

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.

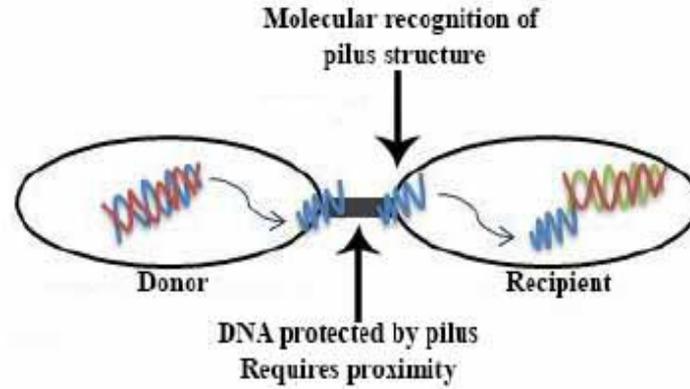
Горизонтальный перенос генов является одним из основных механизмов адаптивной эволюции

**Горизонтальный перенос генов осуществляется
посредством**

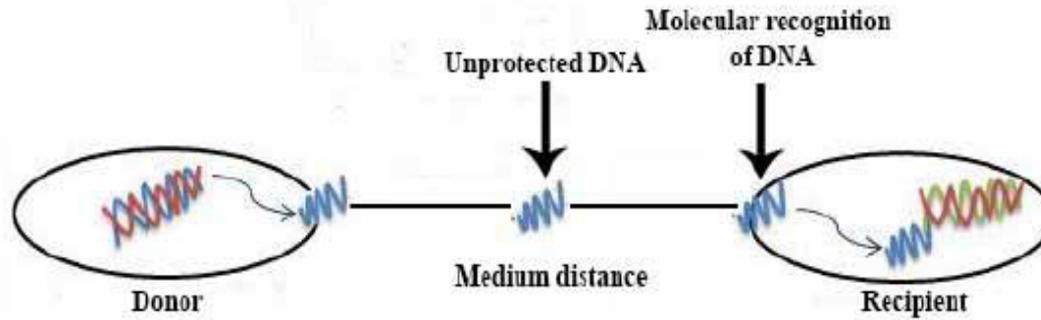
мобильных генетических элементов (МГЭ)

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

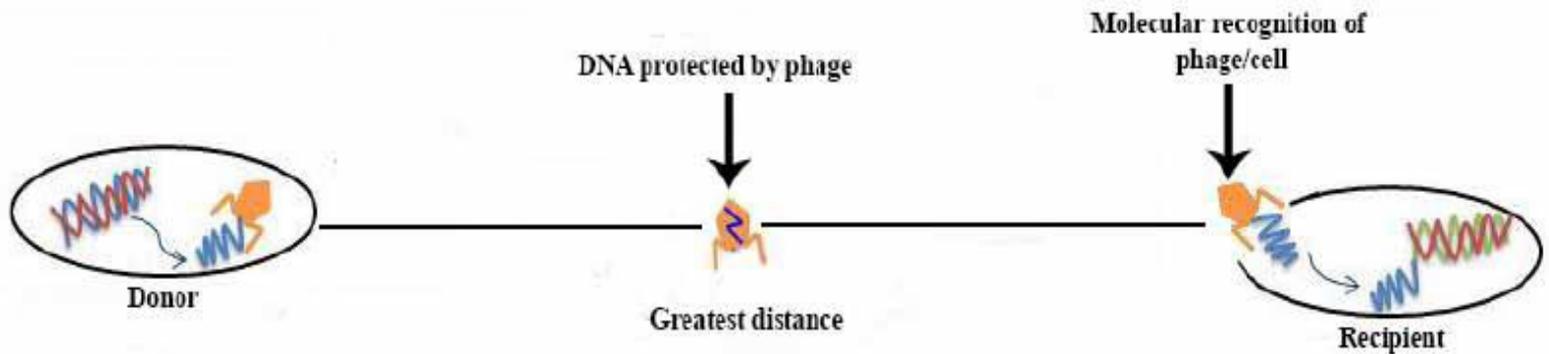
Conjugation



Transformation



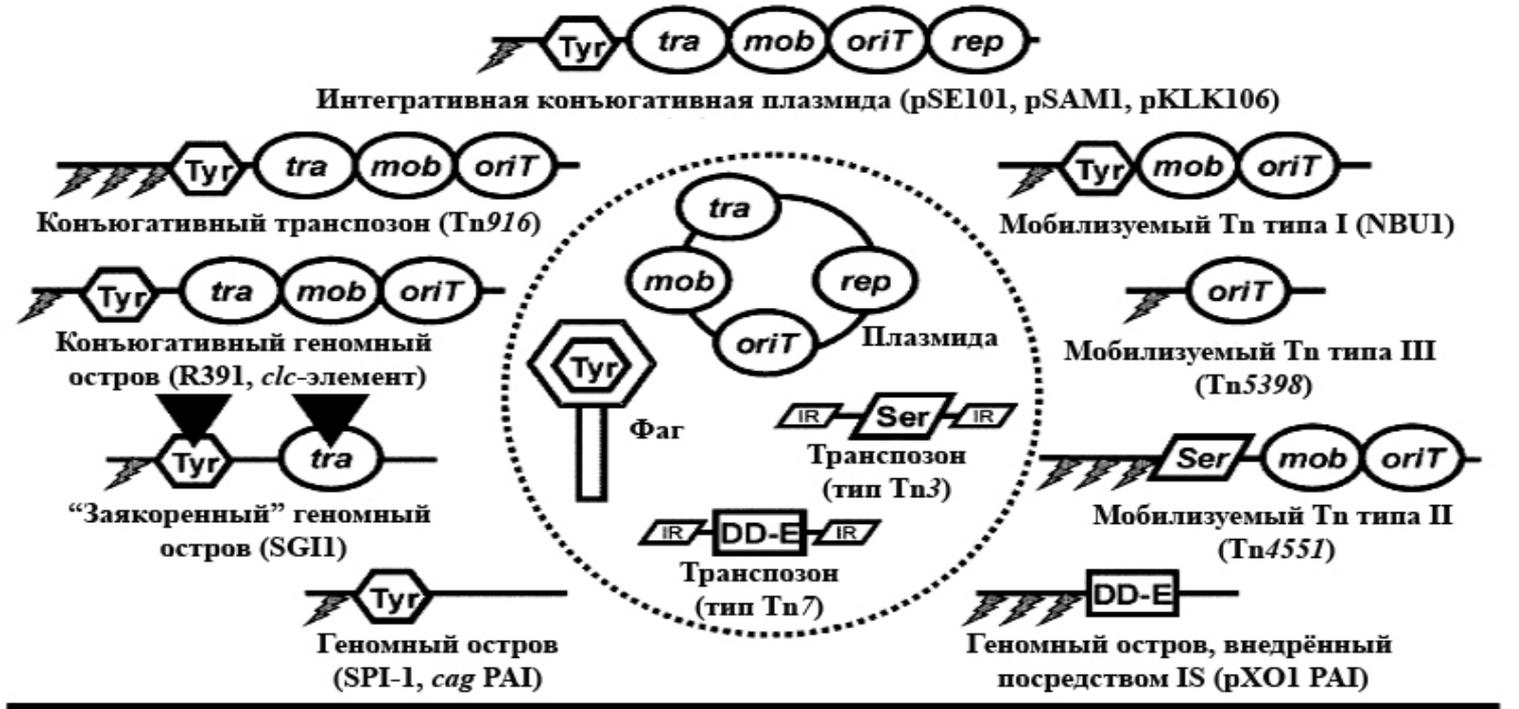
Transduction



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

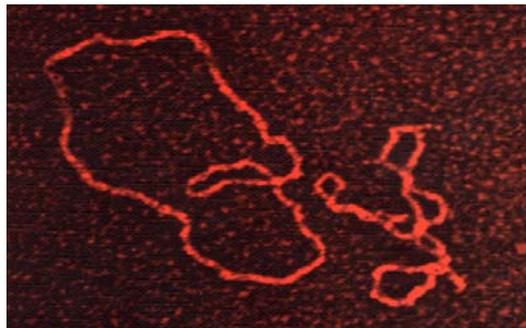
- Бактериофаги способны существовать в интегрированном в хромосому состоянии — в форме *профага*.
- При вырезании профага могут захватываться и упаковываться в вирусные «головки» фрагменты ДНК хозяина, которые в дальнейшем трансдуцируются в новые клетки вместе с фаговой ДНК.
- Профаговая ДНК в некоторых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

