



Геннадий Чураков

# Мобильные элементы и ЭВОЛЮЦИЯ

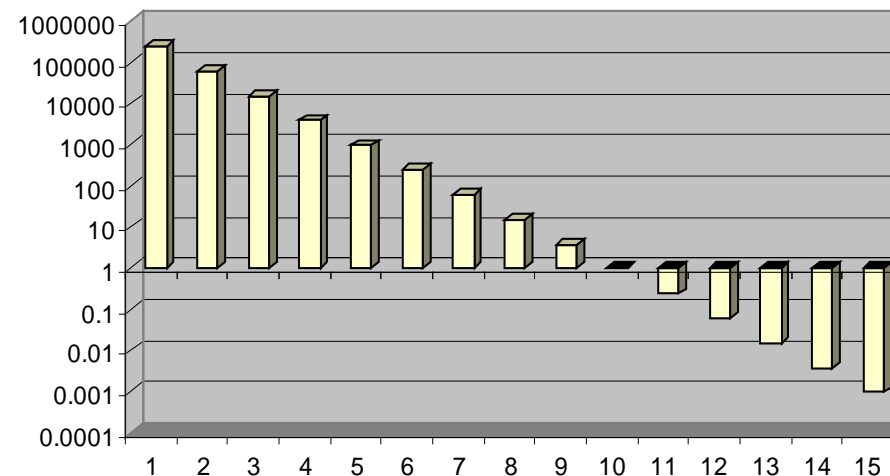
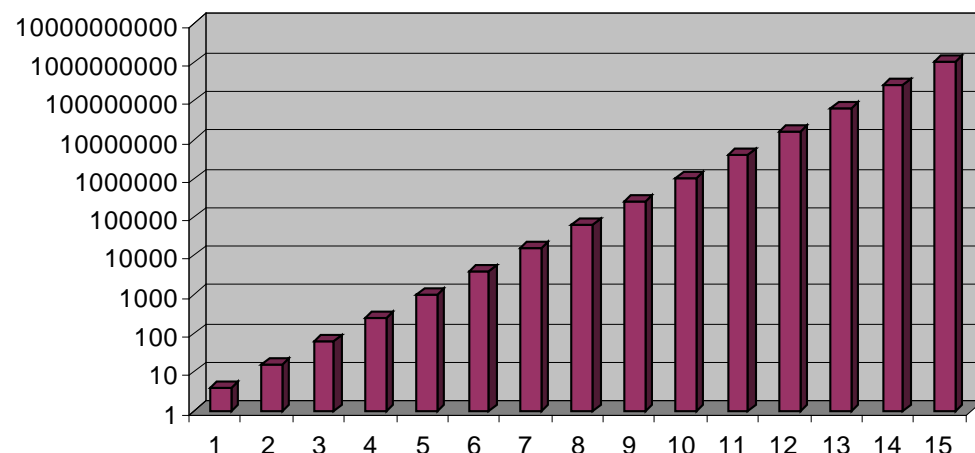
## Лекция 1

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+

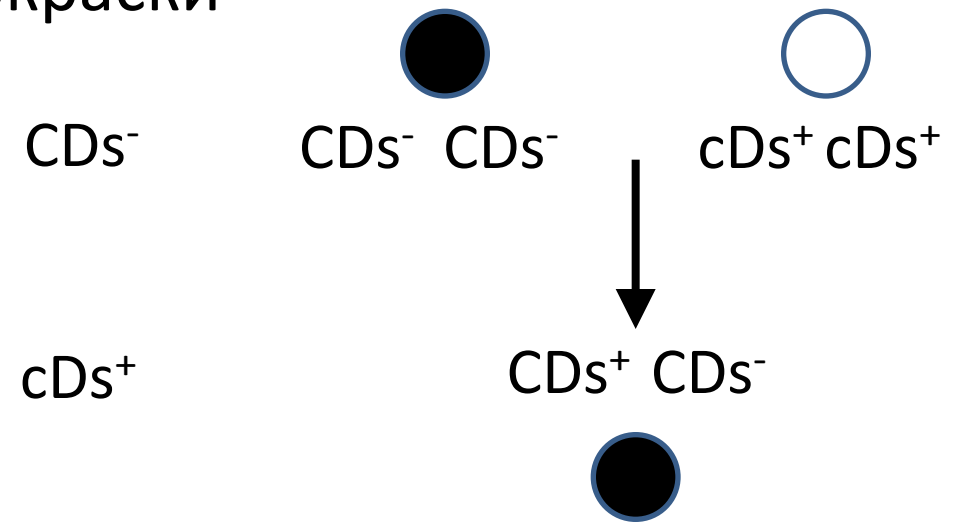
2Ac+

3Ac+

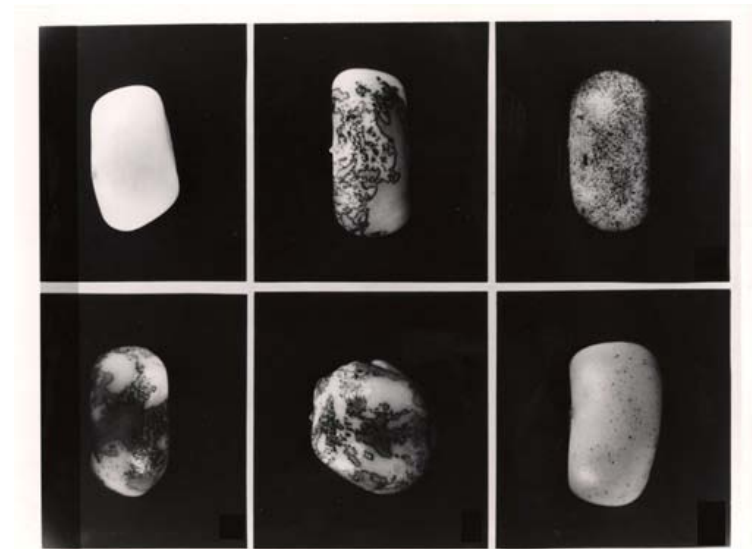
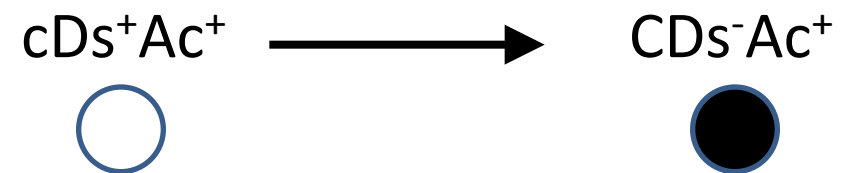
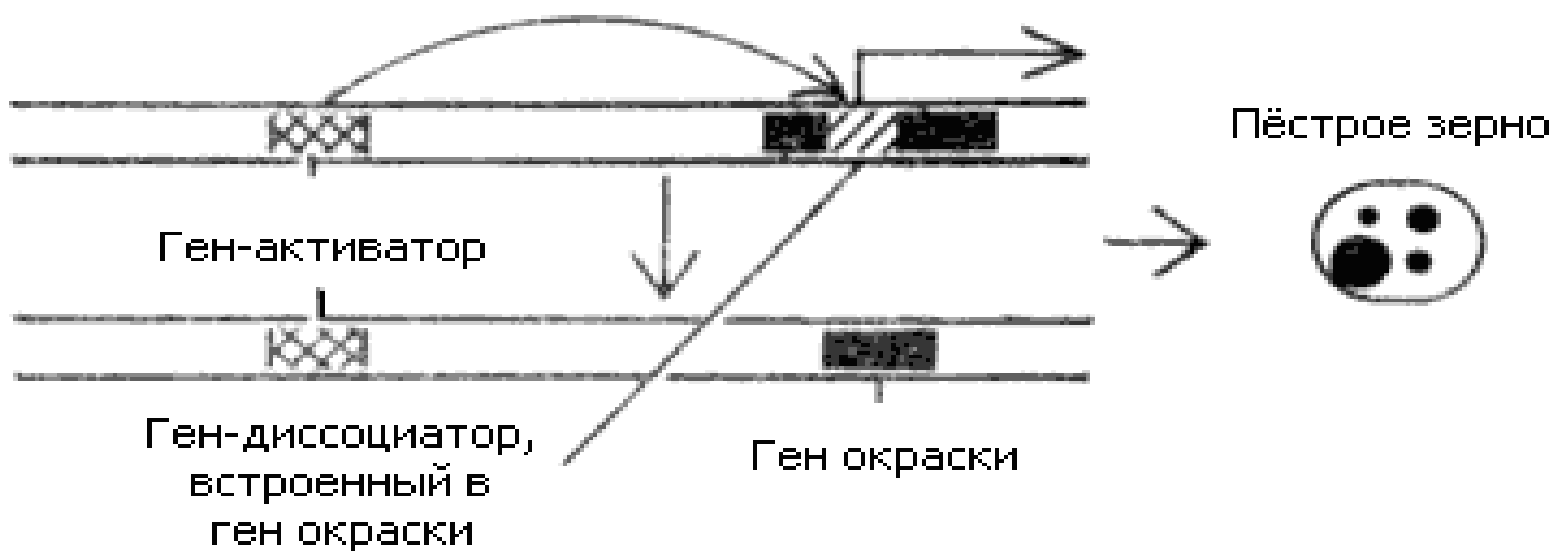


# Открытие мобильных элементов

Ген диссоциатор (Ds) может встраиваться в ген окраски

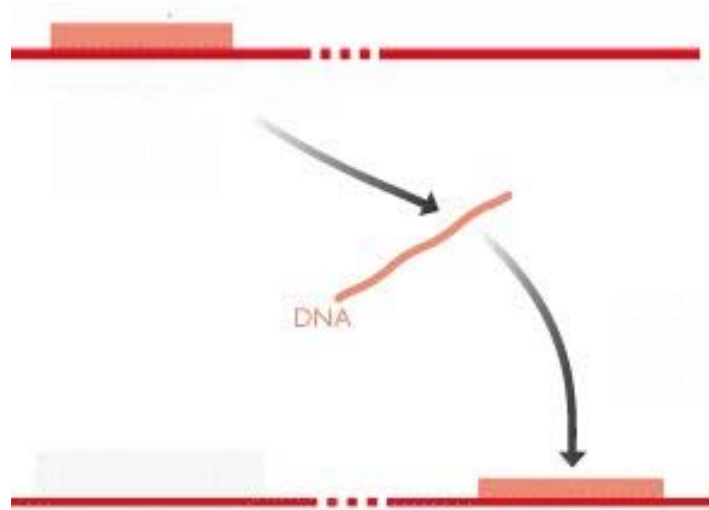


Под действием активатора (Ac), ген диссоциатор (Ds) производит переключение.

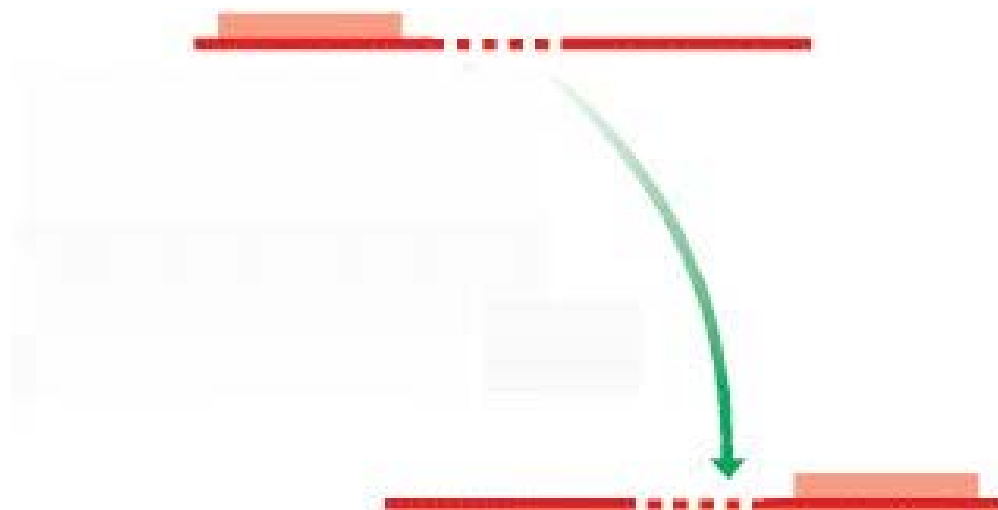


# Классификация мобильных элементов

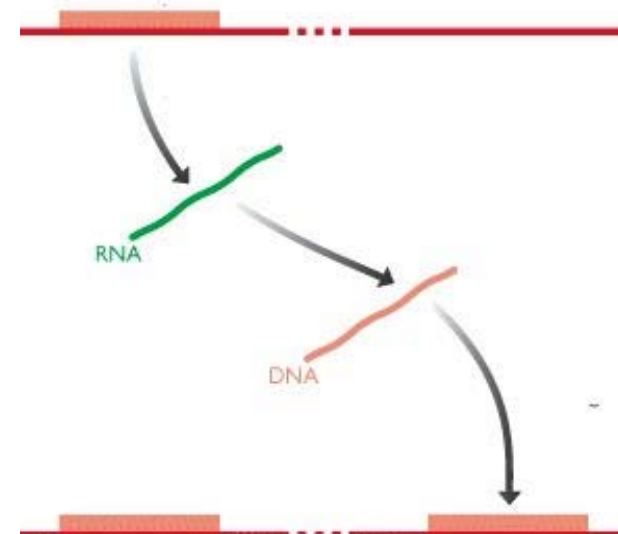
- Вырезание - встраивание  
(Транспозоны) (Тип II)



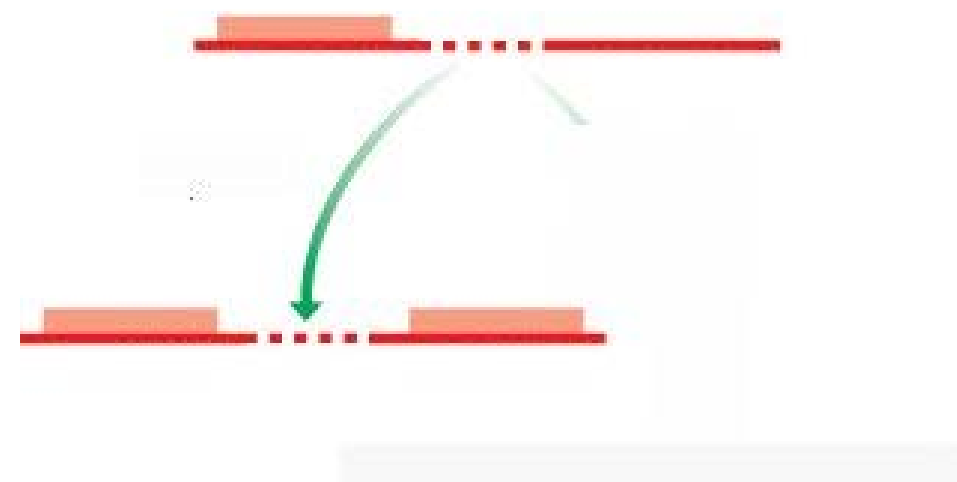
- Консервативная транспозиция



- Копирование - встраивание  
(Ретроэлементы) (Тип I)

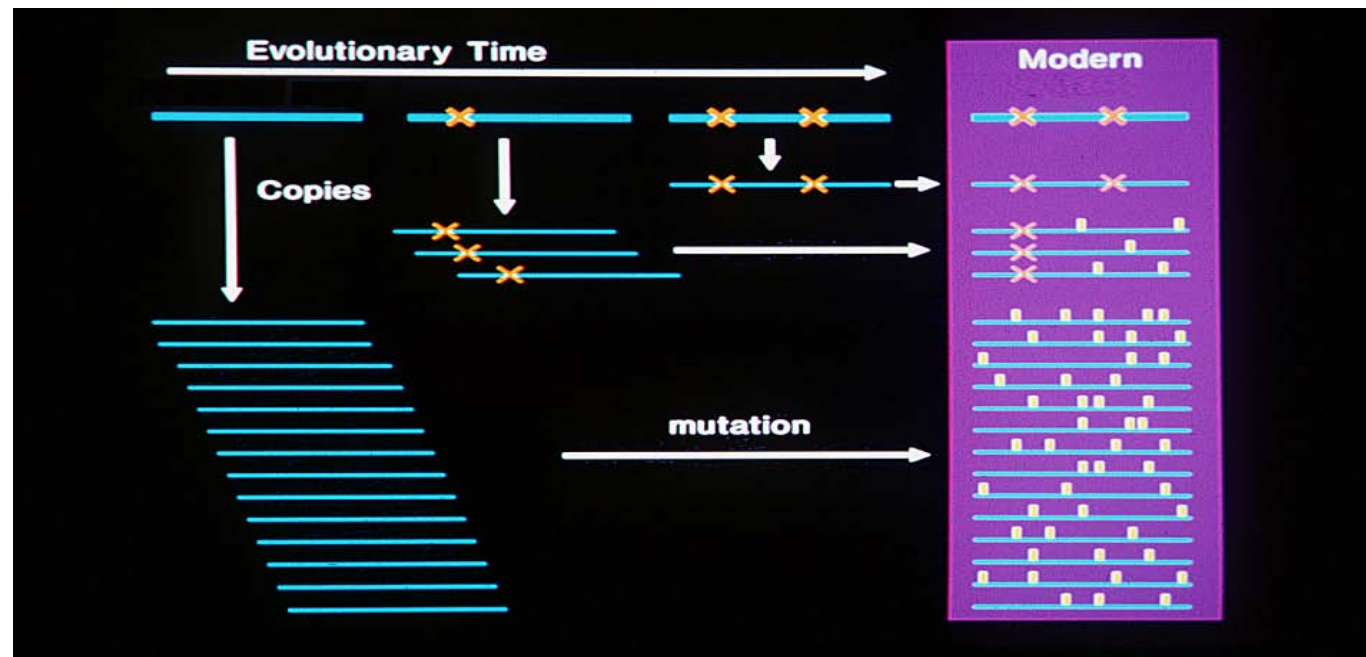


- Репликативная транспозиция/ретропозиция

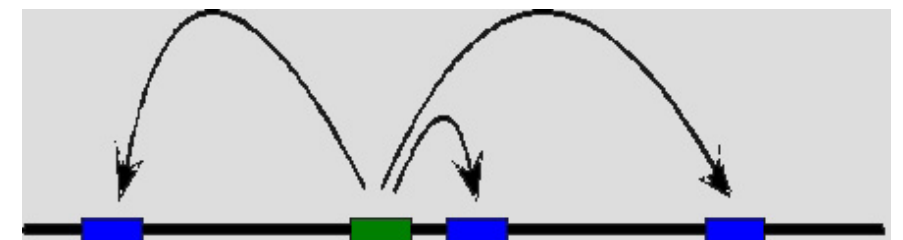


# Общие свойства мобильных элементов в геномах

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.

