

*Прогресс в биологии — это переход
от ложного знания к истинному
незнанию.*

В. Я. Александров

**Повторяющиеся последовательности
генома эукариот.
Мобильные генетические элементы
эукариот.**

Курс молекулярной биологии

**Захарова Ирина Борисовна,
к.б.н., доцент**

С-парадокс - количество ДНК в гаплоидном наборе хромосом эукариот значительно превышает количество ДНК, содержащееся в структурных и регуляторных генах



*В природе нет
ничего
бесполезного.
М. Монтень*

Этот парадокс объясняется тем, что эукариоты содержат «избыточное» количество **повторяющейся ДНК**

Классификации повторов

1. По скорости ренатурации ДНК
2. По ориентации последовательности повторов их можно разделить на прямые (DR) и обращённые (IR).
3. По длине различают короткие (SSR) и длинные (LR).
4. По расположению друг относительно друга: консолидированные и диспергированные. Одна из разновидностей первых – тандемные повторы (TR).
5. По расположению относительно генов: внутригенные (intragenic) и межгенные (intergenic).

По скорости ренатурации ДНК

Быстрые повторы

К быстрым повторам относится сателлитная ДНК

Умеренные повторы

К умеренным повторам относят как транскрибируемые и транслируемые, так и только транскрибируемые, но нетранслируемые последовательности ДНК и регуляторные участки.

Уникальные гены

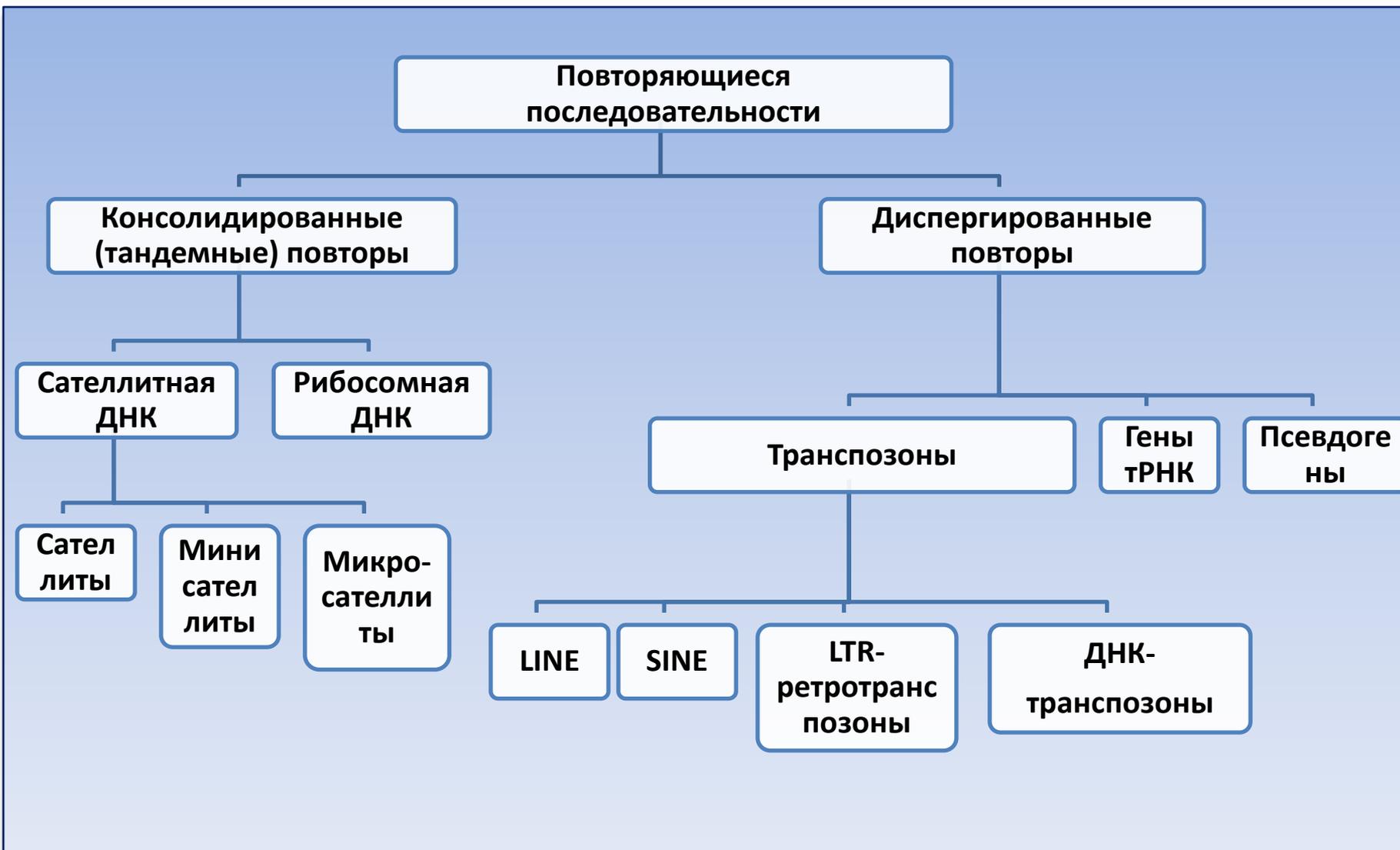
По функциональности генов

"домашнего хозяйства"

Это гистоновые гены, гены tРНК, rРНК и т.п.

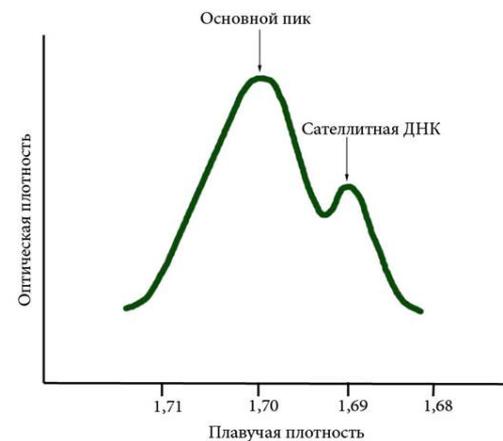
"роскоши"

гены, которые экспрессируются в клетках определенных тканей и в определенное время.



Сателлитная ДНК

Определение: характерный компонент эукариотического генома, состоящий из тандемно организованных повторов



Сателлитная ДНК	Размер последовательности	Размер кора	Локализация
α -сателлиты	1000 т. п.н.	171 п.н.	центромеры
β -сателлиты	250-500 т.п.н.	68 п.н.	теломерные и некоторые перицентромерные участки хромосом
γ -сателлиты		220 п.н.	
Минисателлиты	до 10 000 п.н.	5–50 п.н.	и в эу- и гетерохроматине
Микросателлиты	до 200 п.н.	1–4 п.н.	

**Общим для всех сателлитов является наличие
тандемно расположенных повторов**



Тандемный повтор.

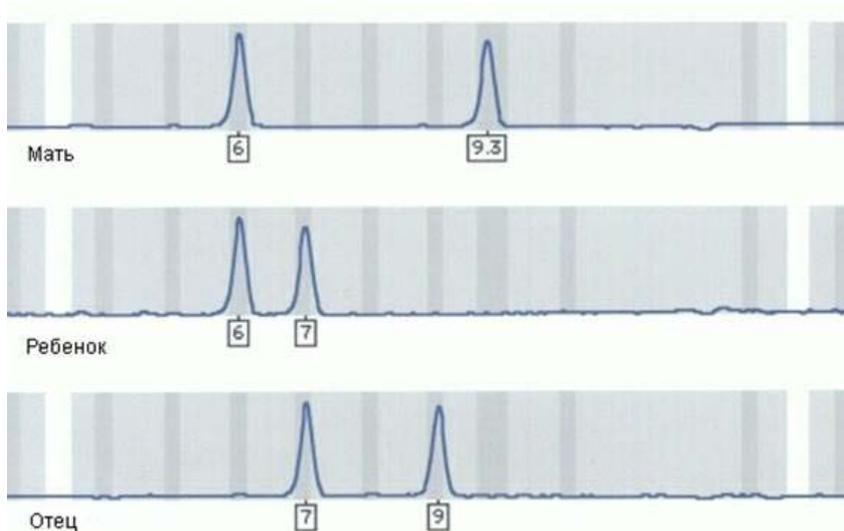


**Инвертированный
повтор**

Микросателлиты (STR) – короткие tandemные повторы с длиной повторяющейся единицы 1-4(6) п.н.

- обладают значительным полиморфизмом
- большое число локусов (около 100000)
- равномерно распределены по геному

Распределение и число микросателлитов в геноме каждого конкретного человека индивидуально, что позволяет использовать STR-локусы в качестве маркера для генетического картирования, идентификации личности, установления родства



Результаты анализа длин аллелей одного микросателлитного локуса в пределах семьи

Минисателлиты

Минисателлитные ДНК построены из повторов длиной в 6–50 п.н., формируют блоки промежуточных размеров и локализованы в разных участках хромосом.

У человека известны два основных типа минисателлитов

1. Гипервариабельные минисателлиты

- основная повторяющаяся единица 5'-GGGCAGGAN-3', где N – любой нуклеотид
- локализованы в ~1000 участках генома
- длина их блоков высокополиморфна у разных индивидуумов.

2. Субтеломерные минисателлиты

Диспергированные повторы

- ✓ Расположены поодиночке, в разных участках генома.
- ✓ Одна и та же повторяющаяся единица может находиться в тысячах различных сайтов.

