

**Курс молекулярной биологии**

**Мобильные генетические  
элементы прокариот**

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

***Горизонтальный перенос генов*** - передача наследственной информации не только «вертикально» (от предков к потомкам), но и активный обмен ею «горизонтально» (между «соседями») — путем конъюгации, трансформации и трансдукции.

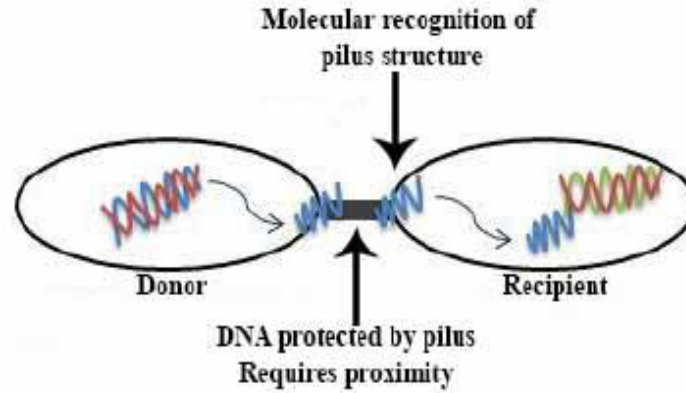
**Горизонтальный перенос генов является одним из основных механизмов адаптивной эволюции**

**Горизонтальный перенос генов осуществляется  
посредством**

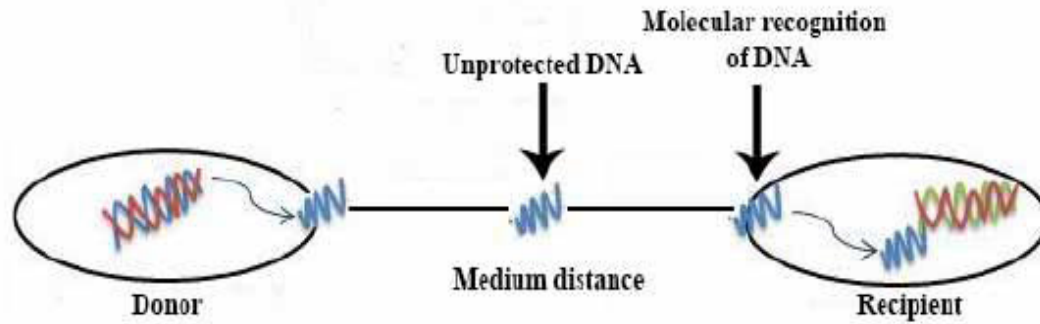
***мобильных генетических элементов (МГЭ)***

- **Вирусы**
- **Плазмиды**
- **Транспозоны**
- **Интегроны**
- **Геномные острова и др.**

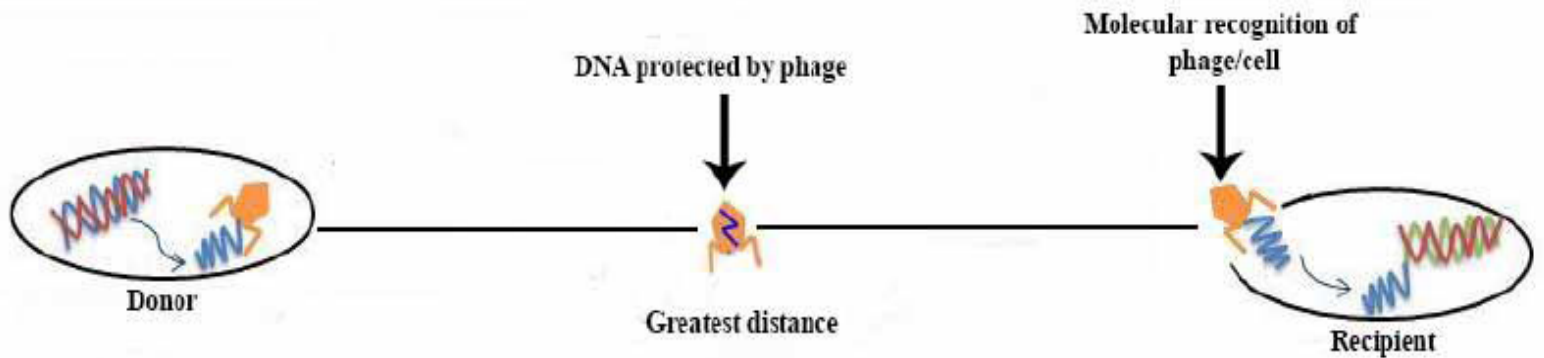
**Conjugation**



**Transformation**



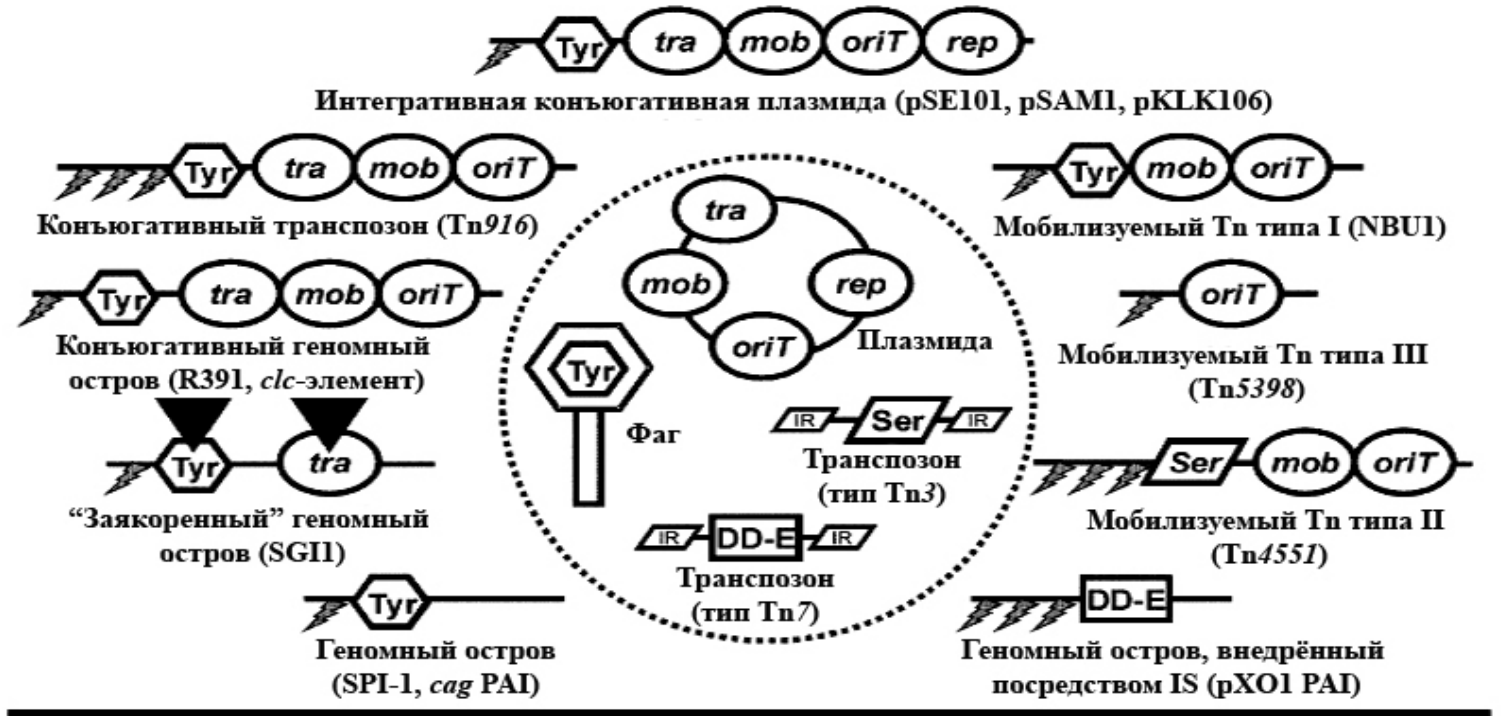
**Transduction**



## **МГЭ имеют модульную организацию:**

- ✓ **Одни и те же модули могут входить в состав разных МГЭ**
- ✓ **МГЭ меньшего размера могут входить в состав более крупных**

# Модули МГЭ



*ori T* — место начала переноса цепи плазмидной ДНК

*ori V* — место начала репликации плазмидной ДНК

*rep* — ген белка-инициатора репликации бактериальных плазмид

# Вирусы

Субклеточные инфекционные агенты, которые могут воспроизводиться только внутри живых клеток

Вирусы паразитируют в клетках представителей всех известных доменов:

- *Archaea* – бактериофаги
- *Bacteria* или эубактерии – бактериофаги
- *Eukaryota* – вирусы
- *Vira* – вирофаги

# Бактериофаги

- Бактериофаги способны существовать в интегрированном в хромосому состоянии — в форме *профага*.
- При вырезании профага могут захватываться и упаковываться в вирусные «головки» фрагменты ДНК хозяина, которые в дальнейшем трансдуцируются в новые клетки вместе с фаговой ДНК.
- Профаговая ДНК в некоторых случаях может составлять до 16% бактериального генома

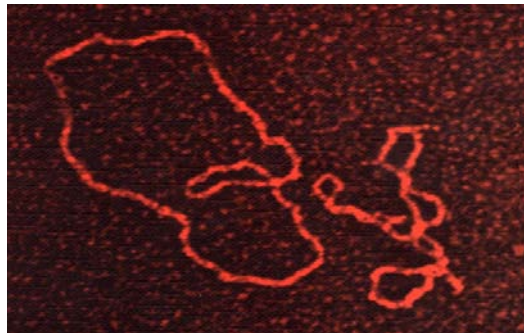
**Многие профаги кодируют факторы вирулентности:**

- профаг CTX из *Vibrio cholerae* кодирует холерный токсин
- P22 — ферменты конверсии O-антигена сальмонеллы, позволяя ей уходить от иммунного пресса хозяина



# Плазмиды

- Плазмиды – это небольшие кольцевые (иногда линейные) экстрахромосомные молекулы ДНК, способные к автономной репликации.
- Размеры плазмид варьируют от 2 000 до 200 000 п.н. и более
- Плазмиды, способные существовать в двух состояниях – автономном и интегрированном в нуклеоид, называют *эписомами*.