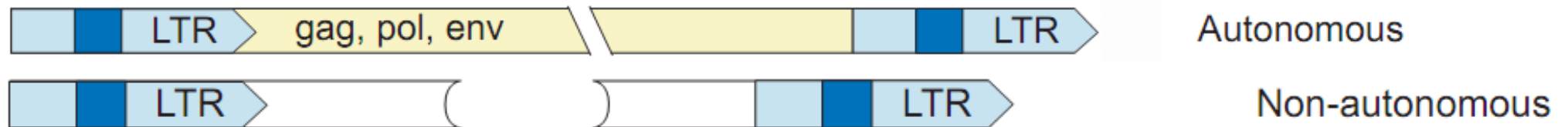


# Классификация мобильных элементов.

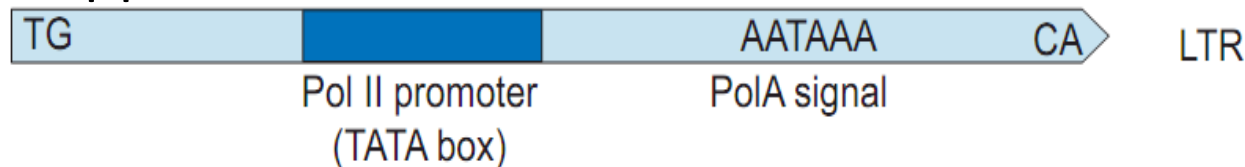
## Тип – Класс – Семейство – Вид

- Тип I – LTR ретроэлементы

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



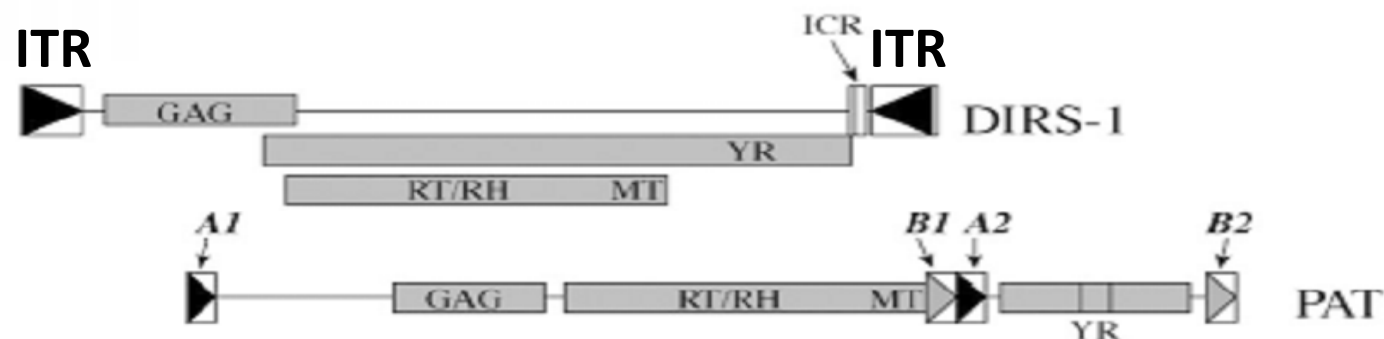
- Одиночные LTR.



- «Псевдогены» LTR.



- Класс - DIRS

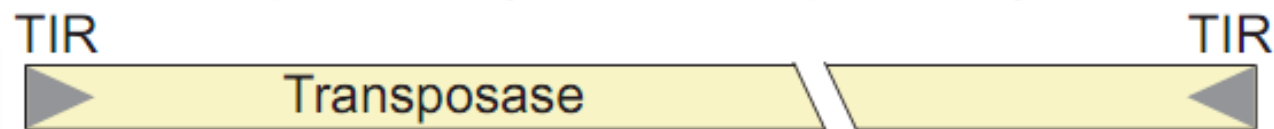


# Классификация мобильных элементов.

Тип – Класс – Семейство – Вид

- Тип II – ДНК транспозоны

- Класс – ДНК-транспозоны
- Класс MITE

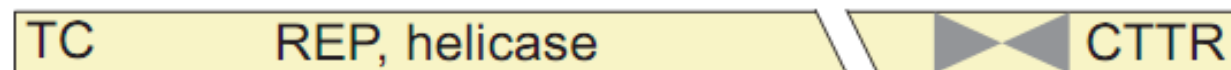


Autonomous



Non-autonomous

- Класс - Хелитроны

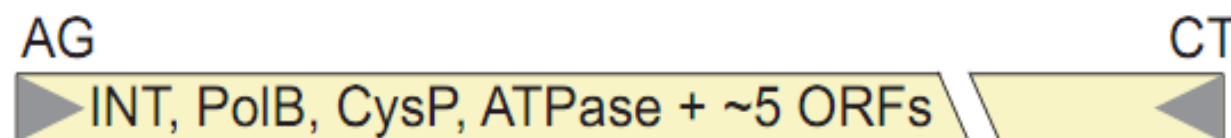


Autonomous



Non-autonomous

- Класс - Полинтоны



Autonomous



Non-autonomous

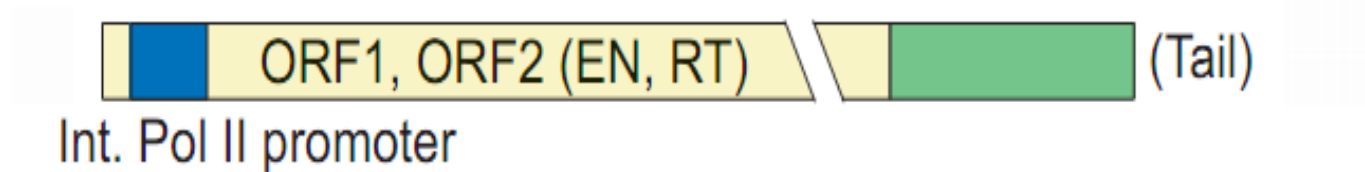


# Классификация мобильных элементов.

Тип – Класс – Семейство – Вид

- Тип III – Не LTR ретроэлементы

- Суперкласс – LINE



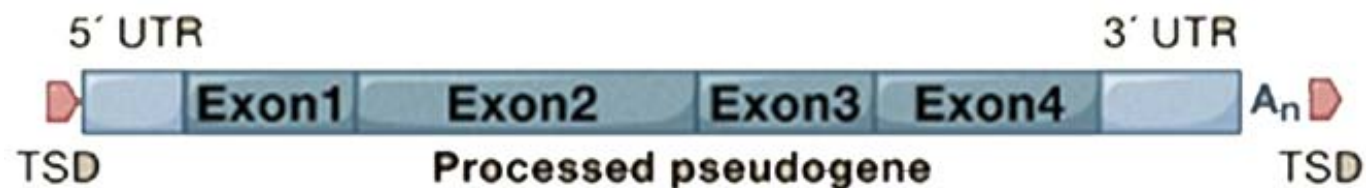
Autonomous

- Класс – SINE

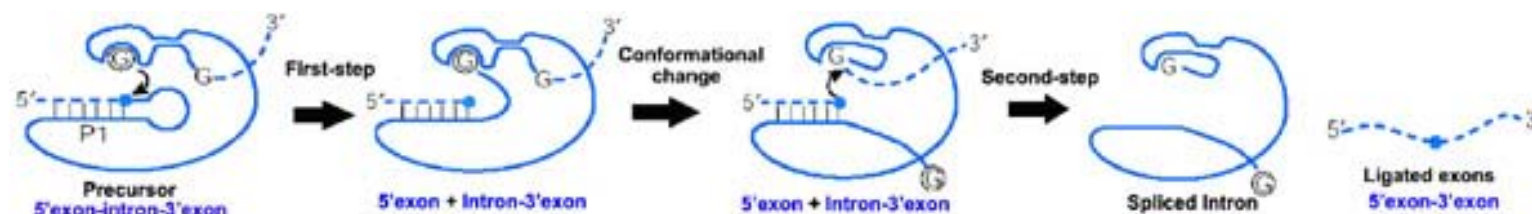


Non-autonomous

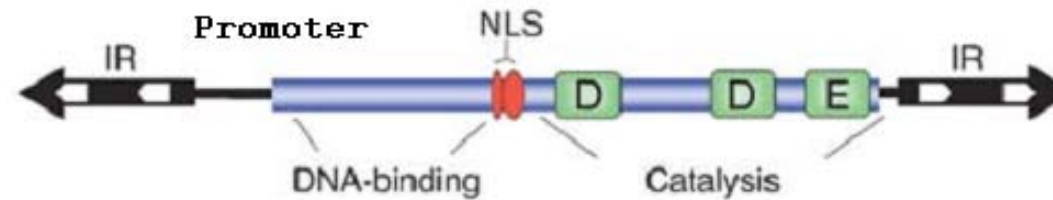
- Псевдогены



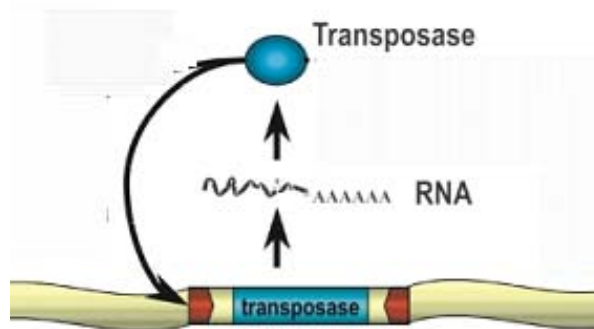
- Ретроинтроны



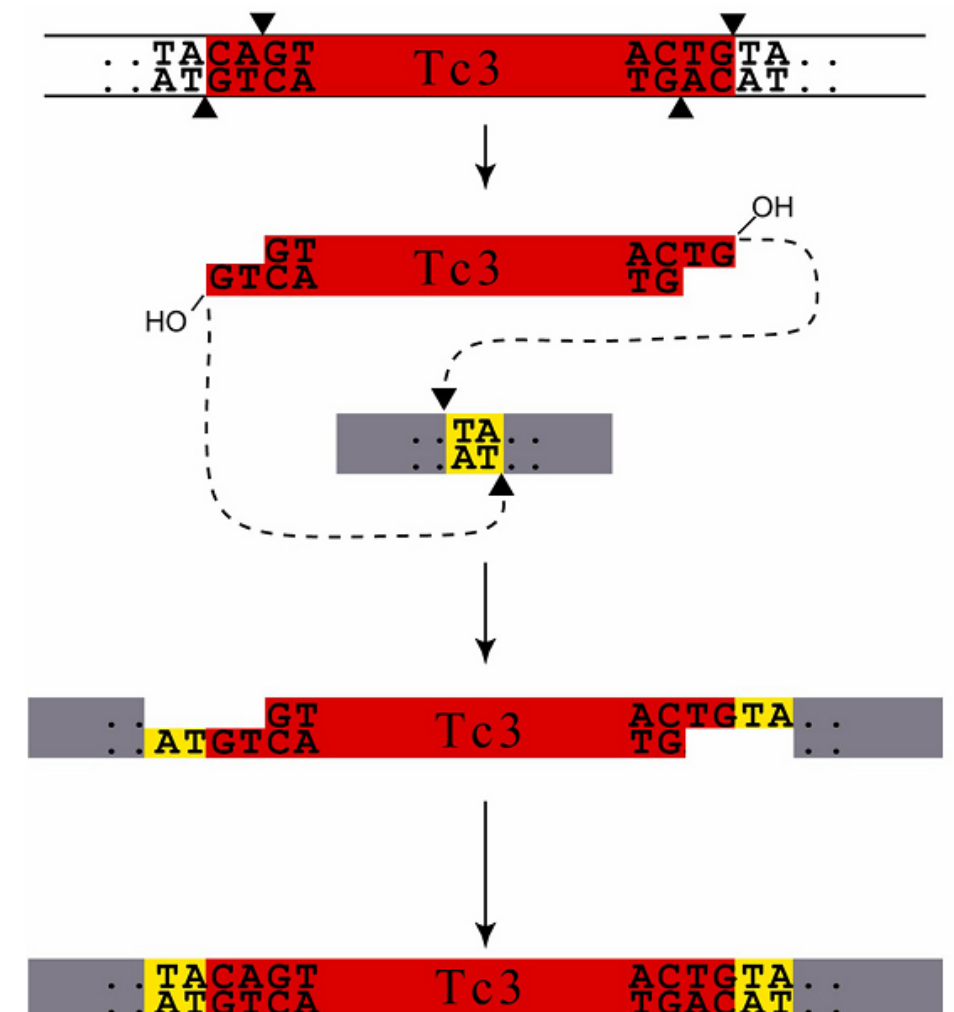
# Этапы репликации автономных ДНК транспозонов.



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

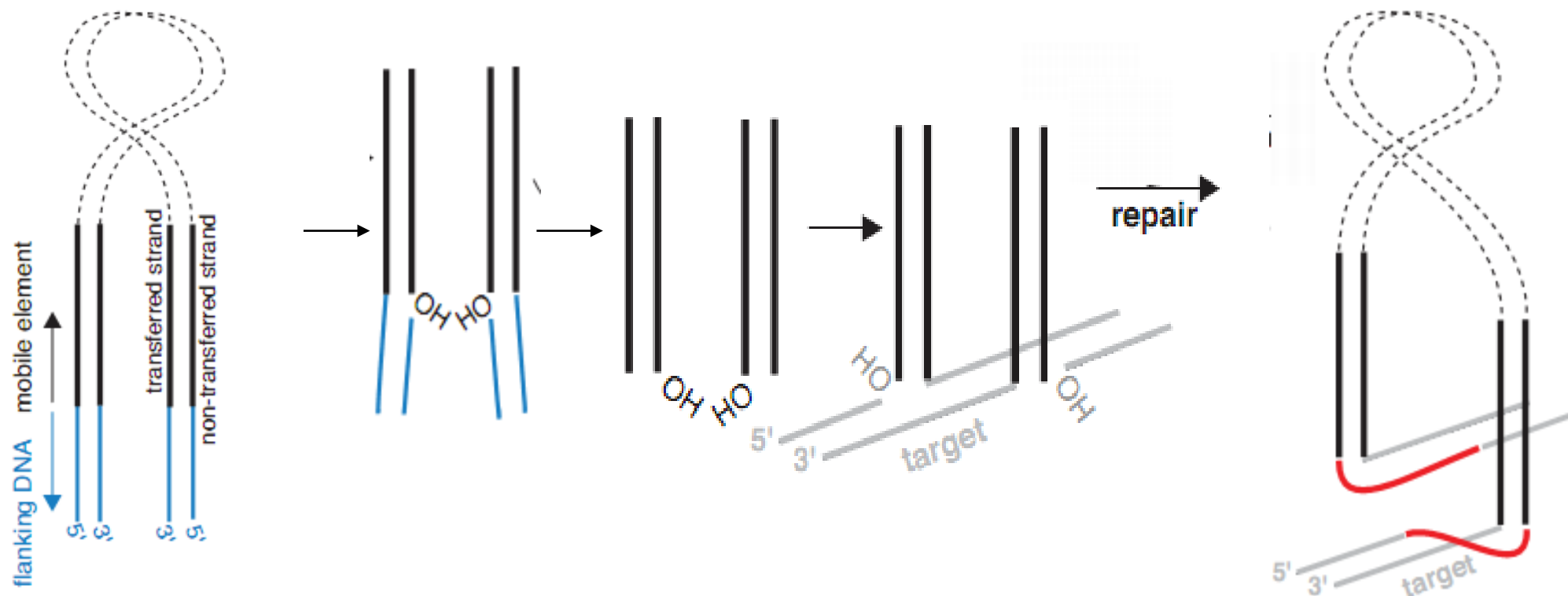


- Поиск специфичных для данного типа транспозона инвертированных повторов.
- Формирование «петли» и вырезание ДНК элемента, образование «липких концов».
- Лигирование ДНК хозяина.
- Репарация ДНК хозяина на обоих сайтах.



