

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ. ТРАНСПОЗИЦИИ

В геномах плазмид, бактерий и эукариот широко распространены особые генетические элементы, способные перемещаться из одного участка генома в другой, - мобильные элементы.

Разнообразные рекомбинационные процессы, лежащие в основе перемещений мобильных элементов, объединены под общим названием «транспозиции».

Транспозиции осуществляются особыми белками, гены которых, в основном, локализованы в самих мобильных элементах. Гомология между мобильным элементом и последовательностью ДНК, в которую он перемещается (ДНК-мишень), как правило, отсутствует.

Встраивание элементов, как правило, происходит в случайные сайты ДНК-мишени.

Для мобильных элементов характерно пребывание в составе хромосом или плазмид.

В большинстве своем мобильные элементы прокариот и эукариот построены по сходному плану. Сами элементы состоят из центральной части, фланкированной инвертированными повторами (ИП). Центральная часть обычно содержит ген (или гены), кодирующие белки транспозиции. **Главный белок транспозиции – транспозаза.**

У ретроземетов с длинными концевыми повторами энзим, соответствующий транспозазе, называют интегразой.

Группа мобильных элементов бактерий содержит в центральной части также гены, не имеющие отношения к транспозиции, чаще всего это факторы устойчивости к антибиотикам, лекарственным веществам или ядам. Такие элементы при их открытии получили название транспозонов (Tn). Позднее так стали называть все мобильные элементы. Далее мы тоже будем называть все мобильные элементы транспозонами.

Некоторые бактериальные транспозоны имеют на концах длинные ИП, в свою очередь являющиеся мобильными IS-элементами. В этих случаях центральная часть транспозона содержит только посторонние гены, а гены транспозиции находятся в IS-элементах, причем один из них, инактивирован одной или более мутациями.

Основные типы мобильных элементов

Структура	Ключевой ген транспозиции	Способ перемещения	Примеры
	Кодирует транспозазу	В виде ДНК, репликативная или нерепликативная транспозиция	<i>E. coli.</i> : IS1, Tn3 Кукуруза: Ac-Ds, Spm1 Соя: Tgm1 Львиный зев: Tam1 Дрозофила: P, hobo
	Кодирует транспозазу	В виде ДНК, нерепликативная транспозиция	<i>E. coli.</i> : Tn5, Tn9, Tn10 Дрозофила: FB
	Кодирует обратную транскриптазу	Через РНК-интермедиат	Дрожжи: Ty1, Ty2, Ty3 Кукуруза: Bs1 Лилия: del Дрозофила: copia, МДГ1, МДГ2, gypsy Мышь: IAP Человек: THE1
	Кодирует обратную транскриптазу	Через РНК-интермедиат	Кукуруза: cin4 Трипаносома: ingi Дрозофила: F, I Мышь: L1 Md Человек: L1 Hs

ИП абсолютно необходимы для транспозиции, поскольку именно их концы связываются транспозазой, и по ним происходит рекомбинация.

Отдельная группа ретротранспозонов не содержит никаких концевых повторов.

Все мобильные элементы, кроме последней группы, на обоих концах фланкированы дублированными прямыми повторами (ДПП) из нескольких нуклеотидов ДНК-мишени. Состав этих нуклеотидов варьирует, так как мобильные элементы внедряются в случайные сайты ДНК-мишени, но их число постоянно для каждого элемента. Чаще всего оно равно 5.

Таковы общие представления о структуре мобильных элементов.

Далее отдельно рассмотрим мобильные элементы прокариот и эукариот.

Структура мобильных элементов определяет механизмы их перемещений. Хотя эти механизмы различаются в деталях, имеется **общий принцип** реакций транспозиции.

Процесс происходит в 3 этапа.

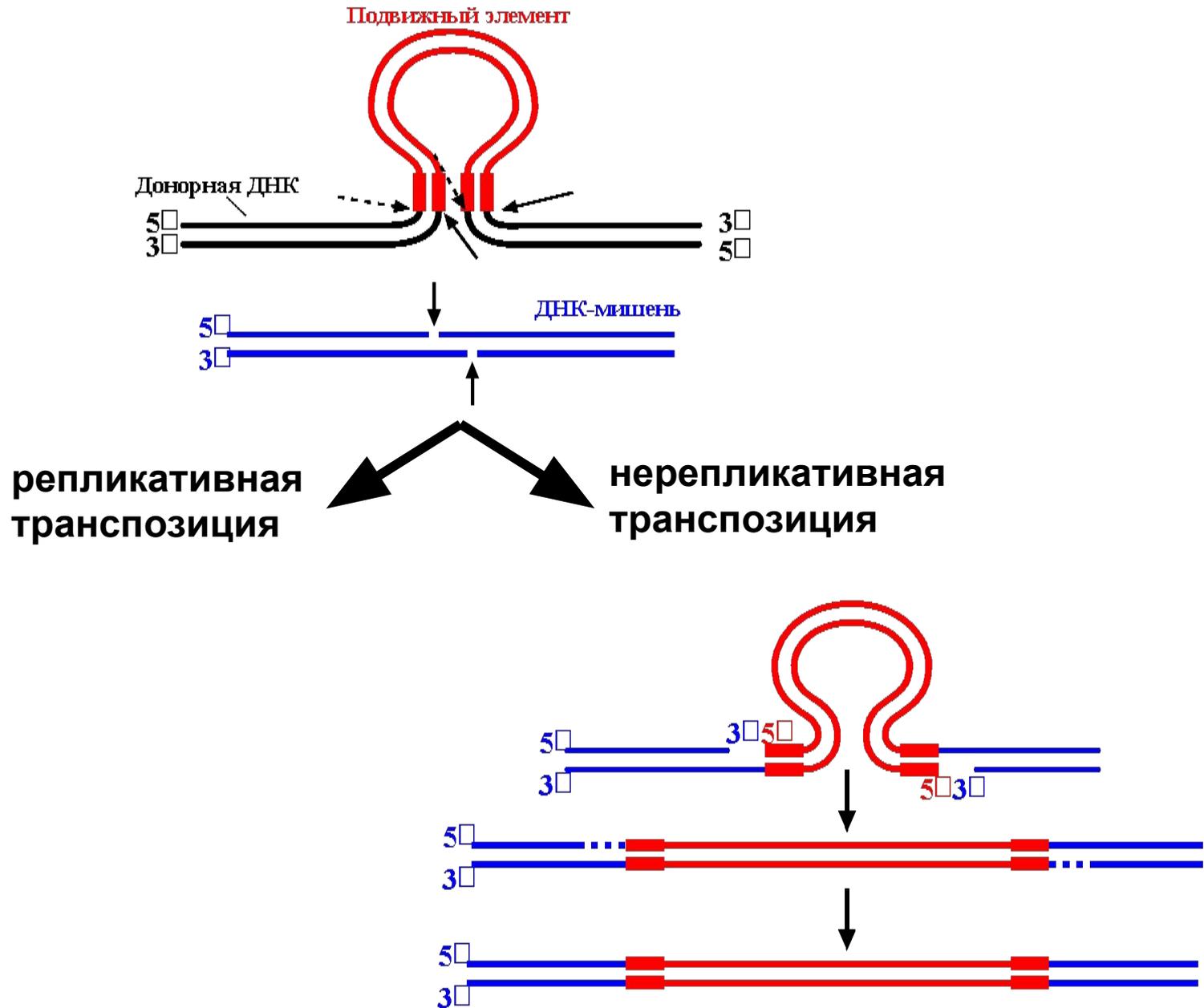
На первом этапе 2 молекулы транспозазы соединяются с концами подвижного элемента, сводят концы вместе и генерирует в них разрывы, чаще всего в обеих цепях. Затем транспозаза делает в обеих цепях ДНК-мишени ступенчатые разрывы, отстоящие друг от друга на столько пар нуклеотидов, сколько обнаруживается в ДПП данного элемента.

