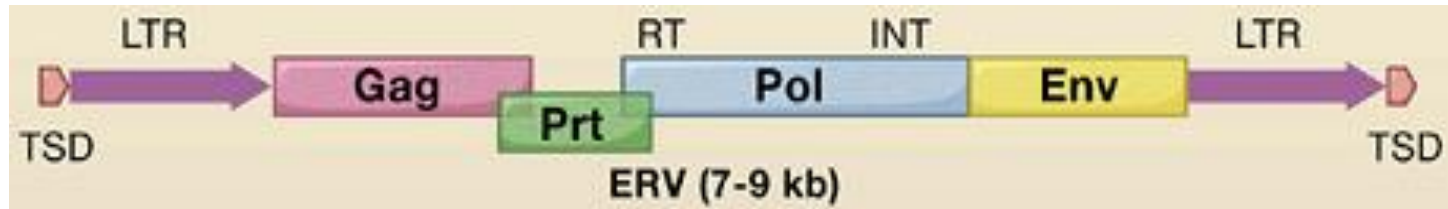
- По окончании репликации двунитевая ДНК захватывается Интегразой и транспортируется в новое место.
- В новом сайте интегразы делает двунитевой разрез с «липкими концами».
- После встраивания ДНК полинтон «липкие концы» репарируются клеточной системой и образуется дупликация сайта встраивания.



Особенности ДНК транспозиции

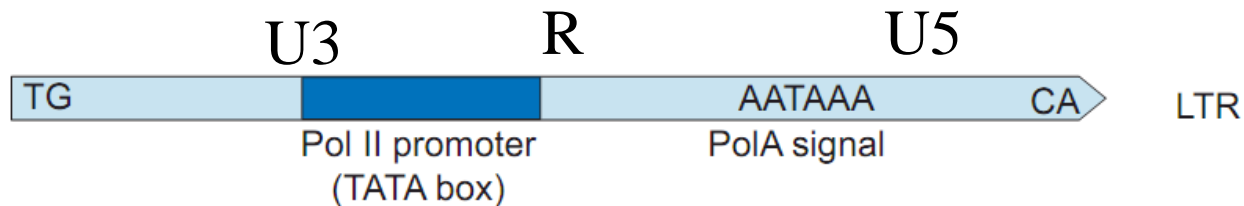
- РНК никогда не бывает матрицей для синтеза ДНК, ДНК синтезируется только на основе самой себя.
- Автономные элементы могут нести несколько промоторов, интроны и иные структурные не транслирующиеся элементы.
- Большое значения для транспозиции имеют фланговые 5' и 3' последовательности, часто являющиеся инвертированными повторами друг друга.
- Все этапы синтеза ДНК протекают в ядре клетки (или в непосредственной близости от хромосом).
- Для успешной транспозиции не автономным элементам достаточно имитировать фланговые инвертированные повторы, похожие на повторы автономных элементов.

Структура генома LTR элементов



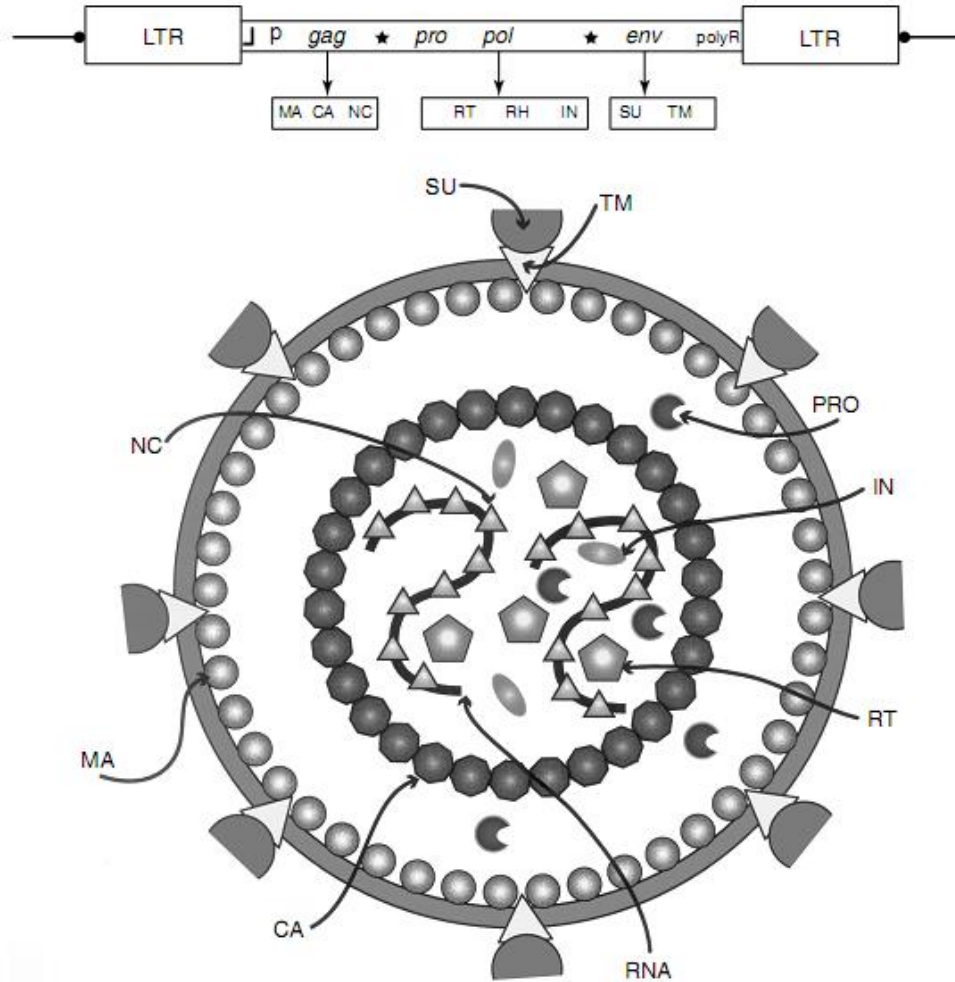
- Gag – белки вирусного компартмента
- Prt = Pro - протеаза
- Pol = RT + IN (+RN)– РНК зависимая ДНК полимераза + Интеграза (+РНКазы)
- Env – белки оболочки вируса.