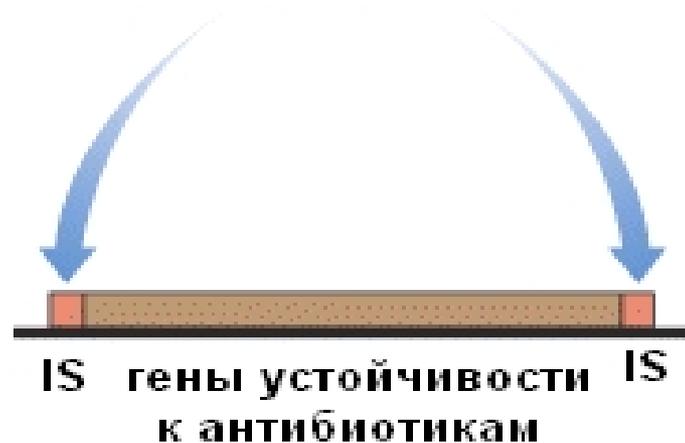
Главный белок транспозиции – **транспозаза**

Транспозоны прокариот

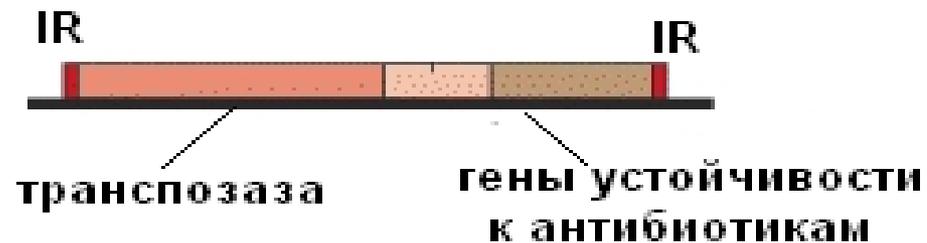
IS-элемент



Сложный
транспозон

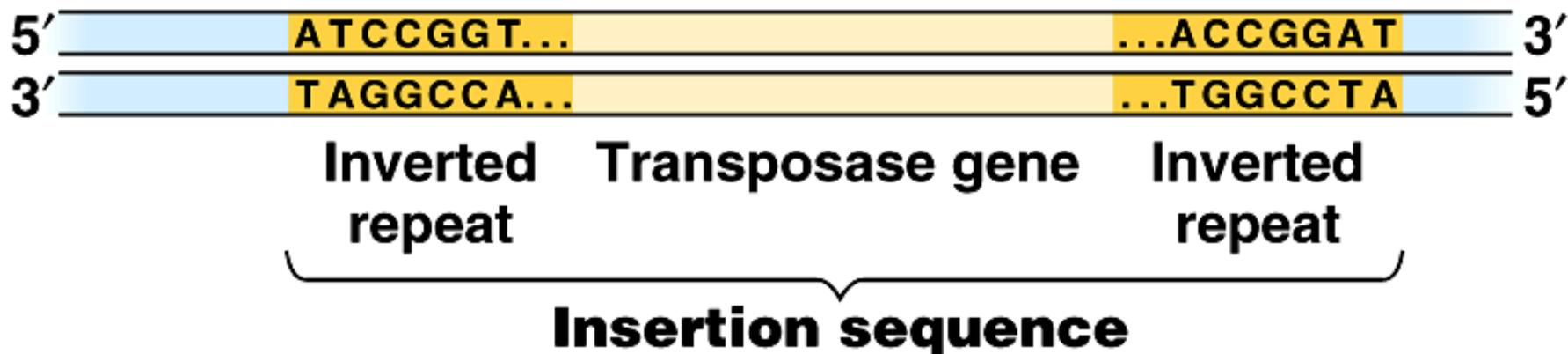


Простой
транспозон



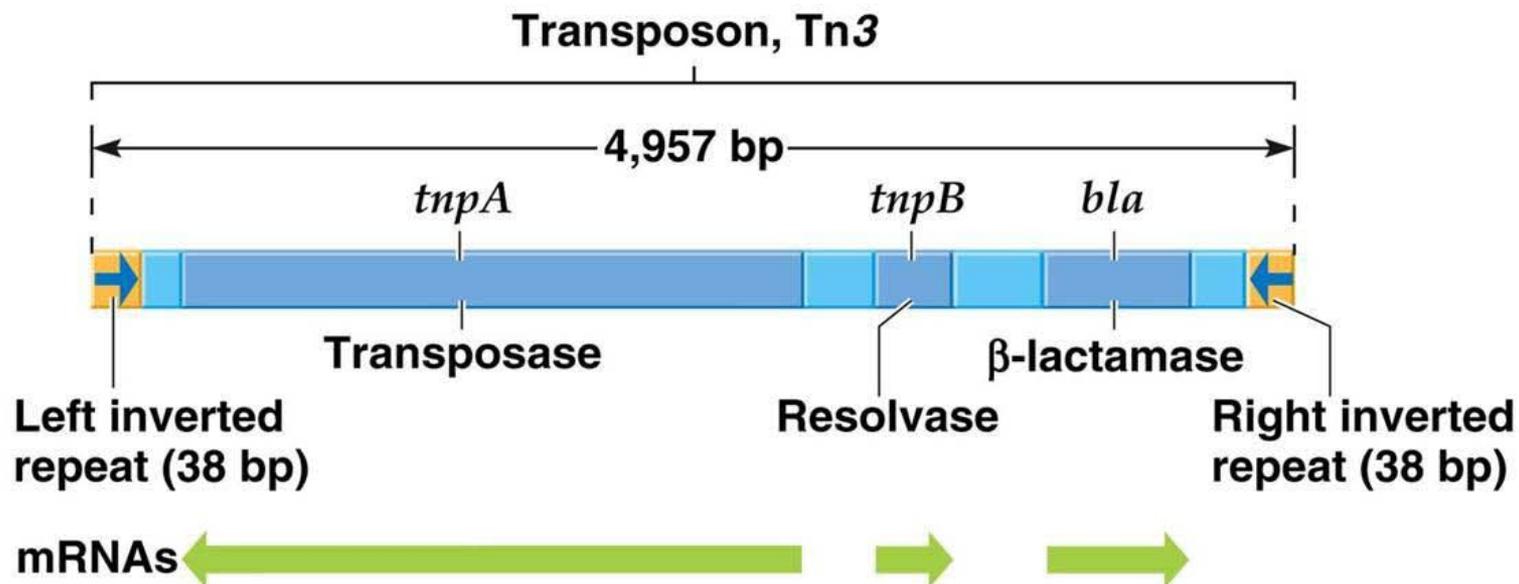
IS-элементы

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).



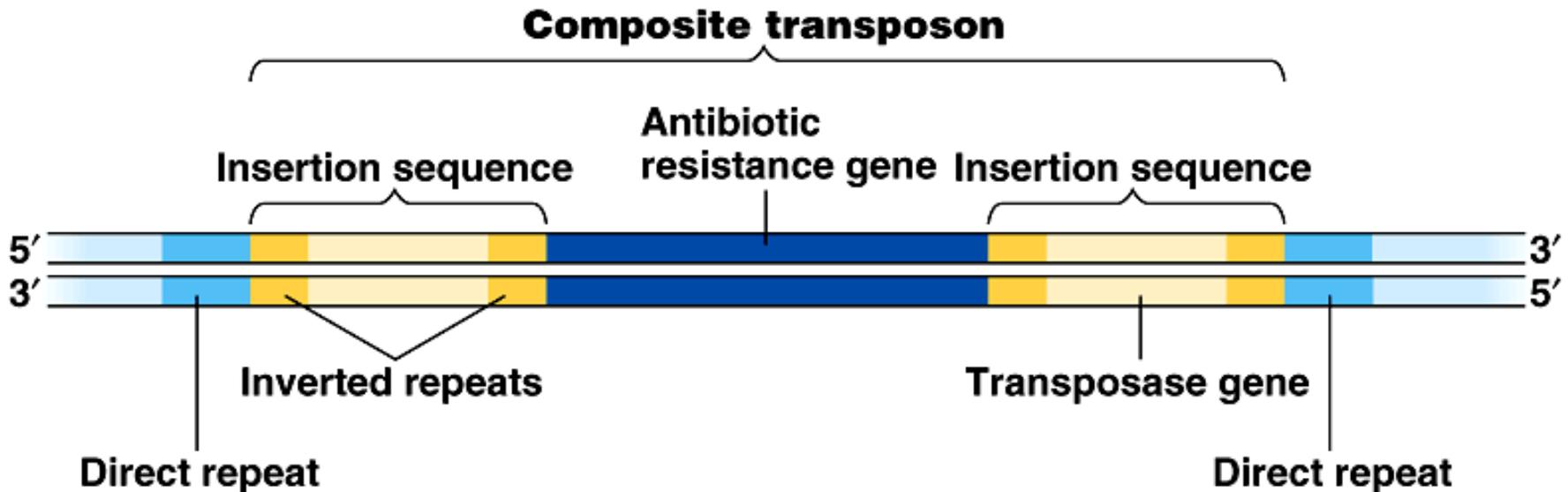
Простые транспозоны

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.