Второй этап – обмен цепями, приводящий к рекомбинации между ДНК оставляя, за счет ступенчатости разрывов, бреши между 5'-Р-концами элемента и 3'-ОН-концами мишени. Катализируемое транспозазой расщепление и замыкание концов цепей ДНК происходит без потери энергии связей и не требует АТФ, что напоминает консервативную сайт-специфическую рекомбинацию. Отличие от последней заключается в том, что транспозаза не образует ковалентной связи с 5'-Р концом ДНК.

На третьем этапе происходит репаративный синтез брешей, формирующий ДПП, а иногда еще и репликация элемента. Таков общий общий механизм транспозиционной рекомбинации.

Различные конкретные механизмы транспозиций рассмотрим одновременно с описанием различных классов мобильных элементов.

Схема, демонстрирующая общий принцип реакций транспозиции



МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ПРОКАРИОТ: IS-элементы, транспозоны

Для бактерий и плазмид характерны мобильные элементы с короткими или длинными ИП. Длина ДПП, как правило, 5 или 9 п.н.

Бактериальные мобильные элементы можно разделить на две основные группы:

1. IS-элементы: небольшие (размером не более 2,5 т.п.н.) элементы, которые состоят из центральной части с геном транспозазы, фланкированной двумя инвертированными повторами.
2. Собственно транспозоны, которые несут, кроме транспозазы, другие гены, не имеющие отношения к транспозиции (чаще всего гены устойчивости к антибиотикам).

Собственно транспозоны можно в свою очередь разделить на следующие группы

- 1) Сложные транспозоны (семейство Tn3) – короткие ИП на концах, делают в ДНК-мишени ДПП из 5 п.н. и перемещаются по механизму репликативной транспозиции.
- 2) Составные транспозоны (Tn5, Tn9, Tn10) с длинными ИП, представляющими собой различные IS-элементы. Длина ДПП обычно 9 п.н.

Примеры прокариотических мобильных элементов приведены в следующей ниже таблице.

Структура мобильных элементов прокариот

Общая схема структуры мобильных элементов прокариот



Элемент	Размер (п.н)	Длина инвертированного повтора (п.н.)	Длина дуплицир. повтора (п.н.)
IS1	768	18/23	9
IS2	1327	32/41	5
Tn3 (Ap ^r)	4957	38	5
Tn5 (Km ^r)	~5400	IS50 (1531-1533)	9
Tn9 (Cm ^r)	2638	IS1 (прямой) инв. повтор 18/23	9
Tn10 (Tc ^r)	~9300	IS10 (~1400)	9
Фаг Mu	~38000	2 (5' TG- - - ЦА 3')	5

Теперь рассмотрим детали. Основные механизмы транспозиций изображены на рисунках, следующих ниже.

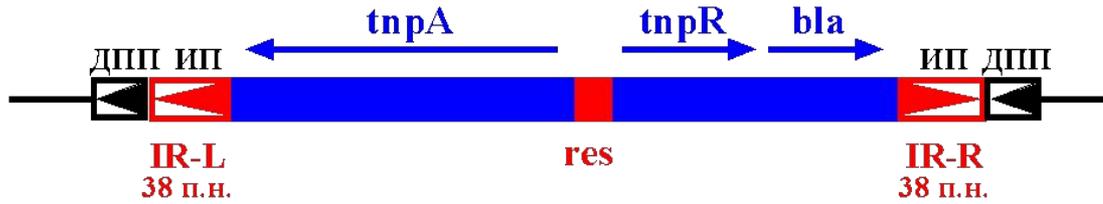
Репликативная транспозиция отличается тем, что мобильный элемент, перемещаясь в другую молекулу, оставляет свою копию в исходной ДНК. Это может произойти только за счет удвоения (репликации) элемента.

При репликативной транспозиции на концах подвижного элемента происходят разрывы с образованием выступающих 3'-ОН-концов. Одновременно транспозаза делает разрывы в ДНК-мишени. 3'-ОН-концы подвижного элемента ковалентно связываются с 5'-Р-концами мишени, и образуется структура с двумя вилками репликации на концах подвижного элемента. В вилках репликации иницируется синтез ДНК (направленный «внутри»). В результате образуется две копии мобильного элемента. При этом репликоны, содержащие «старую» и «новую» копию мобильного элемента сливаются (образуется **коинтеграт**).