Структура LTR



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

Жизненные циклы: ретровирусы и LTR ретроэлементы



Строение классического ретровируса

Жизненные циклы: ретровирусы и LTR ретроэлементы



Трансляция и сборка частицы

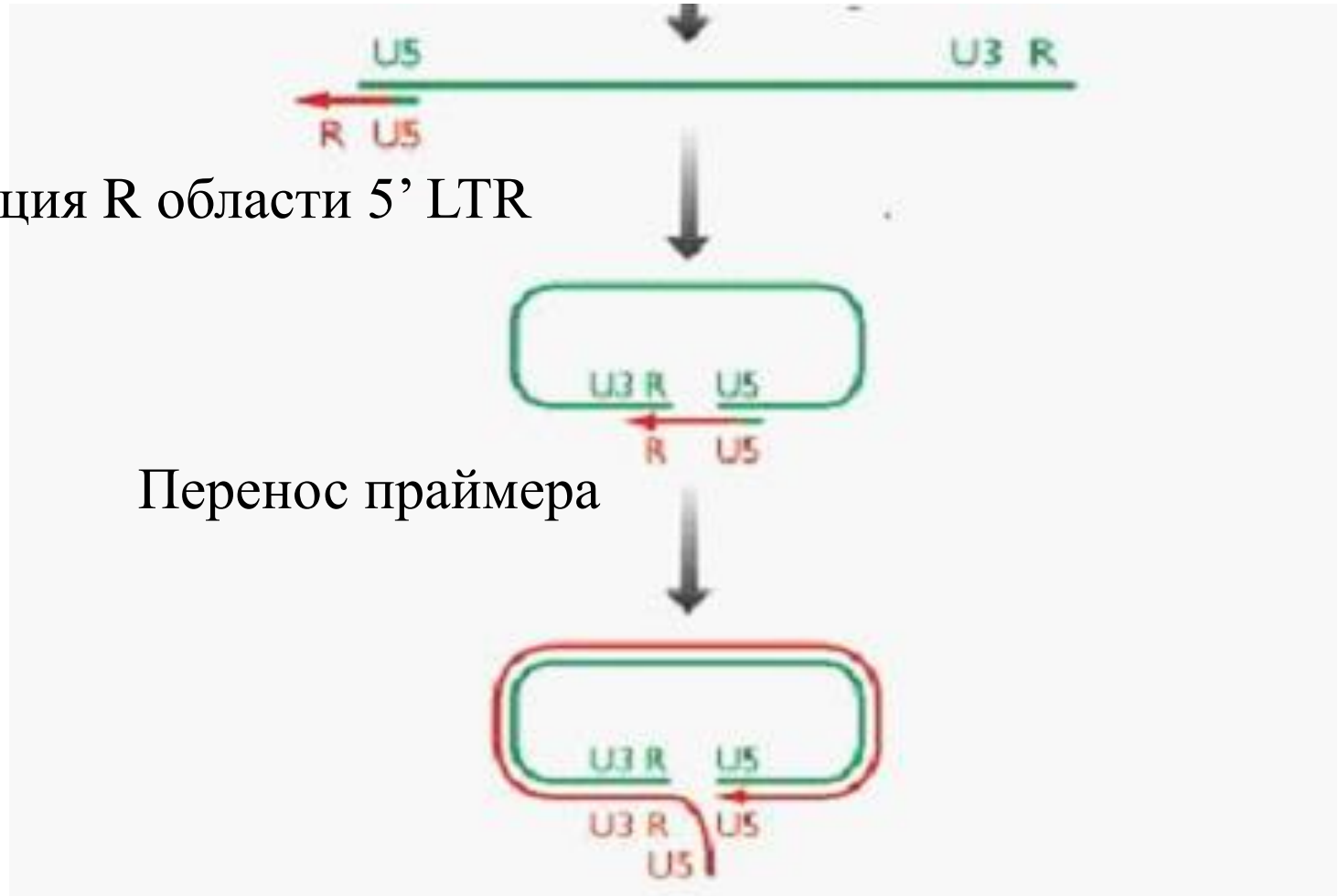
Инициация обратной транскрипции

Жизненные циклы: ретровирусы и LTR ретроэлементы

Деструкция R области 5' LTR

Перенос праймера

Обратная транскрипция “-” цепи ДНК



Жизненные циклы: ретровирусы и LTR ретроэлементы

Деструкция РНК до С/Т области

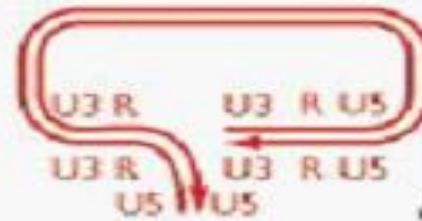
Праймирование и синтез 5' LTR

Перенос праймера и старт синтеза “+” цепи ДНК



Жизненные циклы: ретровирусы и LTR ретроэлементы

Ресинтез 5' LTR



Удаление остатков РНК



Обратная транскрипция “+” цепи ДНК



Жизненные циклы: ретровирусы и LTR ретроэлементы



Формирование липких концов вирусной ДНК

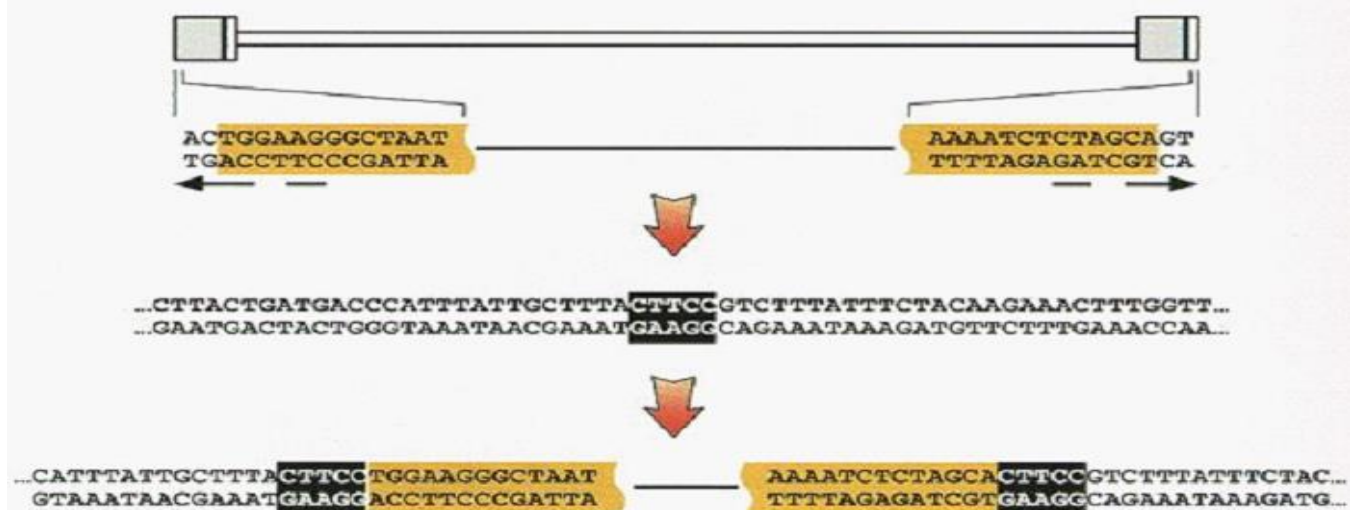


Разрезание ДНК хозяина и формирование липких концов

Жизненные циклы: ретровирусы и LTR ретроэлементы

Интеграция вирусной ДНК в геном клетки хозяина

Репарация однонитевой ДНК и дупликация сайта встраивания



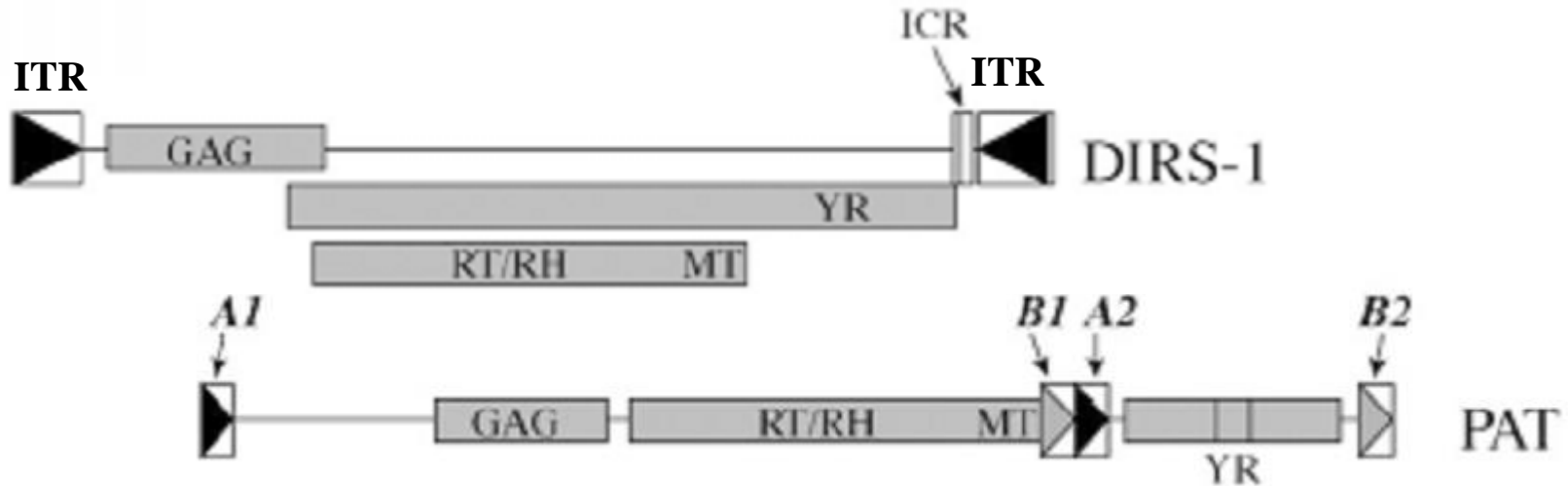
Этапы репликации LTR элементов и ретровирусов.

- Транскрипция.
- Трансляция на рибосомах клетки-хозяина.
- Разрезание белков – заготовок продуктом гена **Pro**.