# Консервативная транспозиция.

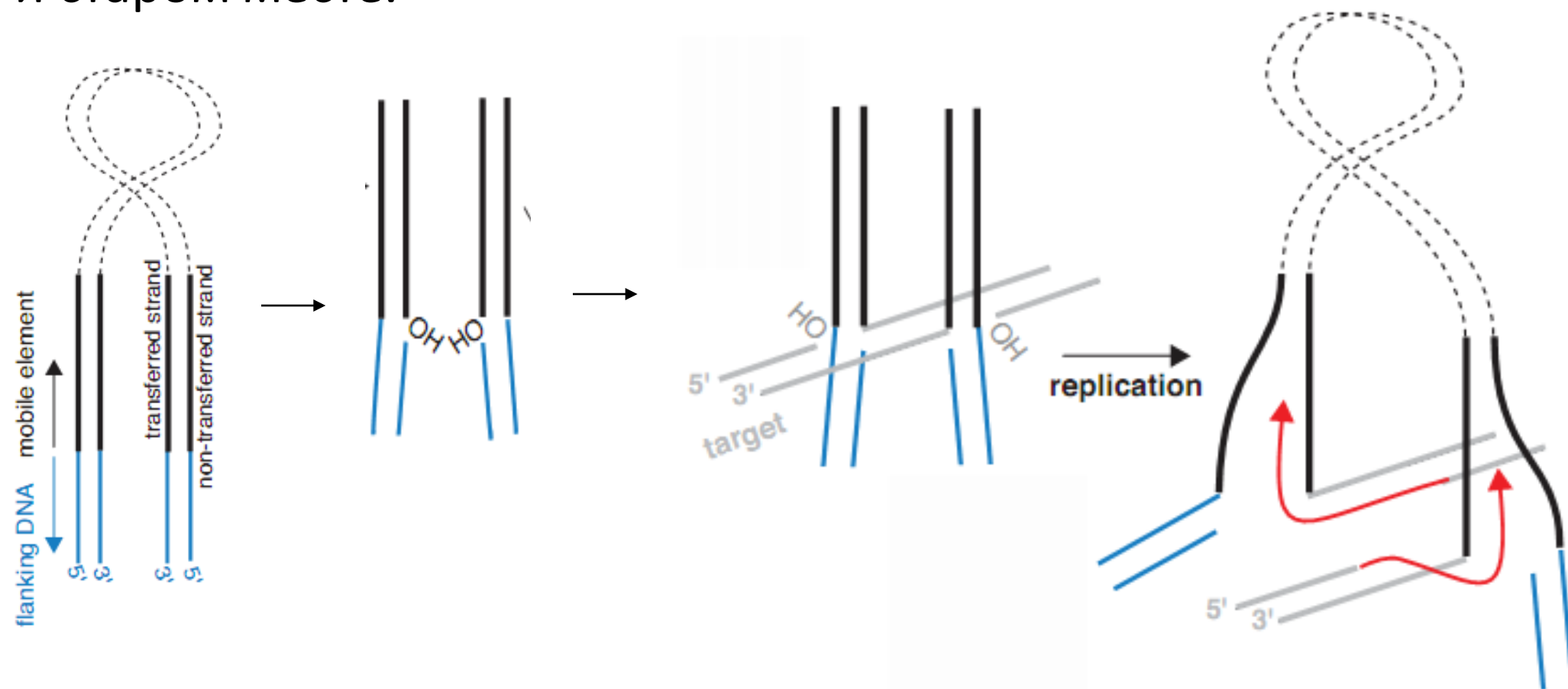
- Консервативная транспозиция осуществляет только перенос ДНК транспозона на новое место.
- Консервативная транспозиция не синхронизирована с делением клетки.
- Консервативная транспозиция осуществляется за счёт репарационной системы клетки.
- При консервативной транспозиции разрезаются обе нити ДНК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

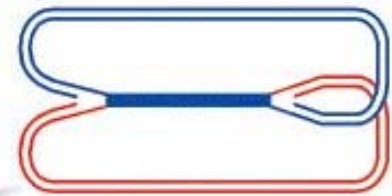
Репаративная транспозиция встречается у прокариот. У эукариот она возможна в геномах пластид и митохондрий



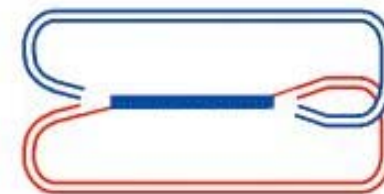
Распознавание гомологичных фланговых последовательностей



Создание «липких концов»

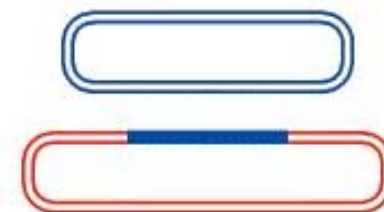


Включение системы репарации повреждений ДНК

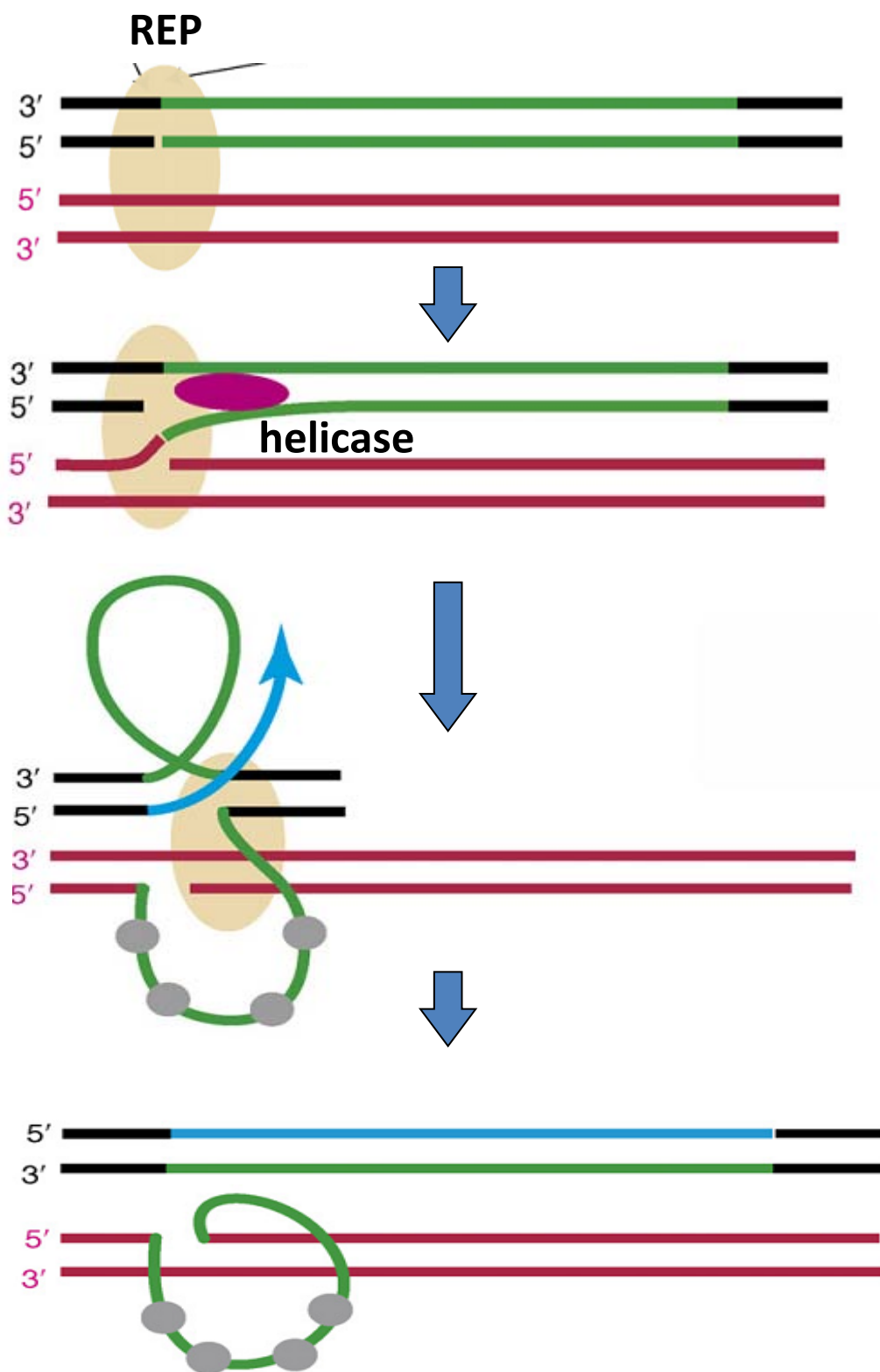


Перенос транспозона на парную хромосому

Репарация за счёт гомологичной рекомбинации



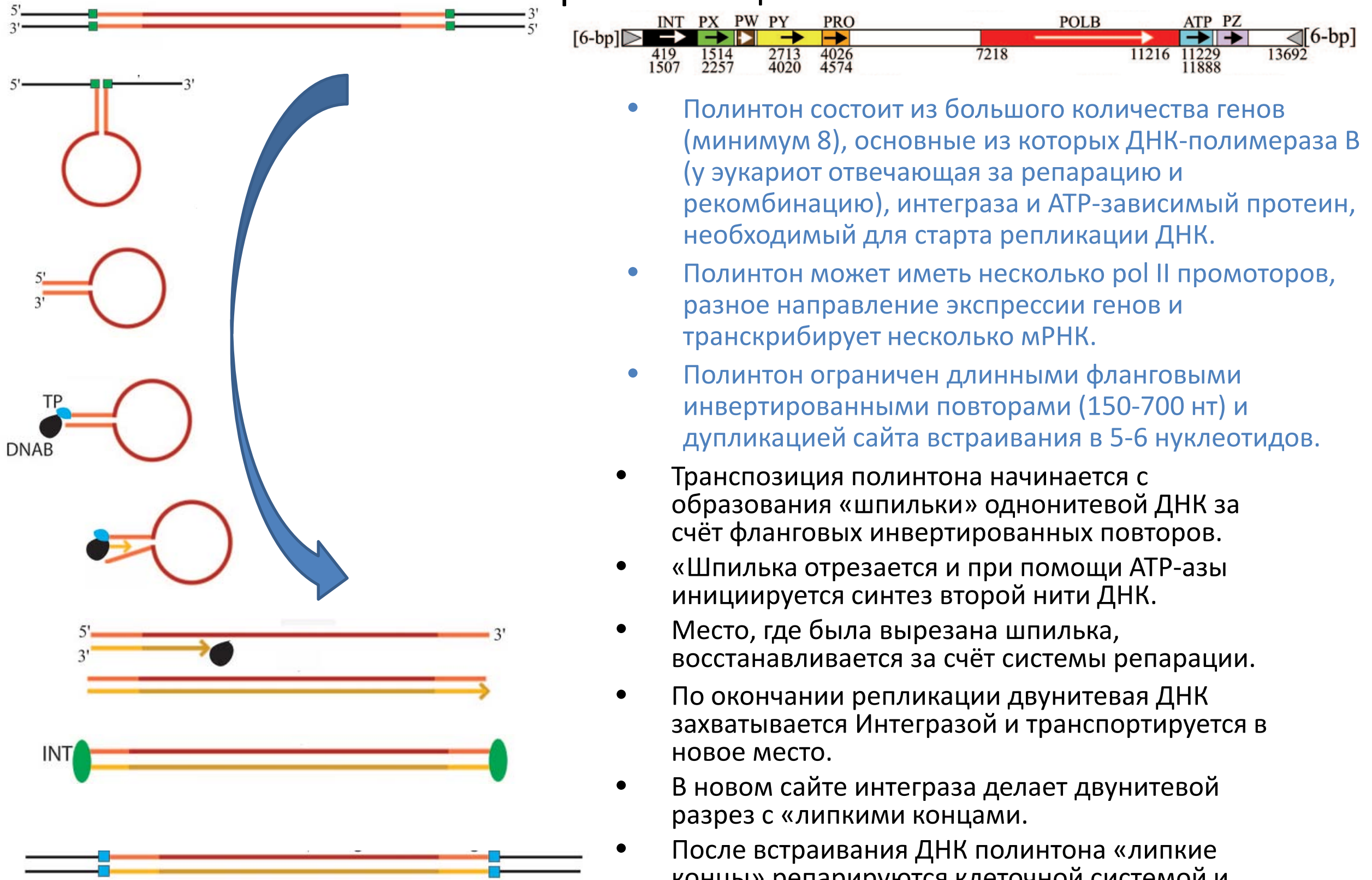
# Репликативная транспозиция хелитрона - «катящийся круг».



- **REP** – эндонуклеаза
  - **Helicase** – АТР-зависимая хеликаза.
  - **A/T** – 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.



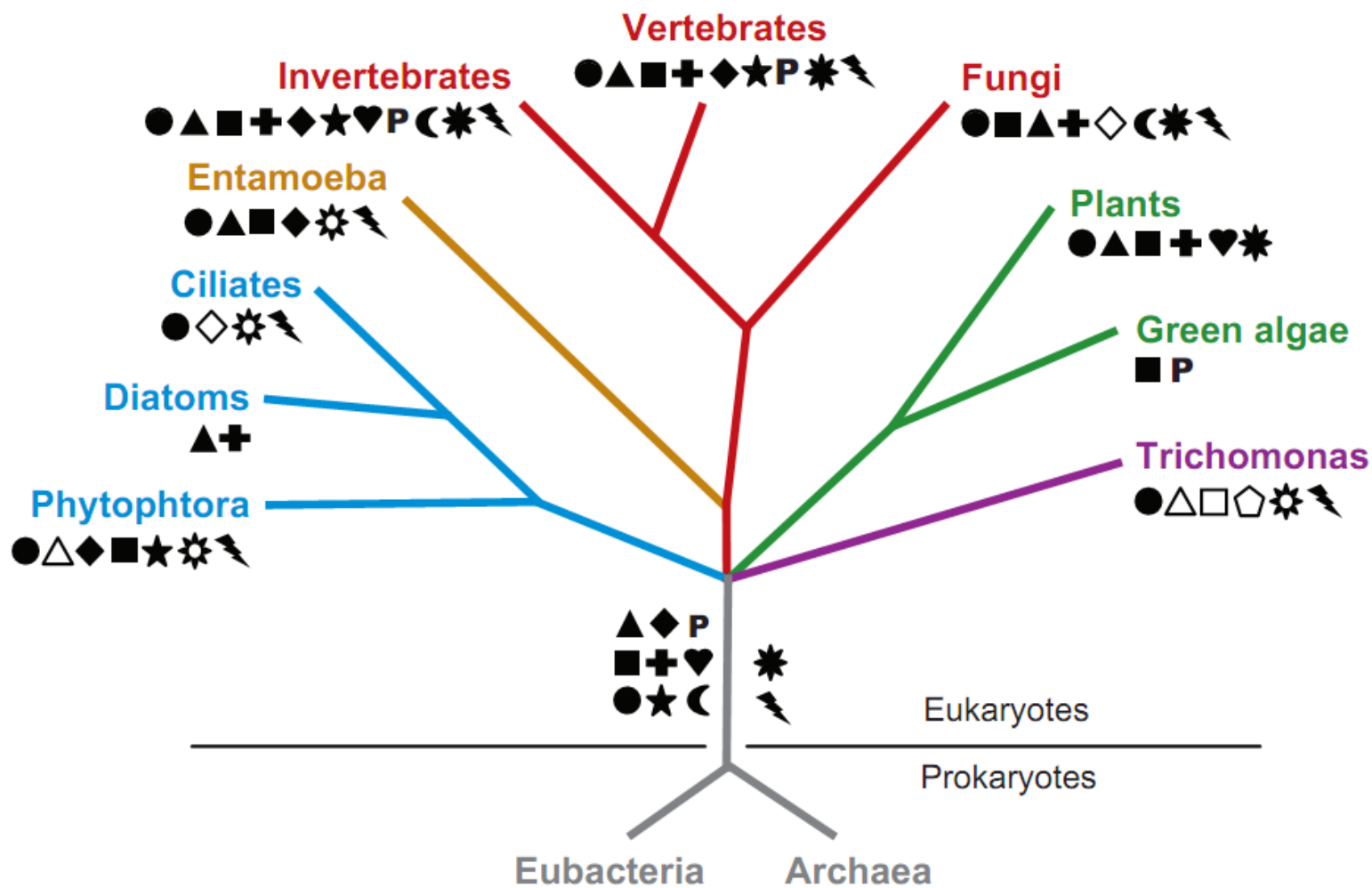
# Репликативная транспозиция полинтонна - «вирусный» тип транспозиции.