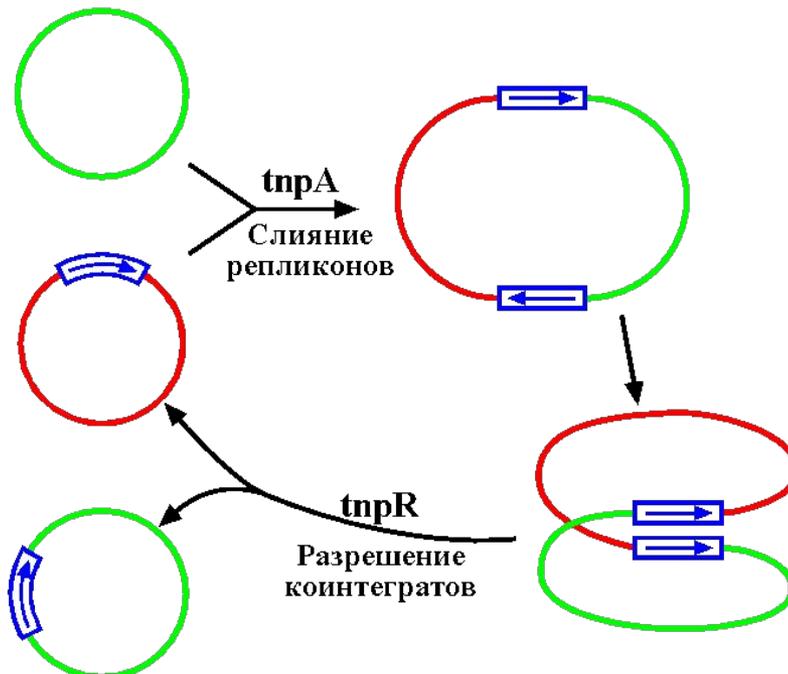
Коинтеграты разрешаются (разрезаются) на 2 репликона в рекомбинационном *res*-сайте ферментом резолвазой. Старая и новая копии мобильного элемента в коинтеграте находятся в одной ориентации, и разрешение коинтеграта идет через сложную фигуру, напоминающую восьмерку. В результате снова образуется 2 репликона, но теперь каждый из них несет копию мобильного элемента. Реакция относится к сайт-специфической рекомбинации.

Репликативный механизм транспозиции распространен сравнительно мало. Он обнаружен у мобильного элемента *Is6*, фага *Mu* и бактериальных транспозонов семейства *Tn3* с короткими ИП.