# Классификации плазмид

- 1. Классификация , базирующаяся на структуре ДНК:**
  - Кольцевые
  - Линейные
- 2. Классификация, базирующаяся на маркерных генах плазмид:**
  - R-плазмиды (факторы резистентности к антибиотикам)
  - Col-плазмиды (факторы колициногенности)
  - Тох-плазмиды (обеспечивают синтез энтеротоксинов)
  - Криптические плазмиды (не содержат маркерных генов)
- 3. Классификация, базирующаяся на способности плазмид к горизонтальному переносу:**
  - Трансмиссивные (конъюгативные)
  - Нетрансмиссивные (неконъюгативные)
- 4. Классификация, базирующаяся на совместимости плазмид**
- 5. Классификация, базирующаяся на копийности плазмид**

## Функции плазмид

- Перенос генетического материала при конъюгации — *F-плазмиды*;
- Плазмиды бактериоциногенности контролируют синтез белков, летальных для других бактерий—*Col-плазмиды*;
- Факторы патогенности: гены гемолизинов, энтеротоксинов, адгезинов и др.
- Устойчивость к антибиотикам и тяжёлым металлам (*R-плазмиды*);
- Устойчивость к УФ-излучению;
- Система рестрикции-модификации;
- Синтез, деградация ксенобиотиков

## Транспозоны прокариот

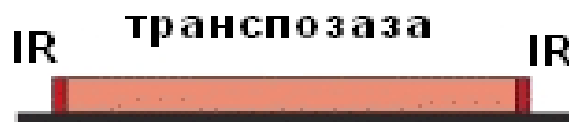
Транспозоны (*transposable element, transposon*) — это участки ДНК организмов, способные к передвижению (транспозиции) и размножению в пределах генома

Подвижные элементы, как правило, не существуют автономно, а находятся в составе хромосом или плазмид.

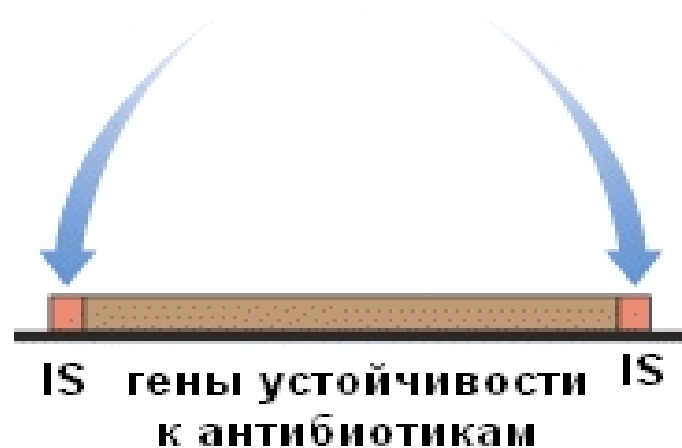
Главный белок транспозиции – **транспозаза**

# Транспозоны прокариот

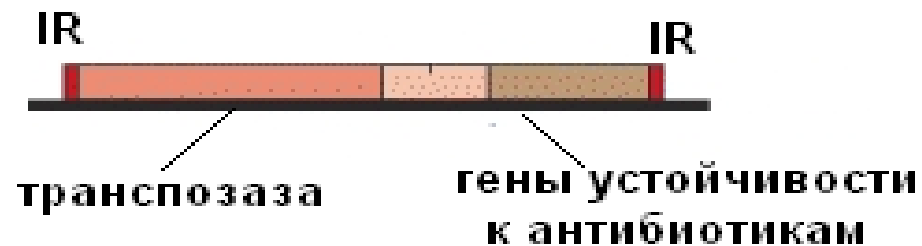
IS-элемент



Сложный  
транспозон

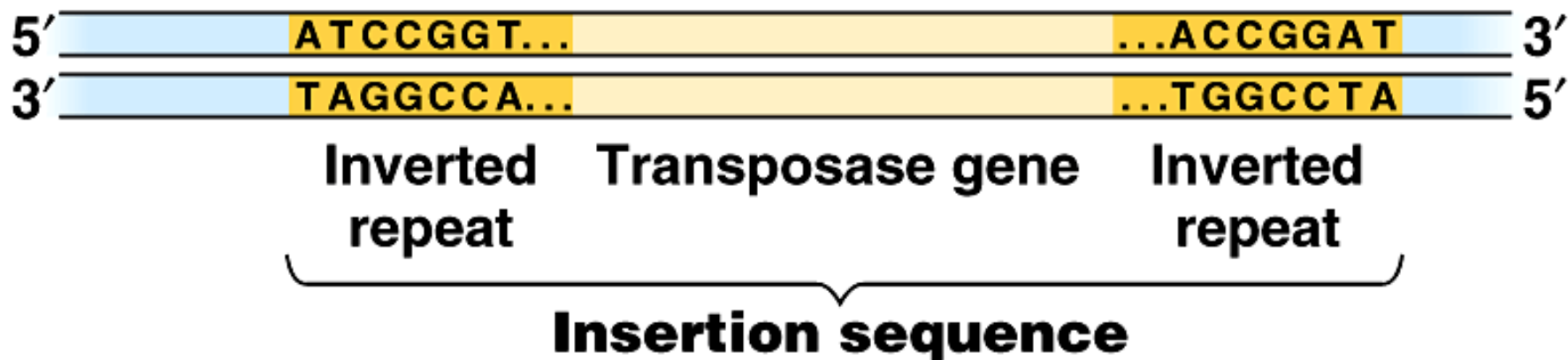


Простой  
транспозон



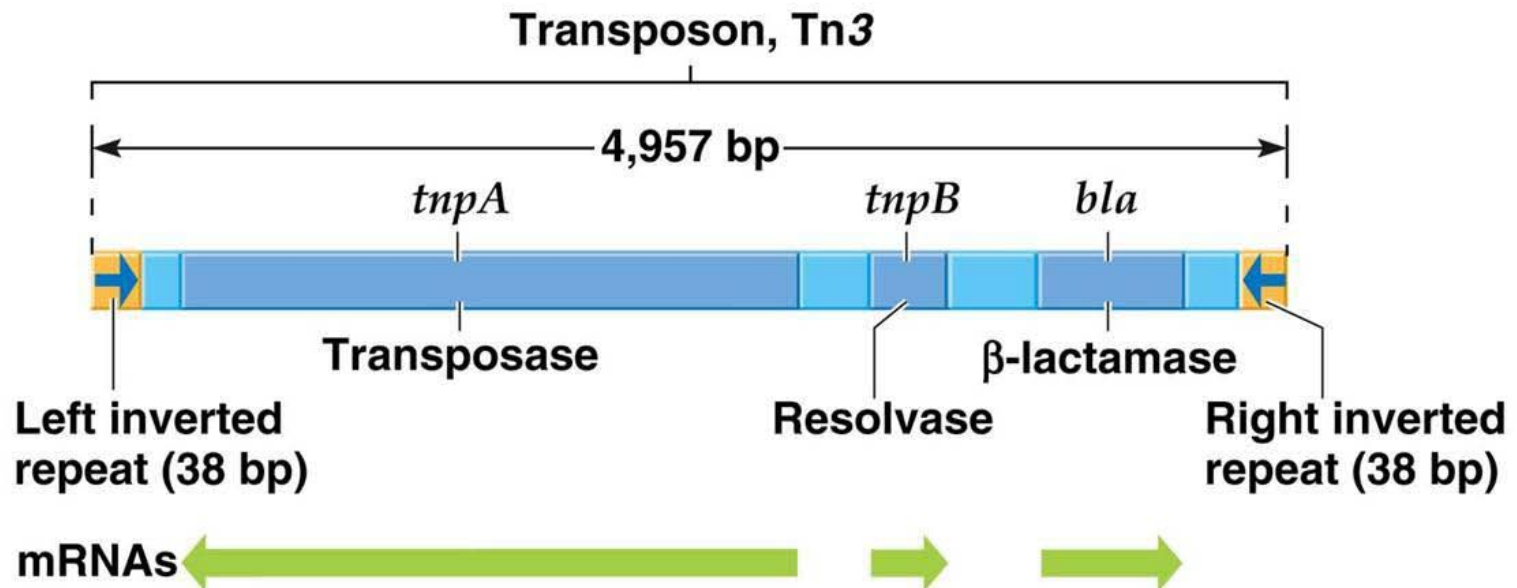
## IS-элементы

1. Размеры от 700 до 1500 п.н.
2. На концах находятся инвертированные повторы (IR), длиной 22-41 п.н.
3. Содержат только гены, необходимые для транспозиции по геному (ген транспозазы).