- Предсборка вирусной частицы, захват вирусной РНК.
- Обратная транскрипция “–” и “+” цепей ДНК.
- Транспорт двунитевой ДНК в ядро.
- Разрезание ДНК хозяина, образование «липких концов»
- Встраивание ДНК вируса в геном хозяина.
- Репарация участков однострессовой ДНК за счёт системы репарации клетки.

Особенности ретропозиции LTR элементов

- Одна нить ДНК (-) синтезируется на матрице РНК, вторая (+) на матрице ДНК, в обоих случаях синтез ведёт обратная транскриптаза.
- Праймерами для синтеза ДНК выступают короткие участки РНК.
- Синтез ДНК происходит в вирусной частице, собранной в цитоплазме.
- Главными структурами, отвечающими за успешную транскрипцию и воспроизведение полного элемента являются LTR.
- Однако проверки и распознавания «своего LTR» у ретровирусов нет, поэтому любой LTR определённые структурные элементы (промотор, сайт полиаденилирования, поли-СТ тракт, участок комплиментарный к 3'конце tRNA) имеет шансы на успех обратной транскрипции за счёт «чужой» вирусной частицы.
- В вирусную частицу часто попадают случайные клеточные РНК и процесс обратной транскрипции может включить их в состав LTR элемента.
- Интегрировавшиеся вирусные LTR частицы часто подвергаются «вырезанию» из генома за счёт гомологичной рекомбинации между LTR. В геноме в этом случае остаётся одиночный LTR.