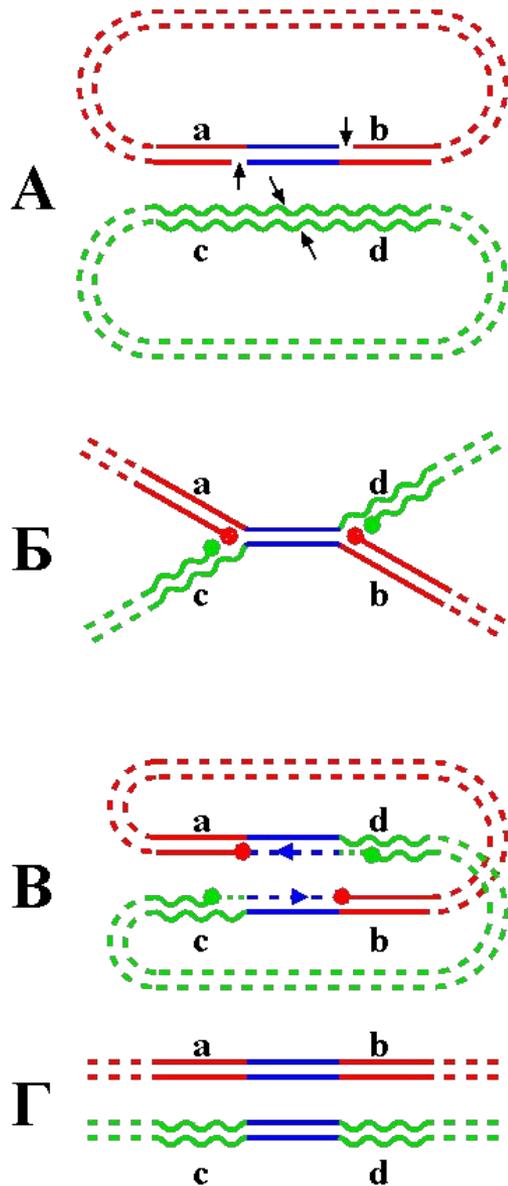
Структура транспозона Tn3



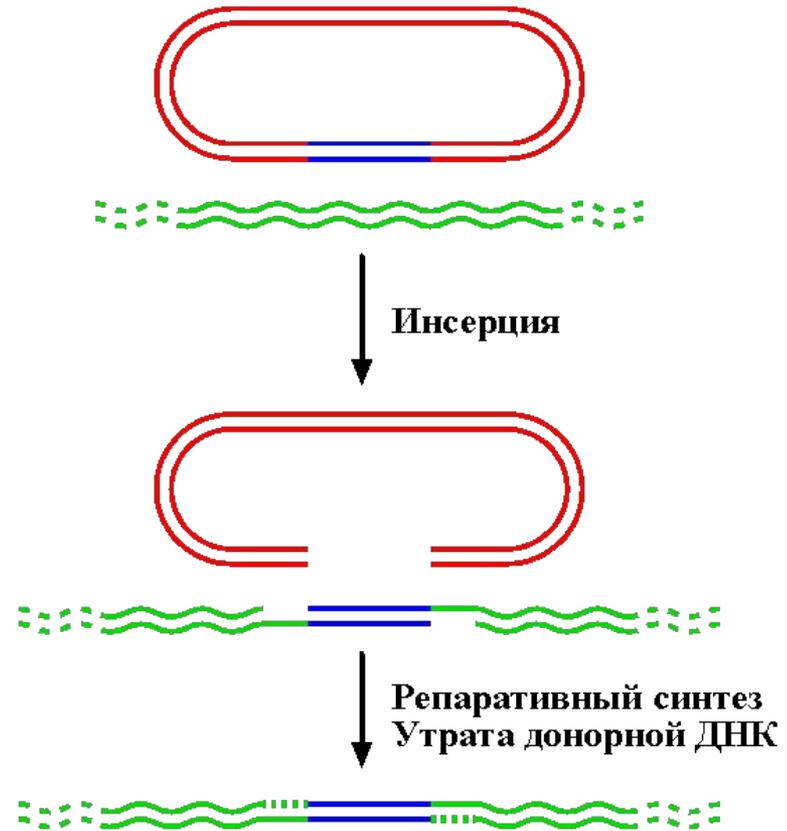
2 этапа репликативной транспозиции Tn3



Модель репликативной транспозиции (Shapiro, 1979)



Модель нерепликативной транспозиции (Berg, 1977)



Транспозон Tn3 представляет семейство мобильных элементов с короткими ИП (35-50 п.н.), перемещающимися с помощью репликативной транспозиции и образующими ДПП из 5 п.н.

У самого Tn3 центральная часть содержит гены транспозазы, резолвазы и бета-лактамазы *bla* (обеспечивает устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда). Ген транспозазы *tnA* кодирует большой белок из примерно 1000 а.о., ген резолвазы *tnR* кодирует белок из 185 а.о. Гены транспозазы и резолвазы транскрибируются в противоположных направлениях с промоторов, расположенных в межгенном пространстве длиной 170 п.н. В межгенном пространстве находится и сайт *res*, по которому происходит разрешение коинтегратов. Транскрипции генов резолвазы и транспозазы конкурируют друг с другом, и ген резолвазы выступает как ген-регулятор гена транспозазы.

К семейству Tn3 относятся Tn1, Tn1000 и др.

Большинство прокариотических мобильных элементов перемещается с помощью **нерепликативной** транспозиции.

Нерепликативная транспозиция заключается в вырезании элемента и его перемещении в новое место. При этом 2 молекулы транспозазы связываются с концами мобильного элемента и делают разрывы одновременно в обеих цепях ДНК на концах мобильного элемента и в ДНК-мишени. Далее транспозаза сводит вместе концы мобильного элемента и ДНК-мишень, 3'-ОН-концы элемента соединяются с 5'-Р-концами ДНК-мишени, а между 3'-ОН-концами ДНК-мишени и 5'-Р-концами элемента образуется брешь, которая заполняется с помощью репаративного синтеза ДНК, в результате чего на концах мобильного элемента возникают ДПП строго фиксированной длины.

В исходном репликоне остается ДНР. Будет ли он репарирован – зависит хозяйской клетки.

Этот механизм характерен для большинства мобильных элементов бактерий и эукариотических элементов с короткими ИП. По такому типу перемещаются многие IS-элементы и мобильные элементы, которые называют составными: Tn5, Tn9, Tn10 и другие. Составные транспозоны отличаются тем, что у них инвертированные повторы представлены IS-элементами, которые находятся в обратной или (гораздо реже, например, Tn9) в прямой ориентации.

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЭУКАРИОТ

Мобильные элементы эукариот значительно разнообразнее прокариотических элементов.

У эукариот распространены разнообразные мобильные элементы как прокариотического типа, так и элементы, встречающиеся только у эукариот, – ретроэлементы или ретротранспозоны.

Элементы прокариотического типа с короткими ИП (класс II.1) характерны для растений и дрозофилы.

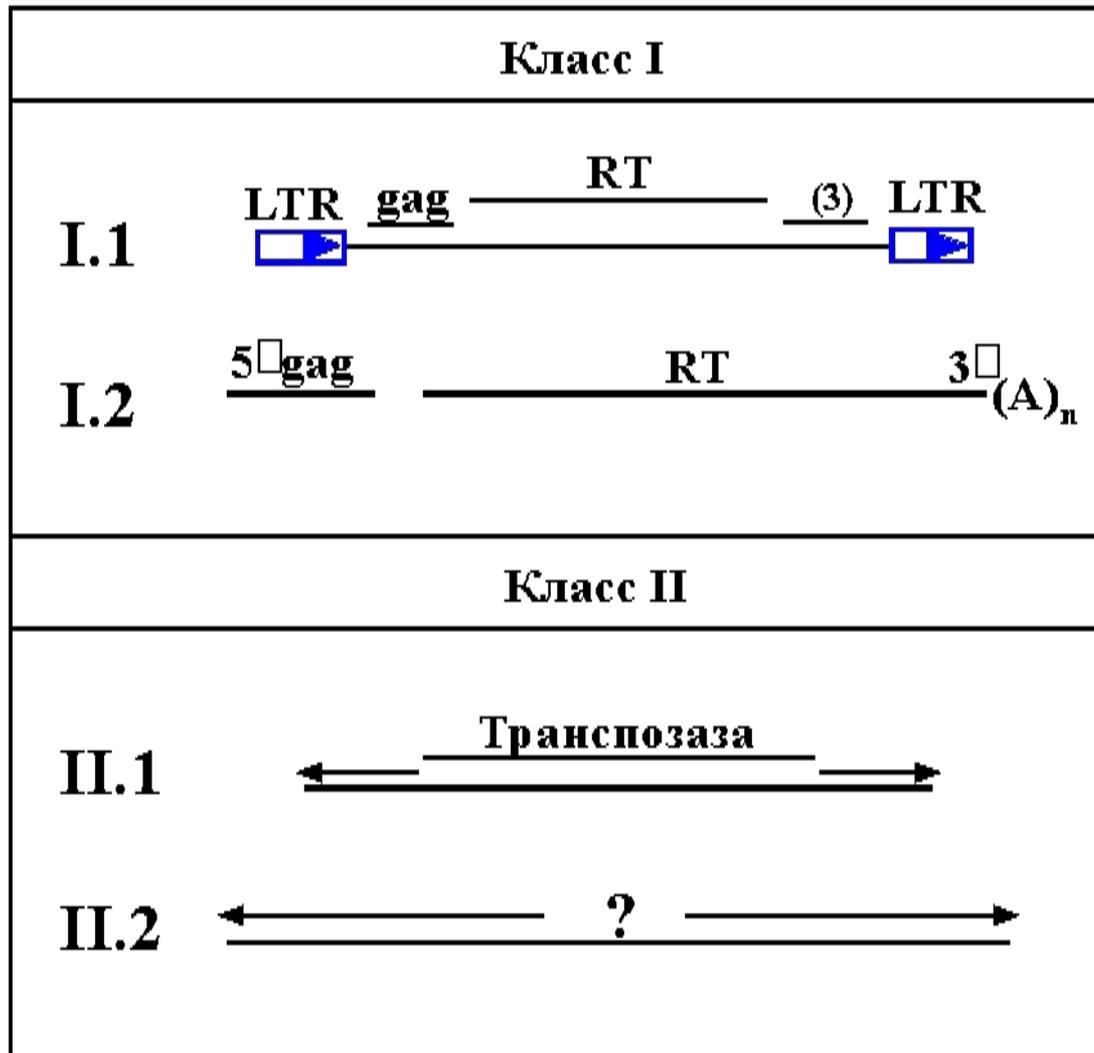
Элементы с длинными ИП (класс II.2) у эукариот встречаются редко.