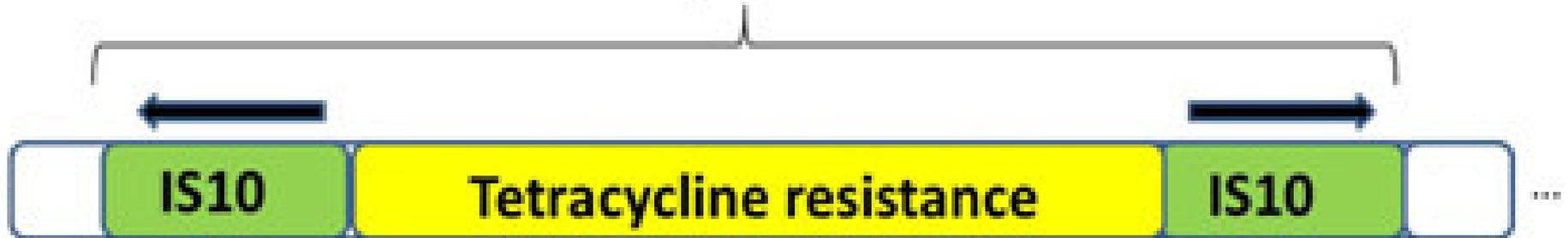
Сложные транспозоны

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

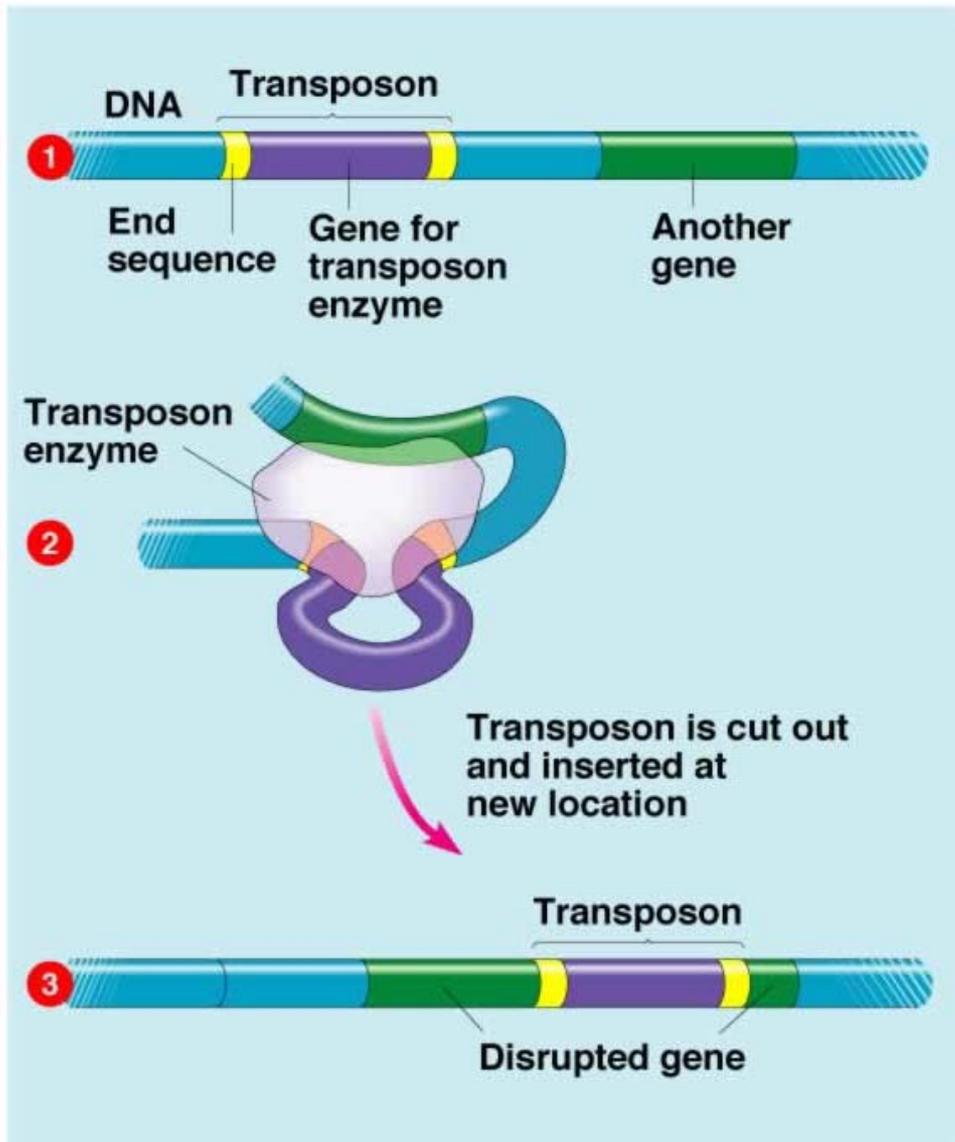


Простой транспозон

Transposon Tn3



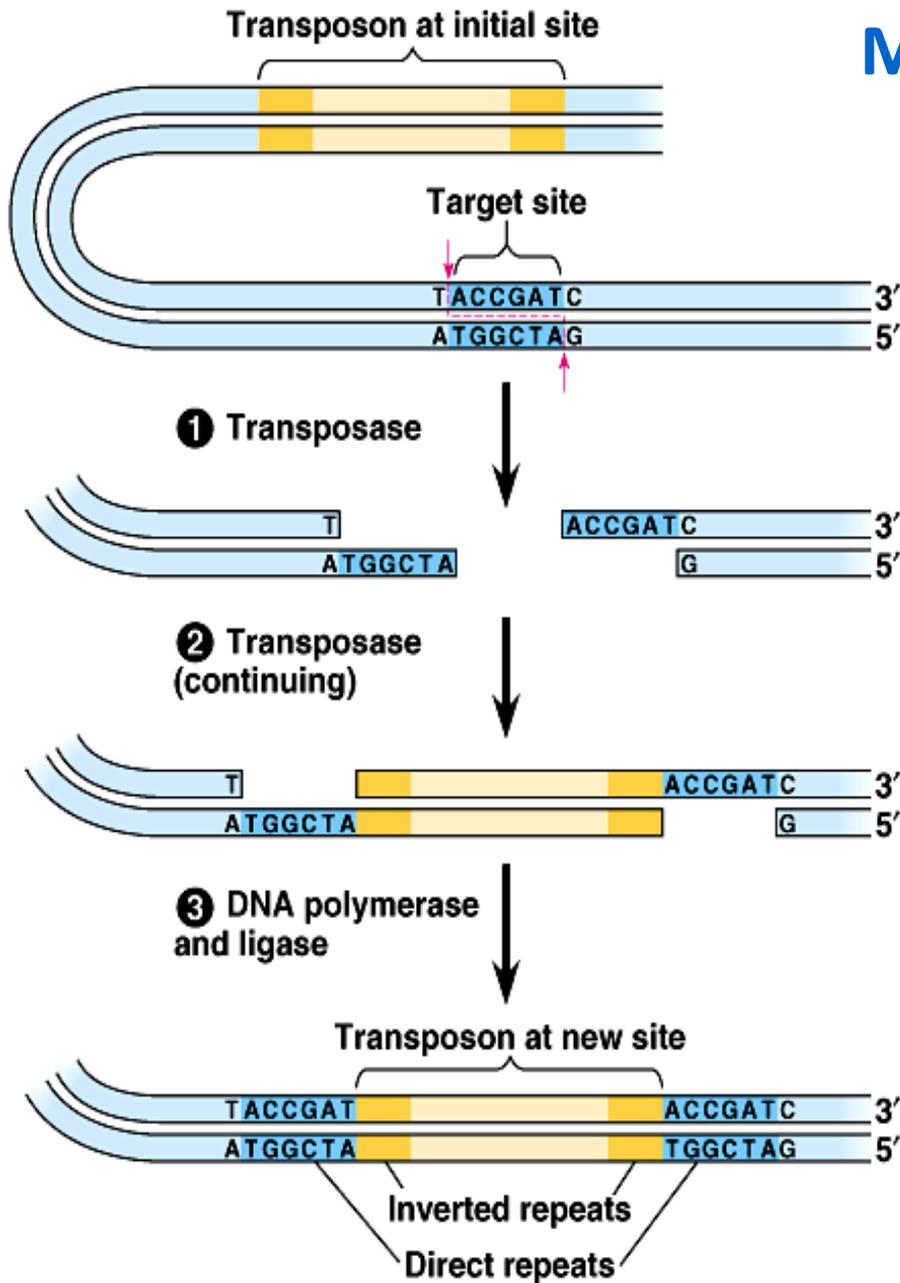
Механизмы транспозиции



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



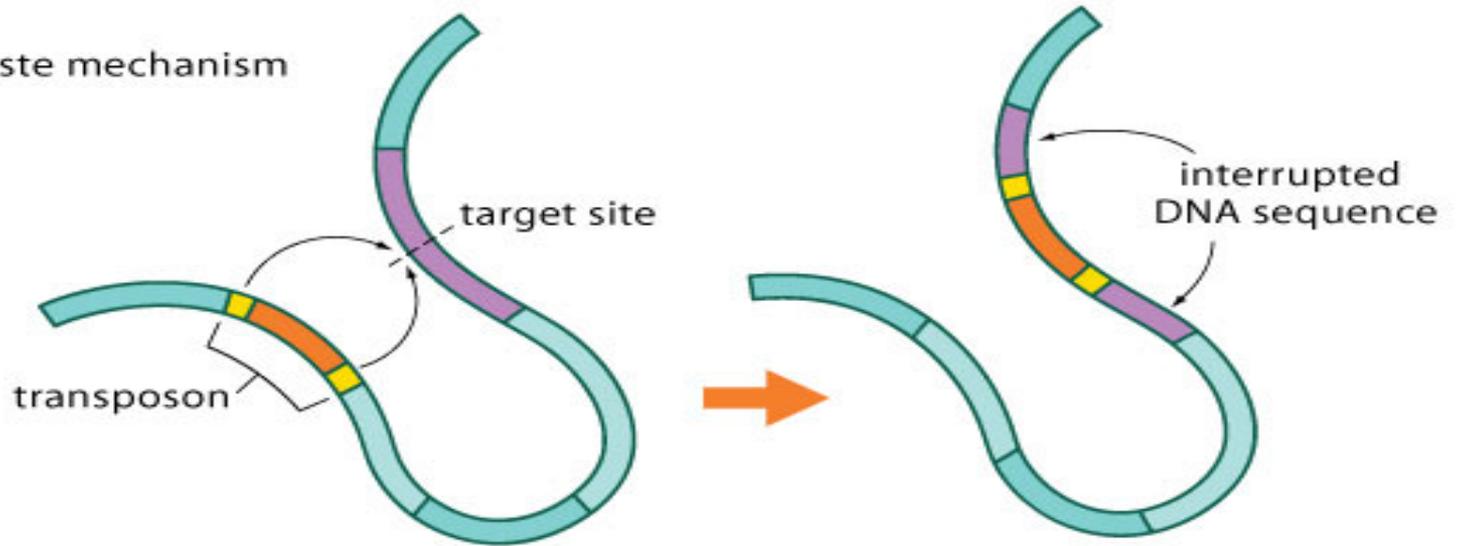
Транспозаза сводит в контакт концы элемента и дуплекс ДНК-мишени. При этом она делает в обеих цепях ДНК-мишени ступенчатые разрывы

Бреши репарируются

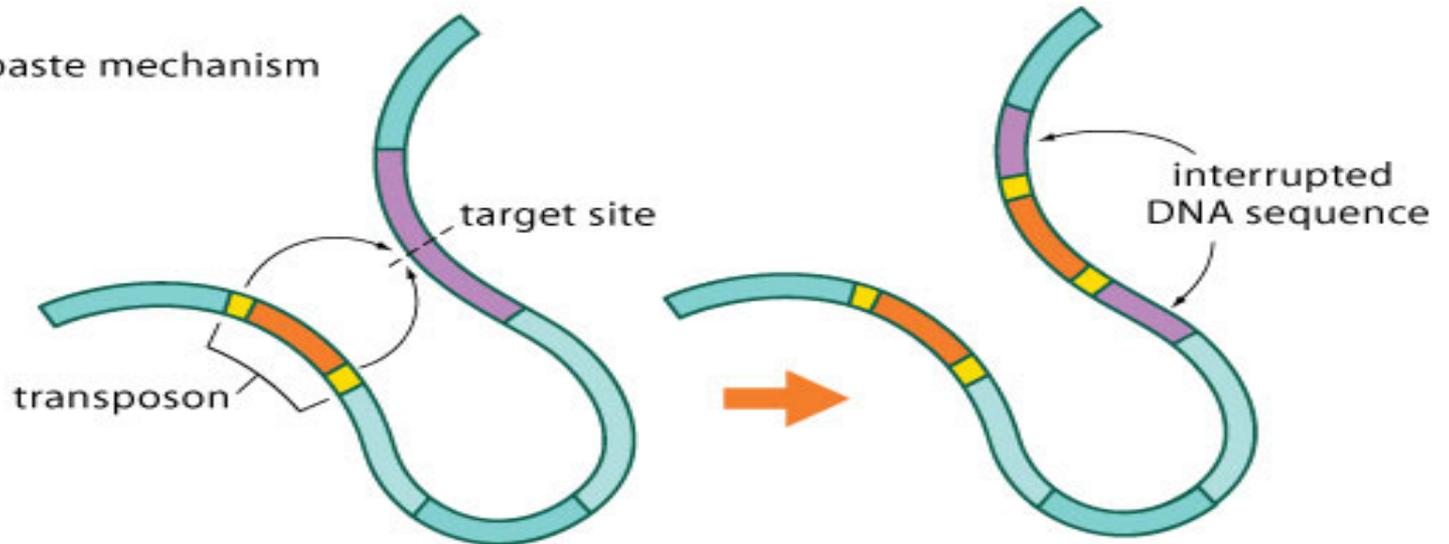