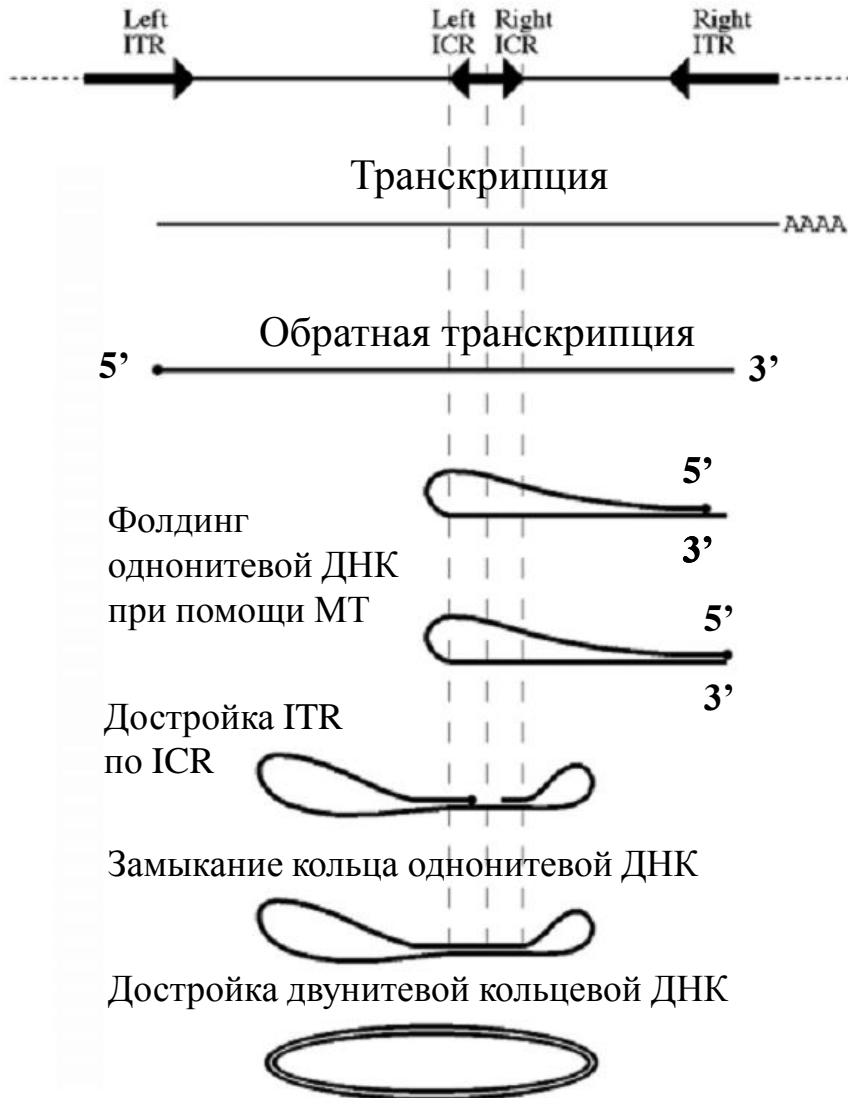
Структура генома DIRS элементов



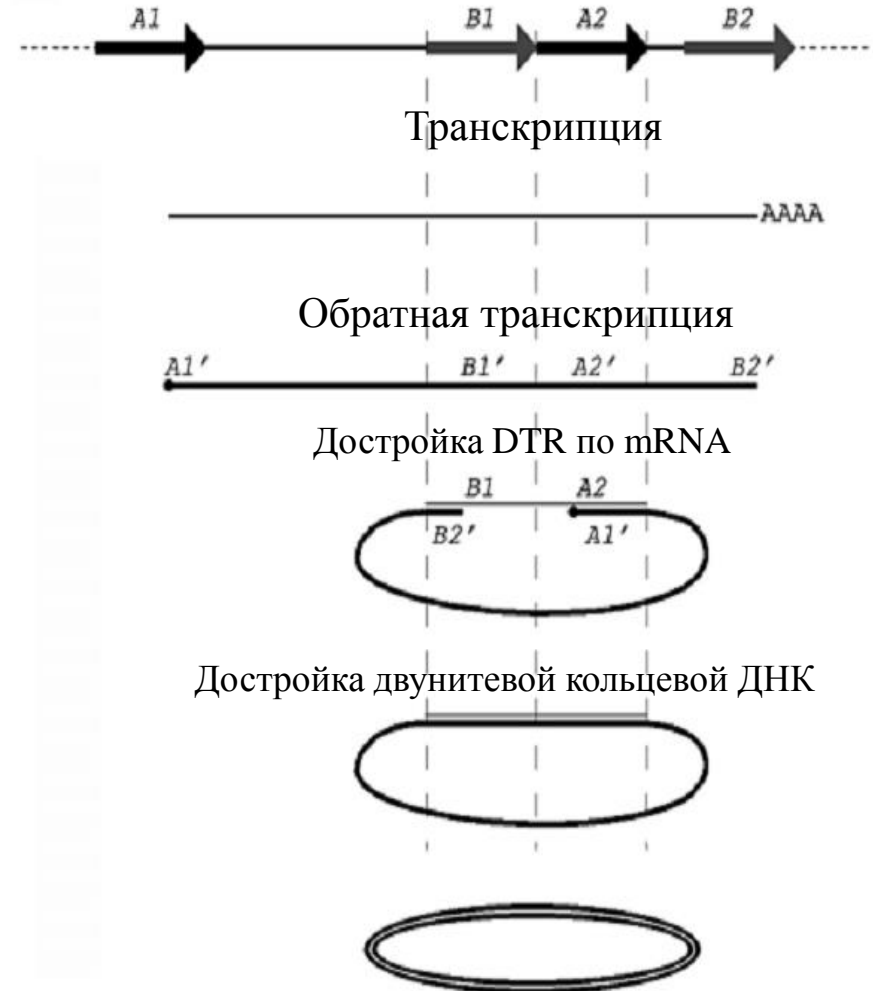
- Gag – белки вирусного компартмента
- RT/RH – обратная транскриптаза/РНКза-Н
- MT – вспомогательный протеин.
- YR – тирозиновая рекомбиназа.
- ITR – фланговые инвертированные повторы.
- ICR – участок, комплиментарный к ITR.
- A1, A2; B1, B2 – пары прямых фланговых повторов.

Жизненные циклы - DIRS

Репликация основанная на ITR



Репликация основанная на DTR



Особенности ретропозиции DIRS элементов

- Промотор DIRS элементов расположен в первом прямом или обратном повторе.
- Обратная транскриптаза инициирует реакцию за счёт структуры гарпина на 3' конце DIRS элемента (во втором терминальном повторе).
- Синтез ДНК протекает в цитоплазме.
- После образования двунитевого кольца ДНК gag протеин транспортирует его в ядро.
- Тирозиновая рекомбиназа осуществляет надрезание кольца ДНК и клеточной ДНК и встраивает кольцо в геном.
- Лигирование осуществляет клеточная система репарации.
- DIRS так же называют YR транспозонами (по факту присутствия в них Тирозиновой рекомбиназы).

Структура генома LINE элементов

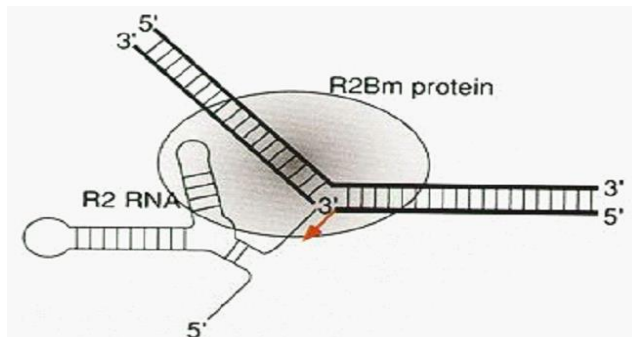


- **TSD** – дупликация сайта встраивания
- **ORF1** = транспортный протеин
- **ORF2** = **EN + RT + C** – ДНК-эндонуклеаза + обратная транскриптаза + домен распознавания нуклеиновых кислот
- **UTR** – 5'- и 3'- не транслируемые последовательности.

Жизненные циклы: R2 LINE (пример TPRT)

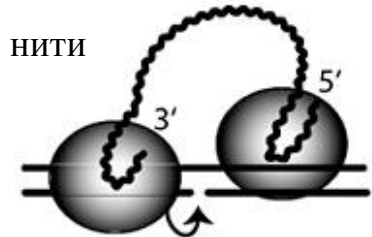


- R2 LINE – специфический LINE. Он «паразитирует» на 28S рибосомальной РНК, и представляет собой самосплайсирующийся интрон.
- R2 LINE кодирует одну ORF, несущую эндонуклеазную активность и обратную транскриптазу.
- R2 LINE имеет высокую специфичность к сайту встраивания в гене 12S рРНК.
- R2 LINE утилизирует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

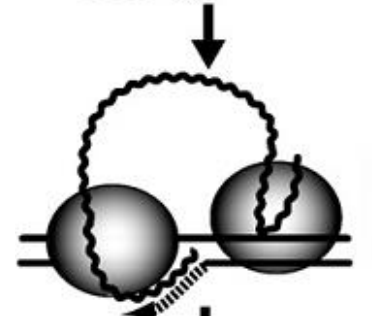


R2-LINE: Разрезание ДНК клетки и старт обратной транскрипции от свободной «-ОН» группы.