Элементы с короткими ИП (класс II.1) содержат транспозазу и перемещаются путем нерепликативной транспозиции, но отличаются прокариотических мобильных элементов некоторыми особенностями, специфичными для эукариотических элементов, например, наличием у многих из них интронов. ДНК-транспозоны эукариот делают ДПП различной длины, специфичной для каждого элемента.

Примерами мобильных элементов класса II.1 у дрозофилы являются элементы P и hobo. P-элемент содержится в количестве 30-50 копий на геном. Его размер примерно 3 т.п.н., ИП из 31 п.н., ДПП – 8 п.н. Ген транспозазы в центральной части элемента содержит 3 интрона и 4 экзона и экспрессируется с использованием альтернативного сплайсинга. В соматических клетках из первых трех экзонов формируется укороченная мРНК, с нее транслируется полипептид размером 66 kDa, который является репрессором транспозазы. В генеративных клетках образуется полноразмерный транскрипт из 4 экзонов и, соответственно, полноразмерный белок – транспозаза. Таким образом, транспозиция P-элемента происходит только в клетках зародышевой линии.

К этому же типу транспозонов относятся многие мобильные элементы растений: элементы *Spm* кукурузы, *Tgm1* сои, *Tam1* и *Tam2* львиного зева и др. Отметим двухкомпонентную систему *Ac/Ds* кукурузы (это самый первый обнаруженный мобильный элемент, описанную Барбарой Мак-Клинтон): она включает автономно транспозирующийся элемент *Ac* (4565 п.н., ИП из 11 п.н., ДПП из 8 п.н., ген транспозазы содержит 4 интрона) и гетерогенные по длине элементы *Ds*, которые являются deletированными производными *Ac*-элемента и перемещаются с помощью его транспозазы.

Классификация эукариотических мобильных элементов



Классификация мобильных элементов эукариот

Класс I.1 Ретротранспозоны

Дрожжи <i>Sacharomycetes cerevisiae</i> Дрозофила Мышь Человек <i>Chlamidomonas reinhardtii</i> Лилия Табак Арабидопсис	Ty1, Ty2, Ty3, Ty4 copia (МДГ1, МДГ2, МДГ3), gypsy, 297, 17.6, TED, tom IAP THE-1 TOC-1 Del Tnt 1 Ta 1	Подгруппы <table style="margin: auto; border: none;"> <tr> <td style="text-align: center;">①</td> <td style="text-align: center;">②</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Ty1, Ty2</td> <td style="text-align: center;">Ty3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Copia</td> <td style="text-align: center;">Gypsy</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Tnt 1, Ta 1</td> <td style="text-align: center;">del</td> </tr> </table>	①	②	Ty1, Ty2	Ty3	Copia	Gypsy	Tnt 1, Ta 1	del
①	②									
Ty1, Ty2	Ty3									
Copia	Gypsy									
Tnt 1, Ta 1	del									

Класс I.2 Ретропозоны

Дрозофила <i>Bombux mori</i> Трупаносома brucei Млекопитающие Кукуруза <i>Neurospora crassa</i> Человек	F, I, jockey R2 Ingi LINE (L1) Cin-4 Tad alu
---	--

Элементы прокариотического типа

Класс II.1

Дрозофила Кукуруза Львиный зев Соя	P, hobo Ac/Ds, Spm1 (En-9), Spm18 Tam1, Tam2 Tgm1
---	---

Класс II.2

Дрозофила <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> Москвой еж	FB TU
---	----------

Инвертированные повторы на концах элементов	Spm1 Tam1 и Tam2 Tgm1	CAC TACAACAAAA CAC TACAAGAAAA CAC TATTAGAAAA
---	-----------------------------	--

У эукариот широко распространены ретротранспозоны, в транспозициях которых задействованы фермент обратная транскриптаза (ревертаза) и РНК-копия элемента в качестве интермедиата. Ретроэлементы подразделяются на 2 группы:

- 1. Ретротранспозоны с длинными прямыми концевыми повторами (ДКП) (класс I.1). Их структура соответствует ДНК-копиям геномов ретровирусов позвоночных, которые также являются мобильными элементами.**
- 2. Ретроэлементы (класс I.2), не содержащие повторов на концах (некоторые авторы используют для них название «ретропозоны»).**