- 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 дупликацией 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 дупликация 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)   |

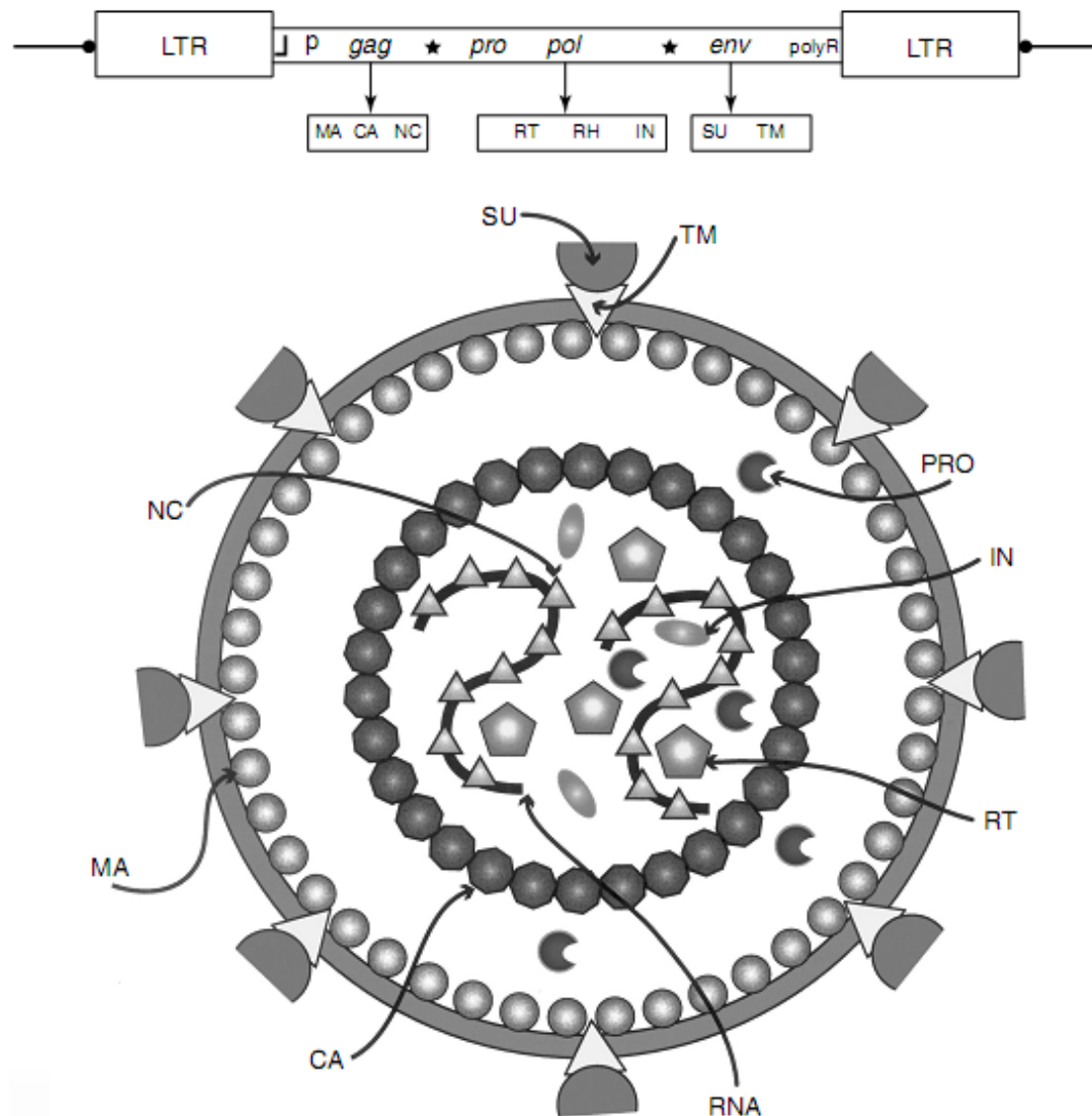
## Other subclasses:

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

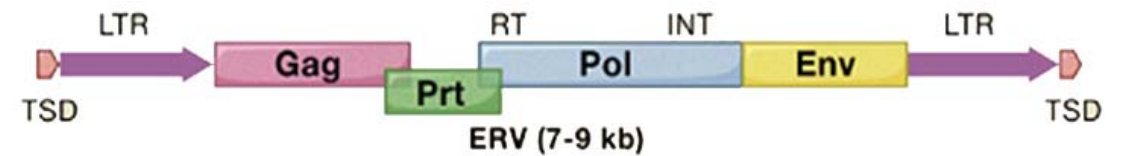


# Жизненные циклы: ретровирусы и LTR ретроэлементы

## Строение классического ретровируса

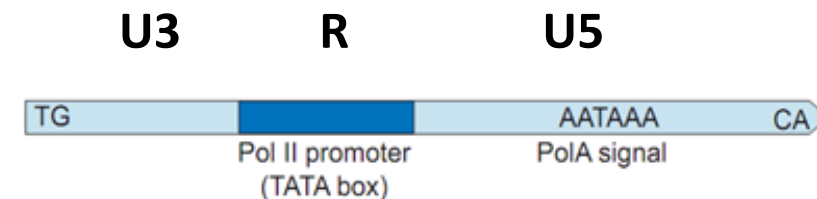


## Структура генома LTR элементов



- 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

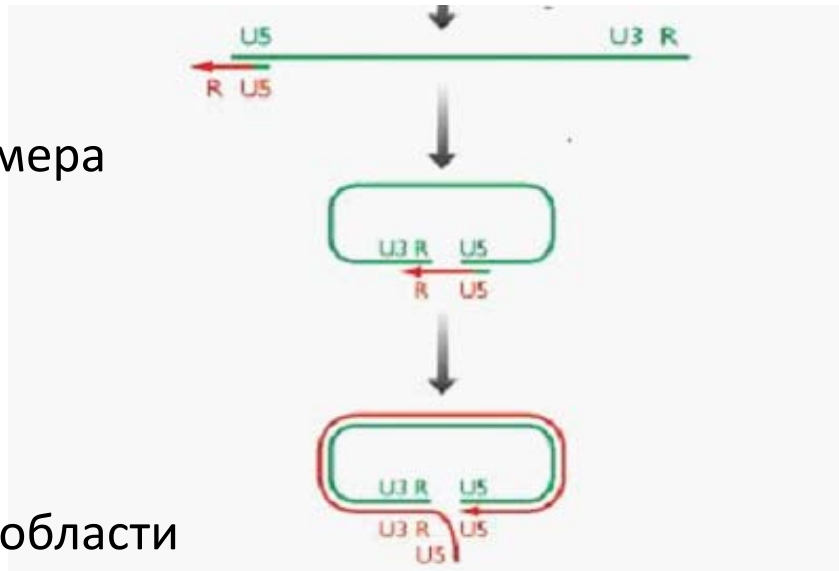
Перенос праймера

Деструкция РНК до С/Т области

Праймирование и синтез 5' LTR

Перенос праймера и старт синтеза "+" цепи ДНК

Удаление остатков РНК



Транскрипция

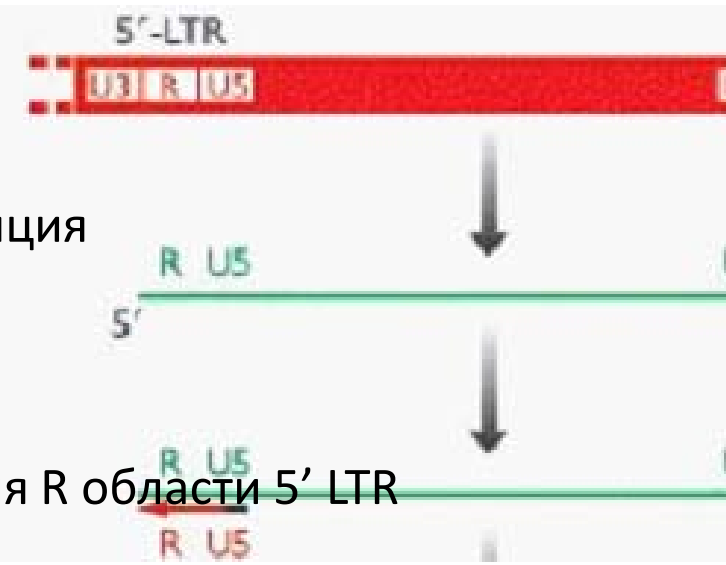
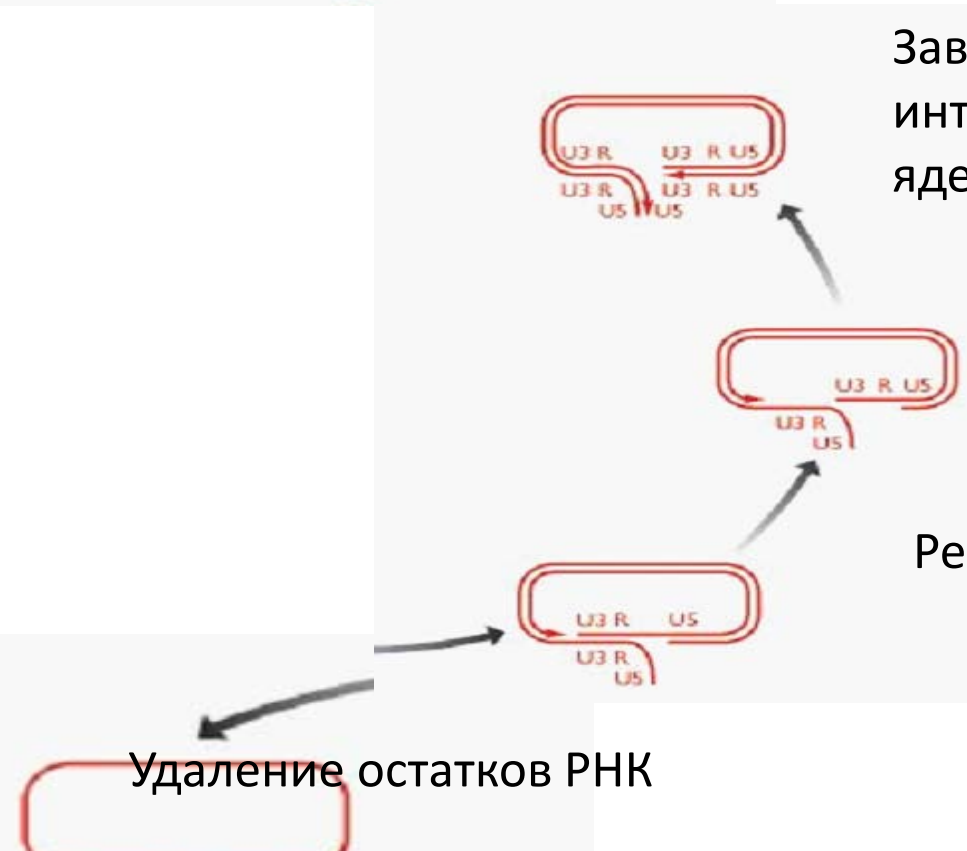
Деструкция R области 5' LTR

Инициация обратной транскрипции

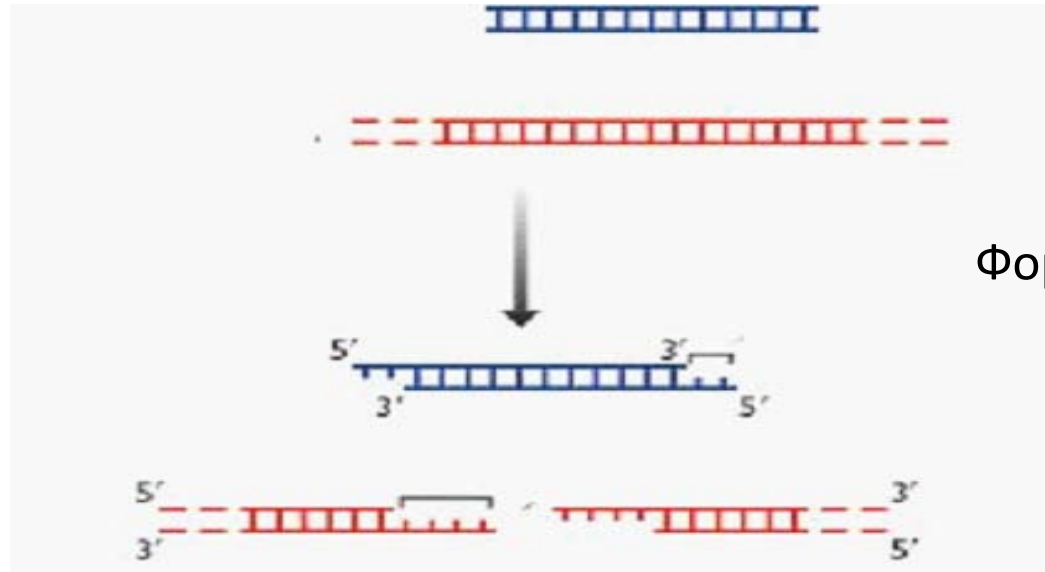
Обратная транскрипция "-" цепи ДНК

Завершение синтеза и старт интеграции ДНК вируса в ядерную ДНК

Ресинтез 5' LTR

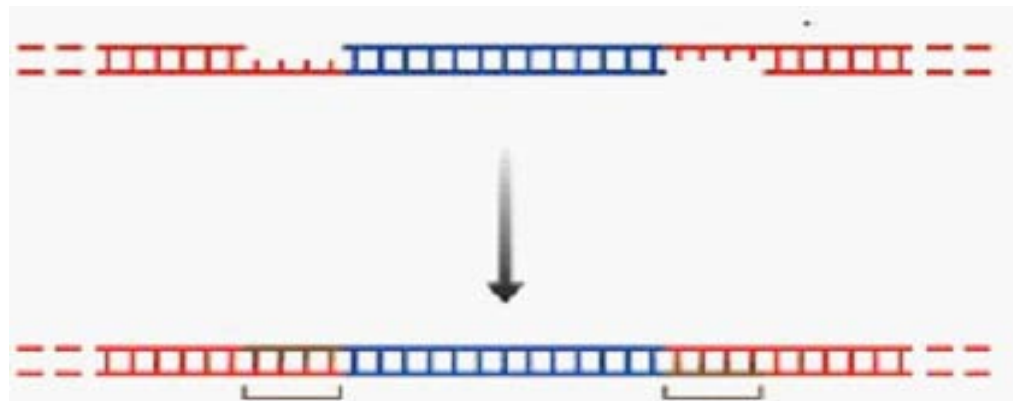


# Интеграция: ретровирусы и LTR ретроэлементы



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

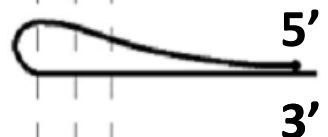


AAAA

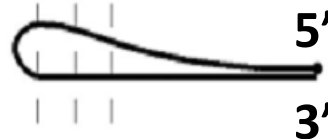
Обратная транскрипция

5' ————— 3'

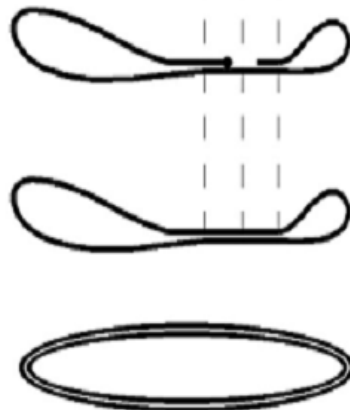
Фолдинг однонитевой ДНК при помощи МТ



Достройка ITR по ICR



Замыкание кольца однонитевой ДНК



Достройка двунитевой кольцевой ДНК

## Репликация основанная на DTR



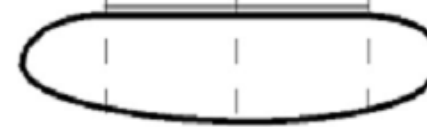
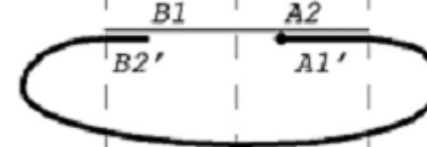
Транскрипция

AAAA

Обратная транскрипция

A1' ————— B1' — A2' — B2'

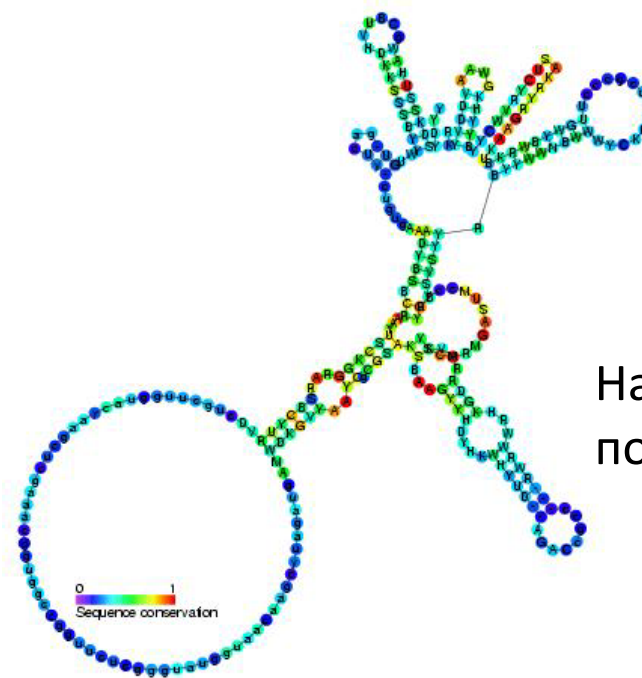
Достройка DTR по mRNA



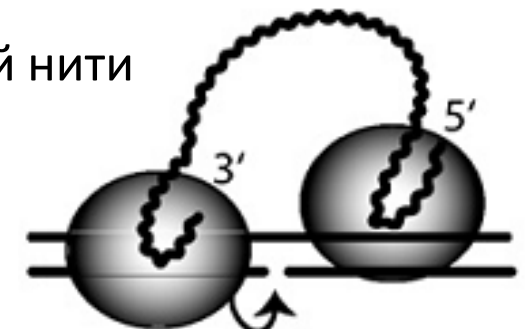
# Жизненные циклы LINE: R2 (пример TPRT)



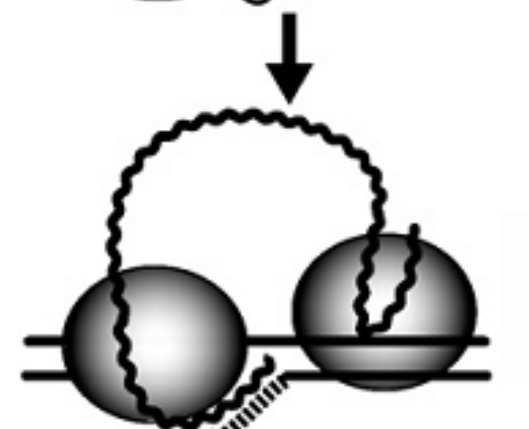
- R2 – специфический LINE. Он «паразитирует» на 28S рибосомальной РНК, и представляет собой самосплайсирующийся интрон II типа.
- R2 кодирует одну ORF, несущую эндонуклеазную активность и обратную транскриптазу.
- R2 имеет высокую специфичность к сайту встраивания в гене 12S рРНК.
- R2 утилизирует заимствованный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