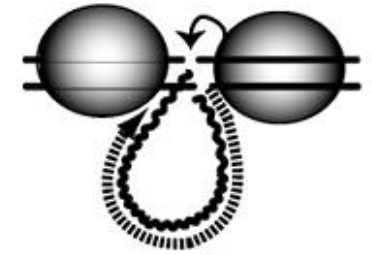
Разрез первой нити



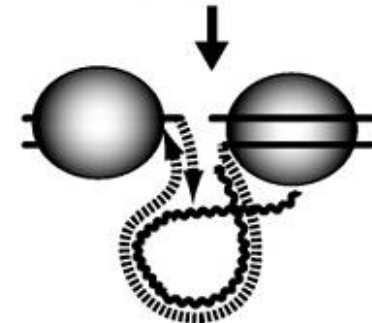
Начало RT по R2 РНК



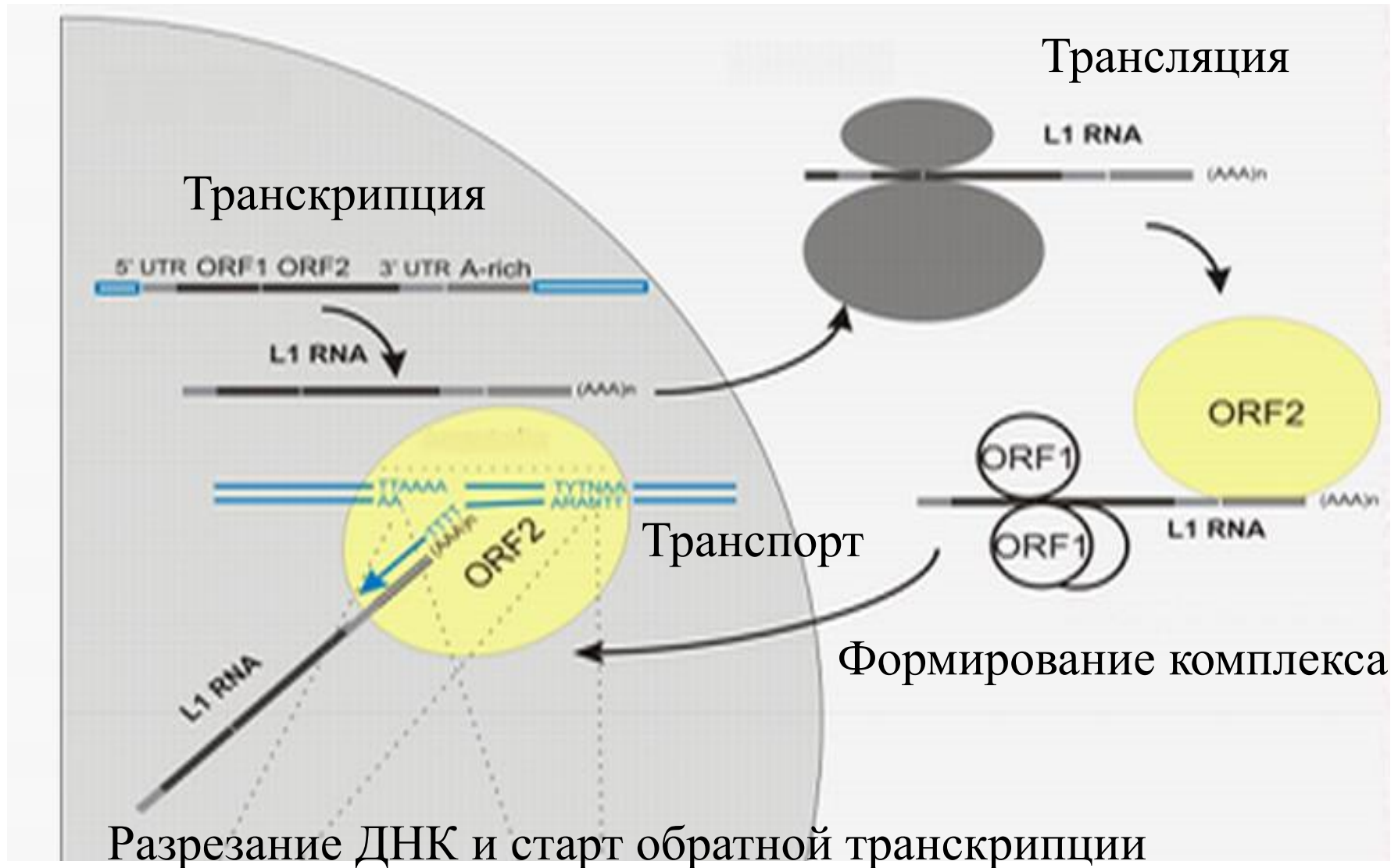
Разрез второй нити



Старт синтеза второй нити R2 ДНК

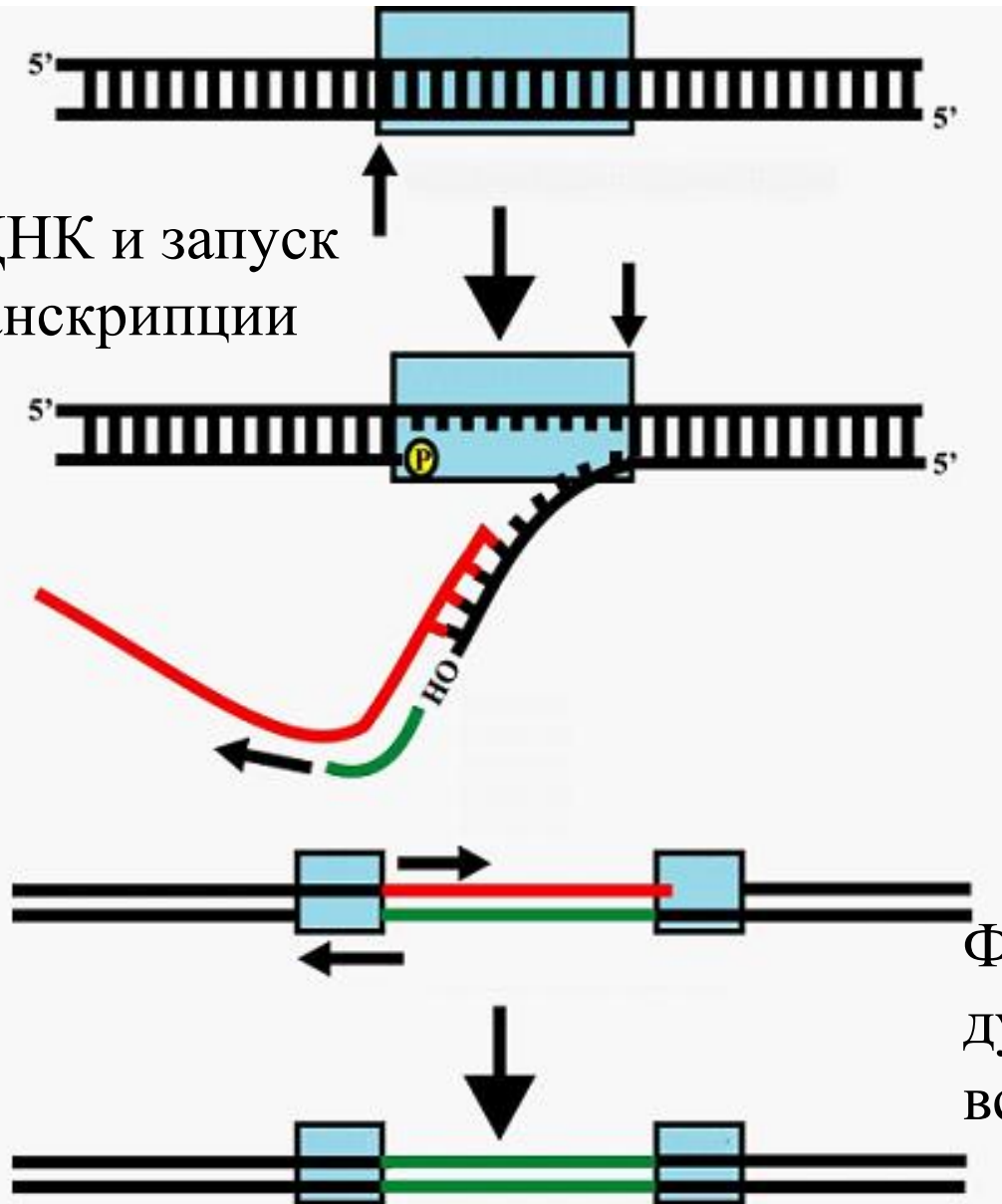


Жизненные циклы: LINE1



Жизненные циклы: LINE1