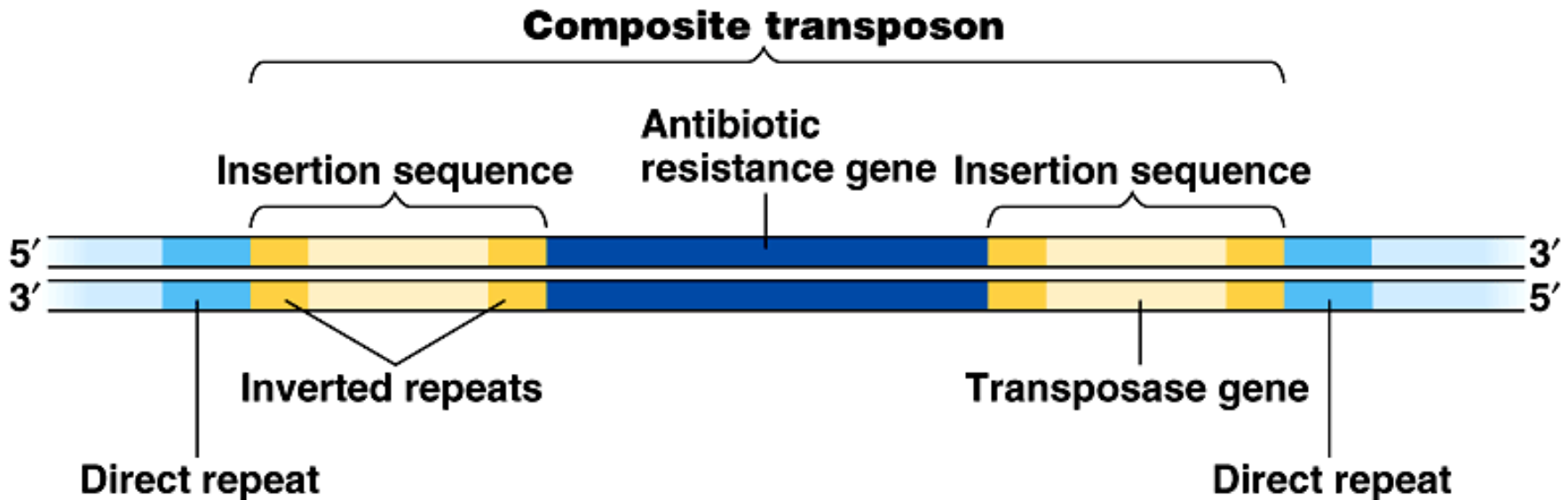
# Простые транспозоны

1. Размеры до 5000 п.н.
2. На концах находятся инвертированные повторы (IR)
3. Между инвертированными повторами располагаются гены, обеспечивающие транспозицию, и дополнительные структурные гены.



# Сложные транспозоны

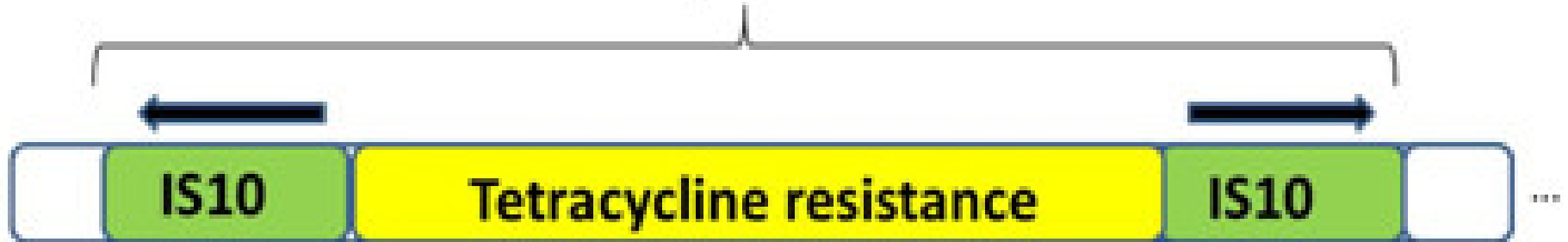
1. Размеры от 2000 до 10 000 п.н.
2. На концах находятся IS-элементы.
3. Между IS-элементами находятся дополнительные структурные гены (гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам, гены, кодирующие токсины и др.)