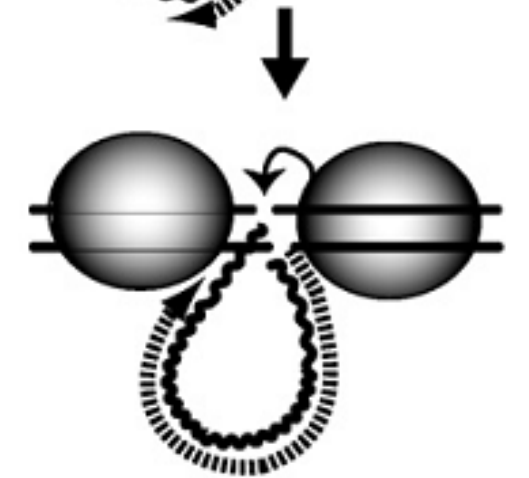
Разрез первой нити



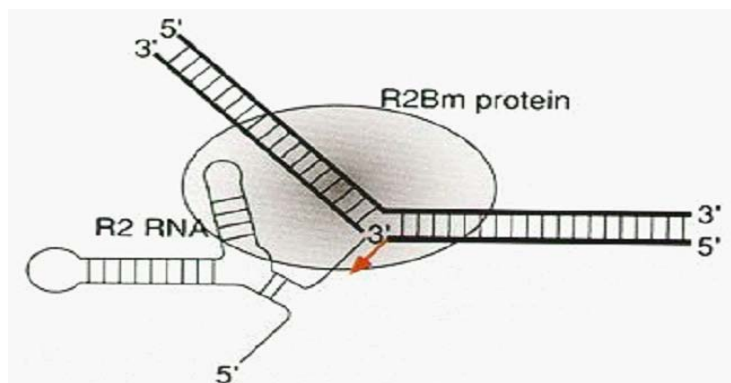
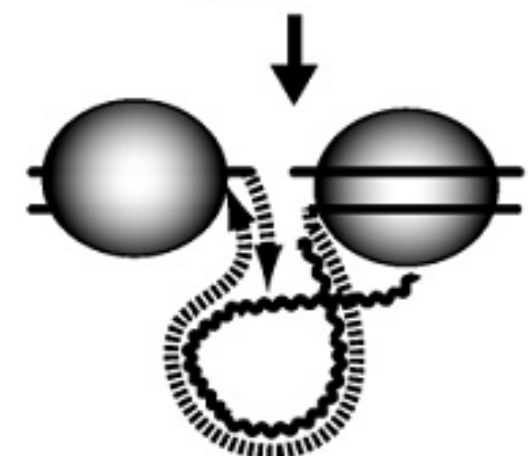
Начало RT по R2 РНК



Разрезание второй нити



Старт синтеза второй нити R2 ДНК



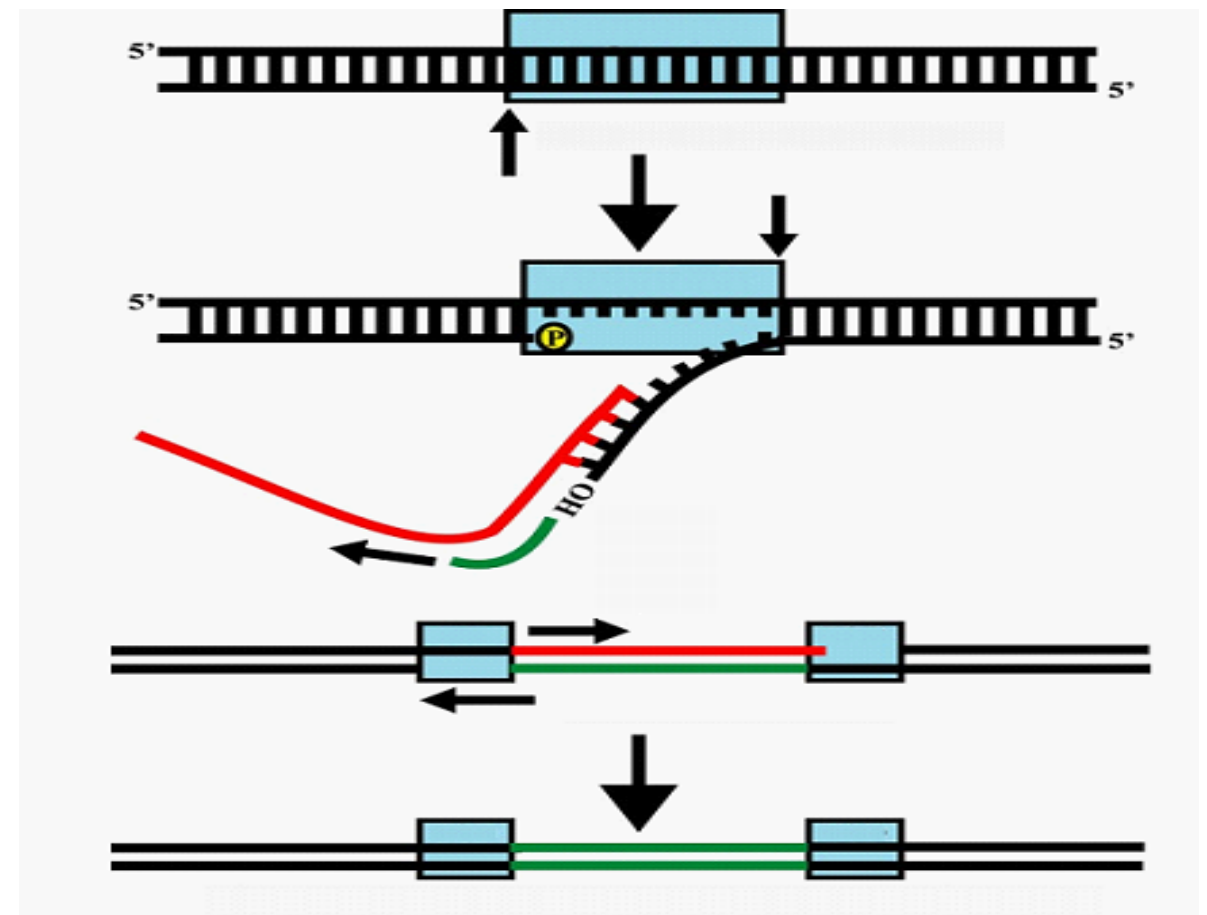
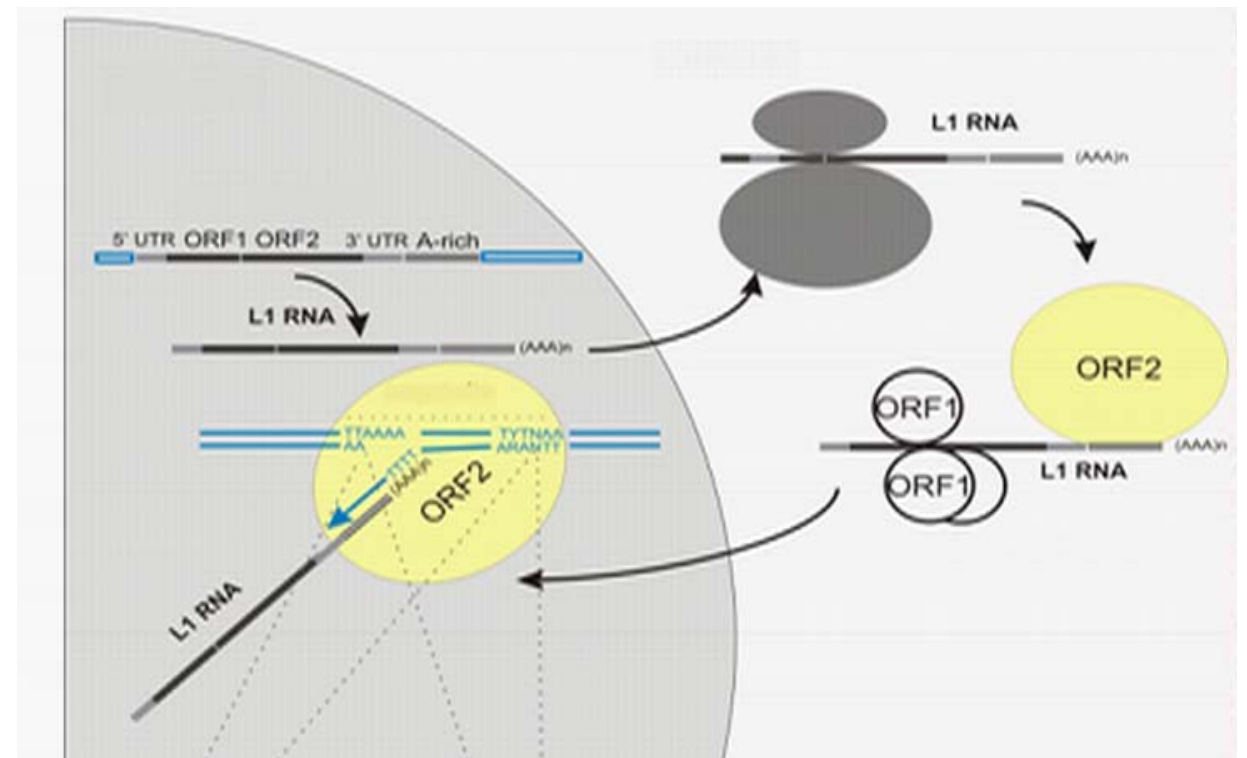
R2-LINE: Разрезание ДНК клетки и старт обратной транскрипции от свободной «-ОН» группы.



# Жизненные циклы: LINE1



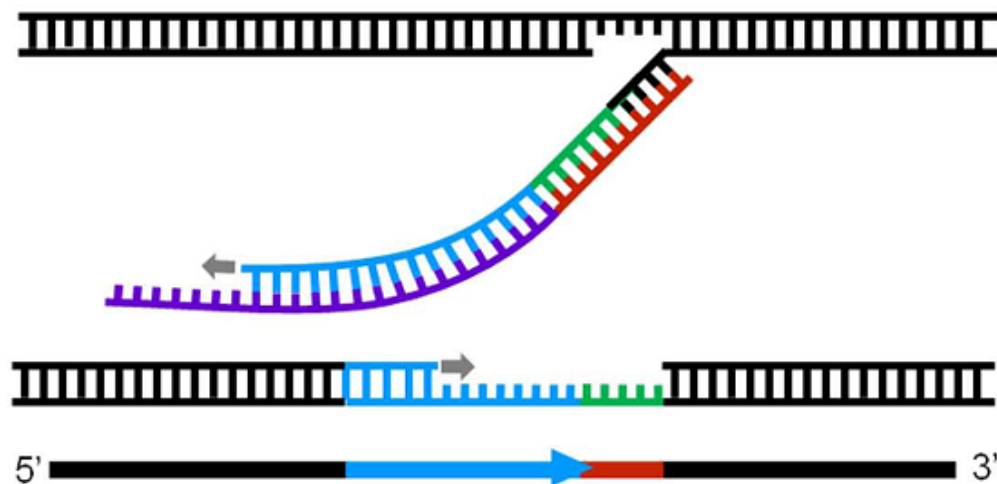
- TSD – дупликация сайта встраивания
- ORF1 = транспортный протеин
- ORF2 = EN + RT + C – ДНК-эндонуклеаза + обратная транскриптаза + домен распознавания нуклеиновых кислот
- UTR – 5'- и 3'- не транслируемые последовательности.
- Транскрипция, трансляция на рибосоме, захват свой мРНК и формирование L1 рибопротеина
- 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

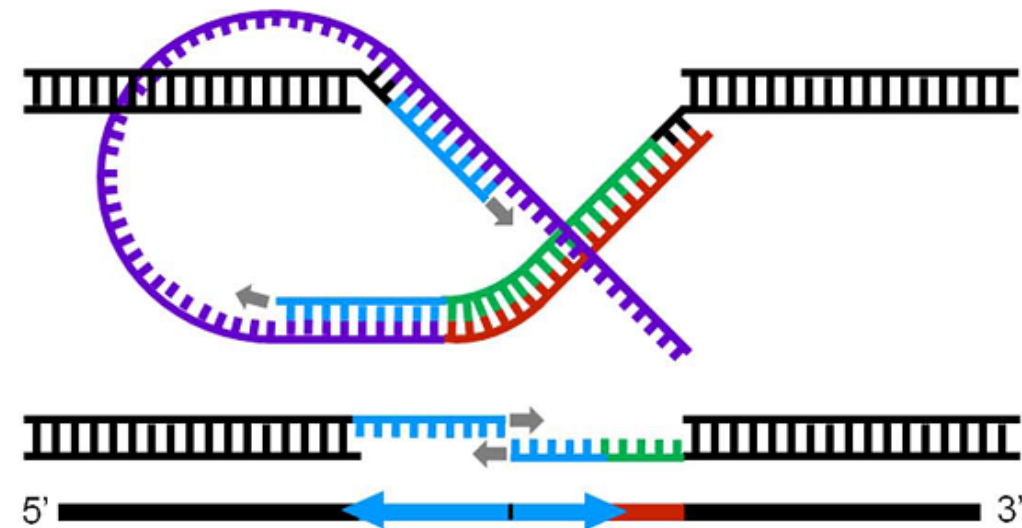
TPRT является особенно уязвимой с точки зрения «смены матриц». У LINE1 это явление может происходить даже внутри самого элемента.

Нормальный процесс TPRT



Двойной процесс TPRT.

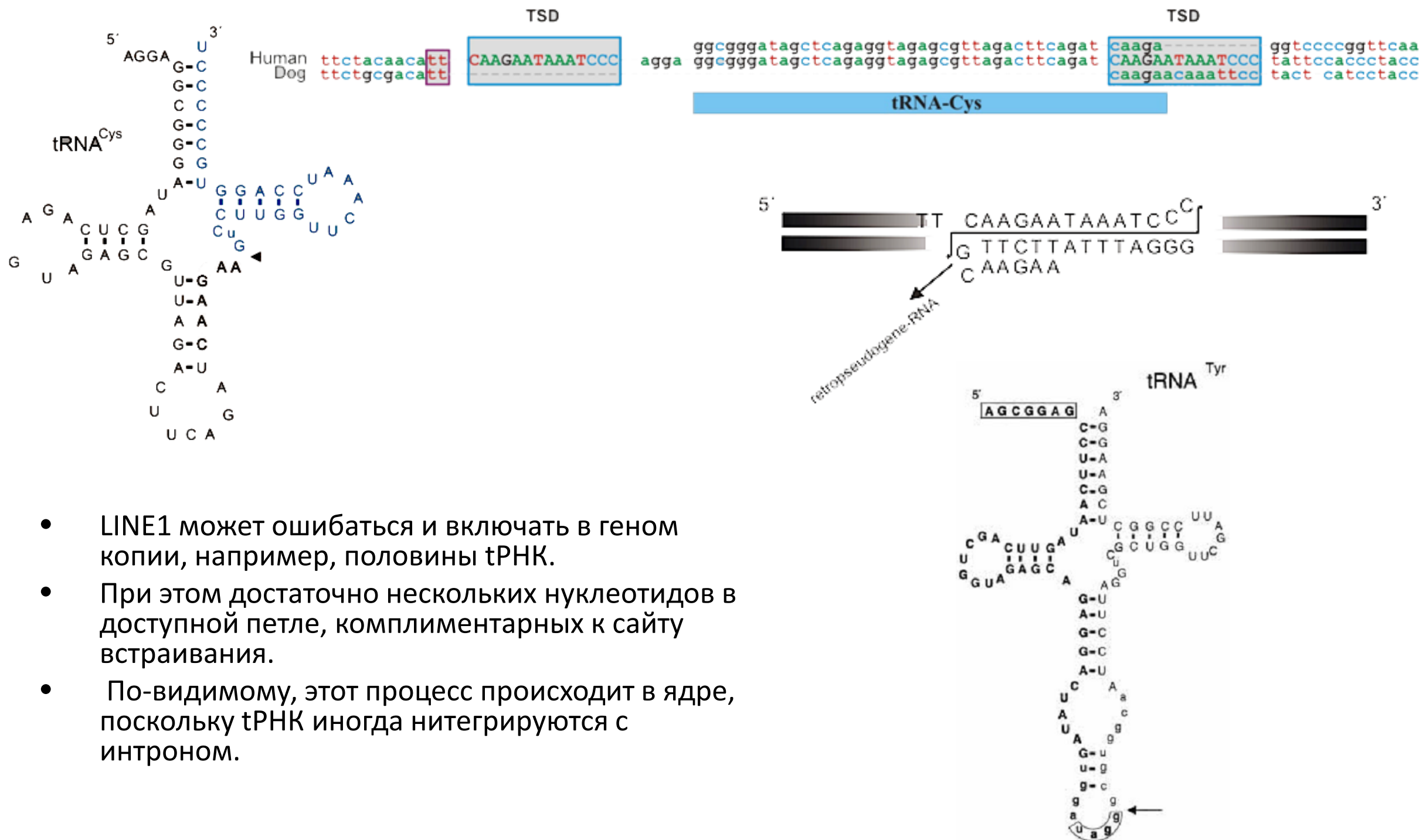
Приводит к формированию дефектной интеграции



- 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 трандукцией.
- L1 встречается во многих группах позвоночных и высших растений, однако у плацентарных, активность L1 LINE обуславливает 50% инсерционного мутагенеза.

# Жизненные циклы: LINE1 и псевдогены.

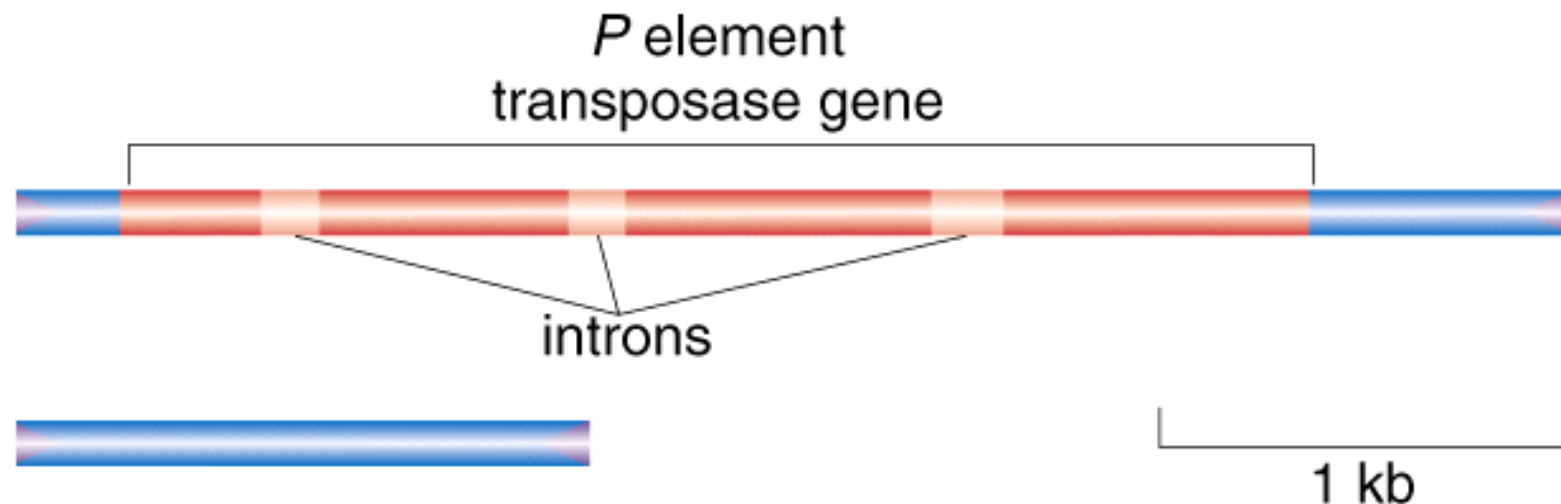
Обычно, псевдогены образуются из мРНК, имеющих поли-А хвост. Однако, поли-А хвост не является обязательным условием для возникновения псевдогена.