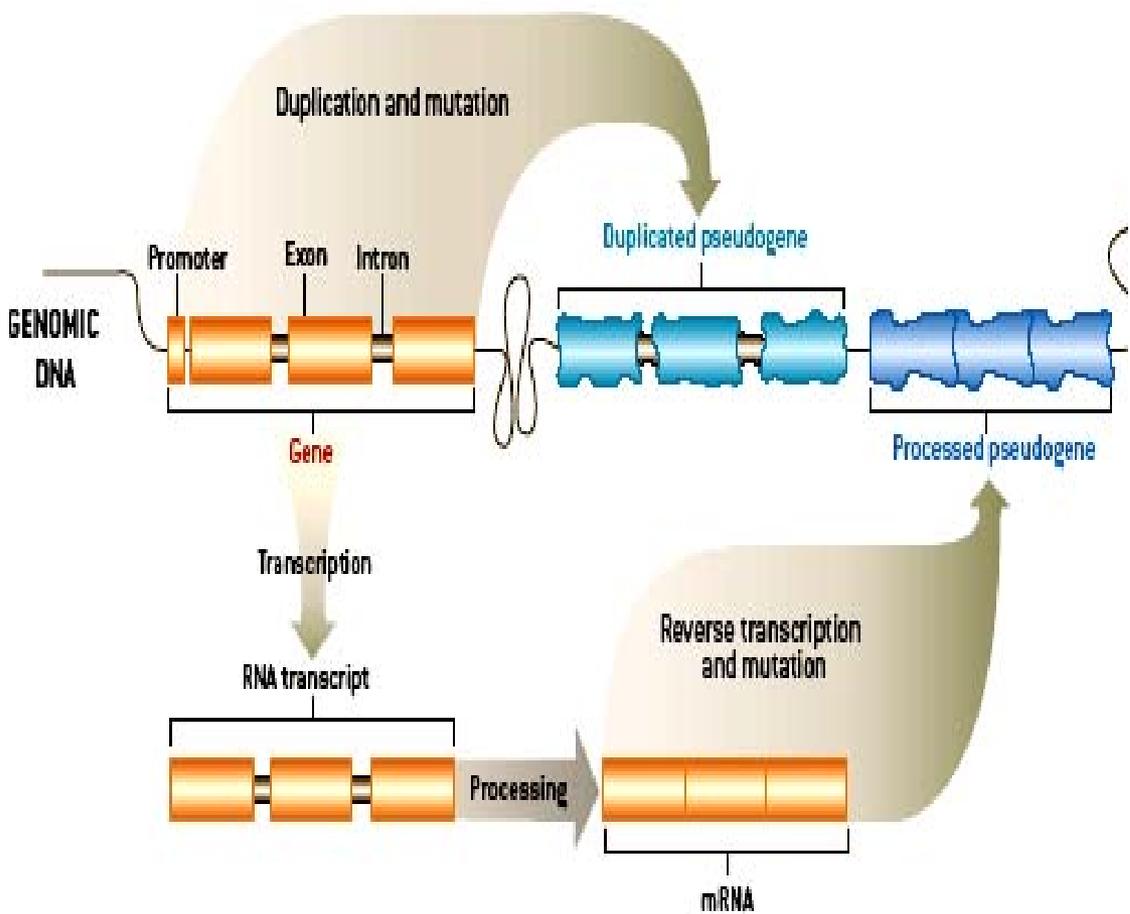
К дисперсным повторам относят

- 1. Гены транспортной РНК**
- 2. Транспозоны**
- 3. Псевдогены**

Псевдогены – последовательности, сходные с обычными структурными генами, но, как правило, не экспрессирующиеся с образованием функционально активных полипептидов

Псевдогены образуются двумя путями:

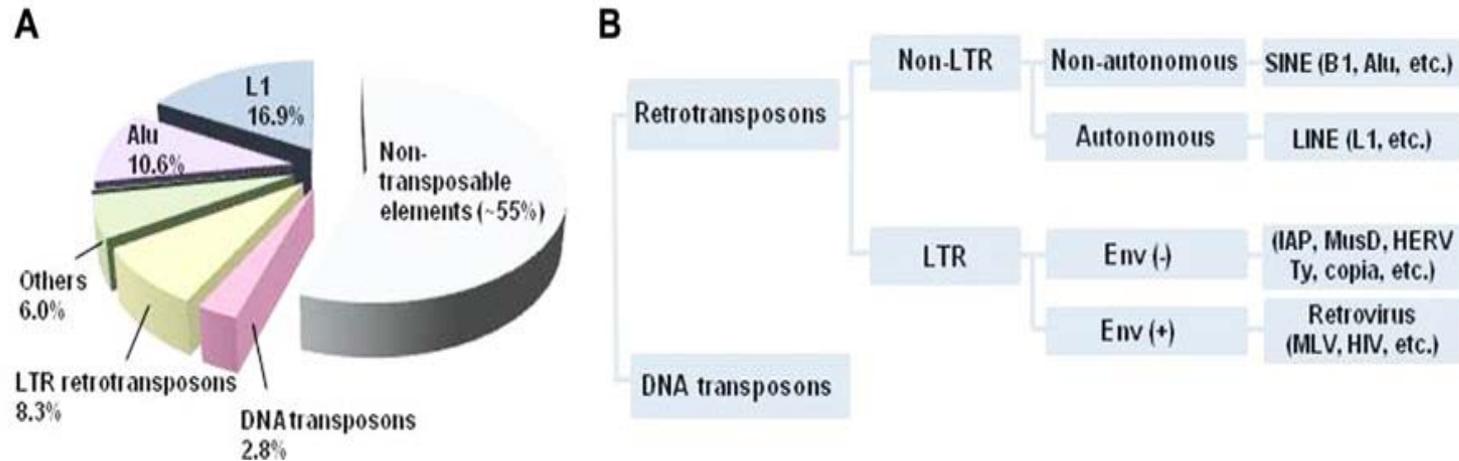
1. через дубликацию с последующей инактивацией копий мутациями
2. через интеграцию в геном копий ДНК, комплементарных зрелой мРНК, возникающих в результате ее обратной транскрипции



Мобильные элементы эукариот - транспозоны

- Копии мобильных элементов, как правило, расположены в геноме равномерно-случайно, а не в кластерах, как сателлитная ДНК.
- Мобильные элементы, относящиеся к одному семейству обладают сходными нуклеотидными последовательностями.
- Подавляющее большинство мобильных элементов в геноме не активно, т.е. не перемещаются и/или не генерируют новые копии.
- Большинство копий мобильных элементов являются неполными по длине и не имеют полноценных промоторов и ОРФ.

Транспозоны в геноме человека



ДНК-транспозоны – 300 000 копий и около 3% генома

Ретротранспозоны

- **SINE** - (Short Interspersed Nuclear Elements) короткие интерсперсные повторы – 1 500 000 копий и 13 (16) % генома
- **LINE** - (Long Interspersed Nuclear Elements) длинные интерсперсные повторы – 850 000 копий и 21 (17)% генома
- **LTR** (Long terminal repeat) - ретротранспозоны с длинными концевыми повторами – 443 000 копий и 8% генома