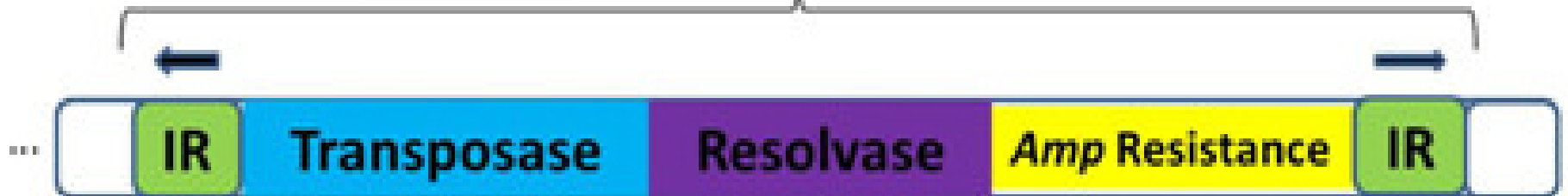
## Сложный транспозон

Transposon Tn10

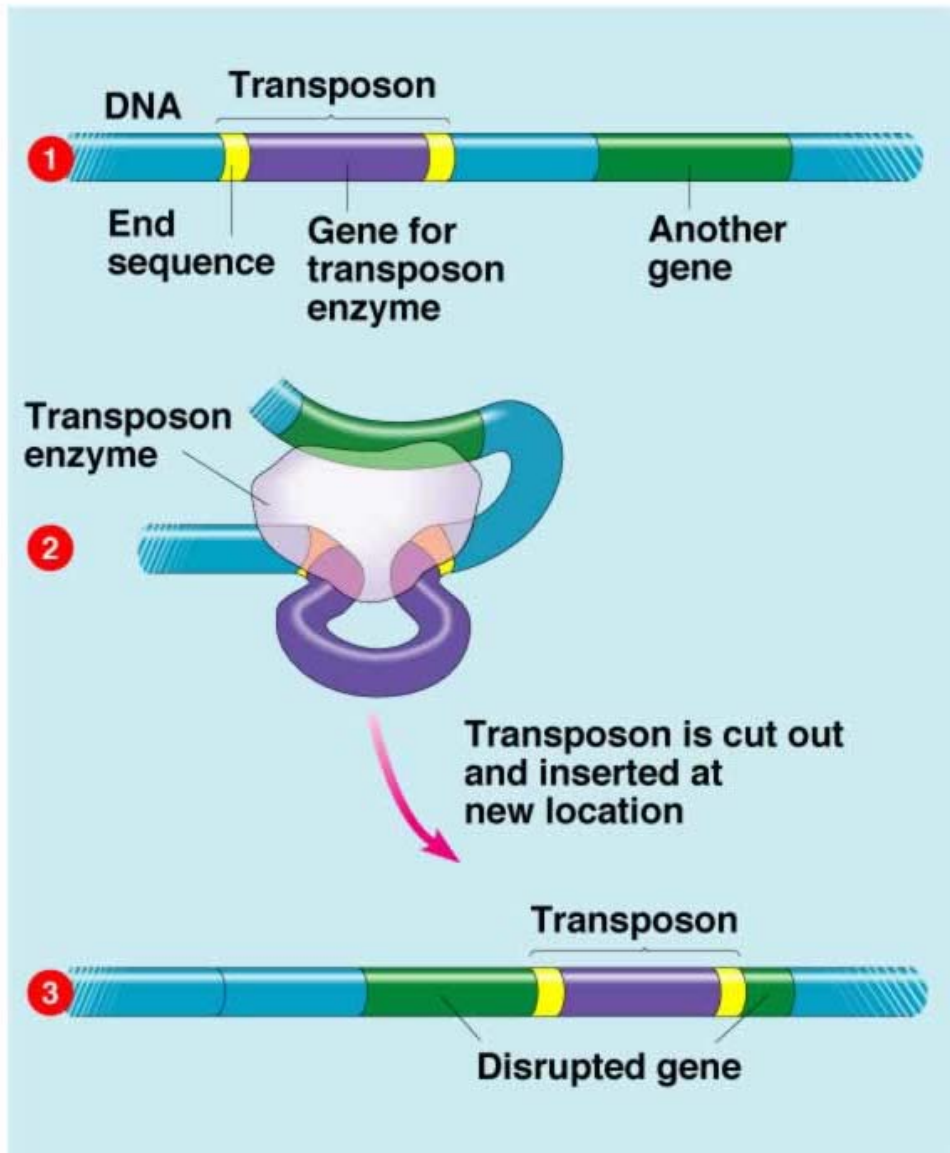


## Простой транспозон

Transposon Tn3



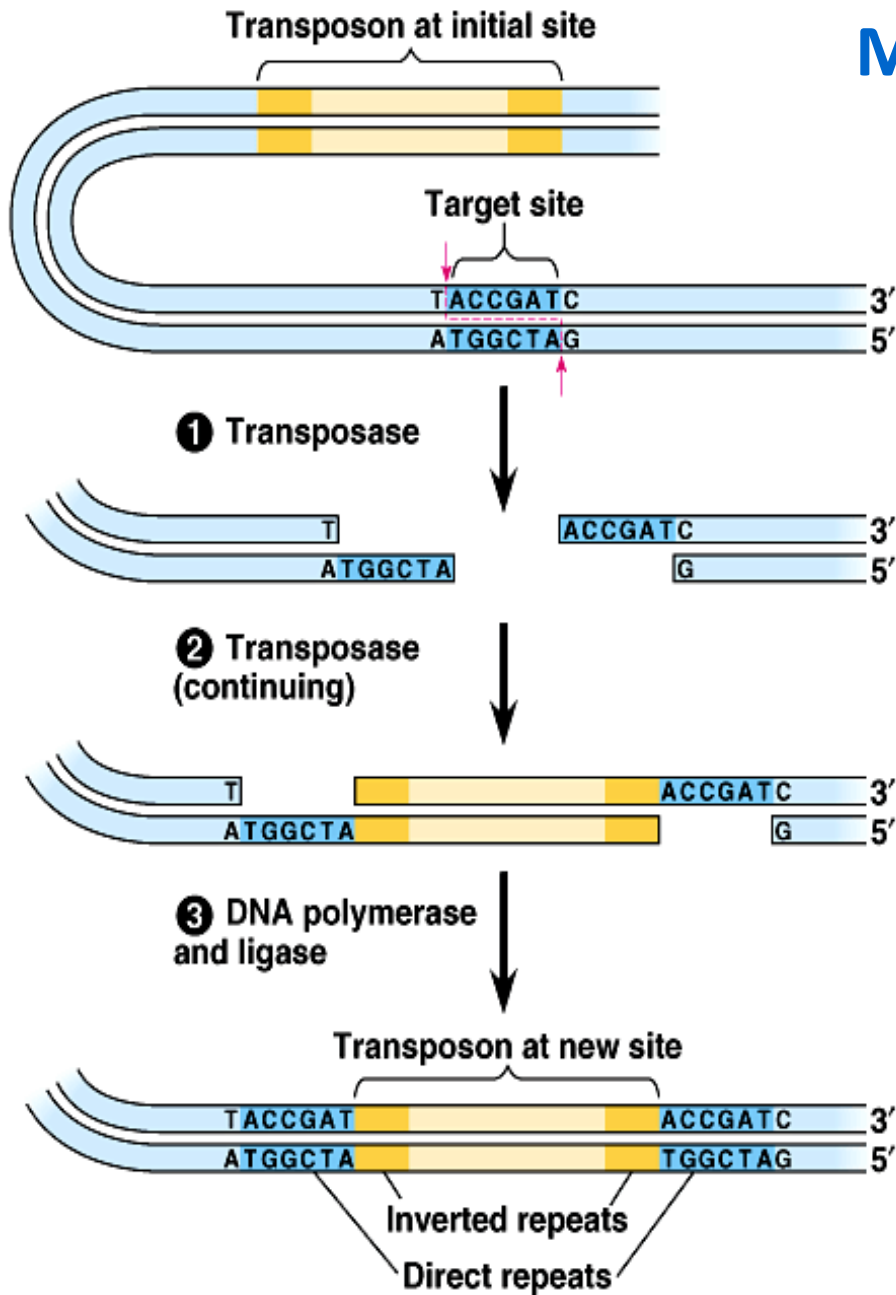
# Механизмы транспозиции



Основной механизм перемещения ДНК-транспозонов – вырезание/встраивание (cut-and-paste).

Транспозаза сводит вместе концы подвижного элемента и делает разрывы точно по этим концам

# Механизмы транспозиции



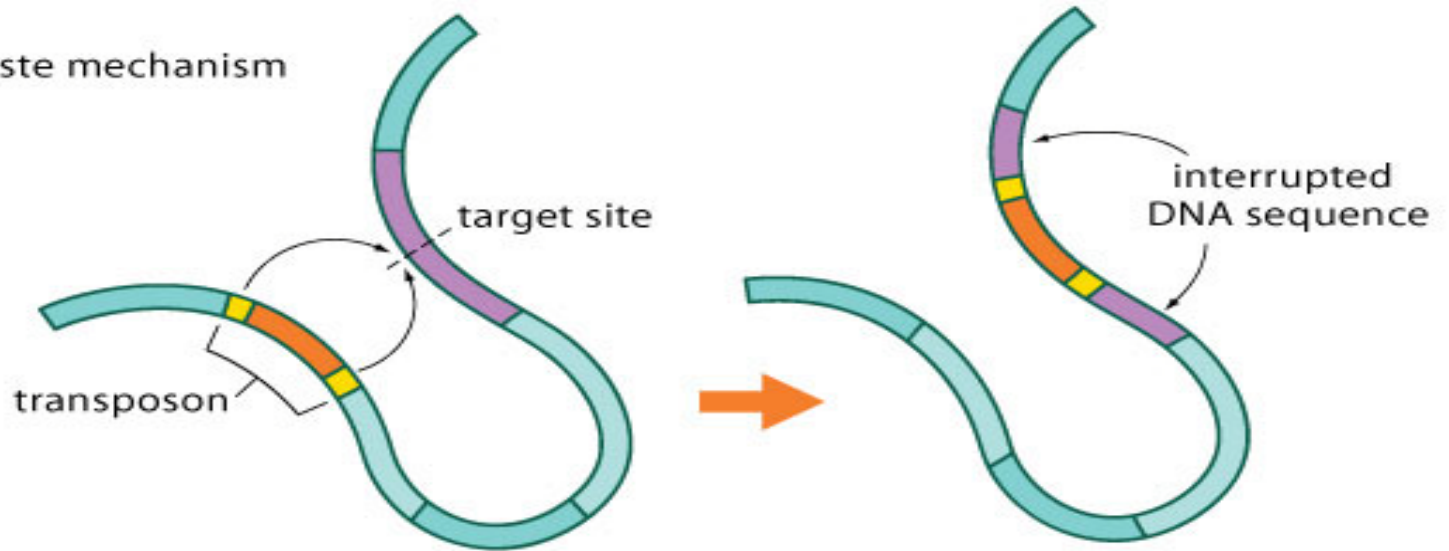
Транспозаза сводит в контакт концы элемента и дуплекс ДНК-мишени. При этом она делает в обеих цепях ДНК-мишени ступенчатые разрывы

Бреши репарируются

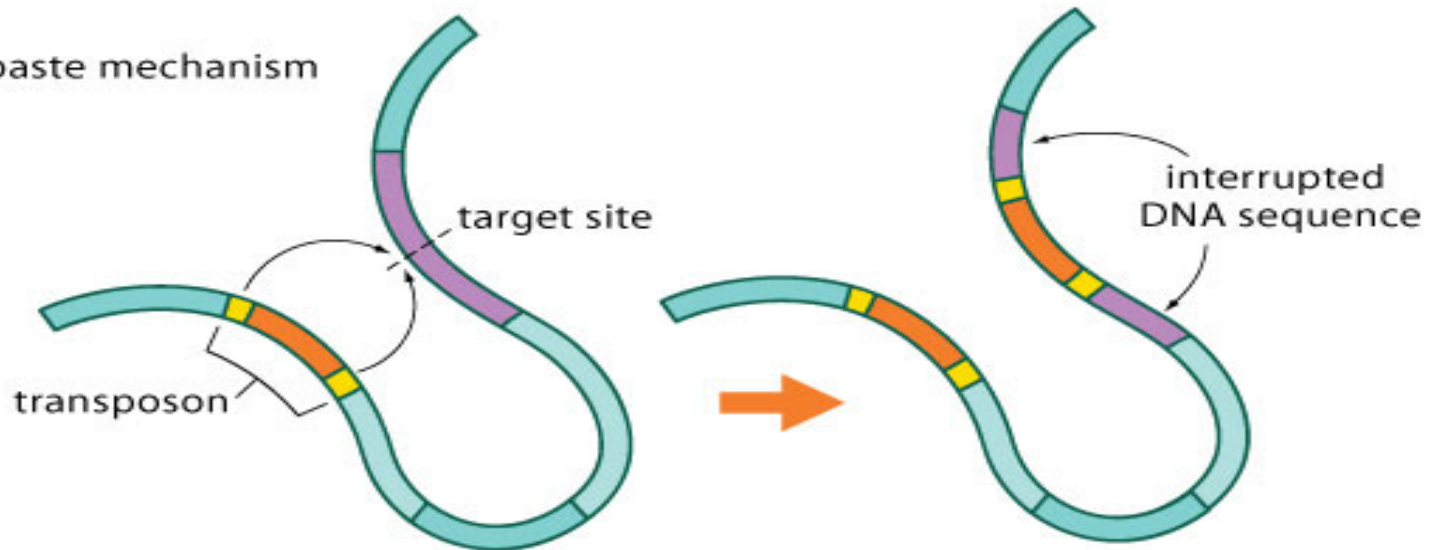
Образуются прямые повторы ДНК-мишени на концах элемента

# Механизмы транспозиции

1. Cut-and-paste mechanism



2. Copy-and-paste mechanism



## Функции транспозонов

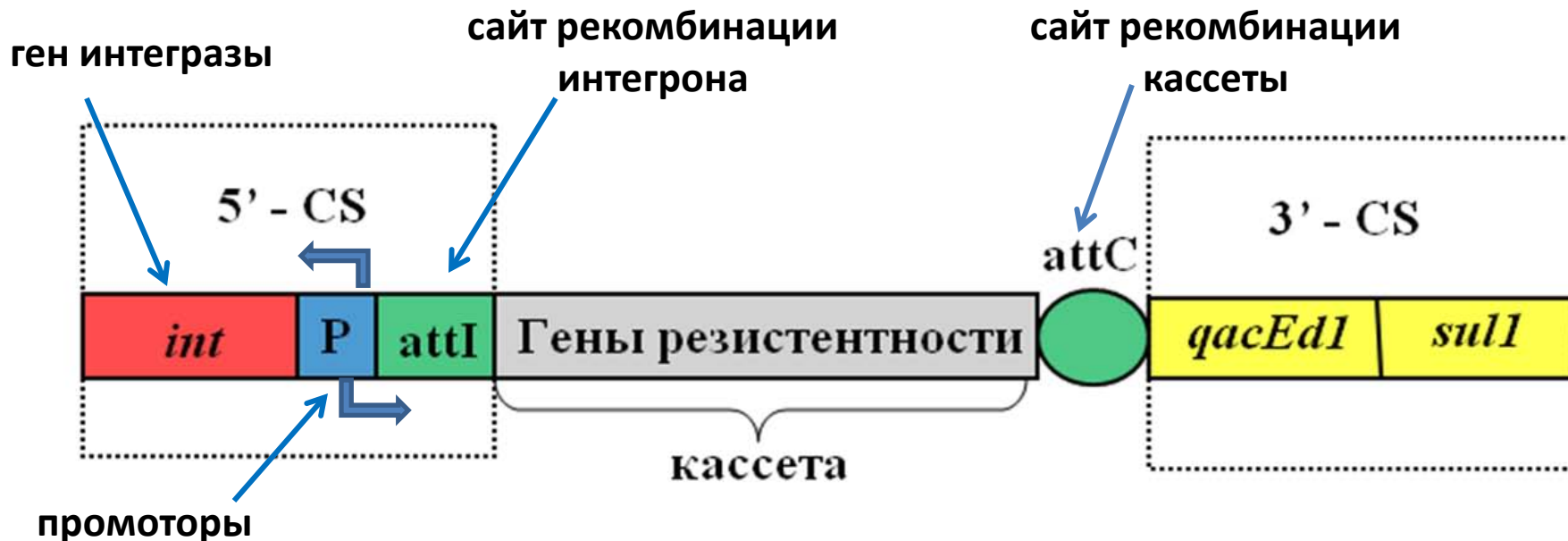
- Могут встраиваться в гены, вызывая мутации или стимулируя хромосомные перестройки, делеции.
- Могут переносить стоп-кодоны либо промоторные участки, что влияет на транскрипцию или трансляцию гена-мишени.
- Часто перемещаются между плазмидами, которые могут содержать несколько транспозонов.
- Могут перемещаться между плазмидами и хромосомами, создавать плазмиды устойчивости, содержащие несколько генов устойчивости к антибиотикам.