- 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 нитегируются с интроном.

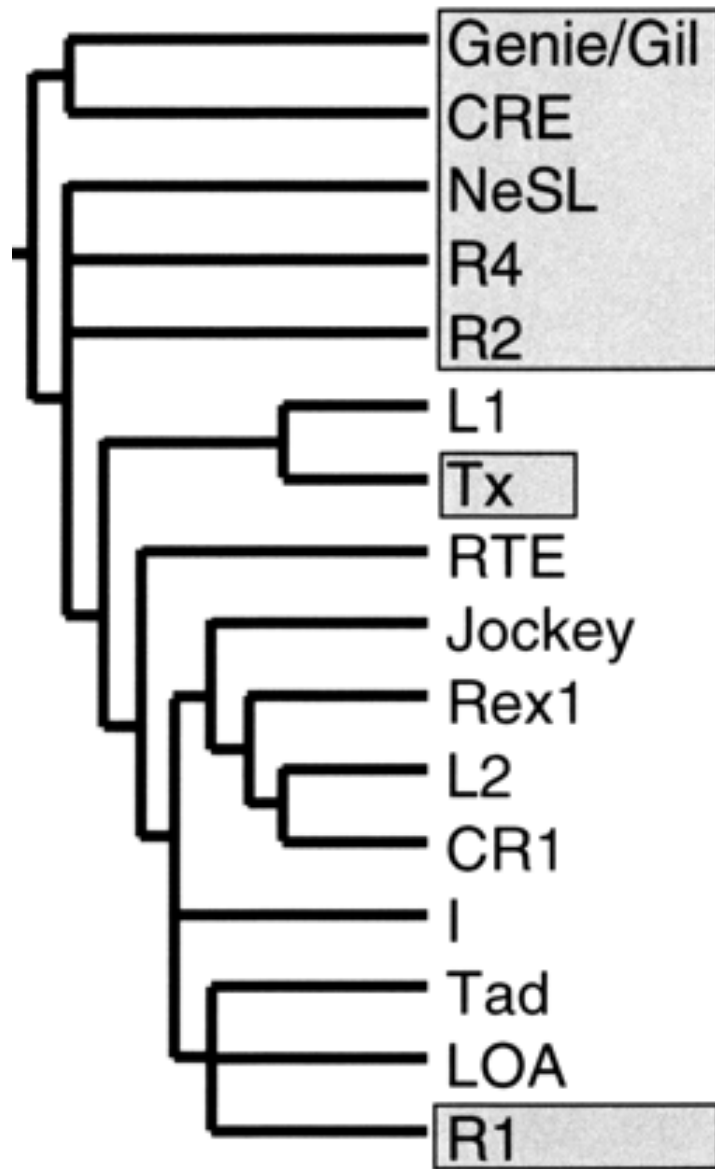


# Особенности репликации Репелоре элементов.



- 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>  |

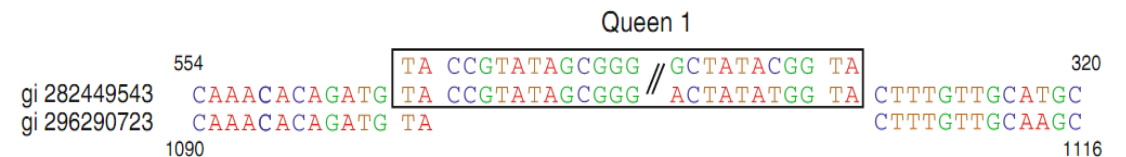
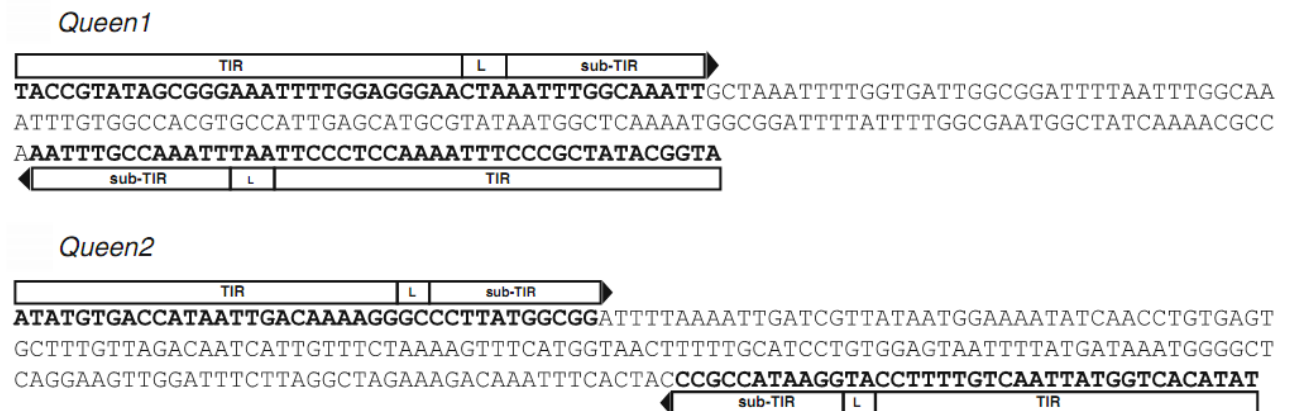
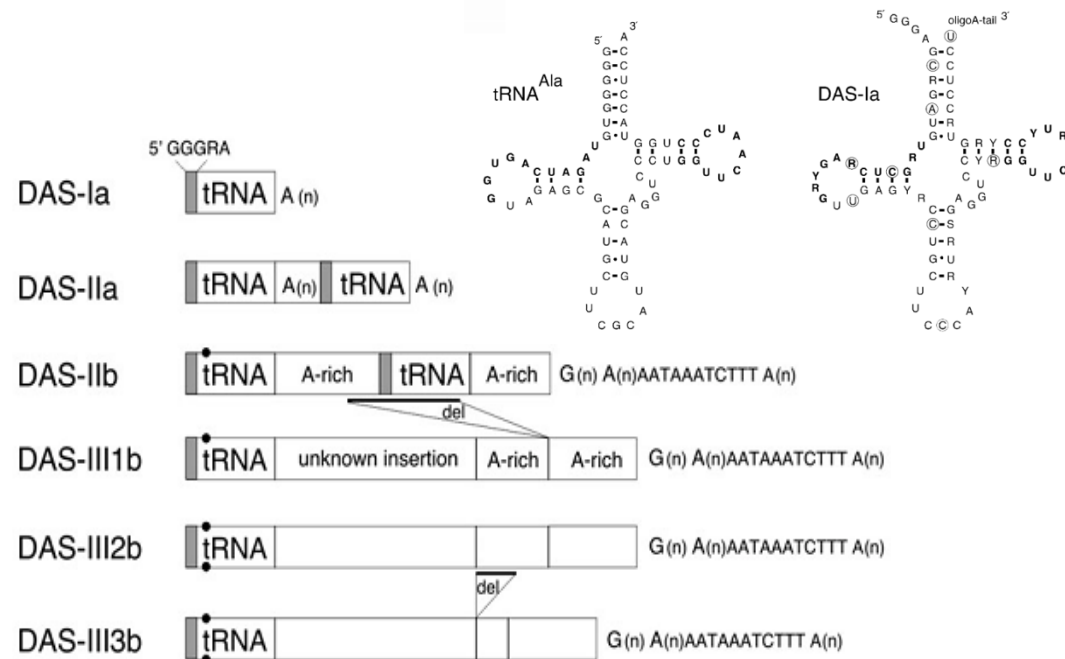
Классификация, основанная на строении и жизненных циклах.

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.

- 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.



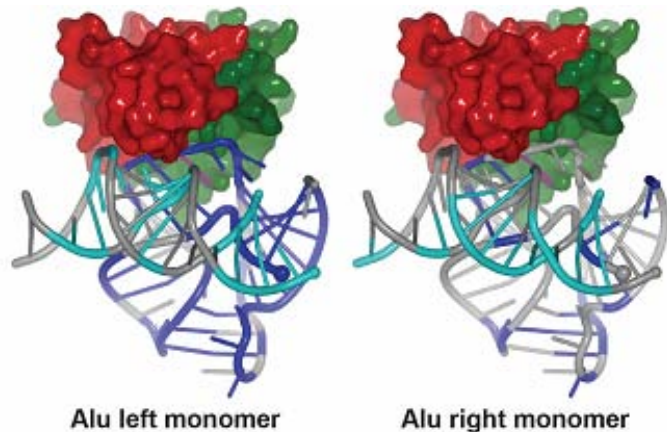
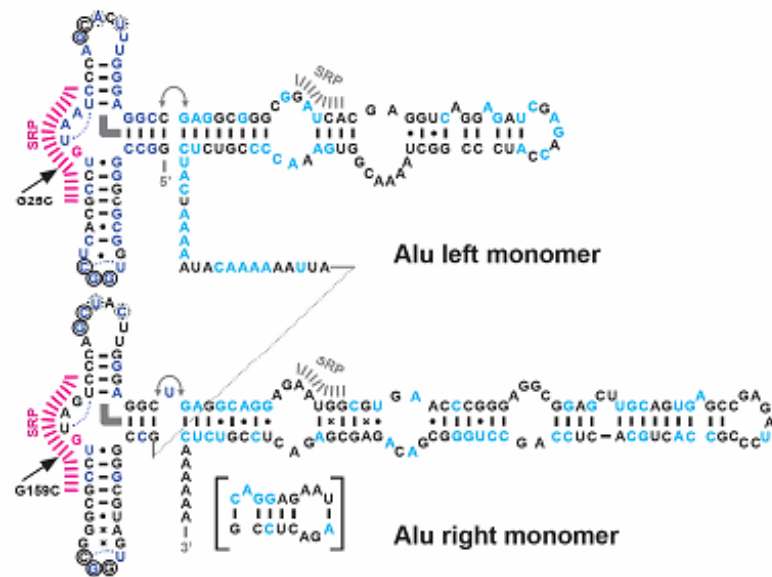
Система DAS-SINE у броненосца  
According to (Churkov et al, MBE, 2005)

Активные Queen MITE в геноме губки.  
(Erpenbeck et al, Hydriobiologia, 2011)

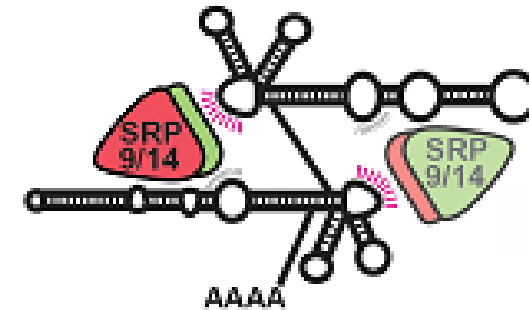
# Не автономные ретроэлементы: Alu повторы.

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

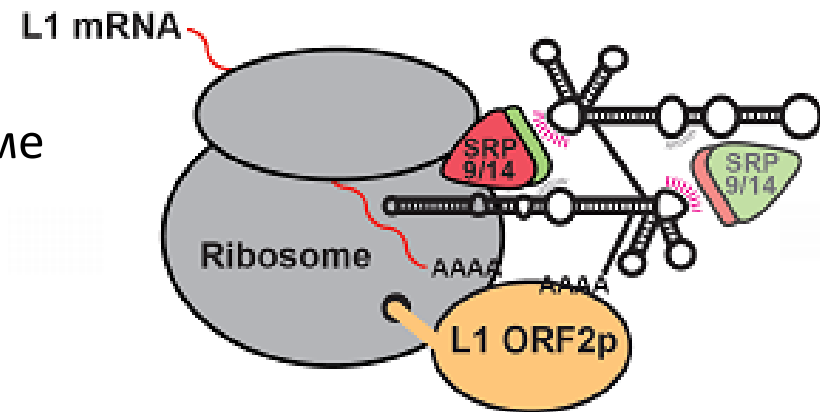
Подстановка Alu вместо L1 мРНК.



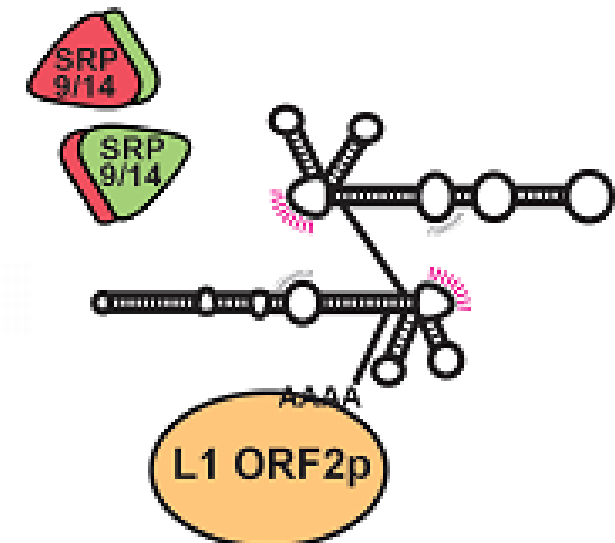
Alu в цитоплазме



Alu в на рибосоме

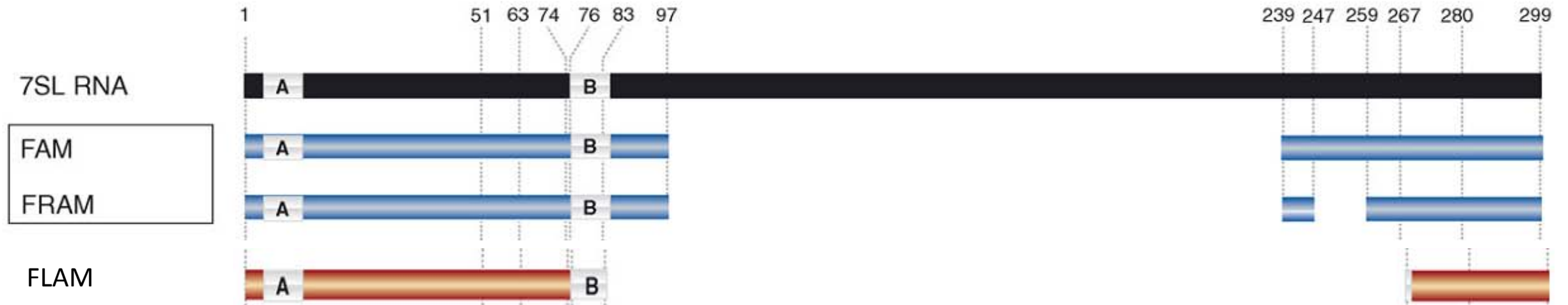


Alu вместо L1

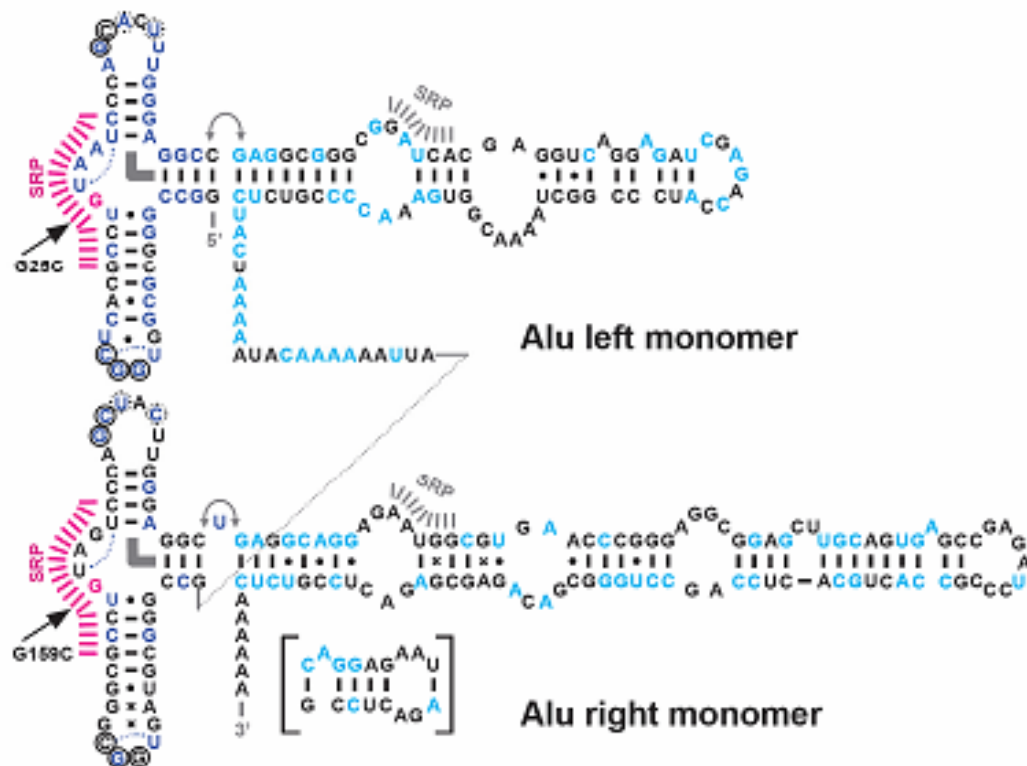


Димер. Состоит из двух мономеров: FRAM и FLAM. Произшли от 7SL РНК и могут взаимодействовать с SRP протеином.

