

TRANSPOSABLE
(MOBILE)
EUKARYOTIC DNA
Part 2. Role
in gene regulation
and genome evolution

V. A. GVOZDEV

The role of mobile genetic elements in gene regulation (promoter alterations, changes of splicing and functional domain boundaries) as well in chromosomal rearrangements and horizontal gene transposition in eukaryotic genome are considered.

Рассмотрена роль мобильных генетических элементов в регуляции активности генов (изменений в регуляторной области, характера сплайсинга и границ функциональных доменов), а также в процессах образования хромосомных перестроек и горизонтальном переносе генов.

© Гвоздев В.А., 1998

ПОДВИЖНАЯ ДНК ЭУКАРИОТ

Часть 2. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома

В. А. ГВОЗДЕВ

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Представление о подвижных (мобильных) элементах у эукариот как о кусочках ДНК, способных перемещаться по хромосомам и размножаться, было дано в предыдущей статье (см. с. 8–14). Отмечалось, что эти перемещения как правило редки, и потенциально подвижные элементы стабильно наследуются в ряду поколений, как обычные гены. Были описаны особенности механизмов перемещения двух основных классов этих элементов — транспозонов и ретротранспозонов, обусловленные особенностями их структуры и наличием соответствующих белков — ферментов (транспозазы и ревертазы). Было отмечено, что подвижные элементы не следует рассматривать только как эгоистичную ДНК, представитель которой хотят лишь размножиться, паразитируя на ДНК клетки-хозяина, поскольку имеются примеры приспособления подвижных элементов для нужд генома клетки, прежде всего для сохранения структурной целостности хромосомной ДНК (см. с. 8–14). Сейчас уже накопилось множество фактов и наблюдений, показывающих, что подвижные элементы, внедряясь в гены, могут не только их инактивировать, вызывая мутации, но и способны существенно менять характер экспрессии (работы) гена. Поэтому им приписывается исключительно большая роль как факторов изменчивости в процессах эволюции генома. Существование подвижных элементов является также основой для возникновения крупномасштабных перестроек структуры хромосом, которым придается большое значение в эволюции геномов.

ПРИЧИНЫ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА ИЛИ ИЗМЕНЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ЕГО АКТИВНОСТИ ПРИ ВНЕДРЕНИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Предполагается, что читатель имеет представление о регуляции транскрипции (промоторах и усилителях транскрипции) гена, мозаичном строении гена из экзонов и интронов, а также о созревании клеточных РНК при сплайсинге [1, 2]. На рис. 1 представлена структура эукариотического гена с обозначенным началом транскрипции, а также