Классификация мобильных элементов эукариот

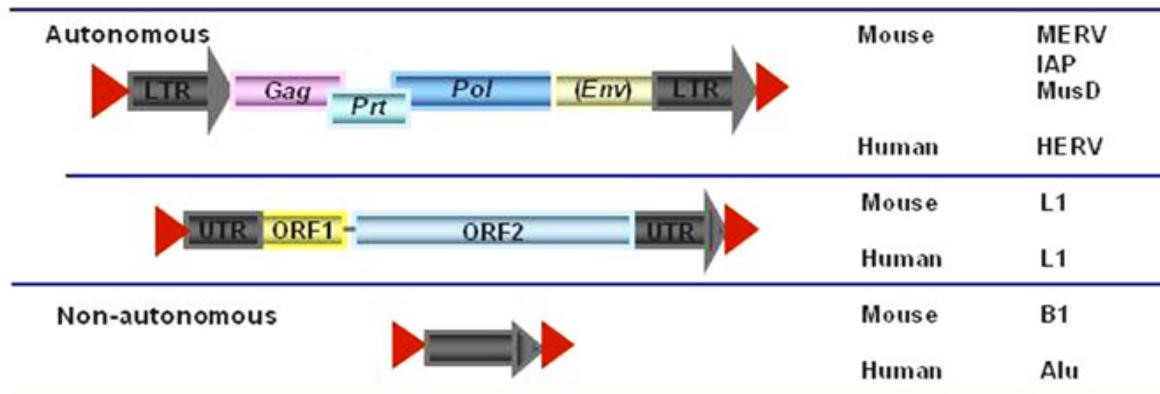
ДНК-Транспозоны

Ретроэлементы
перемещаются через РНК
интермедиаты

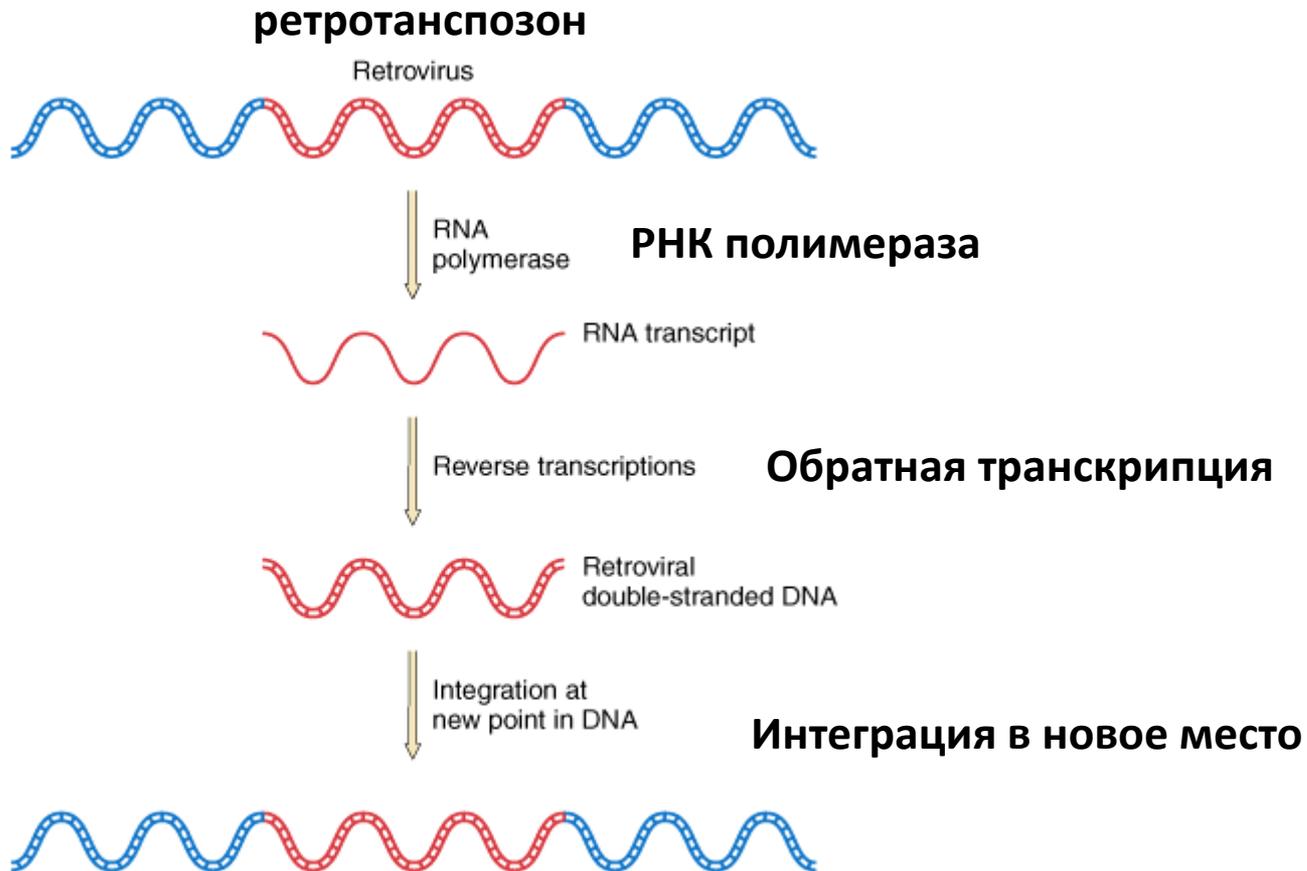
Автономные

Имеют гены, необходимые
для процесса их репликации
и встраивания

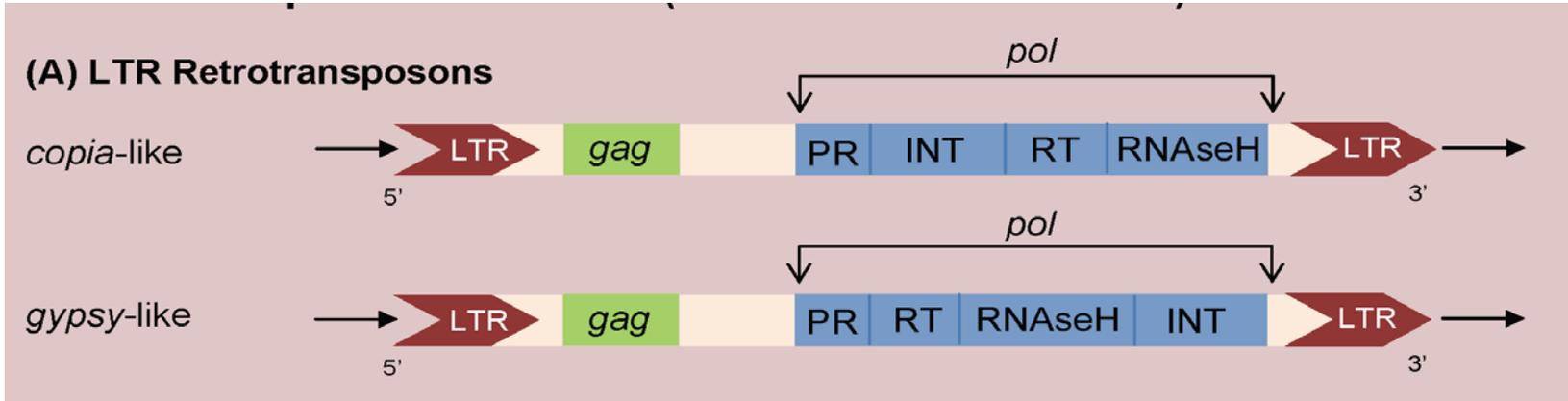
Неавтономные не
кодируют протеинов,
связанных с транспозицией



Жизненный цикл ретротранспозона



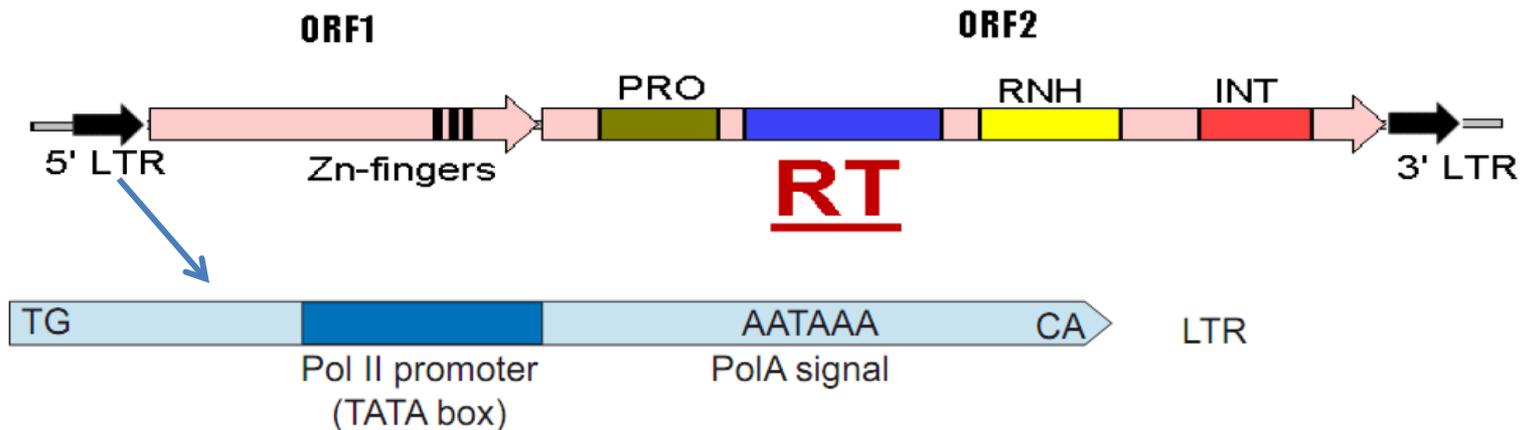
LTR ретротранспозоны

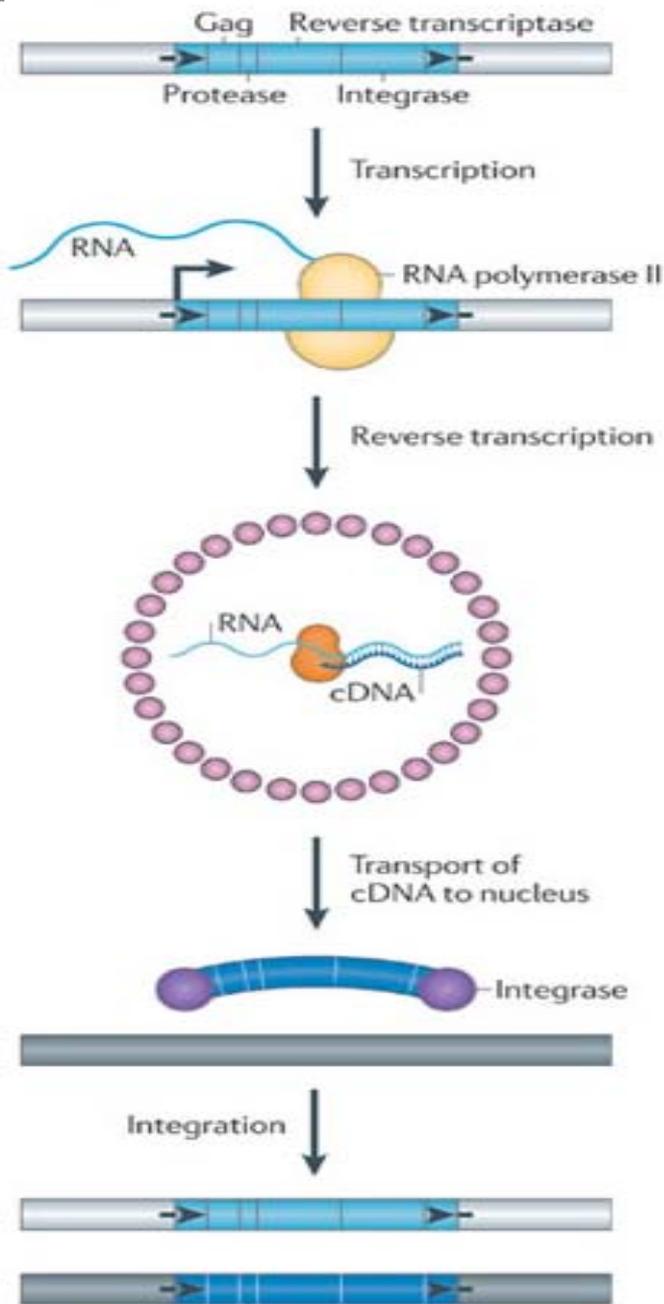


- LTR ретротранспозоны являются эндогенными ретровирусами
- Строение напоминают провирусов истинных ретровирусов
- Содержат длинные концевые повторы (LTR), гены gag, pol
- Отсутствуют гены белков, необходимых для сборки инфекционных вирусных частиц
- Могут перемещаться только внутри клеток

LTR ретроэлементы: структура.

- Длинные фланговые повторы LTR: 200-1500 нт.
- Дупликация сайта встраивания: 2-6 нт.
- Автономные: вирусный pol II промотор в LTR, набор вирусных ORF, длина: 0.5-12 тыс.нт.
- Неавтономные: вирусный pol II промотор в LTR, нет работающей рамки считывания для обратной транскриптазы, (200-2500 нт).
- Обратная транскрипция происходит в цитоплазме и осуществляется при участии LTR.