# Происхождение Alu повторов.



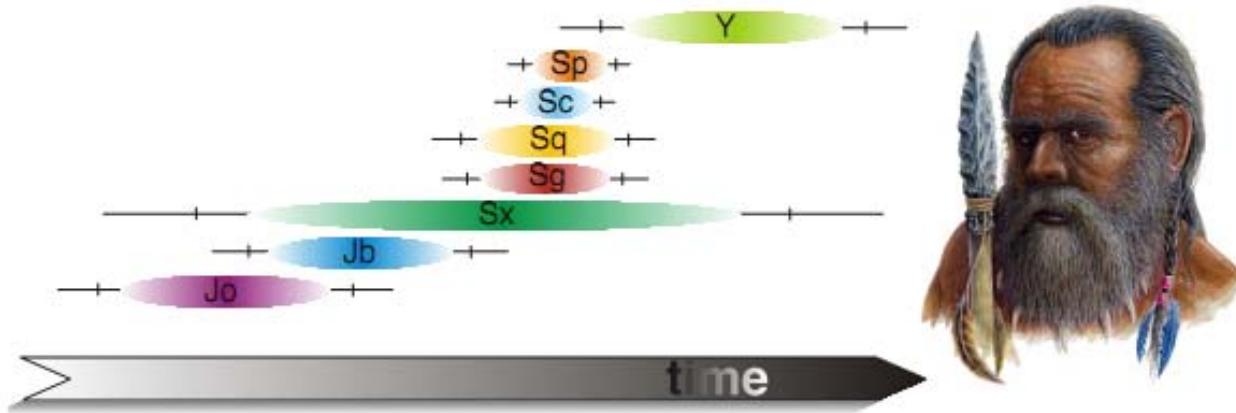
Alu повтор представляет собой комбинацию из двух остатков 7SL РНК: FLAM и FRAM, соединённых олиго-А линкером.



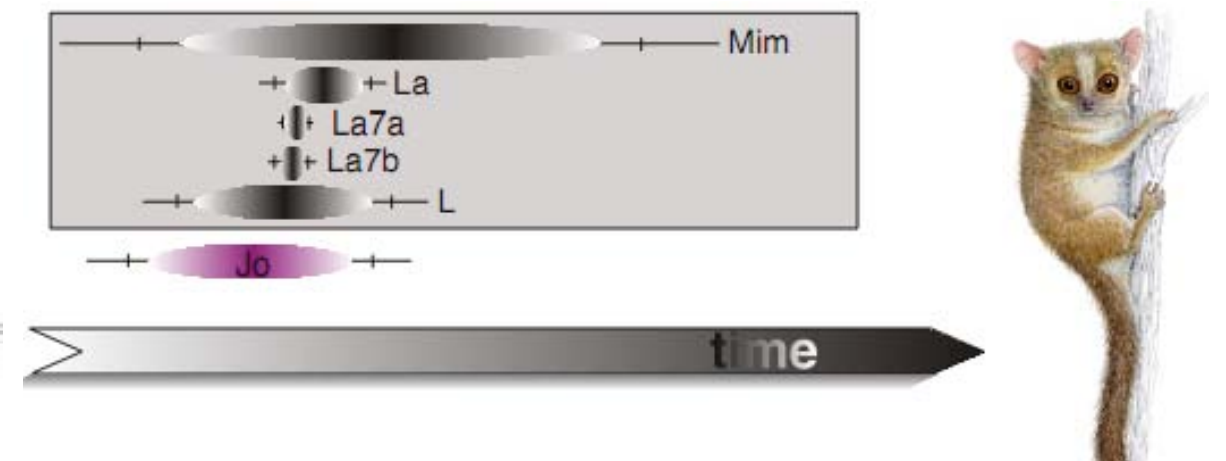
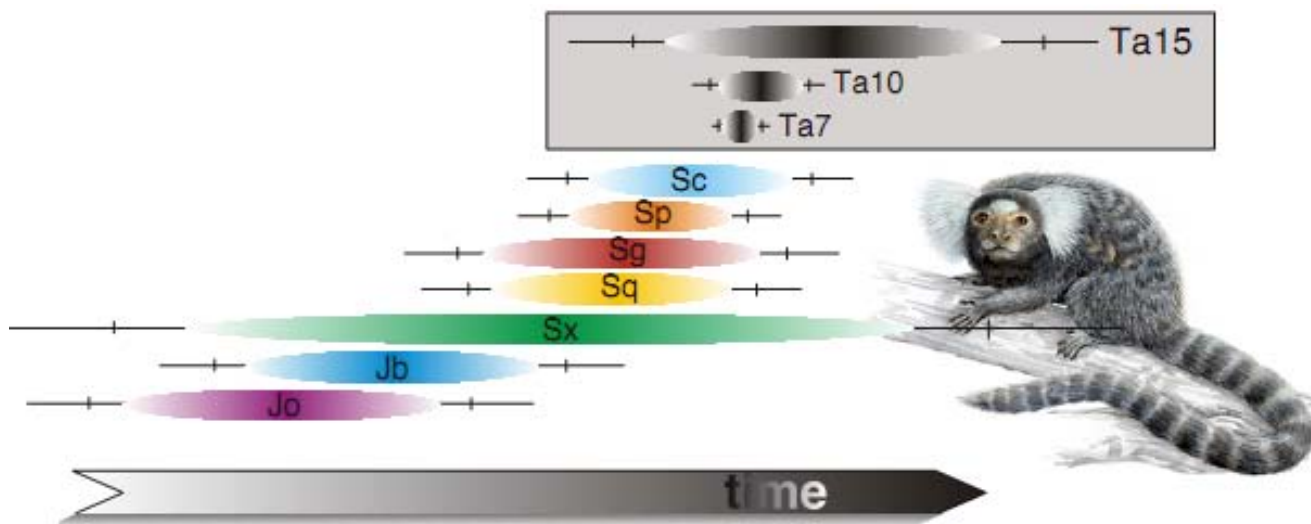
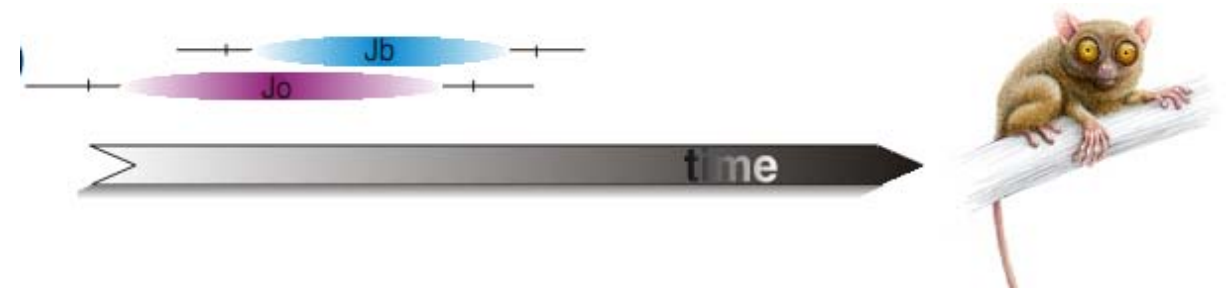
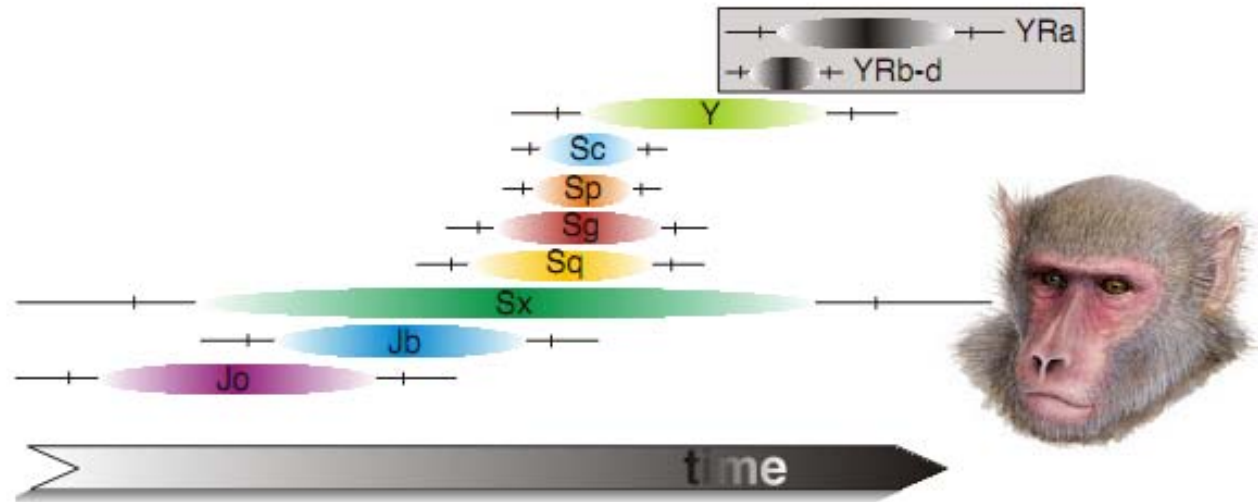
Несмотря на то, что FLAM и FRAM появились у общего предка грызунов и человека, Alu повторы образовались у предков приматов, а у грызунов FRAM, по-видимому был инактивирован, а FLAM породил большое разнообразие мономерных производных.



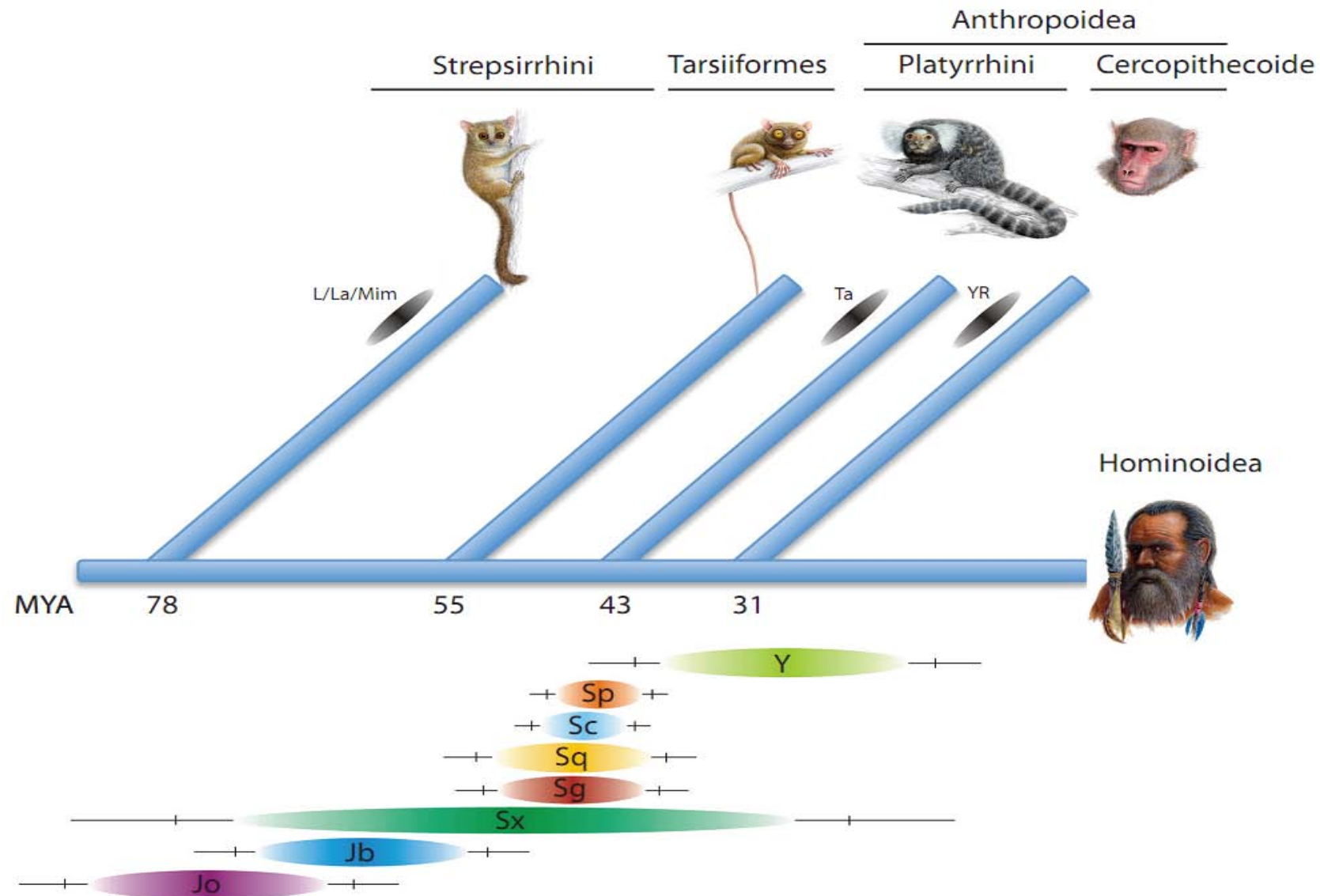
# Эволюция Alu повторов у разных приматов.



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

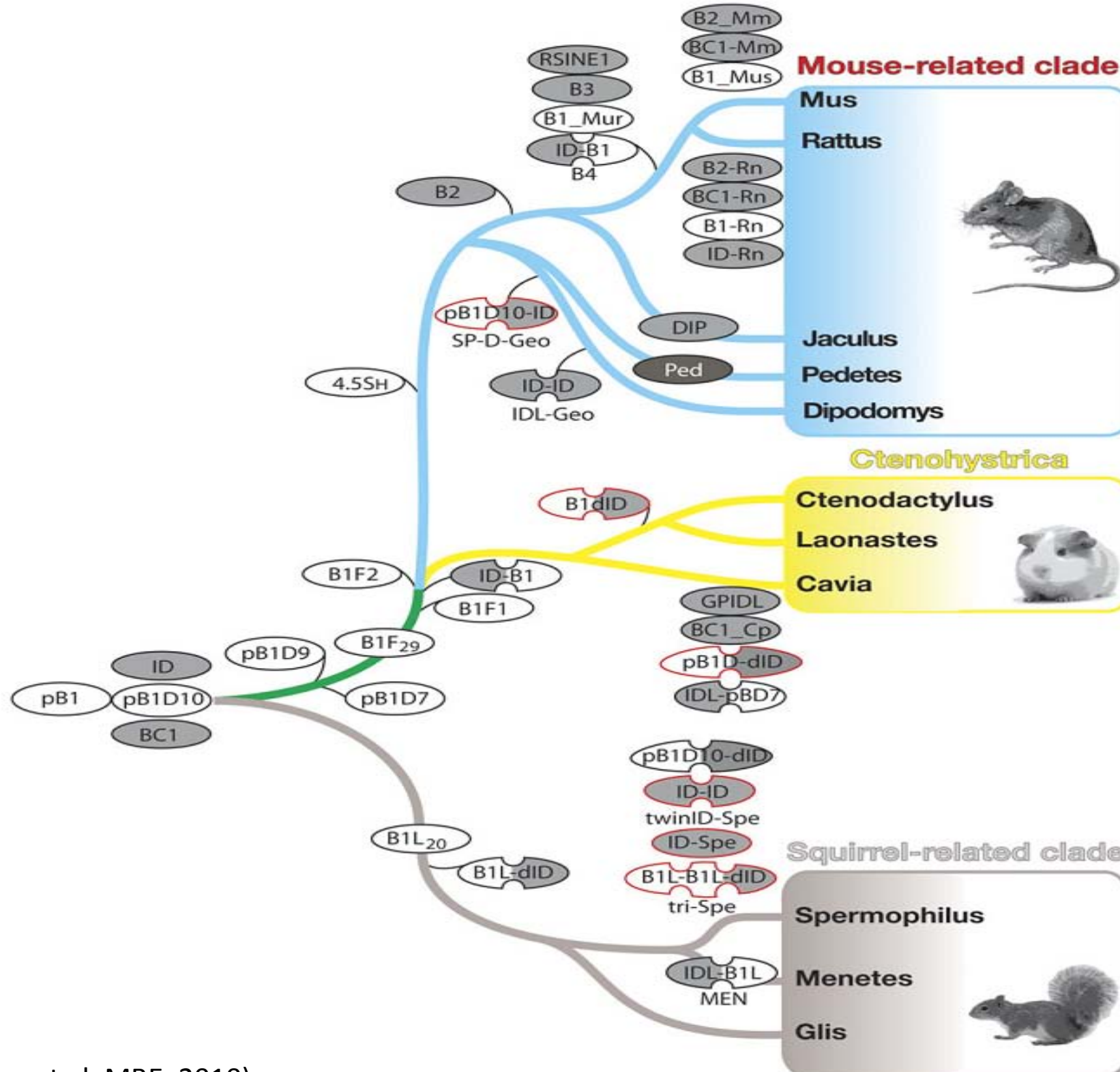


# Эволюция *Alu* повторов у разных приматов.



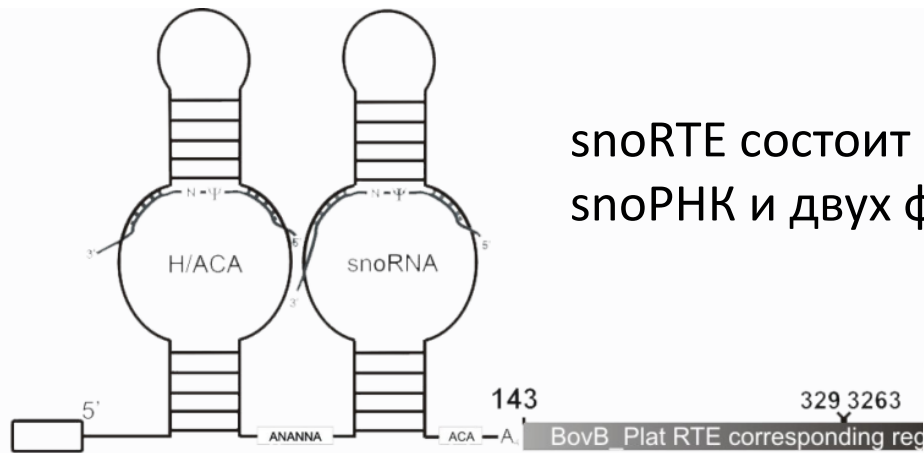
- Несколько типов *Alu* повторов были активны в одно время.
- Значительное изменение активности *Alu* повторов произошло вскоре после разделения на Обезьян Старого света и Обезьян Нового света.