# Интегроны

Интегроны - это **природные системы клонирования и экспрессии**, способные улавливать кассеты с ORF, и превращать их в активно функционирующие гены

Впервые интегроны были найдены в составе мобильных генетических элементов, ответственных за возникновение множественной лекарственной устойчивости у патогенных бактерий

# Элементы структуры интегронов



Интегроны состоят из

- консервативных сегментов (CS): 5'-CS и 3'-CS
- центрального переменного региона, несущего вставки генных кассет

# Элементы структуры интегронов

**5'-консервативный сегмент** содержит

- ген интегразы *intI*
- сайт рекомбинации (интеграции) *attI*
- промоторные последовательности  $P_{int}/P_c$ , обеспечивающие транскрипцию гена интегразы и внедренных в состав интегрона генных кассет.

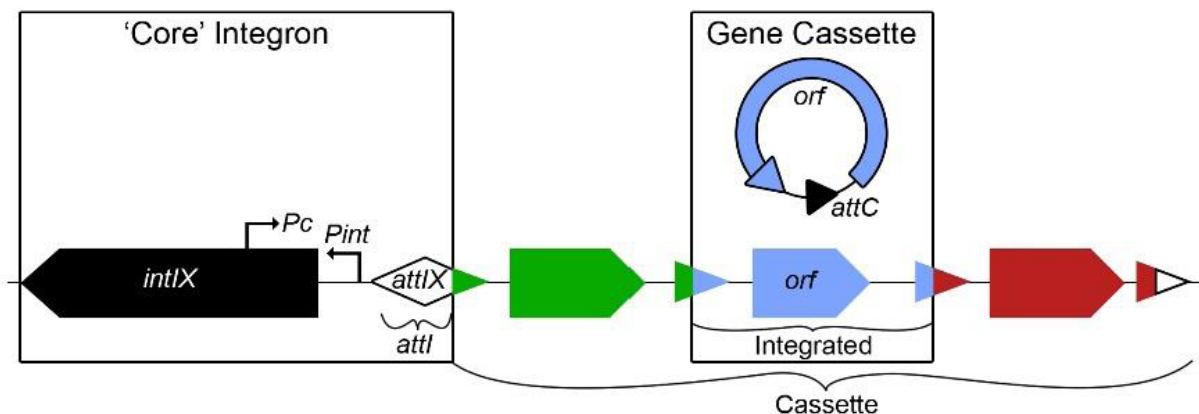
**3'-консервативный сегмент** интегронов класса 1 содержит гены резистентности

- к четвертичным аммонийным соединениям *qacEd1*
- к сульфонидамидам *sul1*



## Вариабельный регион интегронов

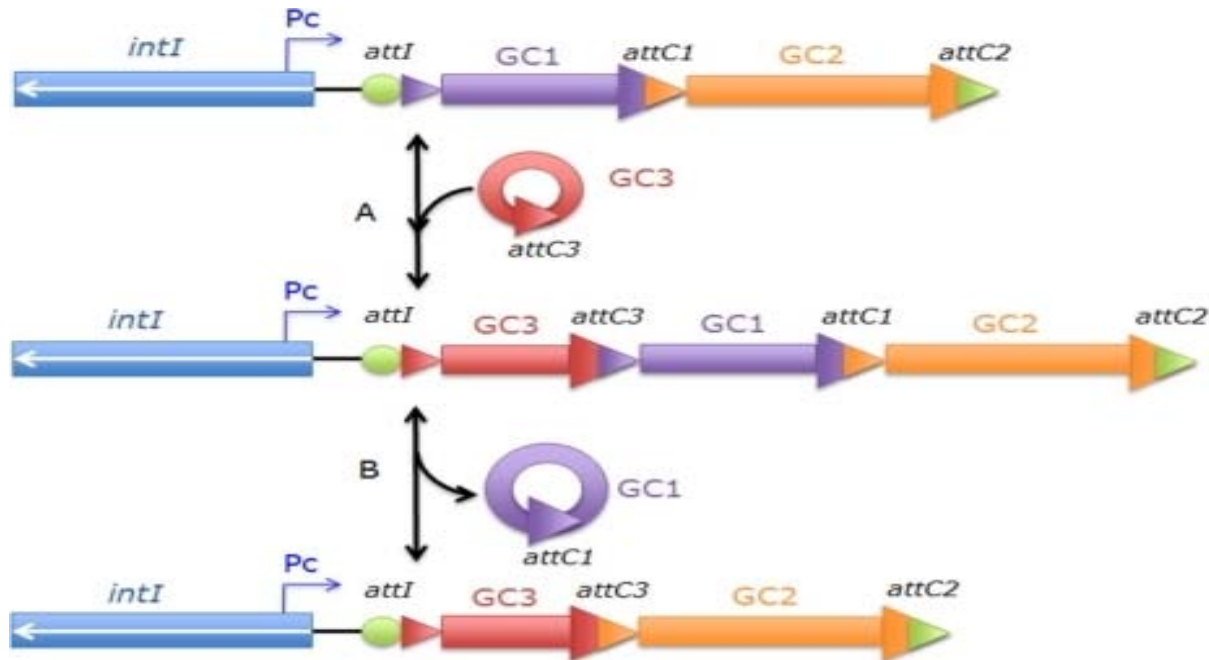
- Представлен мобильными генными кассетами , содержащими беспромоторные ORF с attC-сайтами.
- Интеграза IntI катализирует сайтспецифическую рекомбинацию между сайтами attI и attC, в результате чего происходит интеграция или вырезание кассеты.
- Множество событий интеграции ведет к образованию мультикассетных рядов. В таких рядах все кассеты фланкированы attC-сайтами.



## Генные кассеты

Генные кассеты - это автономные, нереплицирующиеся, замкнутые в кольцо элементы, содержащие по одной открытой рамке считывания и одному рекомбинационному сайту ( attC).

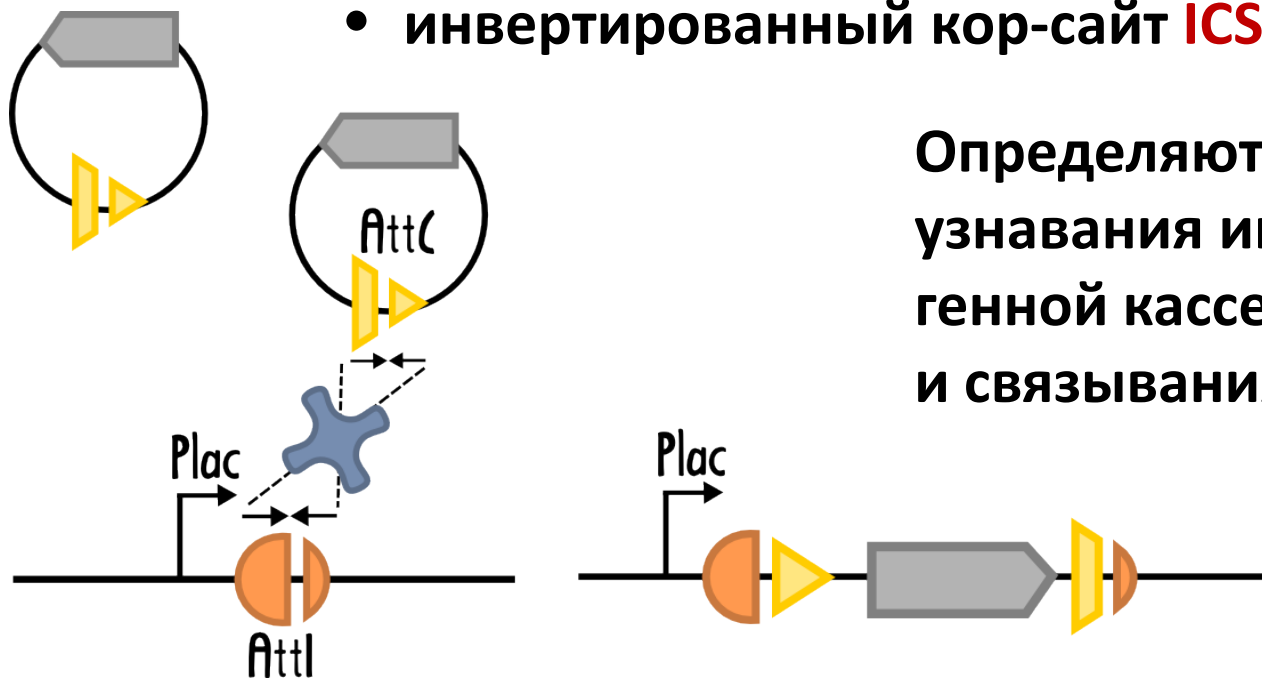
Первоначальное название сайтов рекомбинации генных кассет - 59 be (59 base elements) , поскольку первый изученный сайт имел протяженность, равную 59 п.о.