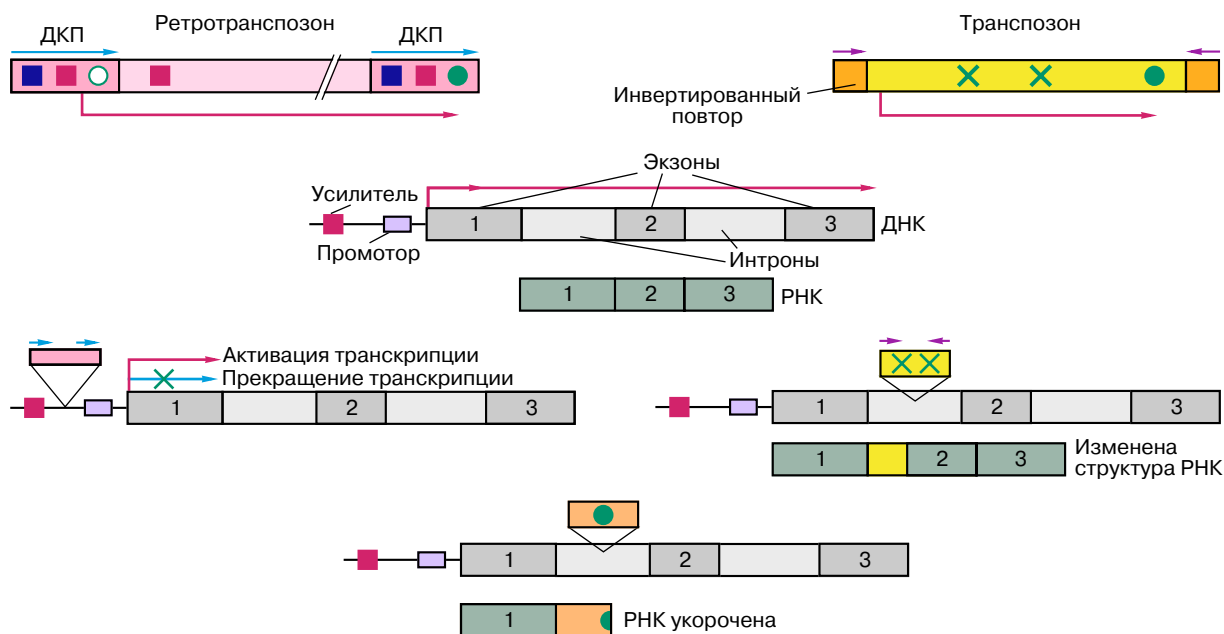


Рис. 1. Нарушения работы гена в результате внедрения подвижного элемента. ДКП – длинные концевые повторы ретротранспозона; квадраты – короткие отрезки нуклеотидной последовательности (10–30 нуклеотидных пар), являющиеся усилителями (красный цвет) или “глушителями” (фиолетовый цвет); сигналы сплайсинга и сайты останковки транскрипции показаны соответственно зеленым крестиком и кружком; красные стрелки указывают транскрипцию элемента или гена

структуры подвижных элементов. Интенсивность транскрипции может возрастать благодаря взаимодействиям вспомогательных белков с короткими (от нескольких нуклеотидных пар до десятков нуклеотидных пар) участками ДНК – усилителями или “глушителями” транскрипции и ферментом РНК-полимеразой, осуществляющей транскрипцию (см. с. 8–14). Внедряясь в ген, подвижный элемент может повредить экзон, разорвав его. В таком случае ген будет лишен возможности кодировать белок. Попадая в район промоторов и/или усилителей, подвижный элемент может нарушать регуляторную область гена. Наконец, попадая в район интрона, подвижный элемент может оставаться практически безвредным, поскольку вся последовательность интрона вместе с подвижным элементом будет вырезаться, а соседние экзоны беспрепятственно соединятся друг с другом.

При рассмотрении воздействий подвижных элементов на гены не следует забывать, что они транскрибируются и, следовательно, несут собственные промоторы, а также нуклеотидные последовательности, необходимые для останковки (терминации) транскрипции. Транспозоны, ограниченные инвертированными повторами, несут собственный ген транспозазы с экзонами и интронами и, следовательно, сигнальные нуклеотидные последовательности, обеспечивающие сплайсинг. В связи с возможной ролью подвижных элементов в эволюции генома заслуживают рассмотрения конкретные

примеры воздействия мобильных элементов на работу генов.

Сначала рассмотрим влияние внедрений ретротранспозонов, содержащих длинные концевые повторы (ДКП), ограничивающие тело транспозона. ДКП необходимы как для репликации перемещающихся копий ретротранспозона, так и для инициации его транскрипции (см. с. 8–14). ДКП являются промоторами ретротранспозона, причем как ДКП, так и тело ретротранспозона содержат нуклеотидные последовательности, являющиеся усилителями транскрипции (см. рис. 1). Различия в окружении левого и правого ДКП, обусловленные примыкающими к ним разными последовательностями (генетическая последовательность рядом с левым ДКП или 3'-конец тела ретротранспозона рядом с 5'-концом правого ДКП), определяют старт транскрипции в левом ДКП и конец транскрипции в правом ДКП. В результате сигнал останковки транскрипции (белый кружок) не работает в левом ДКП, но функционирует в правом (зеленый кружок). Поскольку нуклеотидные последовательности ретротранспозонов, а в особенности ДКП, насыщены регуляторными сигналами, обеспечивающими транскрипцию самого элемента, то неудивительно, что перемещение этих сигналов в геноме может изменять регуляцию активности генов.