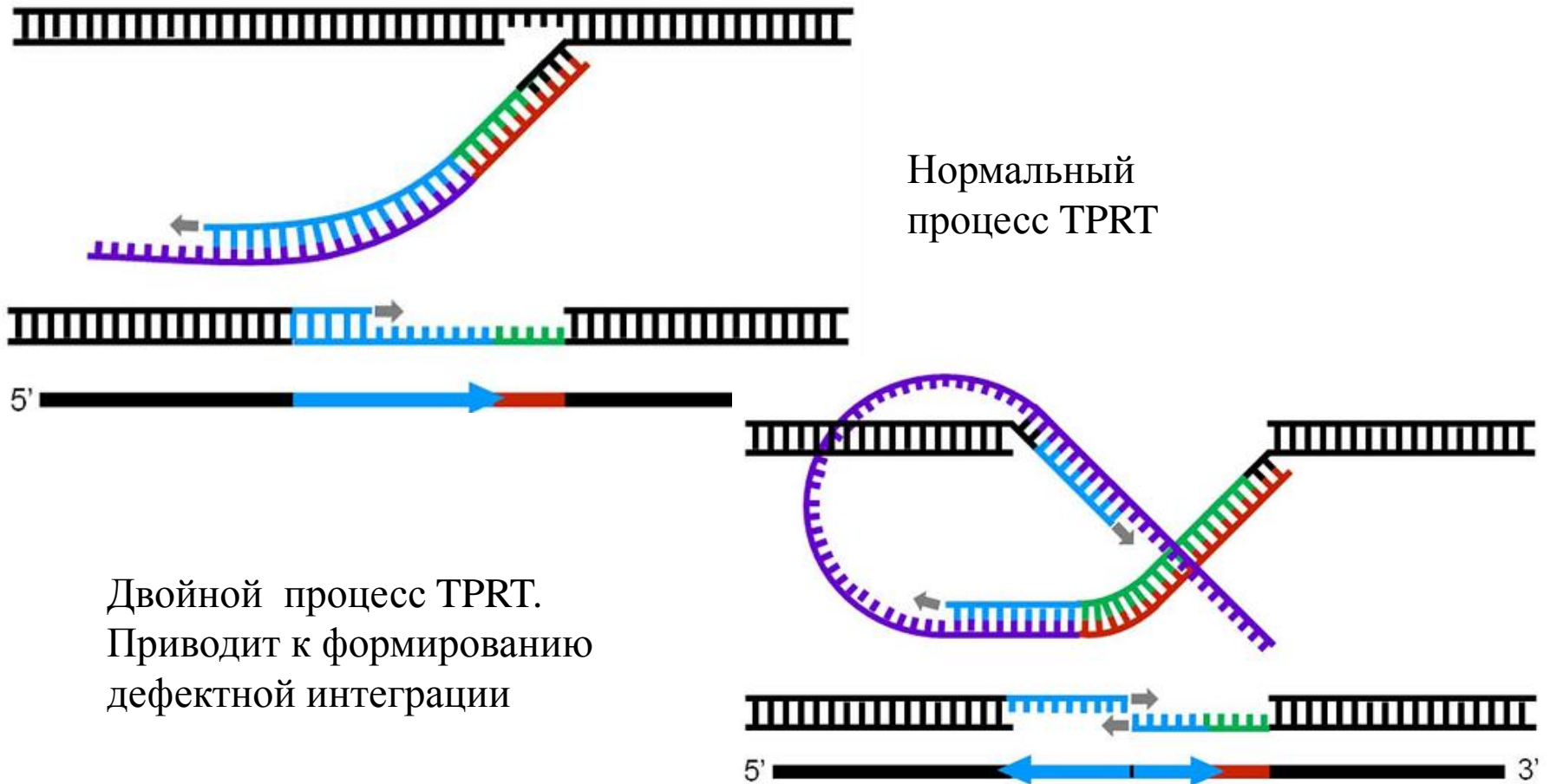
Разрезание ДНК и запуск
обратной транскрипции



Формирование
дубликации сайта
встраивания

Жизненные циклы: LINE1

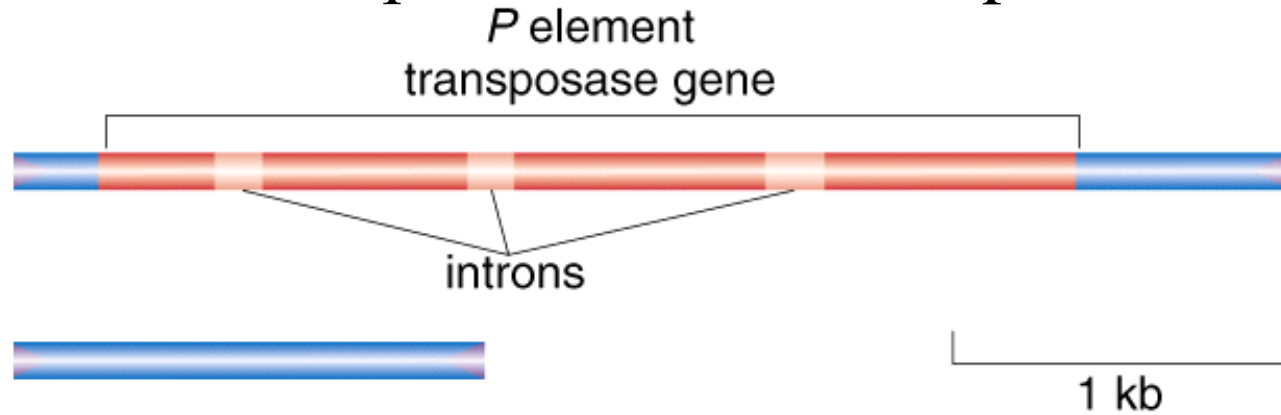
TPRT является особенно уязвимой с точки зрения «смены матриц». У LINE1 это явление может происходить даже внутри самого элемента.