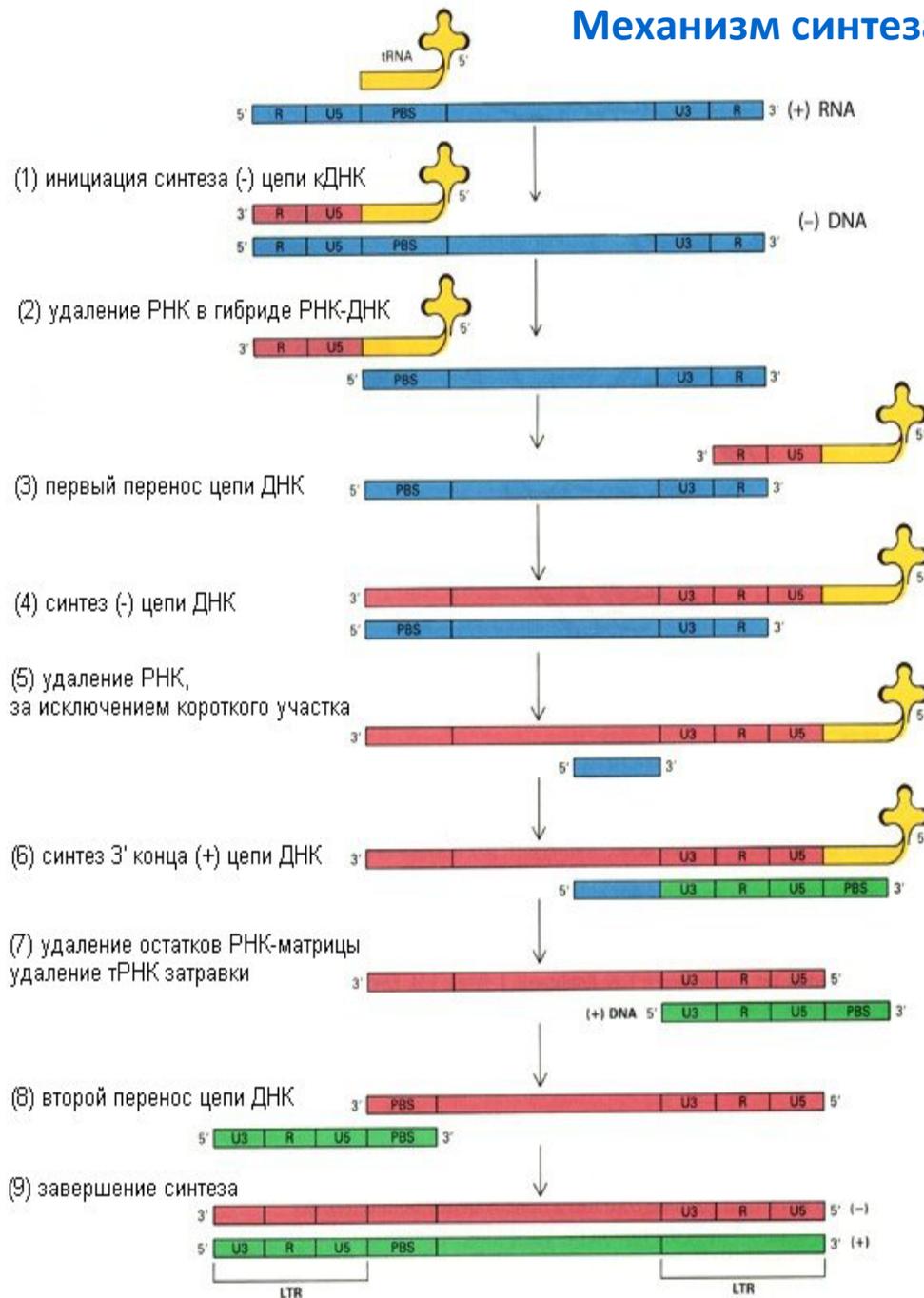




Репликативная ретротранспозиция LTR ретротранспозонов

- Транскрипция.
- Трансляция на рибосомах клетки-хозяина.
- Разрезание белков - предшественников продуктом гена *pro*.
- Предсборка вирусной частицы, захват вирусной РНК – для ретровирусов
- Обратная транскрипция “-” и “+” цепей ДНК.
- Транспорт двунитевой ДНК в ядро.
- Разрезание ДНК хозяина, образование «липких концов»
- Встраивание ДНК вируса в геном хозяина.
- Репарация участков однонитевой ДНК за счёт системы репарации клетки. 18

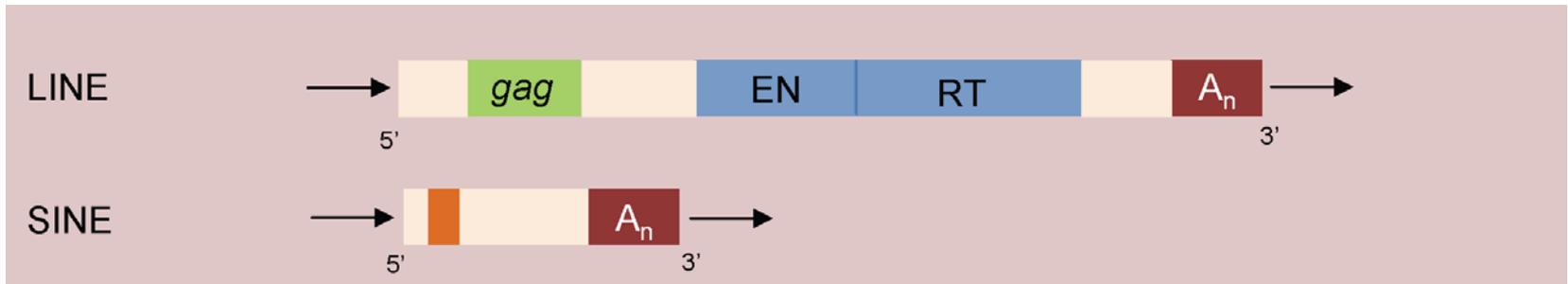
Механизм синтеза новой копии LTR ретротранспозона



LTR ретротранспозоны используют механизм синтеза новой копии сходный с образованием новых копий кДНК ретровирусов

В качестве затравки LTR ретротранспозоны используют тРНК. Все процессы синтеза новой копии LTR ретротранспозона осуществляются в цитоплазме, а к месту встраивания доставляется уже синтезированная кДНК копия элемента.

Non-LTR ретротранспозоны



LINE

- автономные
- характерна усечённость копий с 5'-конца
- На 3'-конце полиА-хвост
У человека имеется только одно семейство повторов
LINE – L1

SINE

- не содержат кодирующих последовательностей
 - при транспозициях используют обратную транскриптазу из LINE
- Значительная часть SINE представлена Alu-повторами

Non-LTR ретротранспозоны

Процессированные псевдогены

Копии генов, не содержащие интронов; с остатками поли(А)-хвоста; по флангам чаще всего есть прямые повторы. Возникли, как правило, путем обратной транскрипции



Автономные не LTR ретроэлементы: структура LINE

- Дупликация сайта встраивания (0-120 п.н.)
- Внутренний *pol II* промотор.
- 1-2 ORF (один из продуктов – обязательно обратная транскриптаза, как правило объединённая с рестриктазой-интегразой). Иногда есть интроны и инвертированные повторы на концах структуры.
- Для запуска обратной транскрипции необходимы последние 50-100 п.н. на 3' конце элемента.
- Длина: 0.8-8 т.п.н.
- Большинство копий в геноме представляют собой 3' фрагменты целого элемента.



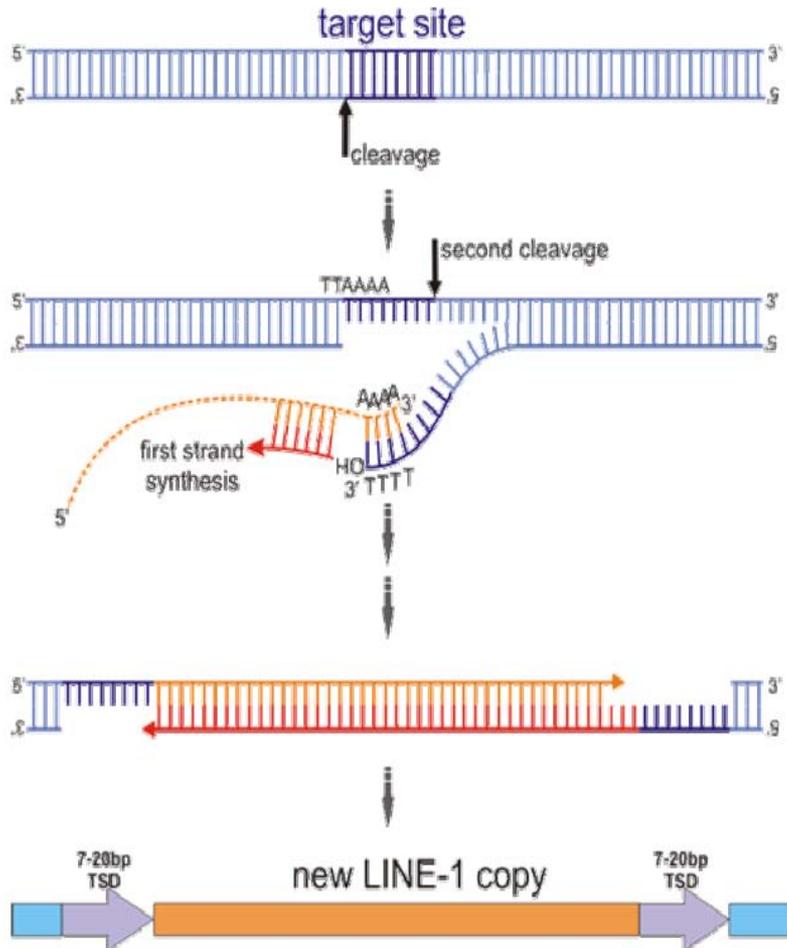
Не автономные не LTR ретроэлементы: структура SINE

- Дупликация сайта встраивания (0-120 нт).
- Внутренний pol III (SINE) или заимствованный pol II (внешний) промотор.
- Внутренняя последовательность, часто является обратным транскриптом регуляторных или tРНК
- Длина: от 70 до 3000 нт.