Ретровирусы являются «прототипами» ретротранспозонов. Их цикл развития состоит из чередования РНК- и ДНК-стадий. Вирионный геном представлен РНК размером обычно 5-6 т.п.н. с короткими прямыми повторами. Когда ретровирус проникает в клетку хозяина, то с помощью кодируемой им обратной транскриптазы на матрице его РНК синтезируется ДНК-копия, но уже с ДКП (в англоязычной литературе LTR – long terminal repeats) длиной обычно 200-400 п.н. ДКП содержат двунуклеотидные инвертированные повторы на концах и еще ряд повторов на некотором расстоянии от концов, разнообразные регуляторные элементы (промоторы и терминаторы и энхансеры транскрипции). Наличием регуляторных элементов в ДКП обусловлены различные эффекты ретровирусов и ретротранспозонов, встроенных в хромосомы, на экспрессию соседних генов. Центральная часть ретровируса содержит 3 кодирующие рамки:

gag — кодирует структурный белок вирионного капсида;

pol – кодирует сложный полипептид, в котором слиты домены интегразы (ответственна за интеграцию ДНК-копии в хозяйский геном; интеграза соответствует транспозазе других подвижных элементов), обратной транскриптазы (ревертазы), РНКазы Н (RNase Н удаляет РНК из гибрида ДНК-РНК) и протеазы (после транскрипции слитого полипептида протеаза «нарезает» его на отдельные функциональные полипептиды).

Env — белки хвостового отростка вируса, которые ответственны за адсорбцию ретровируса на поверхности клетки-хозяина и, соответственно, его вирулентность. Большинство ретровирусов не содержат гена *env* и, следовательно, неинфекционны.

В последние годы А. И. Ким и др. открыли, что мобильный элемент МДГ-4 (gypsy), содержит ген env и обладает инфекционными свойствами. Затем французские исследователи выявили у дрозофилы аналогичные элементы ZAM, Idefix и др., всего более 10. Таким образом, стало известно, что ретровирусы встречаются не только у позвоночных животных. Новые вирусы выделены в отдельную группу Errantiviruses – эндогенные ретровирусы беспозвоночных.

У многих ретровирусов рамки считывания gag и pol перекрываются (а иногда они «сливаются» в общий транскрипт). Транспозоны из обеих групп встречаются среди всех групп живых организмов – от дрожжей до человека.

Ретротранспозоны всегда делают в ДНК-мишени ДПП из 5 п.н.

У ретроэлементов с ДКП транспозиция происходит по схеме, включающей РНК-интермедиат.

С геномной ДНК элемента транскрибируется РНК-копия, но уже с короткими концевыми повторами, с нее путем обратной транскрипции синтезируется ДНК-копия с ДКП, которая встраивается в новое место с помощью интегразы.

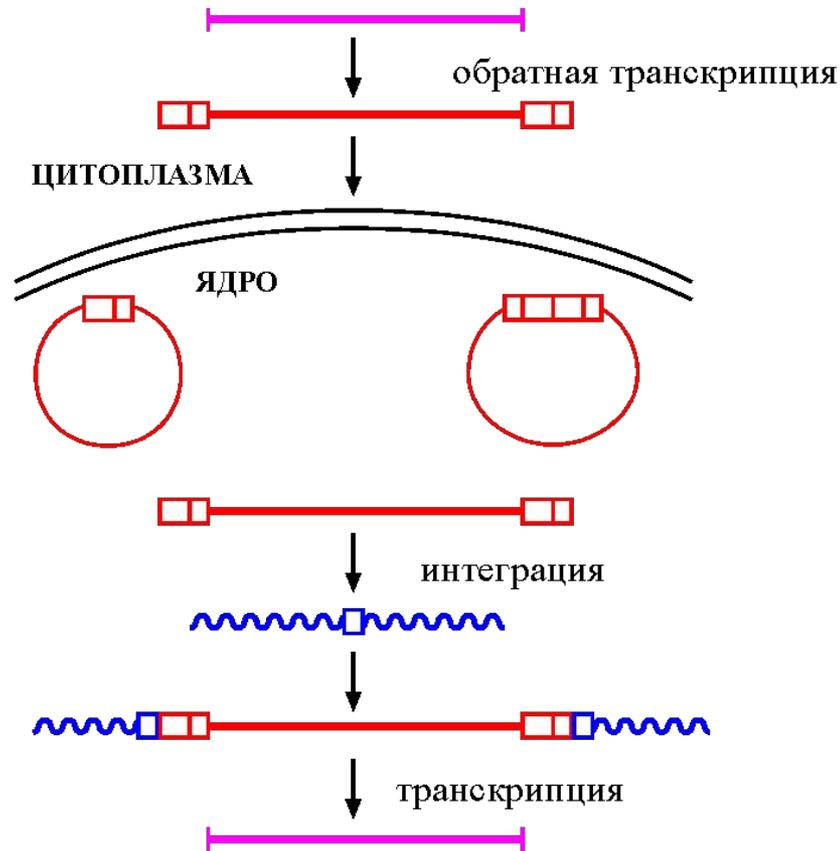
Интеграция ретротранспозонов с ДКП происходит по механизму, идентичному с нерепликативной транспозицией у прокариот.

Интегразы ретротранспозонов, несмотря на различие в названиях, полностью соответствуют транспозазам.

Характерно, что структура каталитического центра интегразы ретровируса человеческого иммунодефицита HIV-1 очень сходна с таковой у транспозазы прокариотического элемента Is3. Сходная ситуация наблюдается между интегразой вируса птичьей саркомы ASV и транспозазами Is50 и Mu.

Рекомбинация у ретроэлементов без концевых повторов менее изучена, но она также осуществляется через РНК-интермедиат.