Образуются прямые повторы ДНК-мишени на концах элемента

Механизмы транспозиции

1. Cut-and-paste mechanism



2. Copy-and-paste mechanism



Функции транспозонов

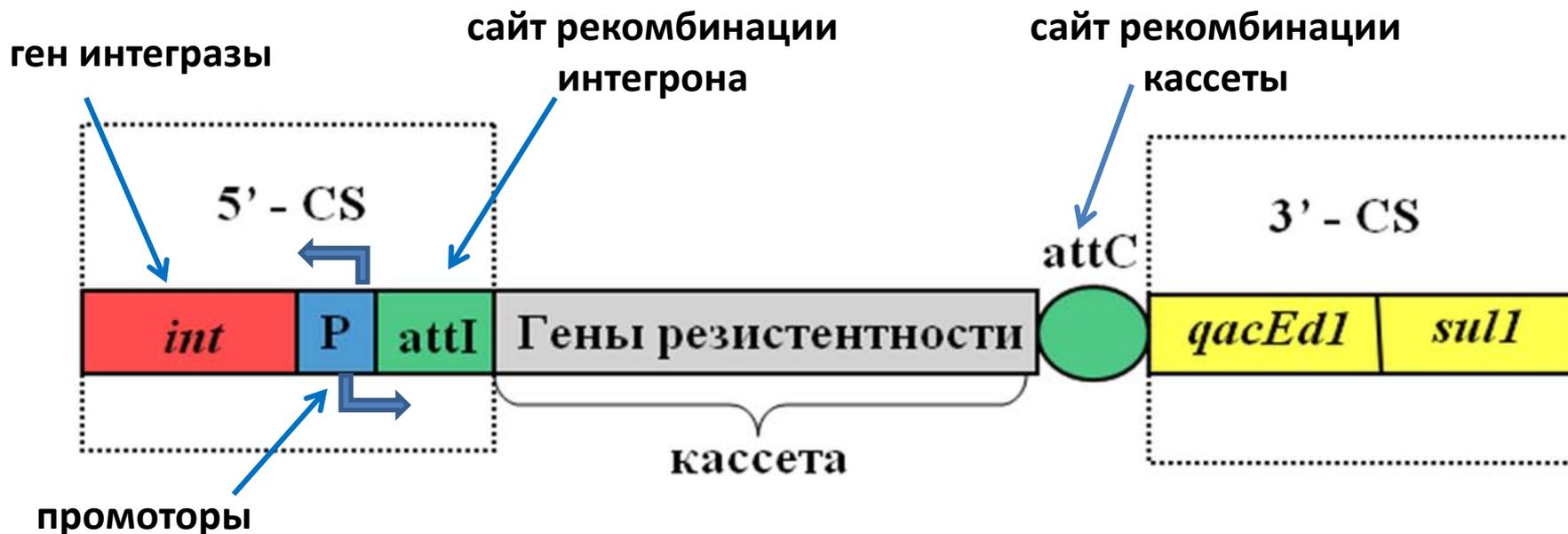
- Могут встраиваться в гены, вызывая мутации или стимулируя хромосомные перестройки, делеции.
- Могут переносить стоп-кодоны либо промоторные участки, что влияет на транскрипцию или трансляцию гена-мишени.
- Часто перемещаются между плазмидами, которые могут содержать несколько транспозонов.
- Могут 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