LINE для обратной транскрипции в качестве праймера использует ДНК в сайте встраивания

Target primed reverse transcription (TPRT)

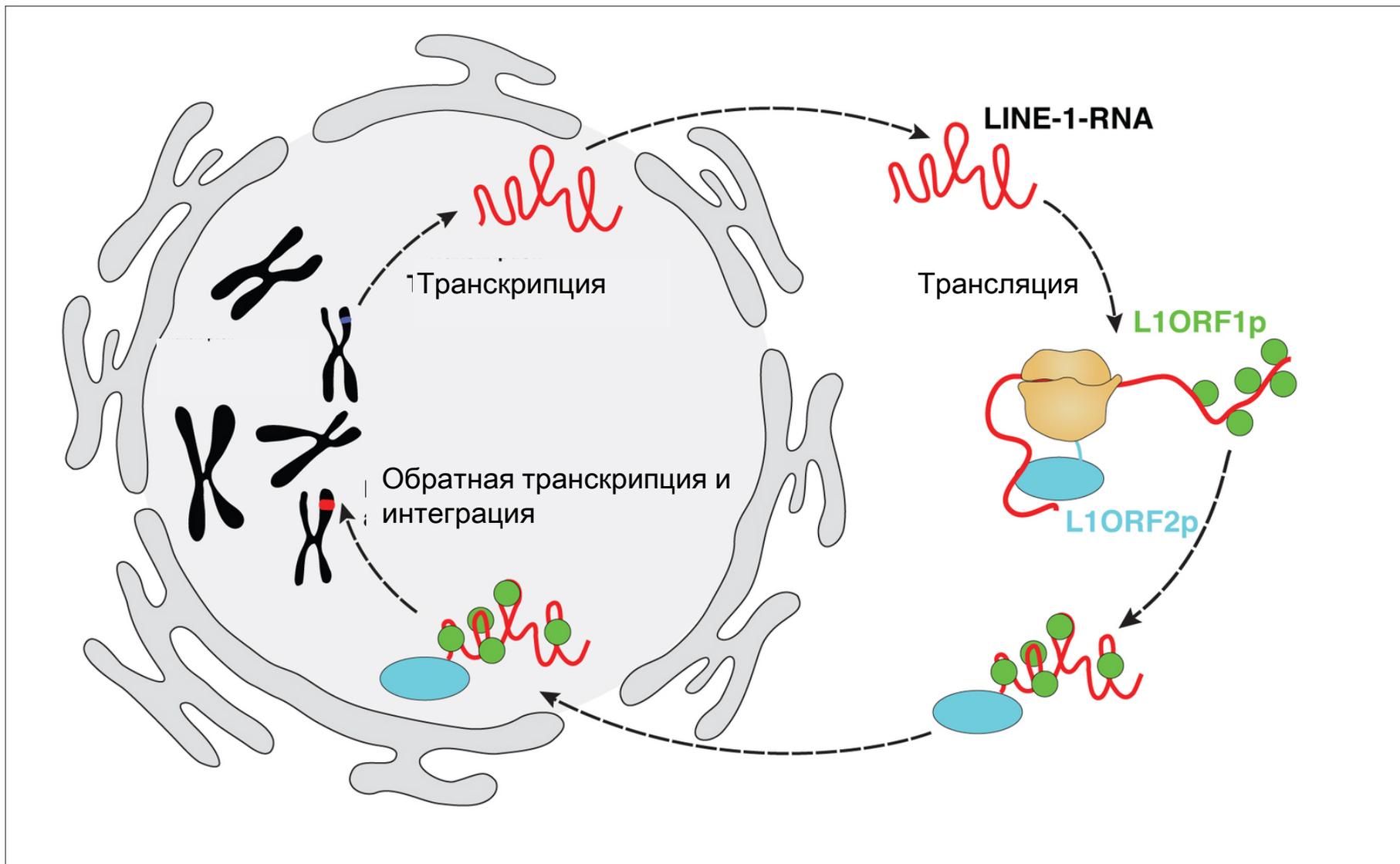


- в ДНК-мишень вносится одноцепочечный разрыв
- 3'-конец ДНК-мишени используется в качестве затравки для синтеза кДНК
- разрушение РНК в составе гетеродуплекса
- разрезание второй цепи ДНК-мишени
- репаративный синтез второй цепи ДНК

Особенности репликации LINE элементов.

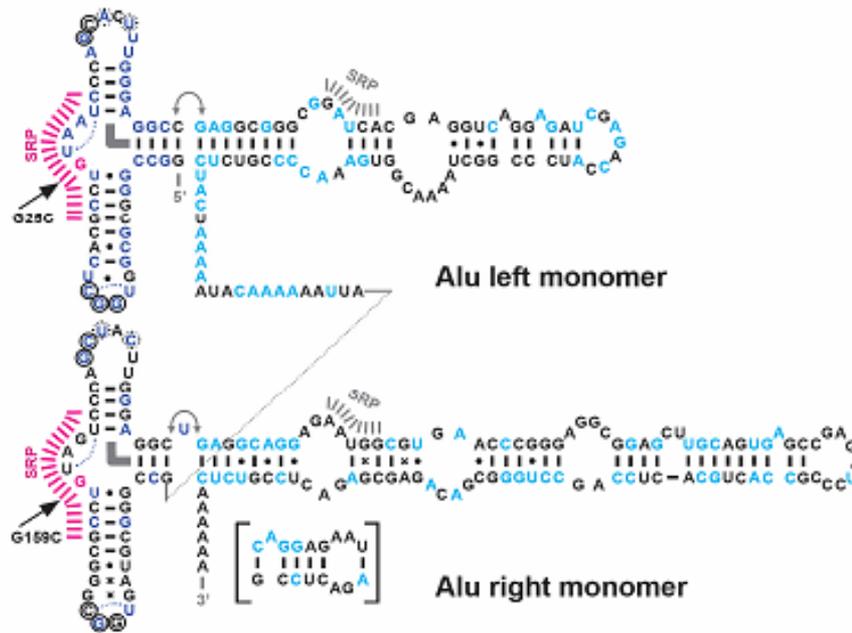
- Транскрипция происходит с использованием внутреннего Pol II промотора, уникального в своём роде.
- Трансляция на рибосомах клетки-хозяина сопряжена с захватом белкового продукта своей же мРНК для дальнейшей транспортировки в ядро и ретропозиции.
- Образуется LINE-рибонуклеопротеид из РНК и белков LINE.
- Транспорт комплекса в ядро
- Все LINE элементы используют ДНК клетки для запуска обратной транскрипции (реакция TPRT).
- Вторая нить ДНК синтезируется системой репарации клетки.

Жизненный цикл LINE1



Неавтономные ретроэлементы: Alu повторы.

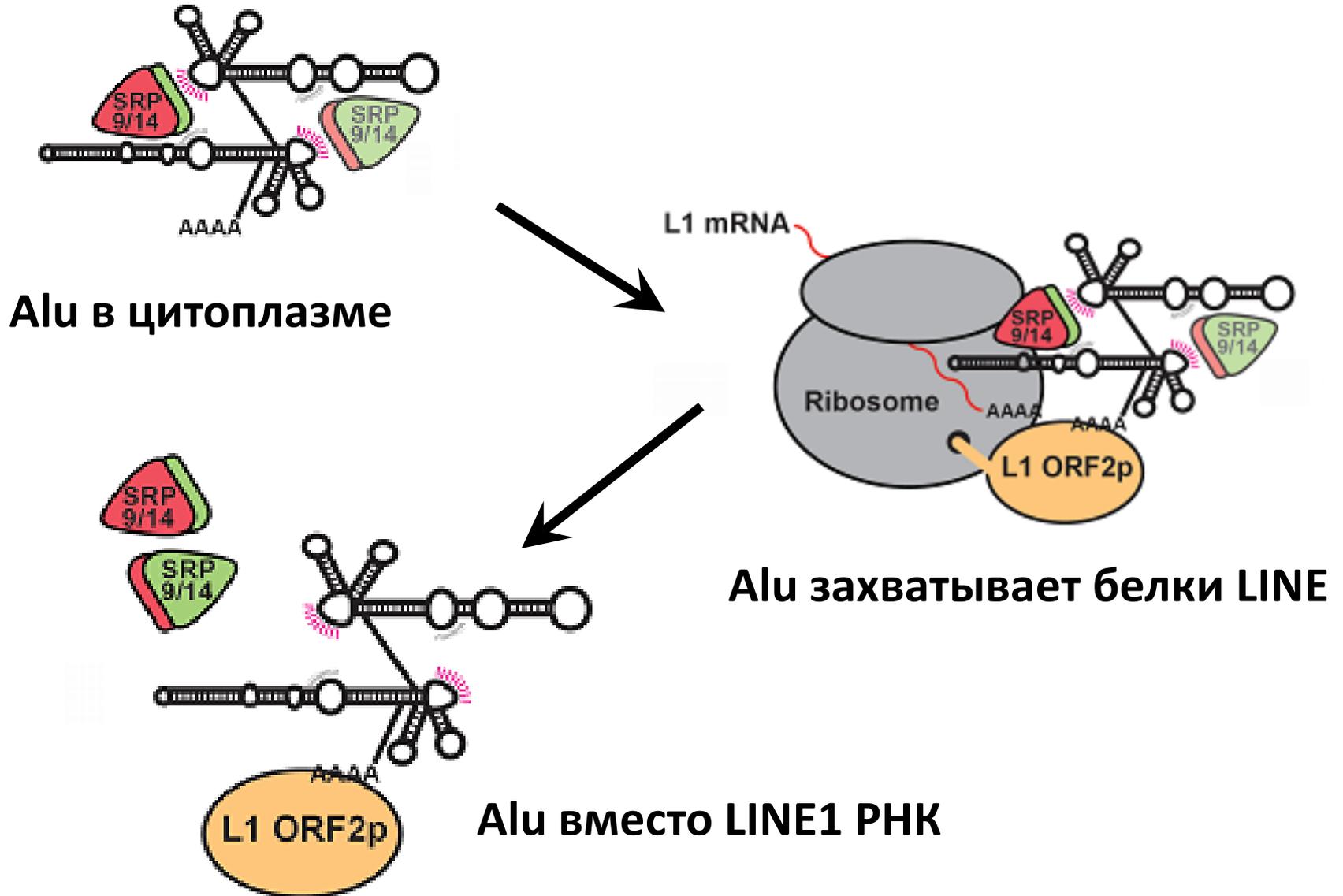
Alu повторы: неавтономный SINE элемент,
в настоящее время активный у приматов и человека



Димер. Состоит из двух мономеров.