Сайты attC имеют одинаковую структурную организацию:

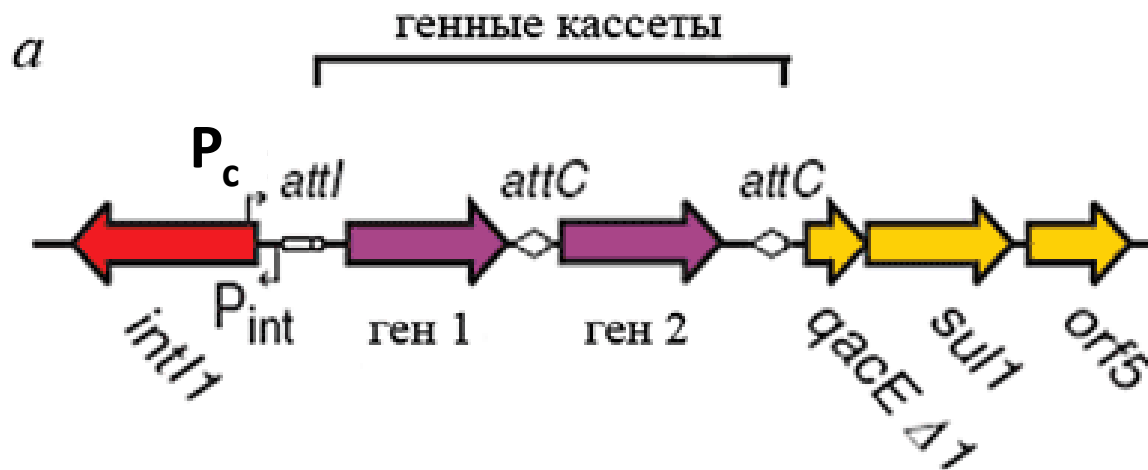
Каждый содержит несовершенные повторяющиеся последовательности с выраженной комплементарностью в терминальных 25 п.н. –

- кор-сайт **CS** и
- инвертированный кор-сайт **ICS**



Определяют процесс узнавания интегразой генной кассеты и связывания с ней.

- Генетическая организация интегронов способствует **коэкспрессии генных кассет**, входящих в его состав, с одного промотора  $P_c$ .
- Наиболее эффективно экспрессируются гены кассет, расположенные ближе к промотору.
- Изменение селективного давления в среде обитания бактерий может способствовать перестройкам разного рода в составе интегрона.



# Интегративные конъюгативные элементы

Интегративные конъюгативные элементы – **ICEs** (**Integrative Conjugative Elements**) или «constin» (conjugative self-transmissible integrating element)

– являются одним из трех известных типов мобильных генетических элементов, способных к самостоятельному переносу:

- Конъюгативные плазмиды
- Бактериофаги
- ICEs

## **Интегративные конъюгативные элементы**

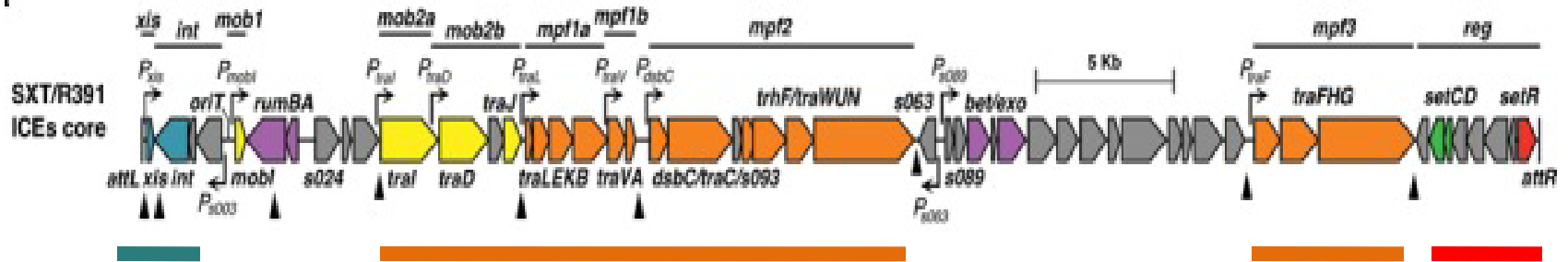
- ✓ **Подобно конъюгативным плазмидам, ICEs перемещаются при помощи конъюгации, но в отличие от плазмид, не способны к самостоятельной репликации**
- ✓ **Подобно умеренным бактериофагам, интегрируют в хромосому хозяина и реплицируются вместе с ней**

## Интегративные конъюгативные элементы

Первый ICE размером порядка 100 т.п.н., был обнаружен в штамме *V. cholerae* O139 MO10 из Индии и назван **SXT-элементом**

SXT-элемент кодирует резистентность к нескольким антибиотикам, включая триметоприм и сульфометаксазол, для которых часто используют совместную аббревиатуру «SXT», по которой и назвали первый идентифицированный ICE.

# Генетическая структура ICE элементов






Интеграция  
- вырезание

Конъюгативный перенос

Регуляция

**Консервативные последовательности** ICEs представлены генами, участвующими в

- интеграции/вырезании 
- конъюгативном переносе 
- регуляторных процессах 

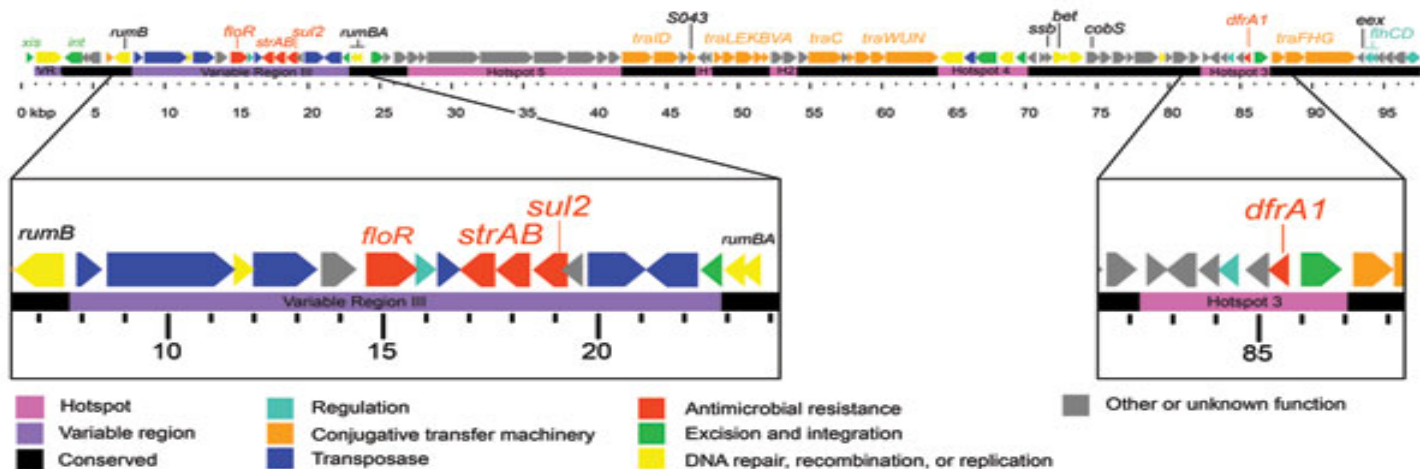
Последовательности ICEs представляют собой совокупность генов предположительно плазмидного, фагового и неизвестного происхождения



Все известные ICEs содержат **варибельную ДНК**, придающую элемент-специфические свойства

Варибельные последовательности размером до 60 т.п.н. находятся:

- ✓ В 5 горячих точках (HS , hot spot)
- ✓ И в 4 варибельных регионах (VR, variable region)



Среди функций, кодируемых варибельной ДНК ICEs – устойчивость к антибиотикам и тяжелым металлам, образование биопленок и подвижности

# Передача ICE элементов

В передаче ICEs выделяют 3 этапа:

1. вырезание из хромосомы хозяина и формирование внехромосомного циркулярно-замкнутого интермедиата,
2. конъюгативный перенос его к новому хозяину,
3. интеграция переданной молекулы в хромосому нового хозяина.

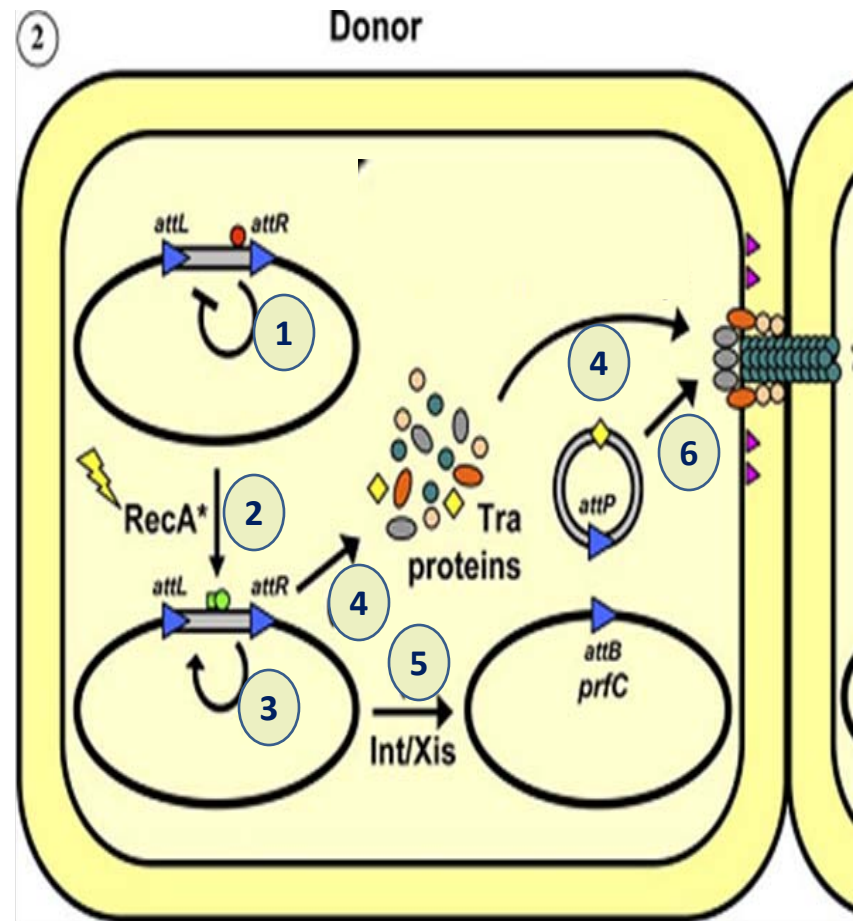
1. SXT белок репрессор SetR подавляет экспрессию большинства генов