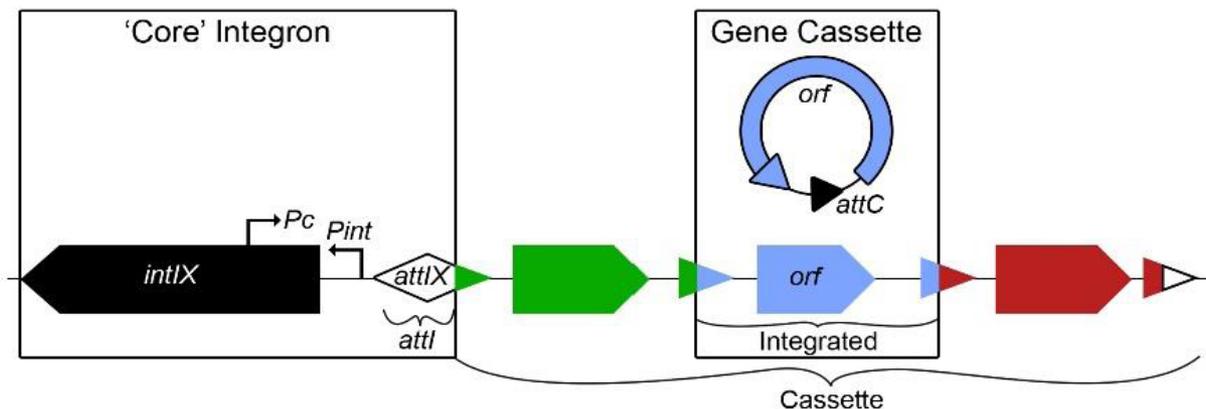
- ген интегразы *intI*
- сайт рекомбинации (интеграции) *attI*
- промоторные последовательности P_{int}/P_c , обеспечивающие транскрипцию гена интегразы и внедренных в состав интегрона генных кассет.

3'-консервативный сегмент интегронов класса 1 содержит гены резистентности

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

Вариабельный регион интегронов

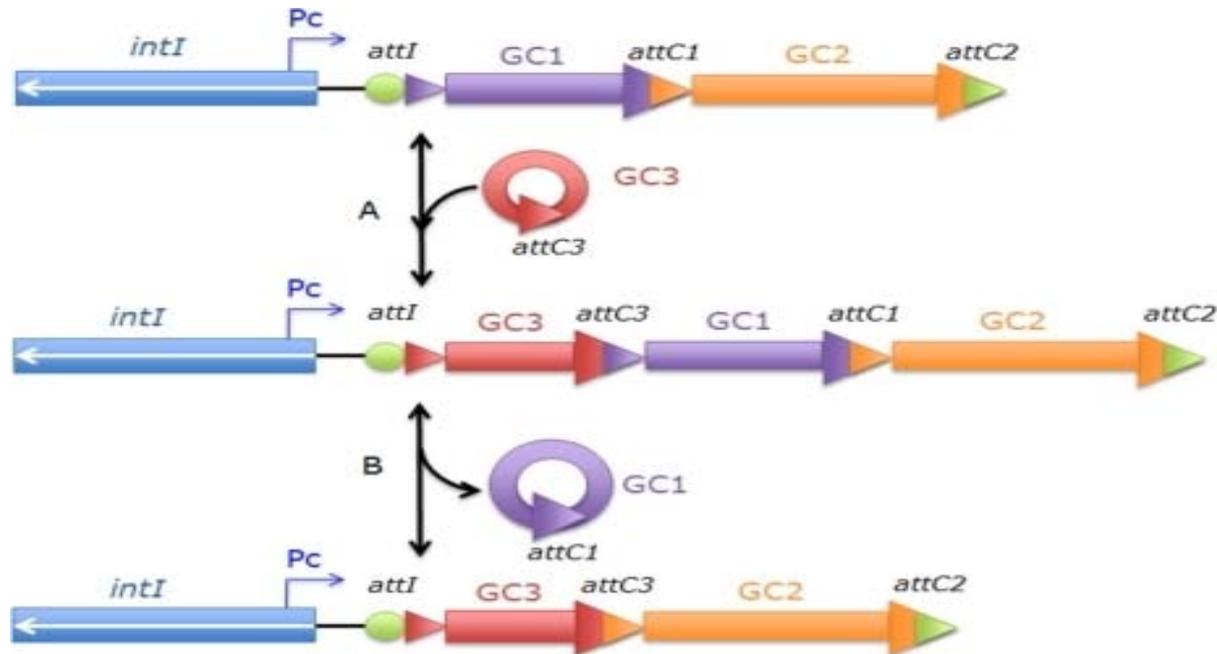
- Представлен мобильными генными кассетами , содержащими беспромоторные ORF с attC-сайтами.
- Интеграза IntI катализирует сайтспецифическую рекомбинацию между сайтами attI и attC, в результате чего происходит интеграция или вырезание кассеты.
- Множество событий интеграции ведет к образованию мультикассетных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

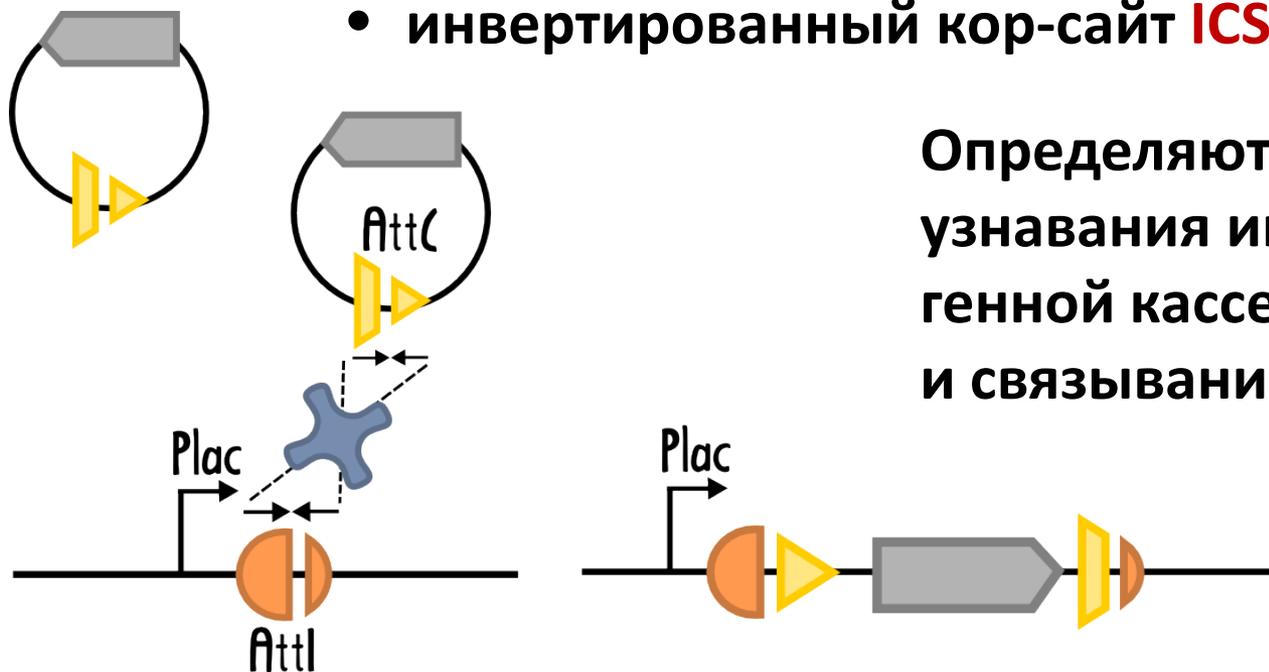
Первоначальное название сайтов рекомбинации генных кассет - 59 be (59 base elements) , поскольку первый изученный сайт имел протяженность, равную 59 п.о.