Успешная транскрипция ретротранспозона осуществляется с помощью белков хозяйской клетки,

взаимодействующих с регуляторными последовательностями транспозона. Показано, что транскрипция некоторых ретротранспозонов (у мышей, дрозофилы, растений) наблюдается только в определенных тканях и на определенных стадиях развития. Подобные наблюдения позволяют предполагать, что специфичная (в пространстве и во времени) транскрипция ретротранспозона небезразлична для функционирования генома хозяина.

Внесение вместе с подвижным элементом новых регуляторных сигналов может привести к сильной активации транскрипции гена хозяина. Если подвижный элемент оказался около протоонкогена (см. [1]), то результатом может быть сверхпродукция белка и злокачественное перерождение клетки. Привнесенный элементом регуляторный сигнал, по-видимому, может быть использован в процессе эволюции системы управления рядом генов. Накоплены факты, показывающие, что в промоторах эукариотических генов обнаруживаются нуклеотидные последовательности, высоко гомологичные таковым в подвижных элементах. Однако около них уже нет концевых повторов и обнаруживается несколько нуклеотидных замен по длине последовательности. Подобные наблюдения позволяют полагать, что эволюция генома сопровождается превращением регуляторных сигналов элемента в область промотора-усилителя гена. Так, например, короткие отрезки ДНК в прошлом подвижного ретротранспозона связывают белок-рецептор полового гормона эстрогена в геноме млекопитающих (см. [1] о механизмах действия гормонов). Нормальное развитие позвоночных регулируется, наряду с гормонами, ретиноевой кислотой — производным витамина А, концентрация ее строго регулируется в процессе развития [3]. Ретиноевая кислота играет огромную роль в формировании пространственной организации организма, участвуя в регуляции активности генов, отвечающих за развитие костей, глаза, мозга. Показано, что белок-рецептор ретиноевой кислоты узнает регуляторные последовательности гена, которые в прошлом также были приобретены при внедрении подвижных элементов. Эти примеры иллюстрируют использование казалось бы эгоистичных подвижных элементов для регуляции важнейших процессов формообразования у позвоночных.

Отметим также некоторые вредные последствия внедрения подвижных элементов, помимо потенциальной способности элемента разрушать регуляторную зону гена или разрывать экзон. Своеобразные последствия может вызвать внедрение подвижных элементов в интрон. Казалось бы (иногда это действительно наблюдается) в результате процессинга и созревания новосинтезированной РНК [1] последовательность интрона вместе с последовательностью мобильного элемента должна вырезаться. Однако элемент может содержать сигнал остановки (терминации) транскрипции, в таком случае моле-

кула РНК также будет оборвана и лишена экзона 2. Укороченная РНК может оказаться исключительно нестойкой, такая РНК может быстро распадаться, поскольку она лишена присущего ей конца, который, как известно, обеспечивает стабильное существование в клетке информационной РНК. Кроме того, описаны случаи, когда попадание транспозона в интрон создает новый, очень сильный (эффективно используемый) сайт сплайсинга, локализованный внутри подвижного элемента. Эти сайты сплайсинга служат для образования зрелой РНК, кодирующей синтез транспозазы. Однако при внедрении транспозона в интрон функционирование этих сайтов сплайсинга приводит к нарушению структуры зрелой РНК и включению в ее состав нуклеотидной последовательности транспозона. Трансляция такой РНК не даст полноценного белка.

В случае ретротранспозонов особые возможности для перенесения и приобретения регуляторных сигналов возникают в том случае, когда элемент удаляется за счет перекреста (рекомбинации) между ДКП с идентичными последовательностями, подобно тому, как осуществляется этот перекрест (кроссинговер) между гомологичными хромосомами. В результате сохраняется лишь один ДКП на месте внедрения ретротранспозона (рис. 2). Это явление широко распространено в клетках дрожжей. Показано, что так называемые одинокие, соло ДКП оказывают существенное влияние на изменчивость регуляторных систем дрожжевой клетки. Поэтому говорят о подвижном промоторе, перемещающемся вместе с элементом, но остающемся на месте встраивания после удаления тела элемента. Наличие такого промотора может перепрограммировать характер зависимости работы гена как от внешних сигналов, так и от внутриклеточных регуляторных систем.