Alu-повторы являются процессированными псевдогенами
7SL-РНК

Подстановка Alu вместо LINE



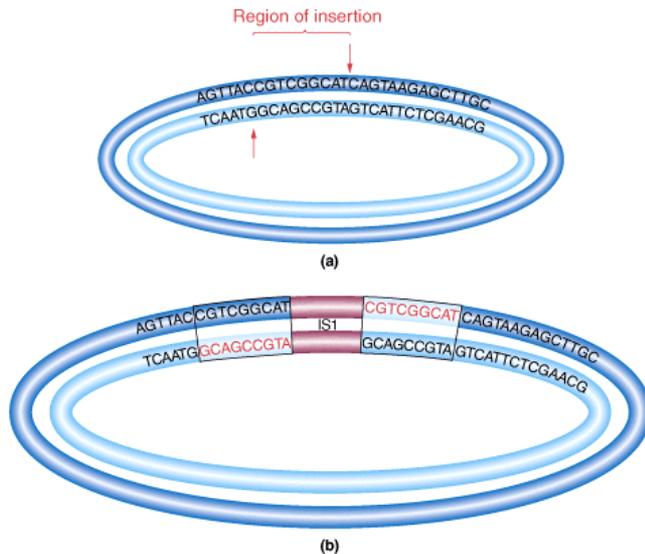
Неавтономные элементы: стратегии репликации.

- **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 SINE – структурно идентичные LINE 3'- последовательности.**

ДНК-транспозоны

Типичны для генома бактерий и достаточно широко представлены в геномах эукариот

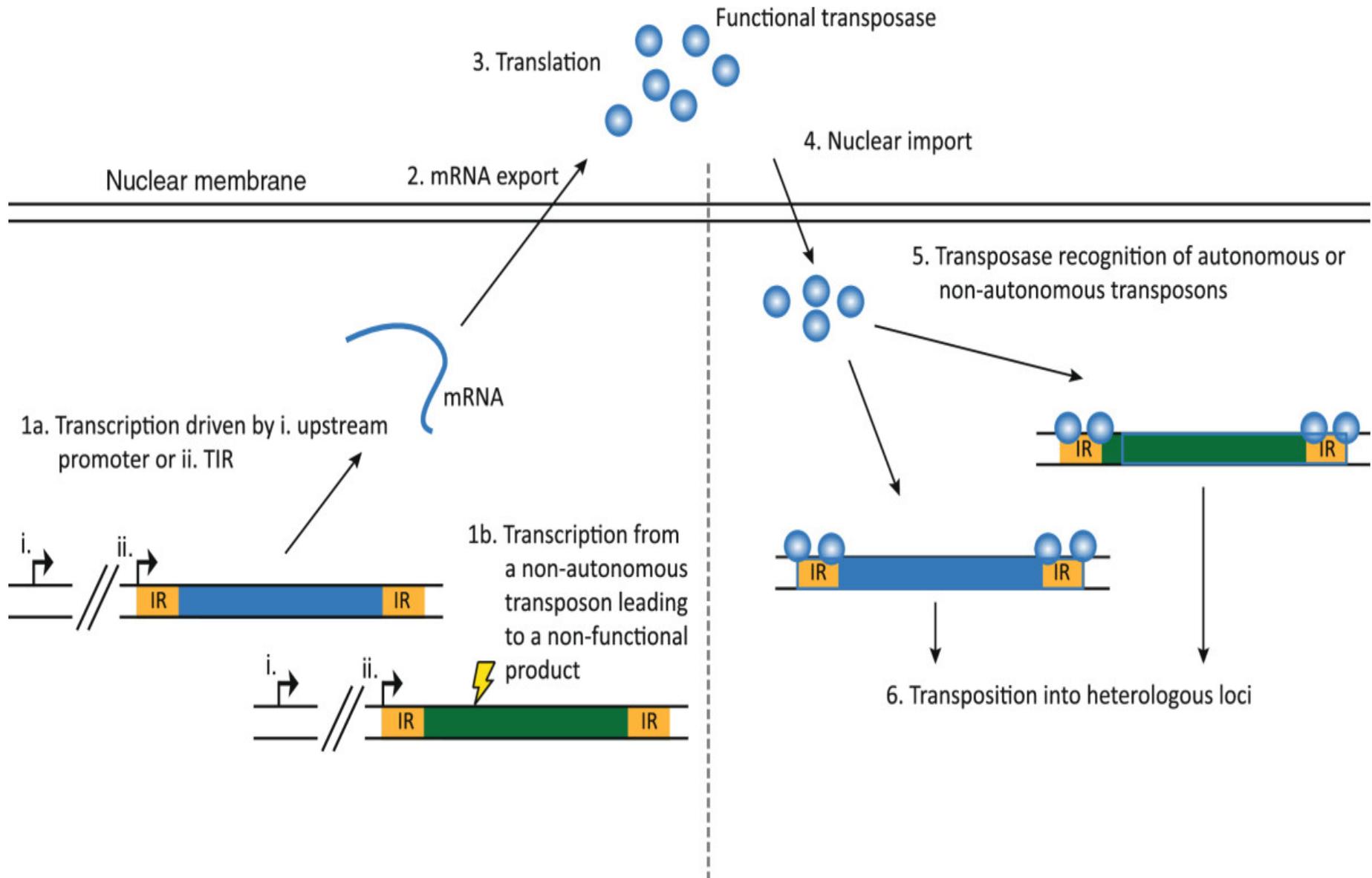
- Транспозиция осуществляется чаще всего по механизму вырезания и вставки (cut and paste) с участием транспозазы – фермента класса рекомбиназ
- В сайте интеграции транспозона есть **дупликация** короткой последовательности



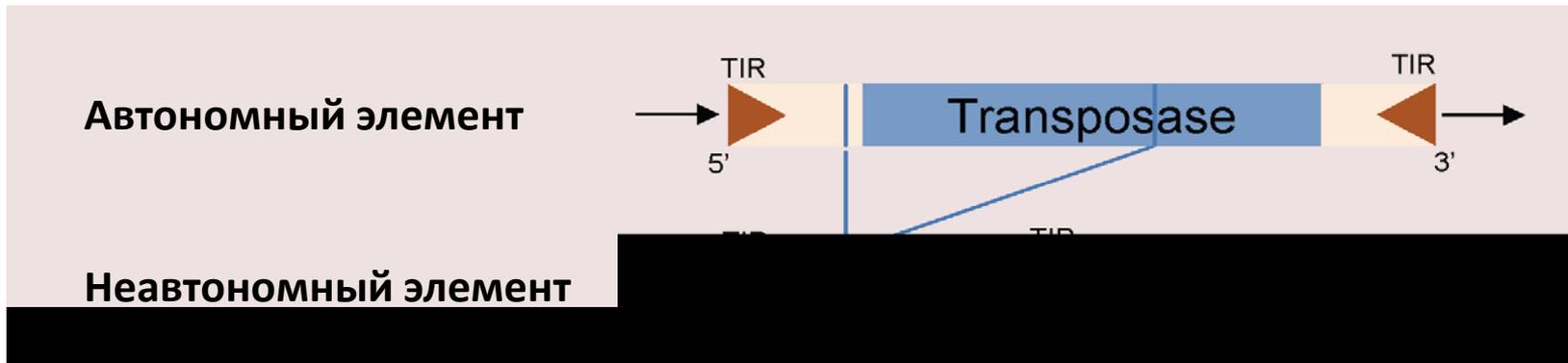
ДНК-транспозоны бывают:

- Автономные ДНК элементы
- Не автономные ДНК элементы (дериваты автономных)

Общая схема механизма транспозиции ДНК-транспозонов



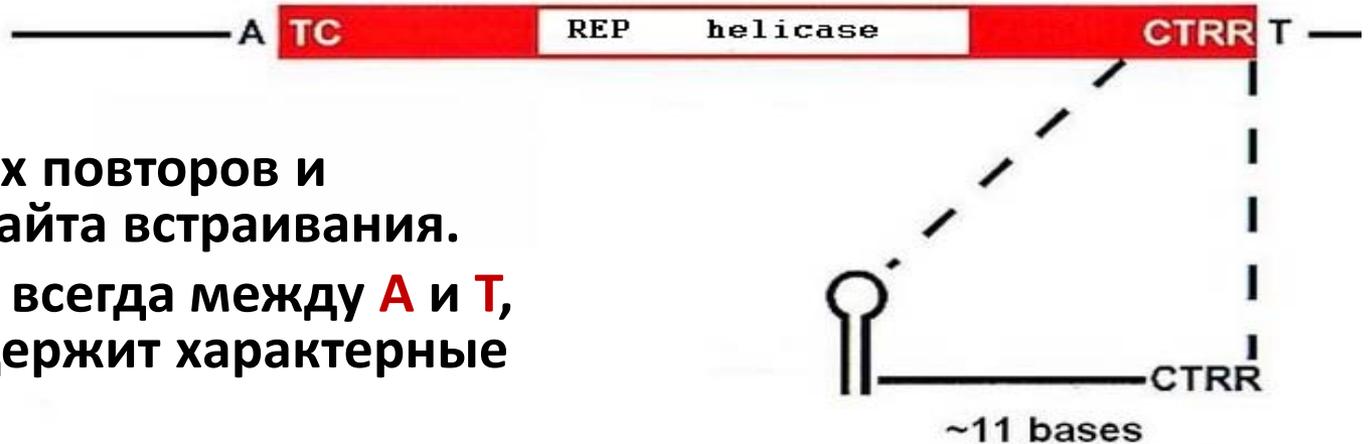
Структура типичного ДНК транспозона



TIR – инвертированные повторы

- Инвертированные фланговые повторы (12-76 п.н.)
- Дупликация сайта встраивания (2-4 п.н.)
- Автономные: *rol II* промотор, ORF транспозазы и интегразы (часто – один белок), длина: 0.5-3 т.п.н., иногда есть интроны.
- Неавтономные: нет промотора, и/или нет работающей рамки считывания, короткие (100-500 п.н.)