Сайты attC имеют одинаковую структурную организацию:

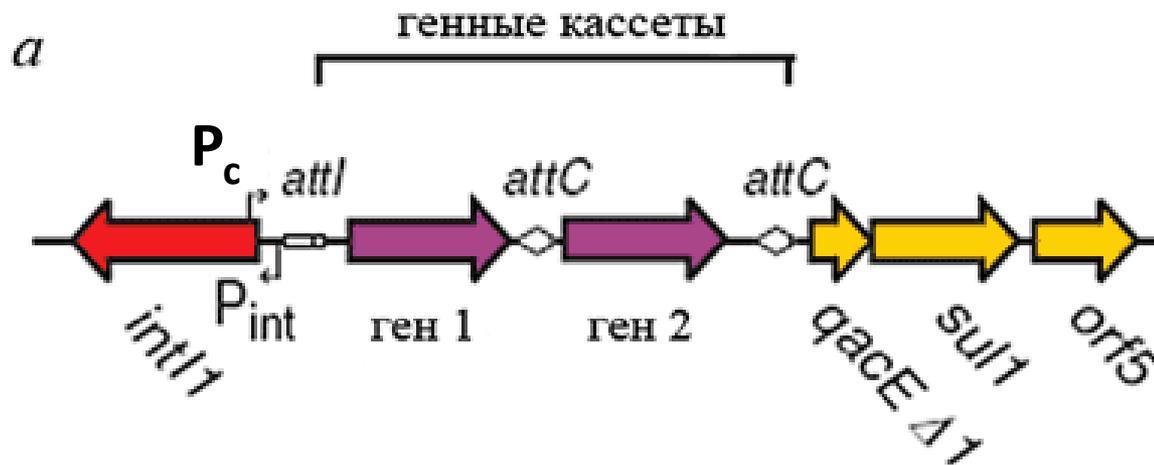
Каждый содержит несовершенные повторяющиеся последовательности с выраженной комплементарностью в терминальных 25 п.н. –

- 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

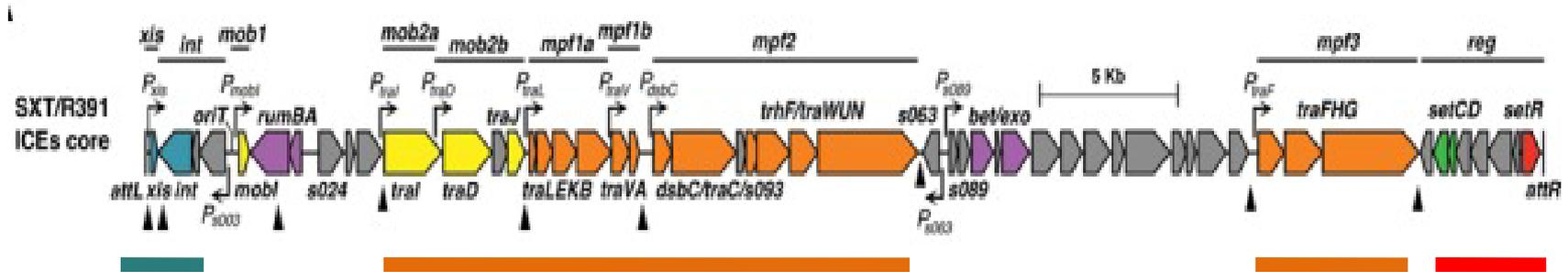
- ✓ **Подобно конъюгативным плазмидам, ICEs перемещаются при помощи конъюгации, но в отличие от плазмид, не способны к самостоятельной репликации**
- ✓ **Подобно умеренным бактериофагам, интегрируют в хромосому хозяина и реплицируются вместе с ней**

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

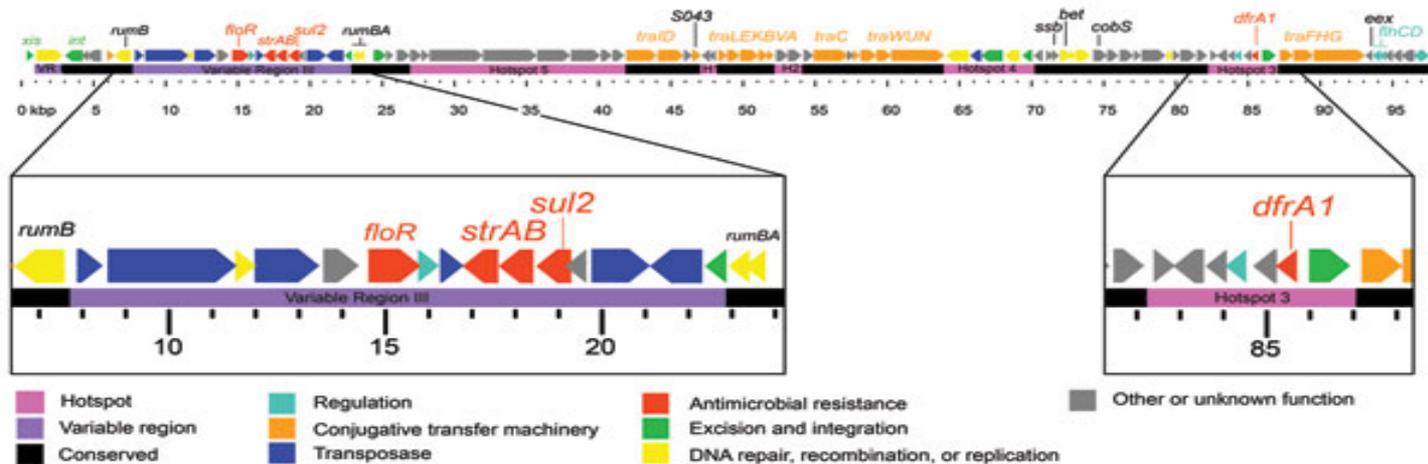
- интеграции/вырезании 
- конъюгативном переносе 
- регуляторных процессах 

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.

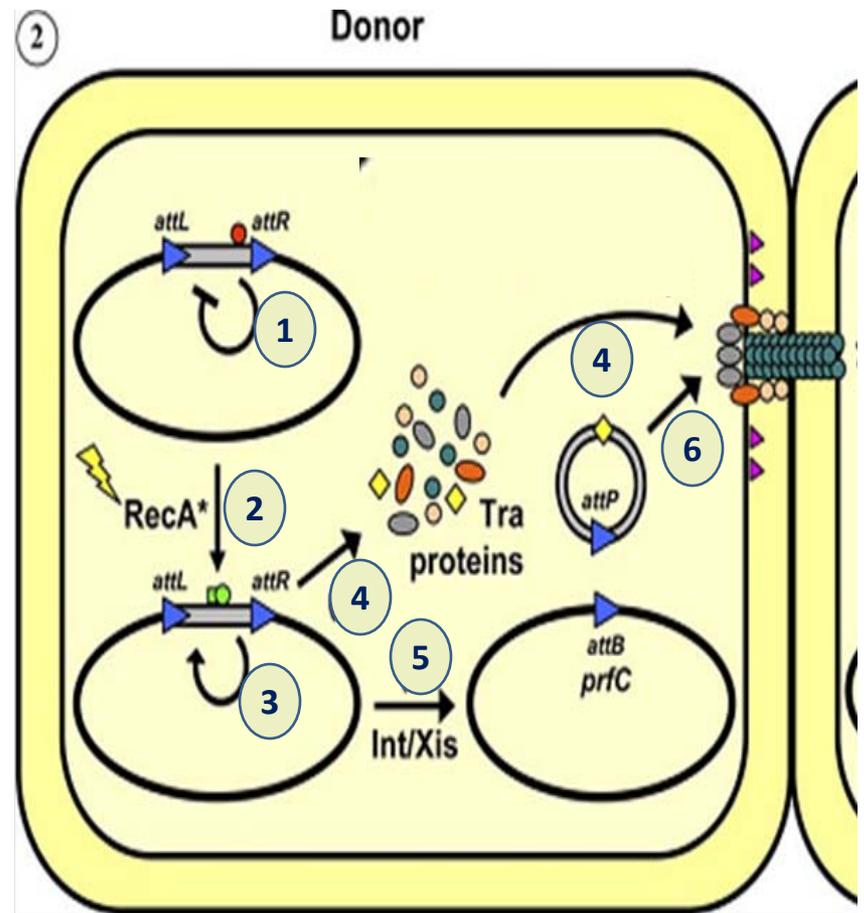
1. SXT белок репрессор SetR ●
подавляет экспрессию
большинства генов