Особенности репликации LINE элементов.

- Транскрипция происходит с использованием внутреннего Pol II промотора, уникального в своём роде.
- Трансляция на рибосомах клетки-хозяина сопряжена, как правило, с захватом своей же мРНК для дальнейшей транспортировки в ядро и ретропозиции.
- LINE – рибонуклеопротеид из РНК и белков LINE.
- Транспорт комплекса в ядро возможен только в моменты, когда ядерная оболочка отсутствует – комплекс как правило слишком большой.
- Все LINE элементы используют ДНК клетки для запуска обратной транскрипции (реакция TPRT).
- Вторая нить ДНК синтезируется системой репарации клетки.
- Реакция TPRT крайне уязвима к «смене матрицы», а RT большинства LINE не стабильна и редко формирует полные элементы.

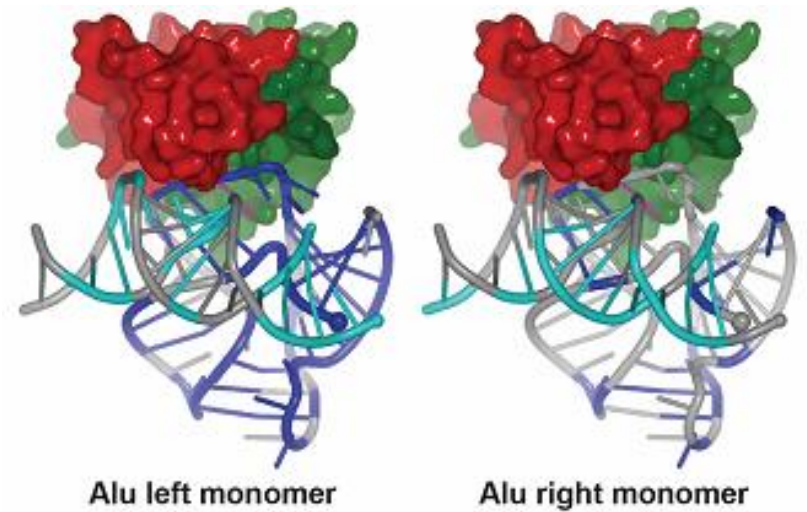
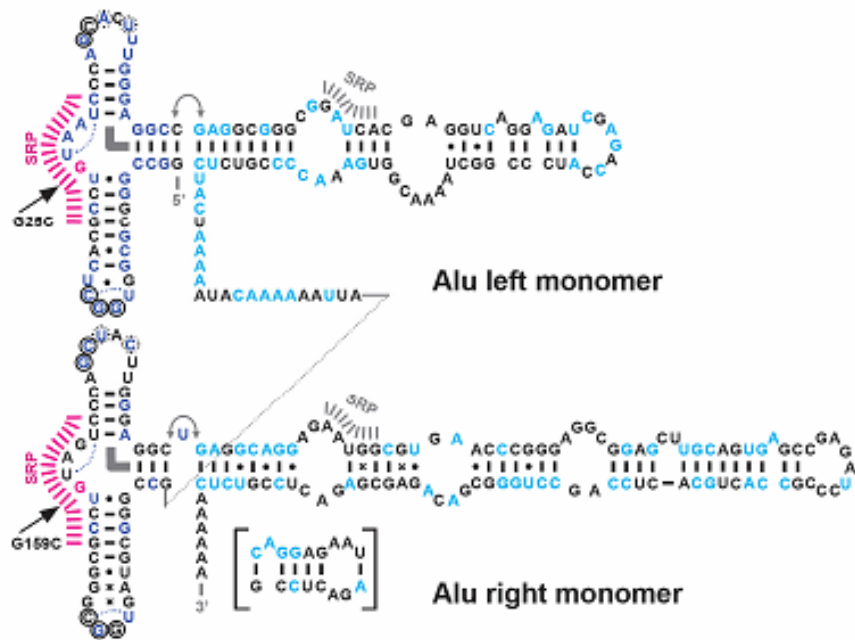
Особенности репликации Ренелоре элементов.



- 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.

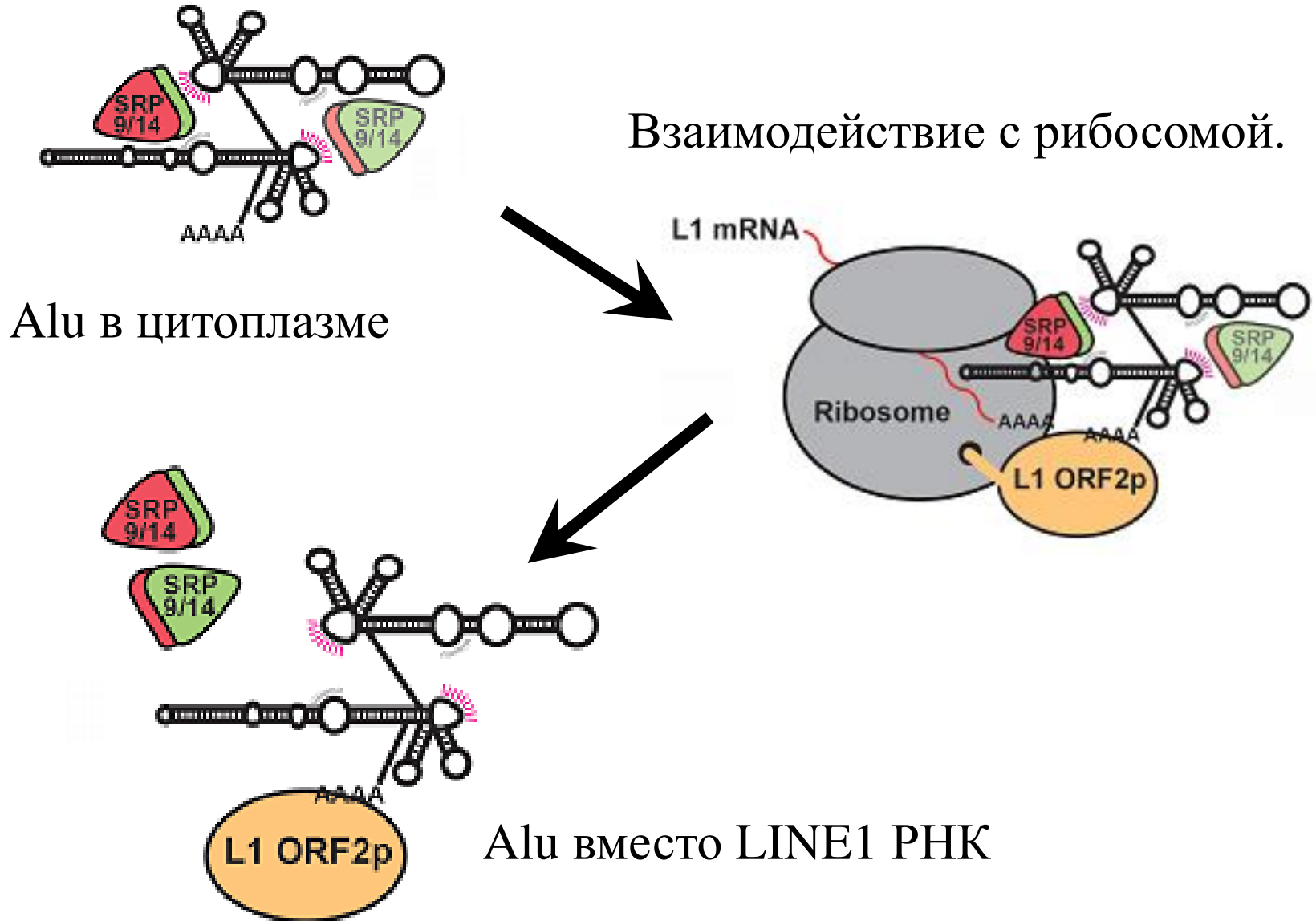
Не автономные ретроэлементы: Alu повторы.