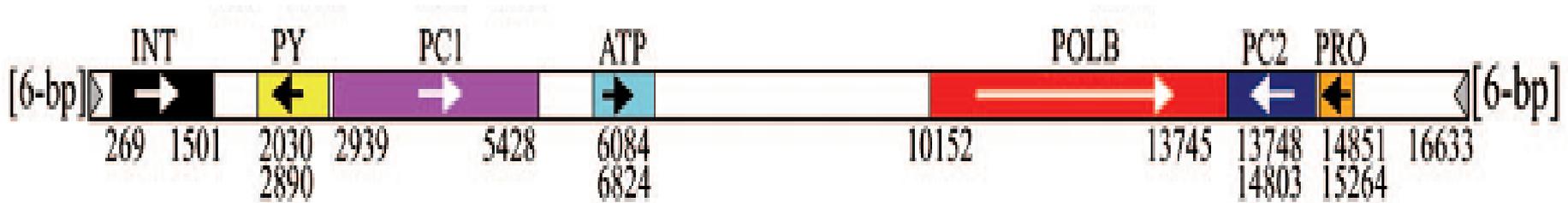
Транспозоны: Хелитроны



- Нет фланговых повторов и дупликаций сайта встраивания.
- Встраиваются всегда между **A** и **T**, консенсус содержит характерные структуры.
- Автономные: *rol* II промотор, ORF хеликазы, ДНК связывающий белок, длина: 2-3 т.п.н., интронов нет.
- Вероятно происхождение от бактериальной плазмиды.

Хелитроны перемещаются с помощью ***полуреplikативной транспозиции по принципу катящегося кольца***, подобно плазмидам и некоторым вирусам

Полинтоны

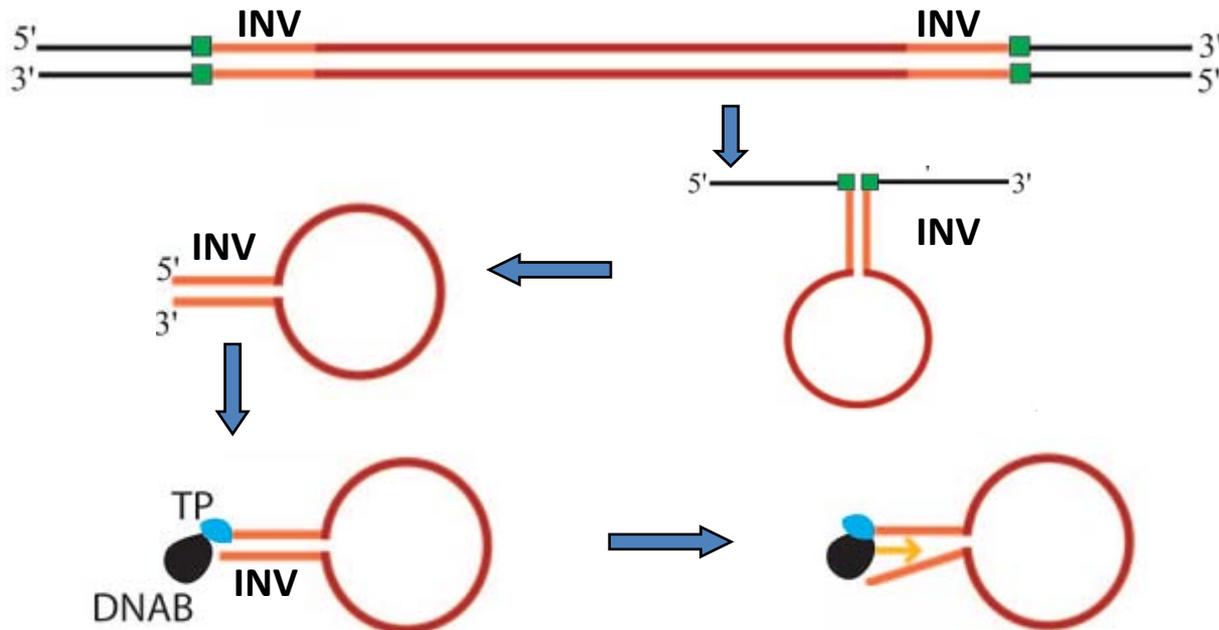


- Фланговые инвертированные повторы 150-700 п.н. и дупликация сайта встраивания 5-6 п.н.
- Очень большие, длина: от 11 до 25 т.п.н., интронов в кодирующих последовательностях нет.
- Автономные: *rol* II промоторы, ORF специфической ДНК-полимеразы, АТФ-азы, интегразы и ещё до 5-и дополнительных ORF, интронов нет, разнонаправленные ORF.
- Используют свою собственную ДНК-полимеразу, праймером для которой служит белок
- Происхождение от сложных ДНК-овых вирусов или фагов.

Считаются в настоящее время самыми сложными ДНК-транспозонами эукариот.

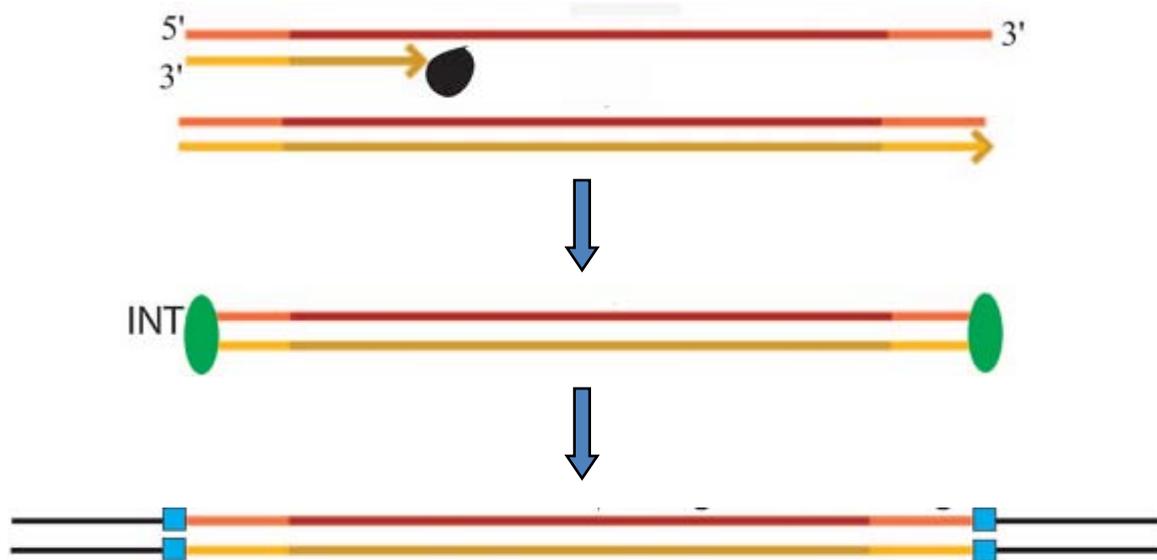
Репликативная транспозиция полиинтона - «вирусный» тип транспозиции.

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



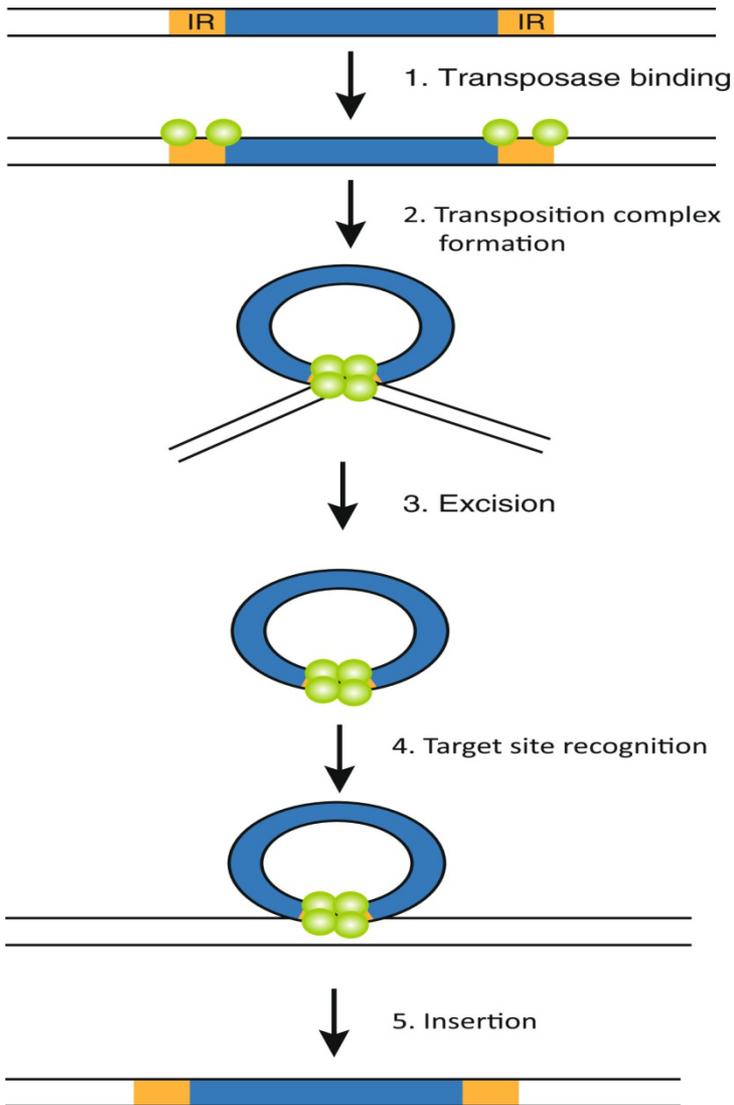
Репликативная транспозиция полинтона - «вирусный» тип транспозиции.