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

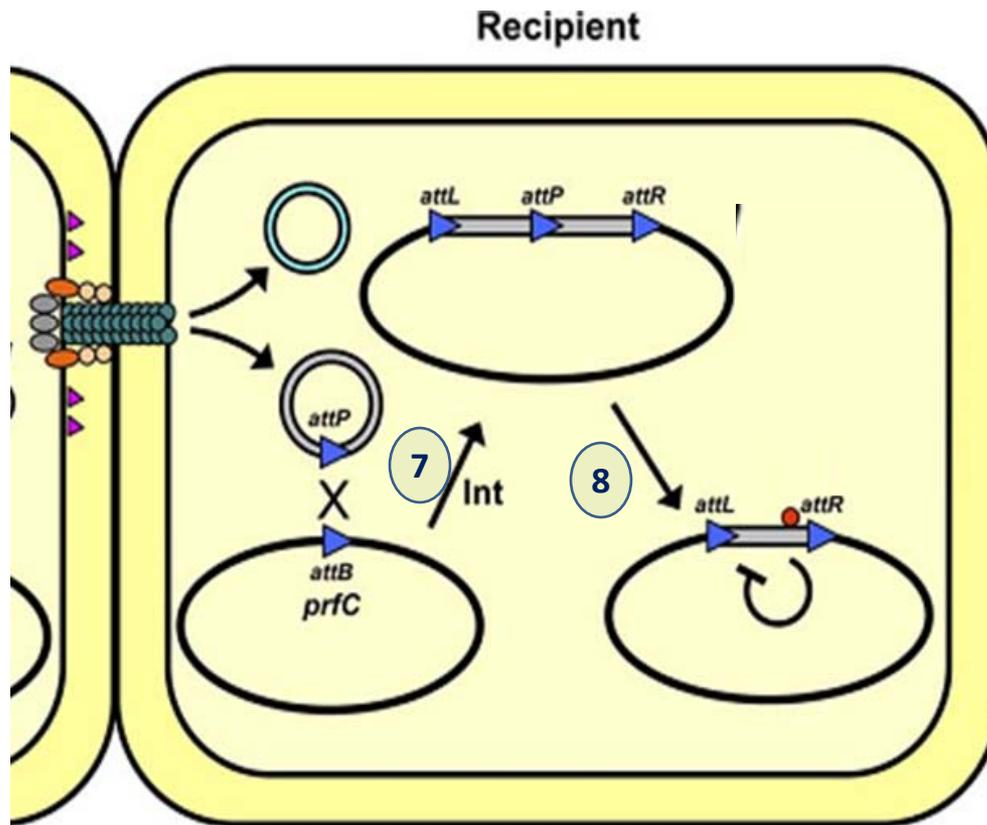
3. Активация экспрессии генов
tra и *int*

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

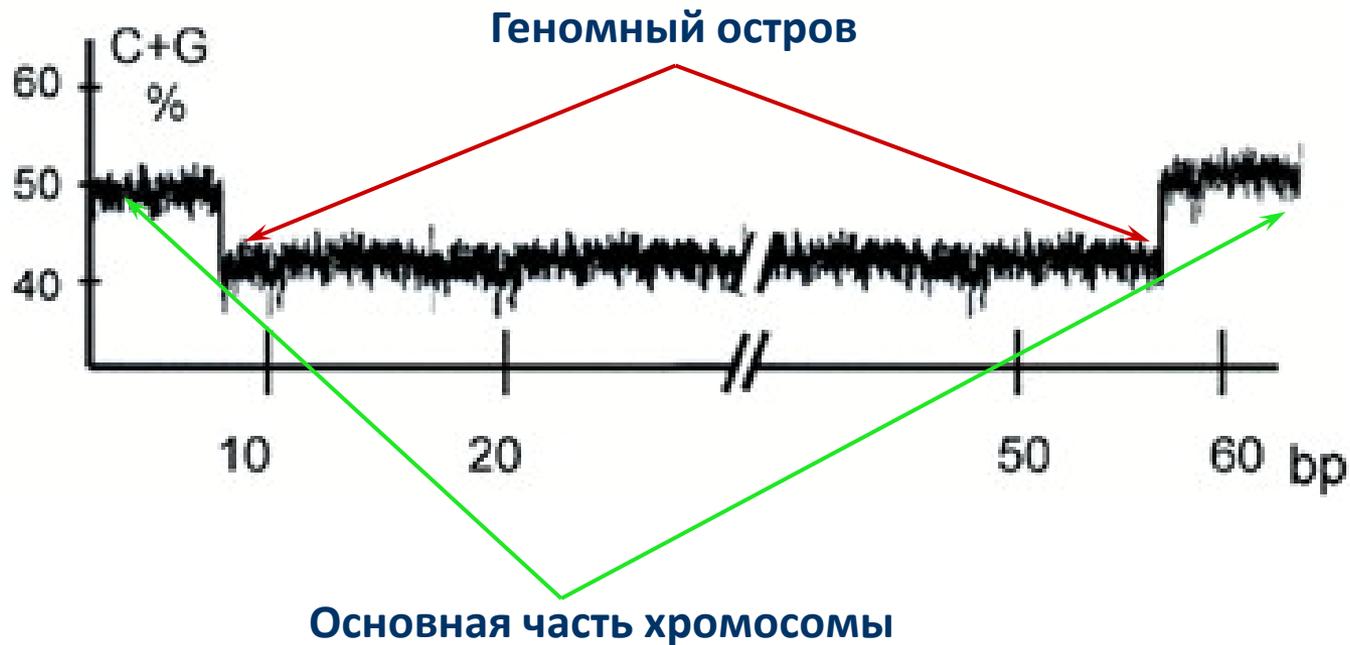
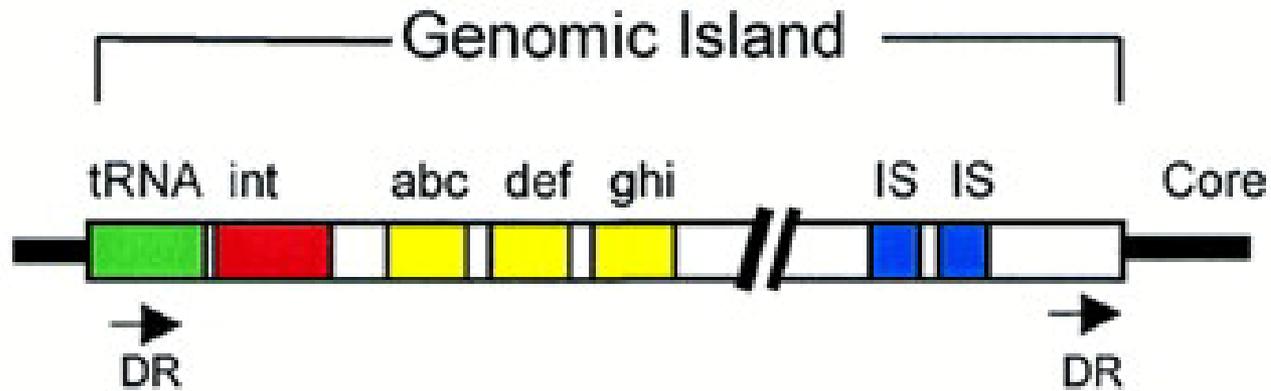
Гены мобильности:

- Интегразы, обеспечивающие интеграцию, вырезание и рекомбинацию
- Транспозазы

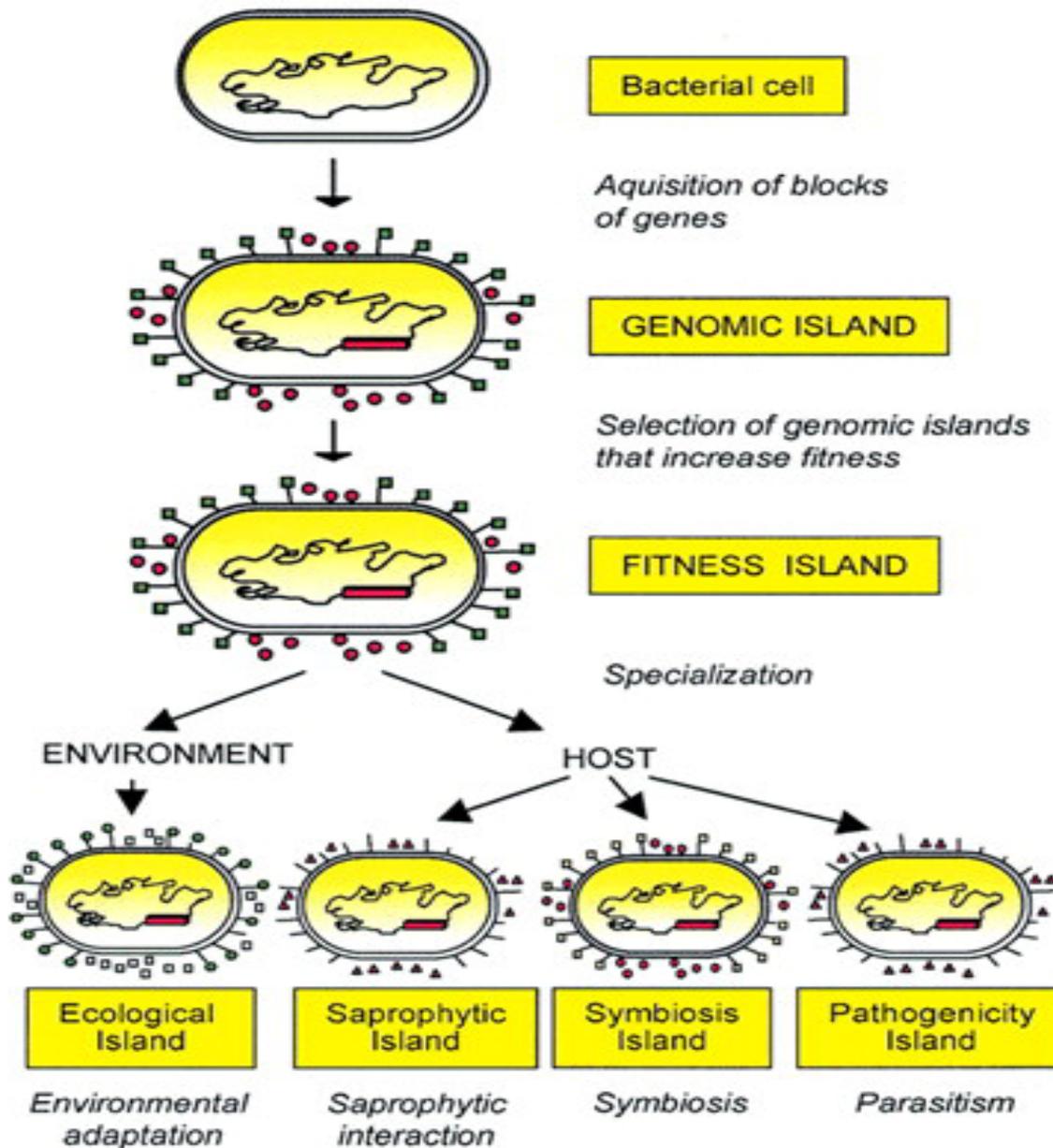
Прямые повторы

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

Отличия в C+G составе



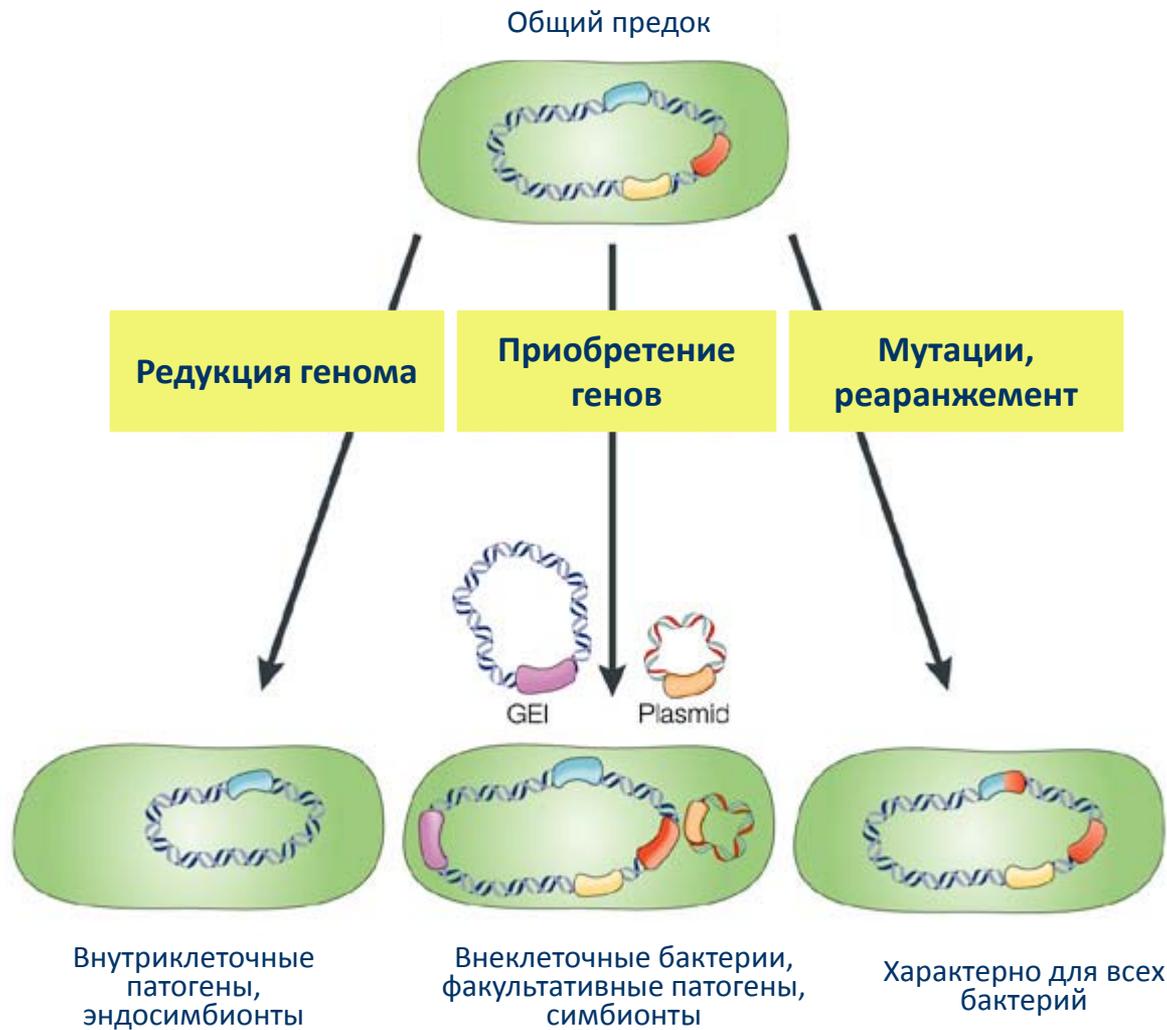
Модель развития геномных островов



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

- сапрофитной жизни,
- симбиозу или
- патогенности.

Роль МГЭ в эволюции бактерий

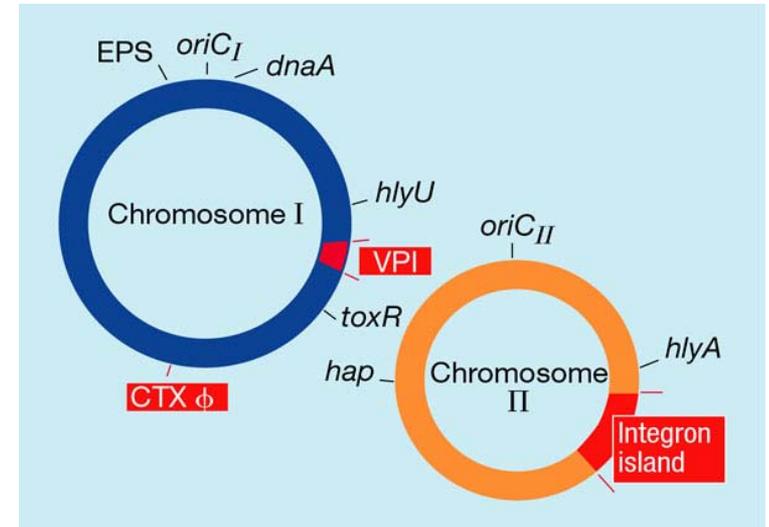


Роль МГЭ в патогенности бактерий на примере холерного вибриона

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**