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

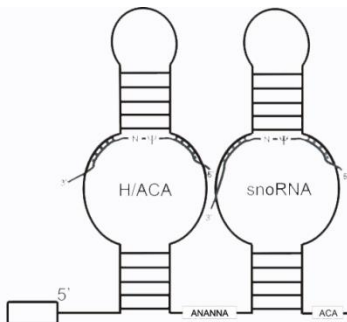


Димер. Состоит из двух мономеров: FRAM и FLAM.
Произошли от 7SL РНК и могут взаимодействовать с SRP протеином.

Подстановка Alu вместо LINE

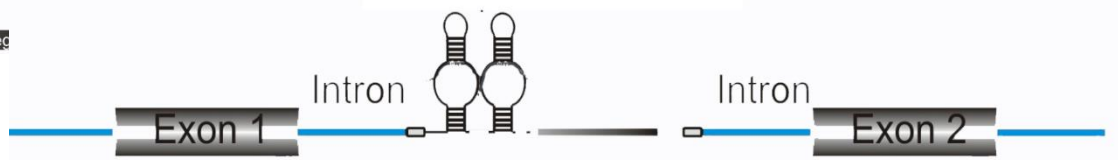


snoRTE – неавтономный элемент с заимствованным промотором у Утконоса.

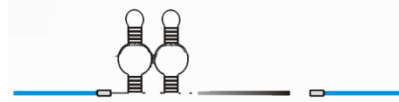


snoRTE состоит из функциональной snoРНК и двух фрагментов RTE LINE.

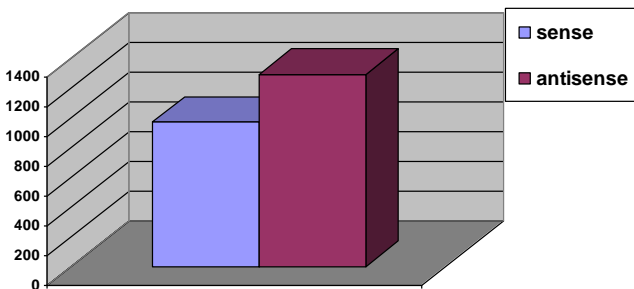
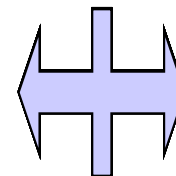
snoRTE не содержит промотор в своём составе и использует промотор гена, в интроне которого он расположен.



Сплайсинг



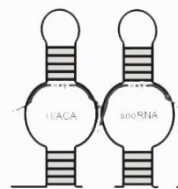
Дегградация интрона



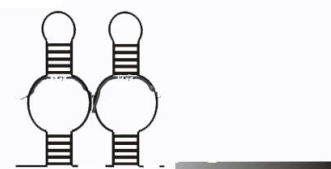
Тримминг snoRNA

5'тримминг snoRNA

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



Функциональная snoRNA



snoRTE



ретропозиция

Не автономные элементы: стратегии репликации.

- Активны только одновременно с активностью автономных элементов.
- «Подставляют» себя на место ДНК или РНК автономного элемента.
- В случае транспозонов – имеют похожие инвертированные повторы. Транскрипция не требуется.
- В случае LTR ретроэлементов – имеют похожие LTR.
- В случае LINE – структурно идентичные идентичные 3' последовательности.

Заключение.

- Стратегии жизненных циклов мобильных элементов основаны на использовании толерантности клетки к ДНК уже имеющей связь с клеточной ДНК.
- Частично интегрированную ДНК эукариотическая клетка считает своей и «корректирует» разрывы системой репарации.
- Основной стратегией «выживания» мобильных элементов является создание большого количества собственных копий.
- В случае если репликация ДНК и обратная транскрипция происходят в цитоплазме они являются субъектом атаки защитных комплексов клетки на цитоплазматическую ДНК и ДНК-РНК гибриды. Это обуславливает необходимость наличия изолирующего «вирусного» протеинового капсида, проницаемого для простых соединений и не проницаемого для крупных молекул.
- TPRT является более защищенной и простой реакцией, однако подвержена «смене матрицы» и для полноценного воспроизведения копий требует наличия элементов внутреннего промотора элемента.
- Интроны могут так же быть удобны для воспроизводства элементов, не имеющих рабочего внутреннего промотора.
- Среди мобильных элементов не является редкостью чувствительность к последовательности сайта встраивания. Однако, как правило, эти последовательности достаточно просты и встречаются в геноме многократно.
- Создание множества своих копий, с другой стороны, делает возможным для клетки распознавание и нейтрализацию активности мобильных элементов.
- Как автономные, так и не автономные мобильные элементы мимикрируют, подстраиваясь под существующие в клетке структуры.
- Многокопийные функциональные некодирующие короткие РНК (такие как tРНК) часто становятся основой не автономных элементов, ввиду толерантности клетки к числу копий этих РНК, наличию у них элементов внутреннего промотора и способности взаимодействовать с протеиновыми клеточными структурами.