- 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 полинтона «липкие концы» репарируются клеточной системой и образуется дупликация сайта встраивания.



Механизмы транспозиции ДНК-транспозонов

Консервативная транспозиция – вырезание и встраивание элемента

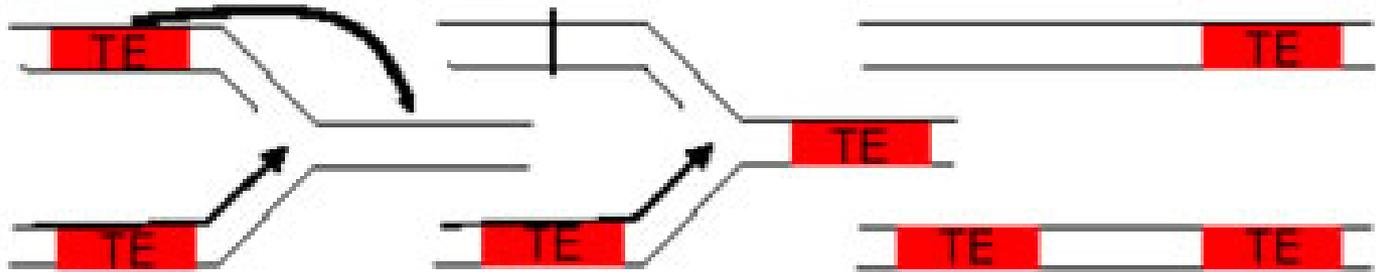


Механизм «cut and paste»

- **выщепление существующего транспозона с переносом на новое место**
- **не синхронизирована с делением клетки**
- **при консервативной транспозиции разрезаются обе нити ДНК и формируются «липкие концы»**
- **нуждается в системе репарации клетки**

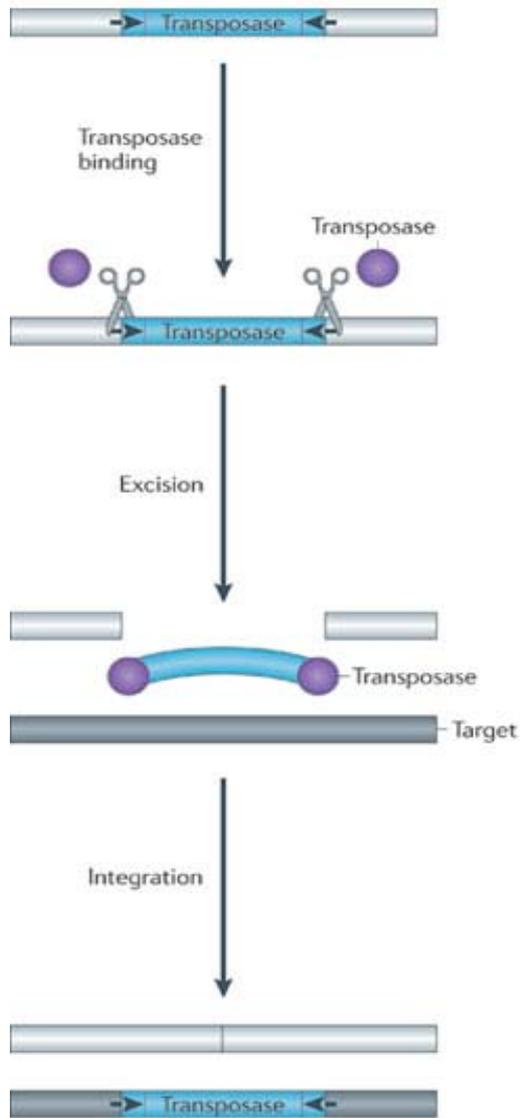
Репликативная транспозиция – копирование и встраивание

B. S-phase Transposition.

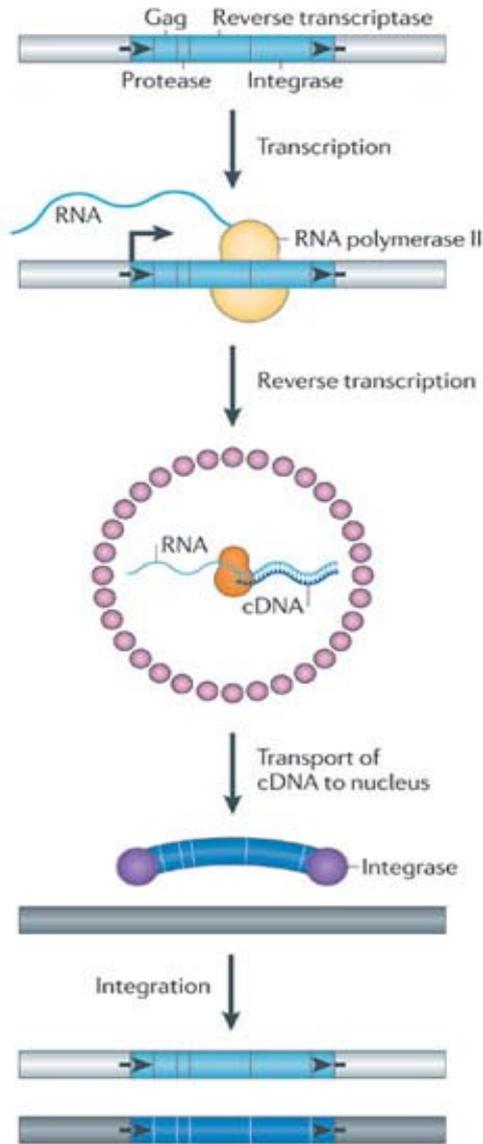


- ✓ Репликация ДНК-транспозона с последующим перемещением.
- ✓ Сохраняются на старом месте и появляются в новом

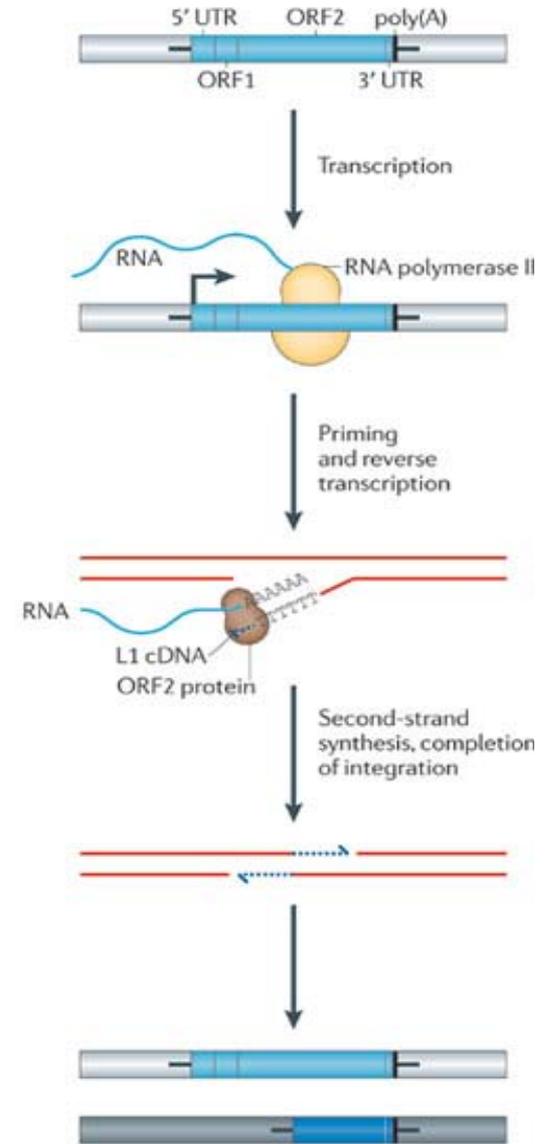
a DNA transposon
'Cut and paste' TE



b LTR retrotransposon
Replicative retrotransposition



c Non-LTR retrotransposon
Target-site primed reverse transcription



Происхождение мобильных элементов

Автономные элементы:

- **LTR элементы:** Ретровирусы – Эндогенные ретровирусы (дефект оболочки) – LTR элементы.
- **Транспозоны, LINE:** предположительно, путем горизонтального переноса (например, с ДНК- вирусами).
- Рекомбинация последовательностей автономных мобильных элементов одного класса.

Происхождение новых мобильных элементов

- Дефектные автономные элементы (например, не автономные LTR элементы)
- Появление новых элементов в результате комбинации частей автономных элементов и клеточных РНК.
- Рекомбинация последовательностей неавтономных элементов между собой, димеризация (гомо- и гетеро- димеры).
- Рекомбинация последовательностей автономных и неавтономных элементов между собой.
- Образование новых мобильных элементов из копий функциональных, некодирующих клеточных РНК, имеющих внутренний (pol III) промотор.
- Образование новых мобильных элементов из мутировавших копий родственных элементов.

Белки и регуляторные элементы вирусного происхождения

- RAG-белки (осуществляют «нарезку» ДНК в ходе рекомбинации) – произошли от транспозаз
- Теломеразы – произошли от обратных транскриптаз
- Фрагменты МГЭ часто становятся регуляторными элементами хозяйского генома. Значительная часть (как минимум 16%) регуляторных элементов (в т.ч. промоторов, энхансеров) в геномах плацентарных млекопитающих представляют собой бывшие фрагменты МГЭ
- Ряд белков вирусного происхождения работает в плаценте (функции: 1) слияние клеток, 2) защита эмбриона от иммунной системы матери, 3) защита эмбриона от вирусов).
- Многие МГЭ «по совместительству» служат генами маленьких регуляторных РНК. Эти РНК используются клеткой прежде всего для того, чтобы контролировать активность самих МГЭ