2. УФ активирует копротеазную активность белка RecA и облегчает аутопротеолиз SetR

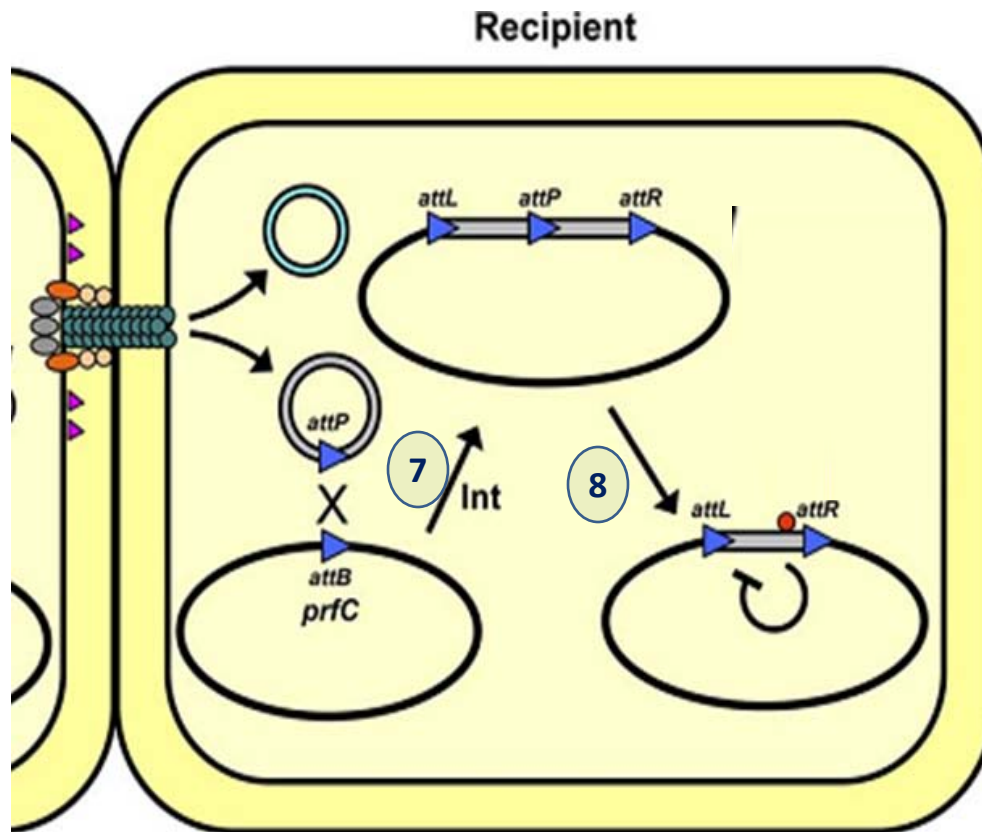
3. Активация экспрессии генов *tra* и *int*

4. Tra белки собираются в аппарате спаривания

5. Интеграза катализирует вырезание SXT путем сайтспецифической рекомбинации между *attL* и *attR*



6. Кольцевая молекула SXT передается по аппарату спаривания



**7. В клетке-реципиента SXT экспрессирует интегразу Int, которая катализирует интеграцию свободный кольцевой формы SXT**

**8. SXT экспрессирует репрессор SetR, который подавляет экспрессию *tra* и *int*.**

# Геномные острова

- Процесс передачи генов от чужеродных геномов известен как **горизонтальный перенос генов**
- В связи с тем, что горизонтально перенесенные гены имеют инородное происхождение, такие регионы известны как **геномные острова Genomic Islands (GIs)**

**Острова патогенности** – Pathogenicity Islands (PAIs) – одна разновидностей GIs

# Геномные острова

Каждый геном имеет свою уникальную «геномную подпись»:

- характерный G + C-состав,
- частота динуклеотидных (или других) повторов,
- использование кодонов

Структура геномной последовательности островов патогенности, как и других GIs, отличается от таковой остального генома хозяина

Геномные острова имеют в своей структуре **гены, отвечающие за их мобильность**

## **“Острова” патогенности бактерий**

**Под островами патогенности принято понимать фрагменты ДНК, включающие дискретные гены вирулентности и обнаруживаемые только у патогенных микроорганизмов.**

- Отличаются от основного генома по % Г+Ц,**
- Фланкированы малыми прямыми нуклеотидными повторами (DR),**
- Интегрируют в хромосому рядом с геном тРНК**
- Способны распространяться среди одного или родственных видов бактерий.**

# “Острова” патогенности бактерий содержат

## Гены факторов патогенности

- Адгезины - поверхностные белки, обеспечивающие прикрепление бактерий к эпителию
- Системы III и IV типов секреции, обеспечивающие секрецию эффекторных белков в клетку-хозяина
- Факторы инвазии
- Токсины: экзотоксины, протеазы, липазы, энтеротоксин и др.
- Системы поглощения железа



# “Острова” патогенности бактерий содержат

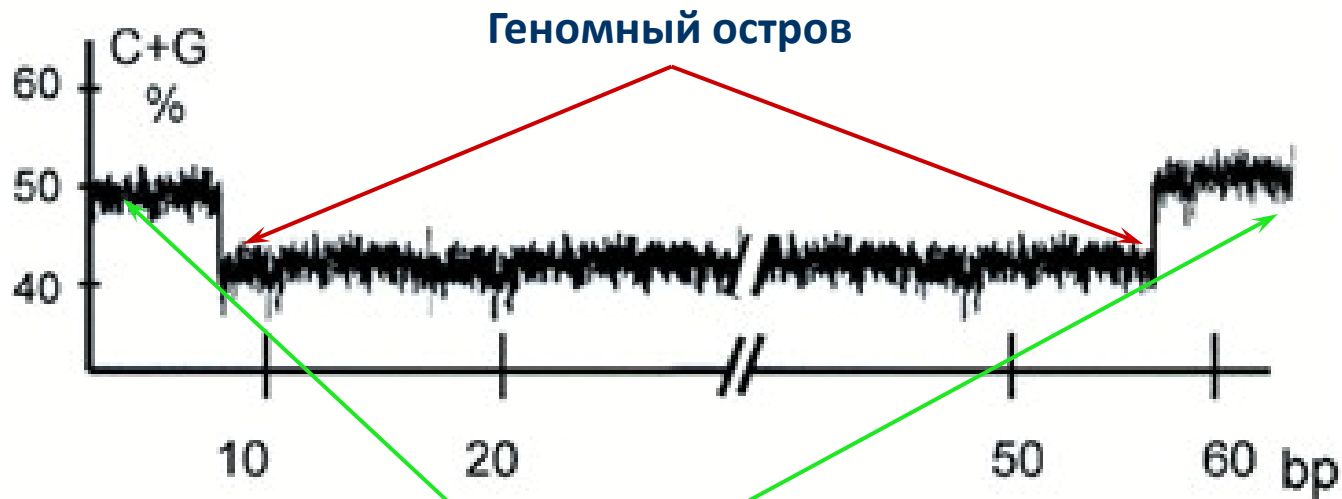
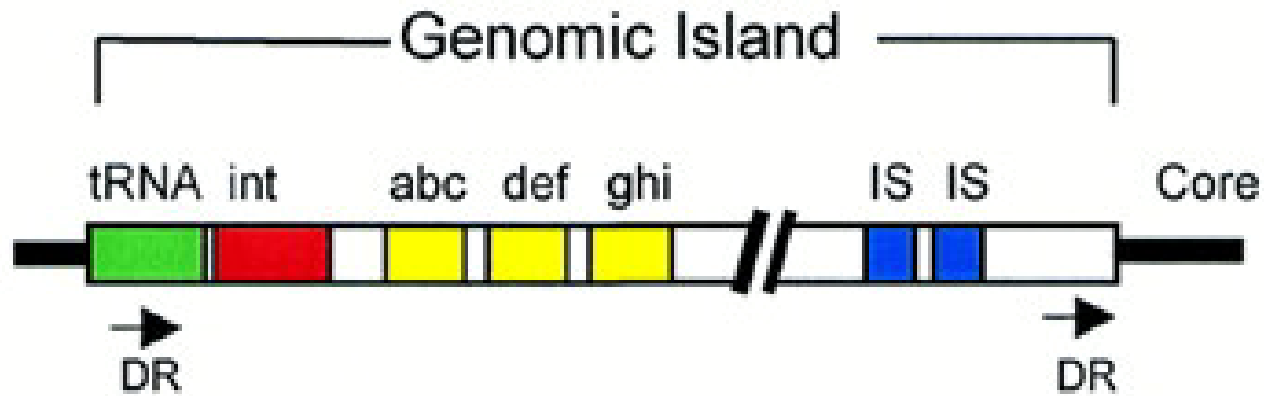
## Гены мобильности:

- Интегразы, обеспечивающие интеграцию, вырезание и рекомбинацию
- Транспозазы

## Прямые повторы

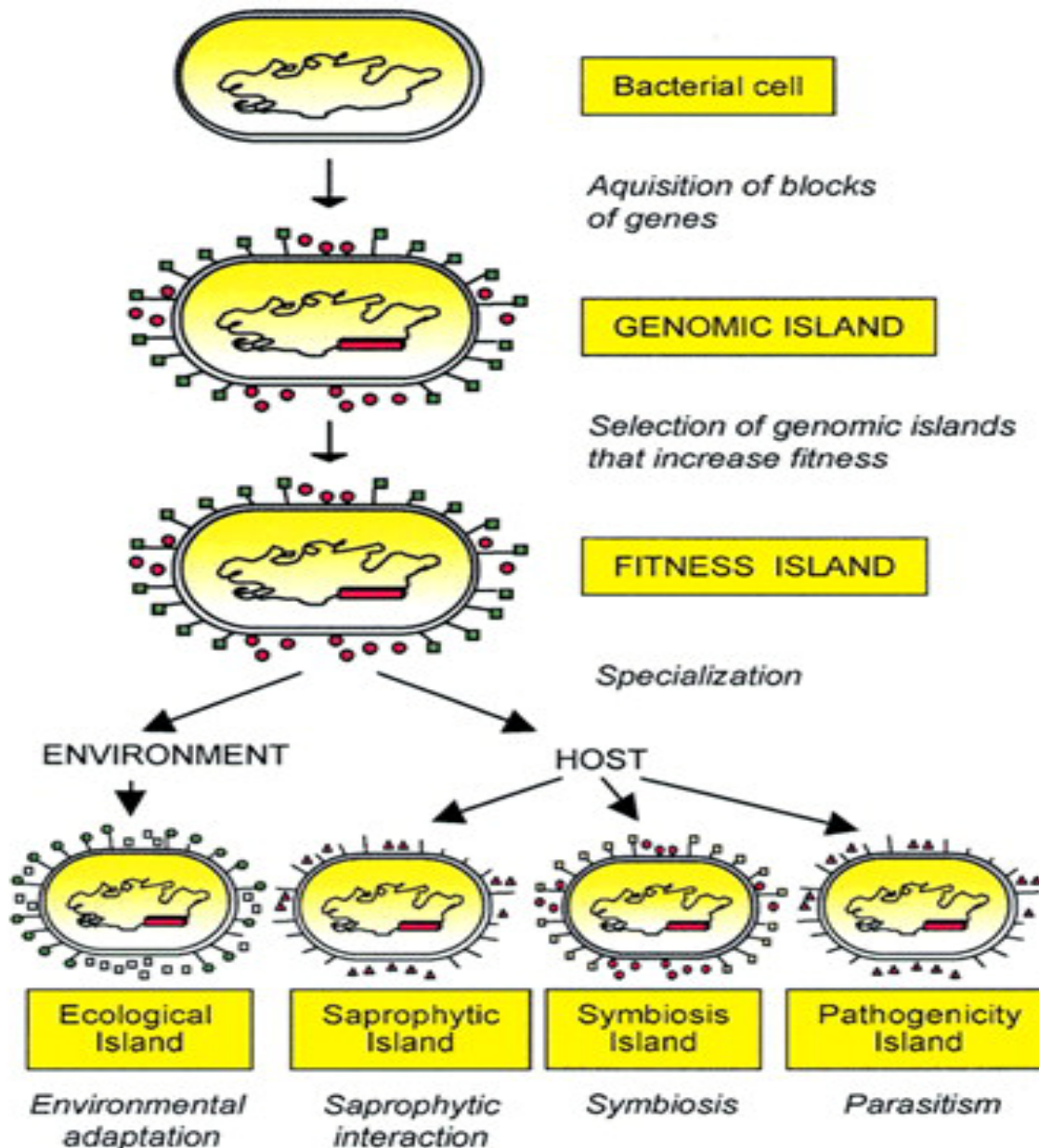
- Как правило фланкированы прямыми повторами (DR) по 16-20 пар оснований с почти идеально повторяющейся последовательностью

## Отличия в C+G составе



Основная часть хромосомы

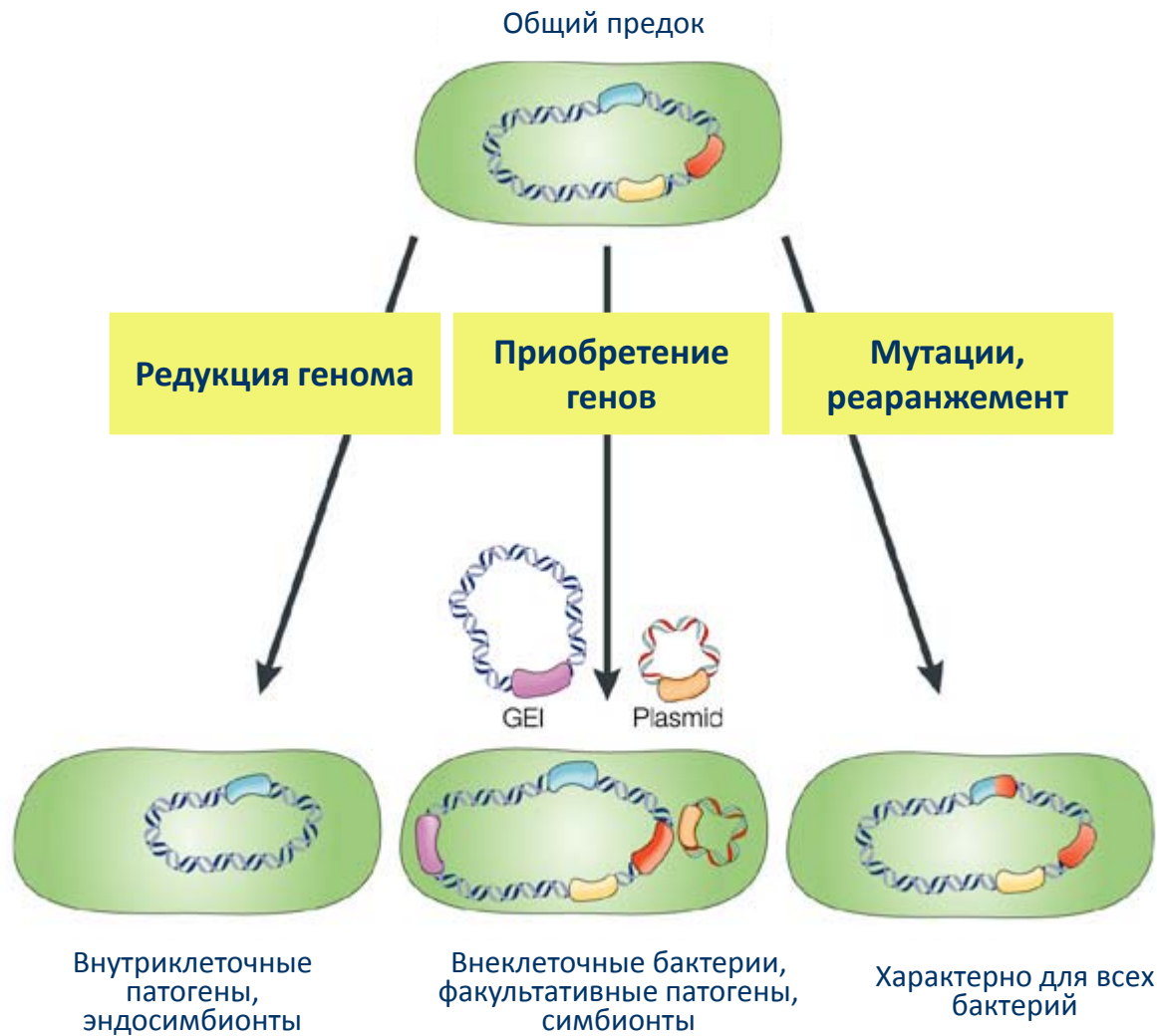
# Модель развития геномных островов



Генные продукты  
инородных блоков  
ДНК могут  
способствовать  
выживанию в  
окружающей среде,  
обеспечивая  
адаптацию к

- сапрофитной жизни,
- симбиозу или
- патогенности.

# Роль МГЭ в эволюции бактерий

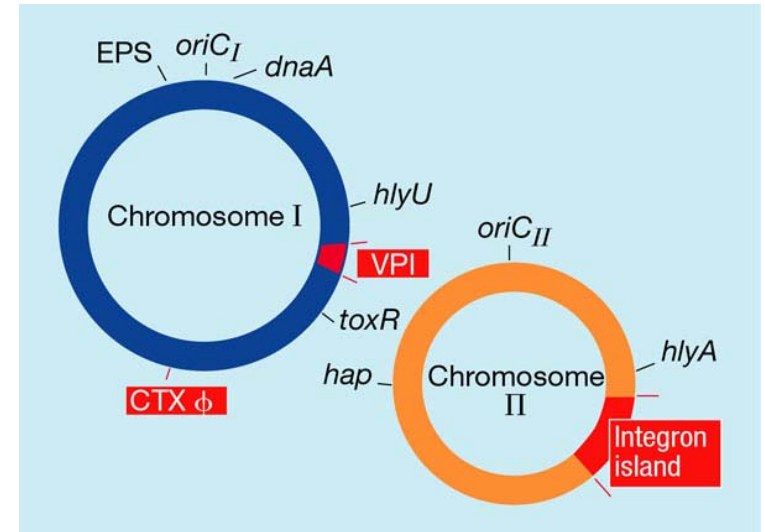


# Роль МГЭ в патогенности бактерий на примере холерного вибриона

Основные факторы патогенности *V. cholerae* расположены на мобильных генетических элементах (МГЭ)

Большая хромосома *V. cholerae* содержит:

- **профаги** *CTXφ*, несущий ген холерного токсина, и *RS1φ*
- **«остров патогенности»** *VPI*, содержащий гены, отвечающие за биосинтез токсин-корегулируемых пилей адгезии,
- **ОП** *VPI-2* с генами нейраминидазы, которая усиливает действие холерного токсина
- **ОП** с генами *O1*-антигена



На малой хромосоме имеется **суперинтегрон**

**ICE** и **интегроны** – впервые обнаружены именно у *V. cholerae*

Есть **плазмиды**