Цикл развития ретровируса/ретротранспозона



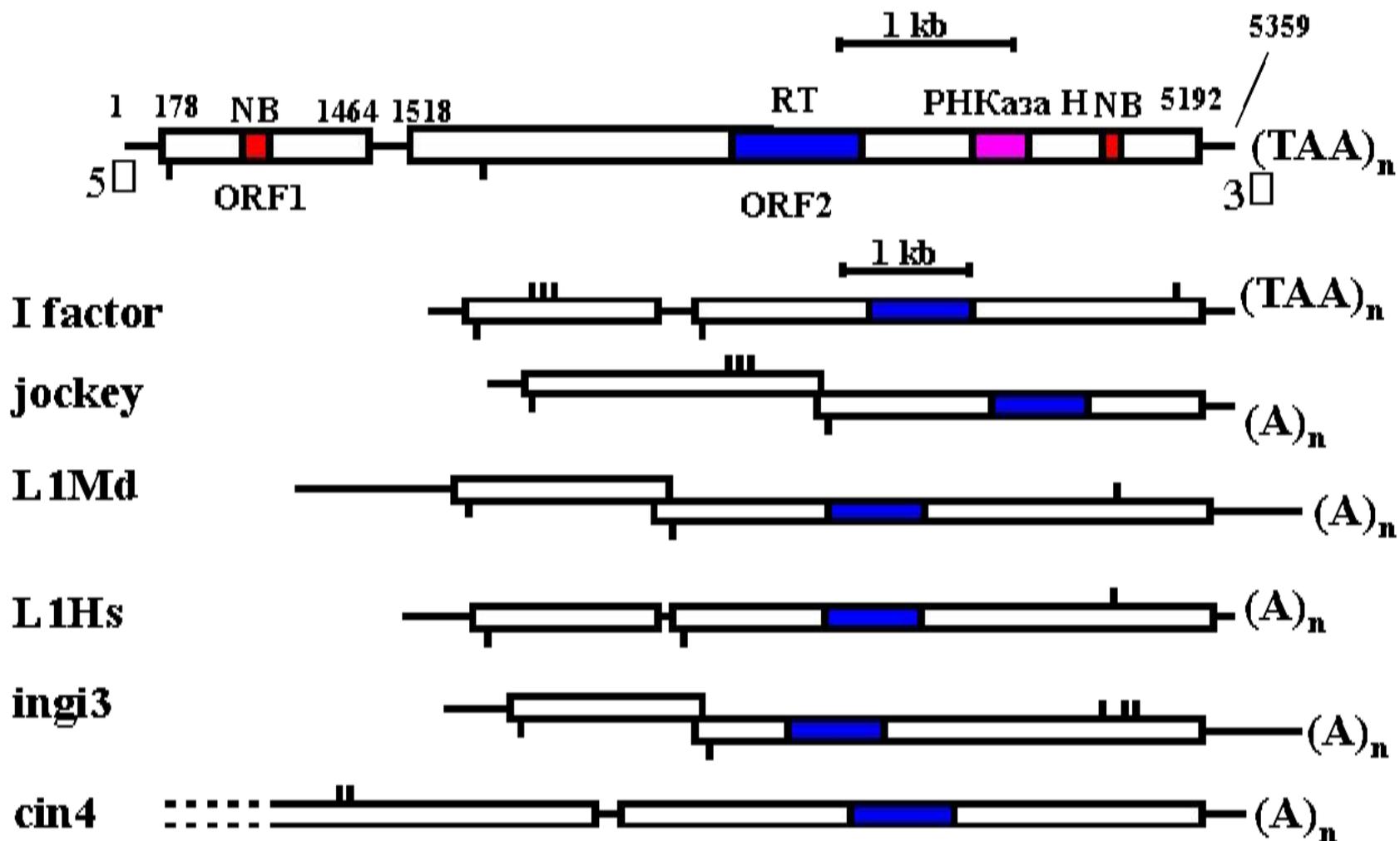
-  Геномная РНК ретровируса
-  ДНК-копия ретровируса
-  Хромосомная ДНК. Сайт интеграции ретровируса выделен прямоугольником

Элементы без длинных концевых последовательностей: LINE и SINE

Другая группа ретротранспозонов – элементы класса I.2 (ретропозоны). Их размер – тоже около 5-6 т.п.н., но на концах они не имеют повторов. На 3'-конце они содержат небольшую последовательность поли-А. Прямых повторов в ДНК-мишени они либо не образуют, либо делают не всегда, и, если делают, то нерегулярной длины. Ретротранспозоны класса II можно разделяют на 2 типа:

LINE (long interspersed nuclear elements) и SINE (short interspersed nuclear elements) – длиной 200-300 п.н., которые не кодируют никаких белков и не способны к самостоятельному перемещению, а перемещаются, по-видимому, за счет элементов LINE.

Структура LINE-элементов



LINE-элементы широко распространены как у беспозвоночных, так и у позвоночных. У млекопитающих LINE и SINE являются преобладающим типом мобильных элементов. Особенно много в геноме позвоночных так называемых Alu-повторов (SINE-элементы, получившие свое название от рестриктазы *AluI*), которые представлены сотнями тысяч копий на геном и, в случае генома человека, составляют 5% геномной ДНК.