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



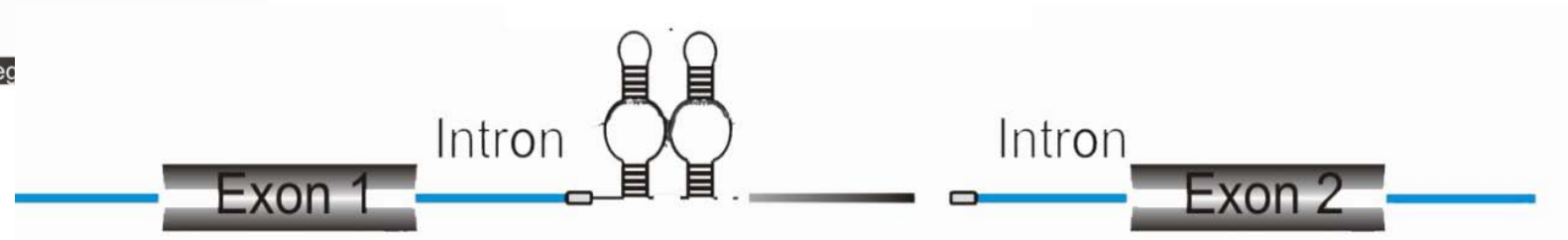


# snoRTE – неавтономный элемент с заимствованным промотором у Утконоса.

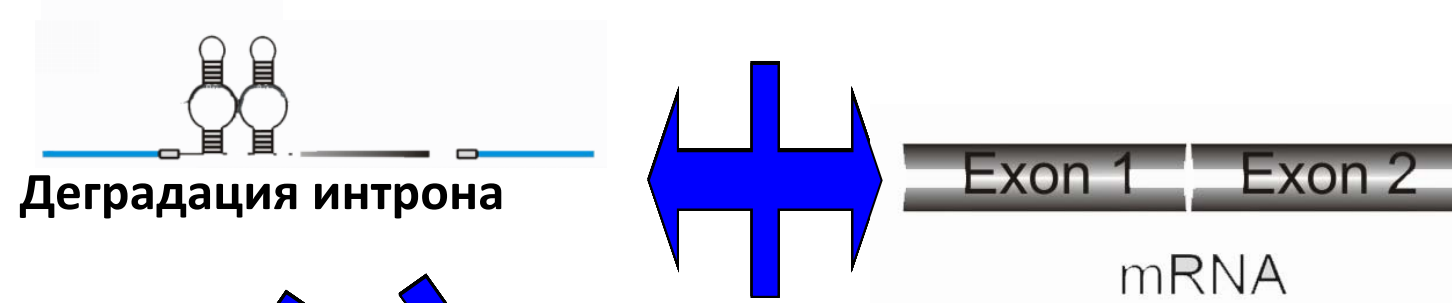


snoRTE состоит из функциональной snoРНК и двух фрагментов RTE LINE.

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



**Сплайсинг**



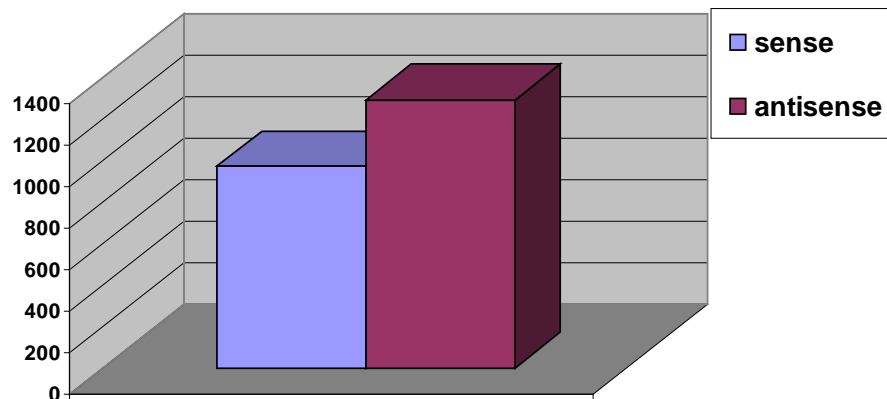
**Тримминг snoRNA**

**5'тримминг snoRNA**

**Функциональная snoRNA**

**snoRTE**

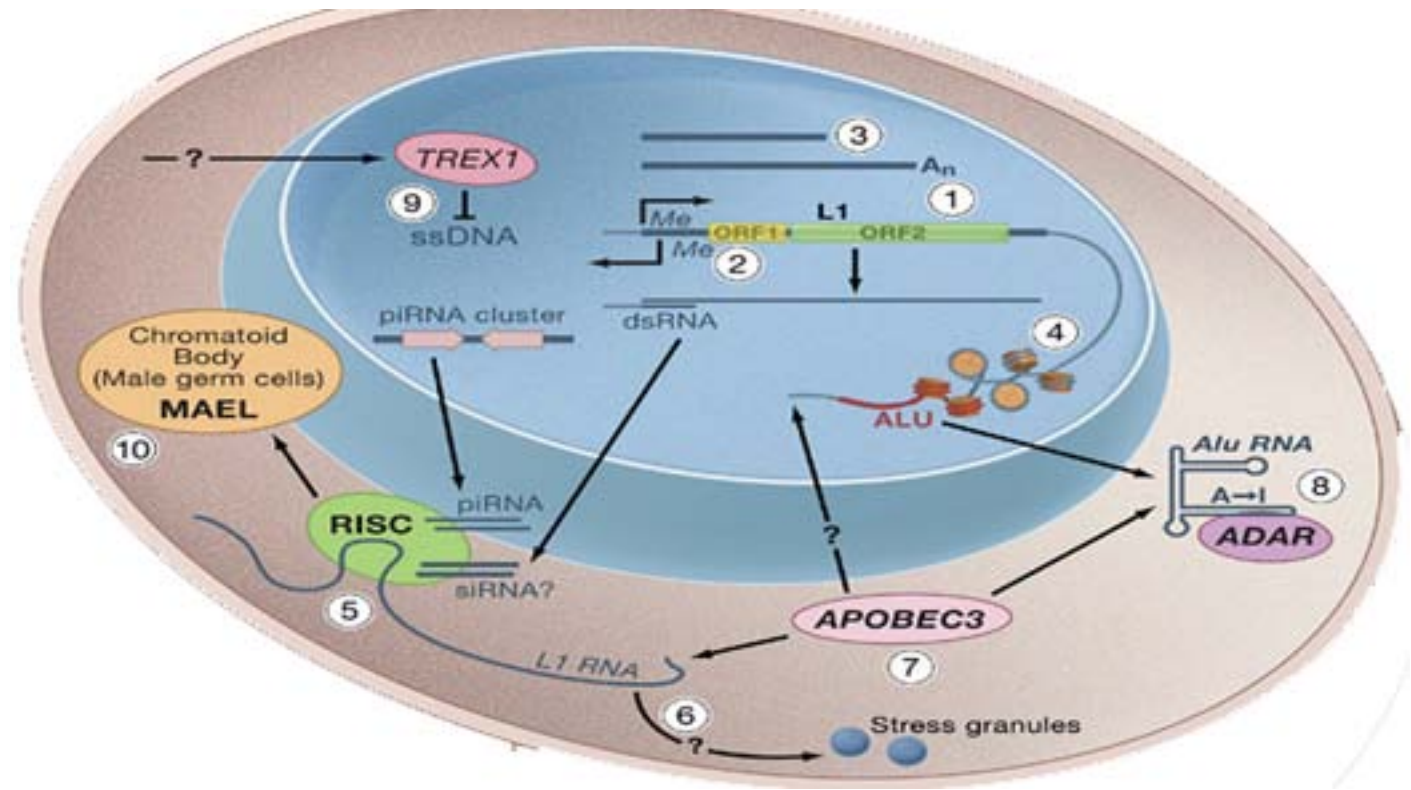
**ретропозиция**



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

# Контроль мобильных элементов клеткой

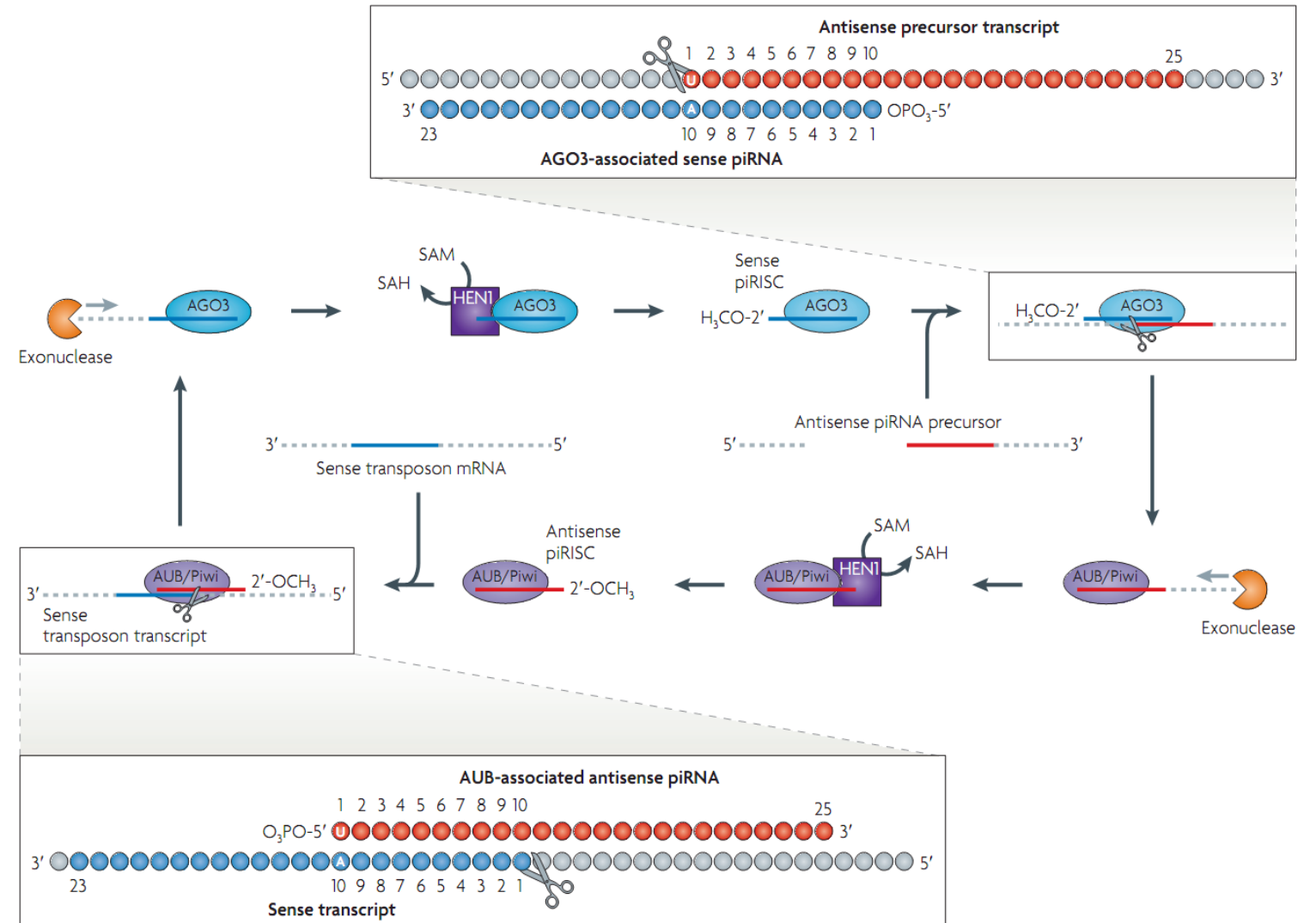
В дифференцированных соматических клетках активность мобильных элементов находится под жестким контролем со стороны различных клеточных систем.



|    |         |   |  |
|----|---------|---|--|
| 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 РНК комплекса           |
| 7  | TREX1   | Деградация однонитевой ДНК.                   | Деградация продуктов обратной транскрипции     |
| 8  | ADAR    | РНК-эдитинг                                   | Нарушение формирования РНК 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.

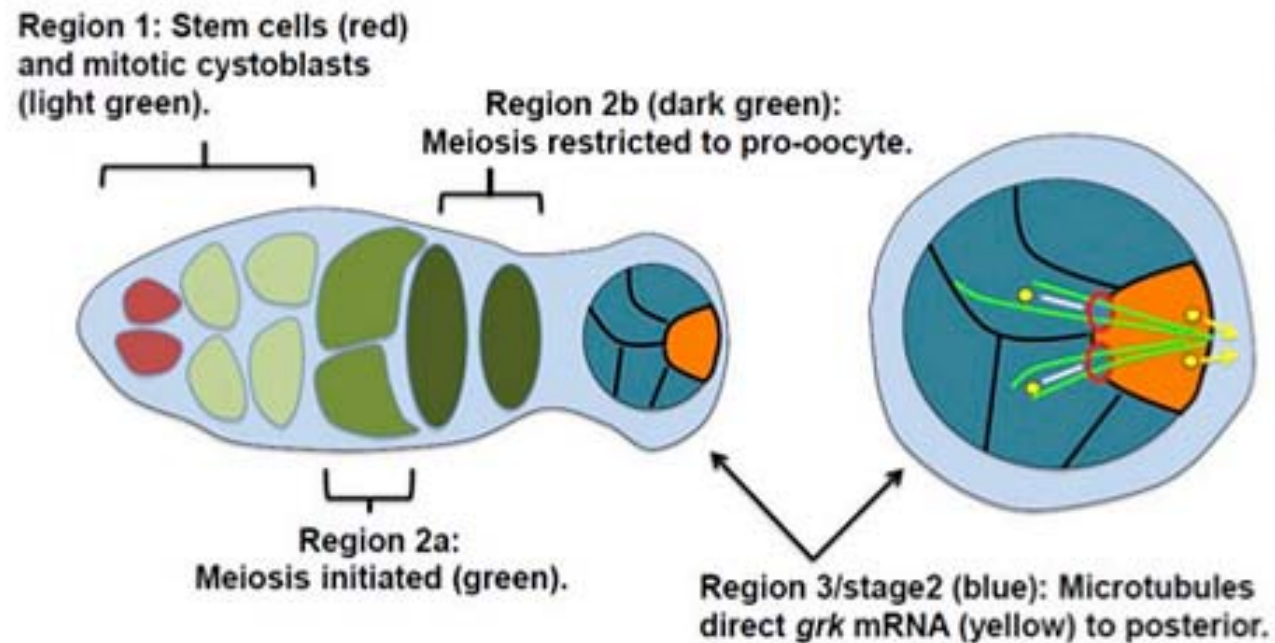


According to (Ghildiyal&Zamore, NatGen, 2009)

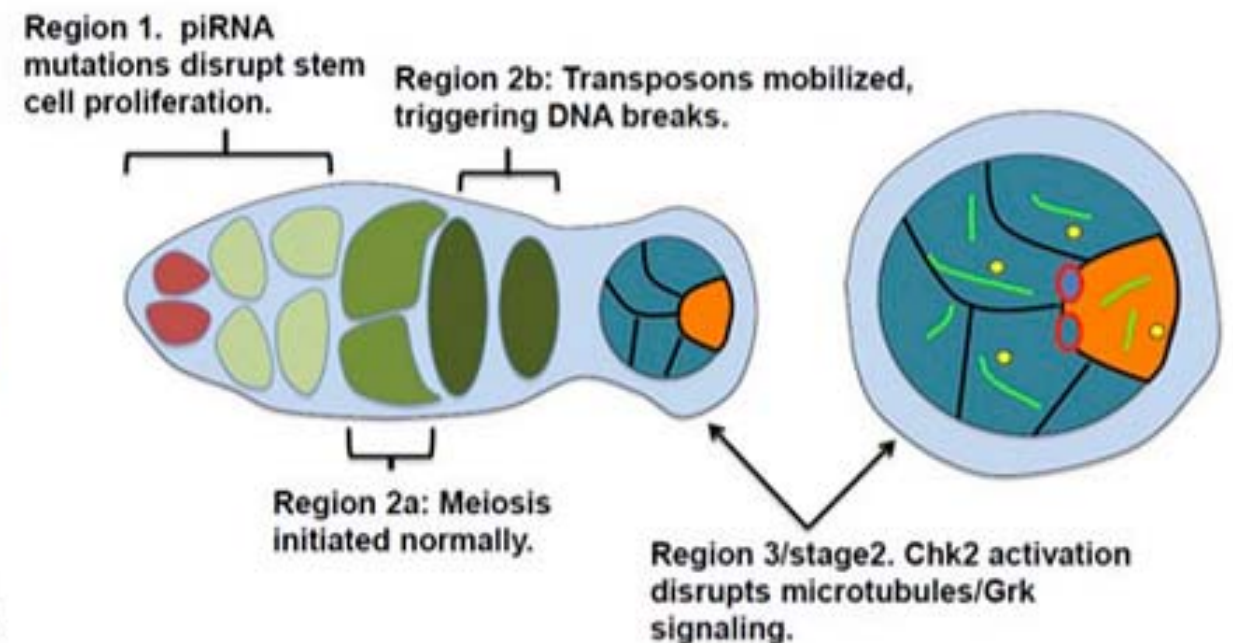
# Нокаут системы Piwi-RНК вызывает стерильность у самок дрозофилы.

- 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!**