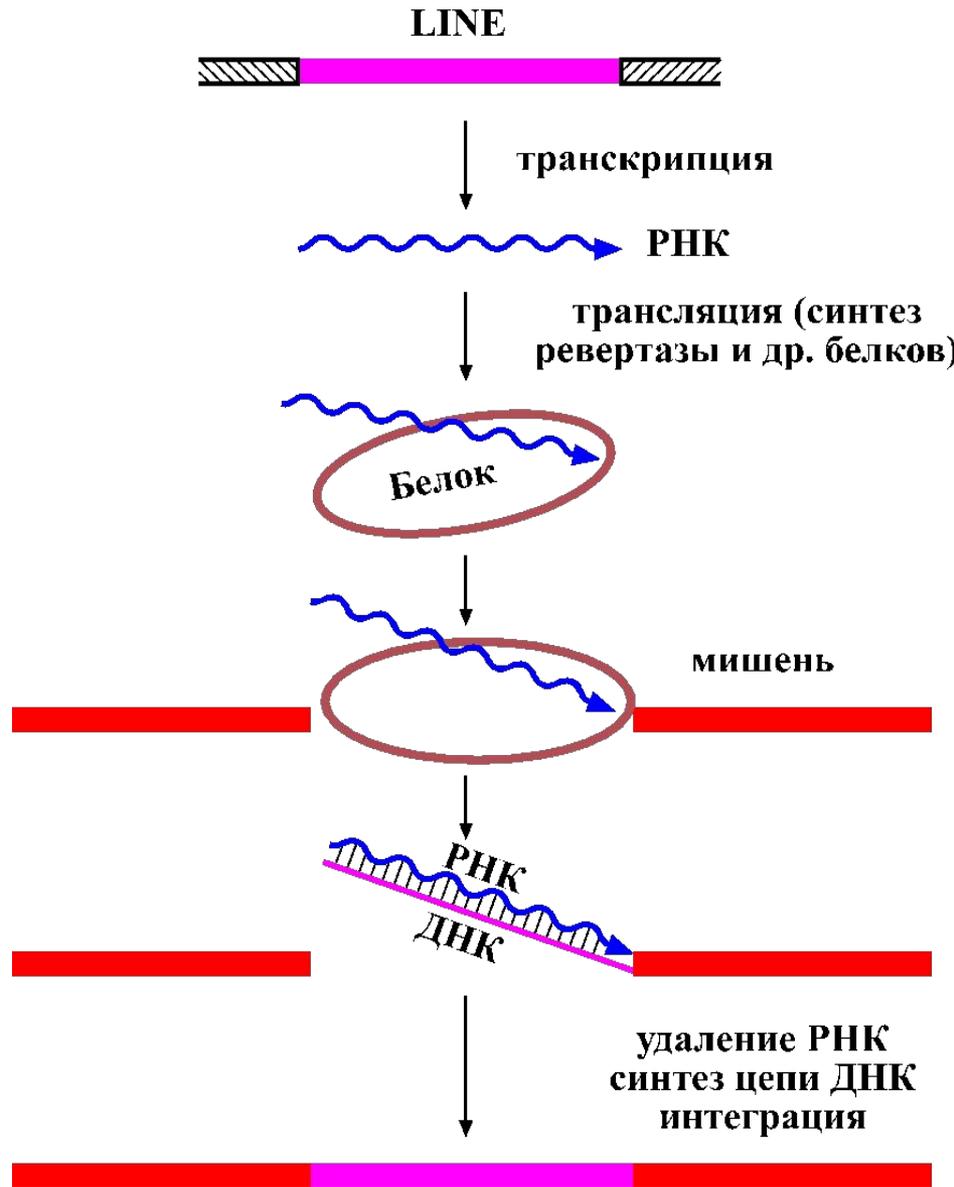
LINE-элементы состоят из 5'-нетранслируемой области, центральной части и 3'-нетранслируемой области. На конце 3'-нетранслируемой области находится короткая последовательность поли-А или поли-ТАА. Центральная часть содержит гены обратной транскриптазы, РНКазы H и эндонуклеазы (*EN*), но не содержит ни гена интегразы, ни гена протеазы, так как механизм перемещения LINE-элементов резко отличается от механизма перемещения ретротранспозонов класса I.1.

Механизм перемещения LINE- и SINE-элементов представлен на рисунке. В отличие от ретротранспозонов I типа, здесь реакцию интеграции в хозяйский геном инициирует РНК-копия элемента. Эндонуклеаза делает ступенчатые ОНР в ДНК-мишени и РНК-копия прикрепляется к концу ДНК-мишени в точке разрыва. На матрице РНК-копии с помощью обратной транскриптазы строится ее ДНК-копия. Свободная группа 3'-ОН в точке разрыва используется как праймер для обратной транскриптазы. Потом РНК-копия удаляется с помощью РНКазы Н, клеточная репаративная система достраивает вторую цепь ДНК, которая оказывается интегрированной в реципиентную ДНК. При этом на концах встроенного элемента могут возникать ДПП различной длины.

SINE-элементы не способны к самостоятельной транспозиции и используют соответствующий аппарат LINE.

Рассмотренный процесс **принципиально отличается** от других механизмов не только транспозиции, но и других типов рекомбинации вообще тем, что здесь не происходит расщепления ДНК на концах элемента и **не происходит обмена цепями ДНК**.

Перемещение мобильного элемента LINE-типа



Мобильные ретроэлементы имеют большое биологическое значение. Как и все мобильные элементы, они вызывают хромосомные перестройки и инактивируют гены путем встраивания в экзоны генов. У дрозофилы на долю транспозиций приходится примерно половина спонтанных мутаций. Вероятно это имеет место и у других организмов.

Мобильные элементы оказывают различные регуляторные эффекты. Например, если ретроэлемент встраивается в интрон, то он может влиять на ход транскрипции. Такая ситуация описана для гена *white* дрозофилы. У мутанта w^a ретротранспозон встроился во второй интрон, что привело к возникновению целого набора альтернативных транскриптов. Соответственно, полной инактивации гена не произошло, и получились глаза абрикосового цвета.

Другой пример – гомеозисная мутация *antennapedia* у дрозофилы. В этом случае мобильный элемент также встроился во второй интрон гена, и изменение экспрессии гена привело к тому, что вместо антенн получились дополнительные конечности.

У позвоночных ретроэлементам приписывают важную роль в индукции канцерогенеза. Они могут встраиваться в хромосому перед протоонкогенами и за счет своих регуляторных элементов активировать протоонкогены, чем стимулируют неконтролируемое клеточное деление. Протоонкогены – это гены, которые работают только на ранних стадиях развития (в основном это гены регуляции клеточного цикла), а потом они должны замолчать.

Гомеозисная мутация *antennapedia*



У представителей рода *Drosophila*, *D.melanogaster* и *D.virilis* теломеры, в отличие от других организмов, формируются путем последовательных транспозиций двух элементов LINE-типа: HeT-A и TART.

Ретровирус HIV-1 вызывает у человека синдром иммунодефицита.

На долю подвижных элементов у эукариот приходится значительная часть генома: у дрозофилы – 20%, у человека – около половины.

Перемещение мобильных элементов находится под жестким контролем как со стороны самих элементов, так, по-видимому, и со стороны организмов-хозяев. Частота транспозиции достаточно низка – в среднем 10^{-4} - 10^{-7} транспозиций на клетку за клеточную генерацию.