Попадание ретротранспозонов рядом с геном может привести неожиданно к экспрессии гена в той ткани и на той стадии развития организма, когда ген обычно молчит. Так, например, внедрение ретротранспозона рядом с одним из генов амилазы человека привело к его экспрессии в слюнной железе, тогда как другой вариант гена амилазы работает в поджелудочной железе. У растений нуклеотидные

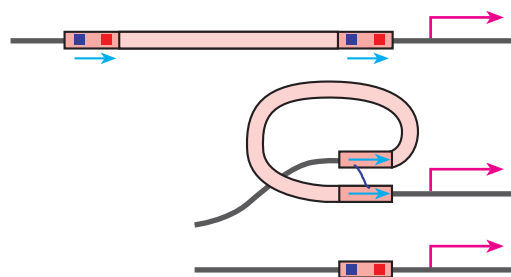


Рис. 2. Представление о подвижном промоторе. Обозначения см. на рис. 1

последовательности нескольких внедрившихся друг в друга ретротранспозонов могут составить протяженный регуляторный район (около 500 нуклеотидных пар). Например, это показано для гена, определяющего развитие пыльцы. Ретротранспозоны, как и транспозоны, предпочтительно внедряются в регуляторные области гена: там, где нарушена строгая нуклеосомная структура (см. с. 8–14) и где участки ДНК более доступны для транспозаз и интеграз, осуществляющих ферментативный процесс перемещения. Это обстоятельство и приводит к тому, что подвижные элементы играют столь большую роль в изменчивости и эволюции регуляторных районов генов. С точки зрения представлений о подвижных элементах как об эгоистичной ДНК внедрение в регуляторный район может способствовать выживанию элемент-паразита а в геноме: подобная специфичность выбора района встраивания выгодна и элементу, поскольку ген клетки-хозяина может продолжать работать на определенном уровне, достаточном для выживания клетки и организма, несмотря на внедрение элемента.

Транскрипция ретротранспозонов может изменяться в ответ на внешние воздействия, например усиливаться при понижении температуры. У растений усиление транскрипции этих элементов может наблюдаться при так называемых стрессах [4], вызванных заражением вирусами или грибами. Если транскрипция усиливается, то создаются условия для образования ДНК-копий ретротранспозонов и их перемещения. Такие перемещения, стимулированные внешними условиями, могут менять характер работы генов. Подобная изменчивость может оказаться полезной для организма, новые способы регу-

ляции работы генов сохраняются в геноме в процессе эволюции под давлением естественного отбора.

Интересные изменения структуры и функциональных характеристик промотора могут происходить не только при перемещении ретротранспозонов, но и транспозонов. Брешь в ДНК, появляющаяся после вырезания транспозона, может либо залечиваться с помощью гомологичного отрезка ДНК, как это описано в предыдущей статье (с. 8–14), либо разорванные концы могут сшиваться. В последнем случае (это особенно характерно для транспозонов растений) могут возникать ошибки – утраты или, напротив, короткие дубликации нуклеотидной последовательности. Таким образом, транспозон оставляет в последовательности ДНК след своего бывшего присутствия (рис. 3, а). Обнаружены возникающие таким способом мутации в регуляторной (промоторной) области гена, ответственного за синтез пигмента антоциана в клетках цветка львиного зева. Интересно, что эти следы меняют характер пространственной экспрессии гена в тканях сформировавшегося цветка. Чем это может быть вызвано? Вероятно, набор ядерных белков, участвующих в регуляции транскрипции гена, различен в разных клетках, образующих цветок, а результат их воздействия на транскрипцию гена синтеза антоциана зависит от нуклеотидной последовательности промотора, изменчивой в результате вызванных элементом повреждений, меняющих сродство промотора к регуляторным белкам. Другими словами, в зависимости от структуры коротких нуклеотидных последовательностей промотор по-разному интерпретирует сигналы регуляторных белков, набор которых различается в разных частях цветка: то перестает отвечать на них (бесцветные участки

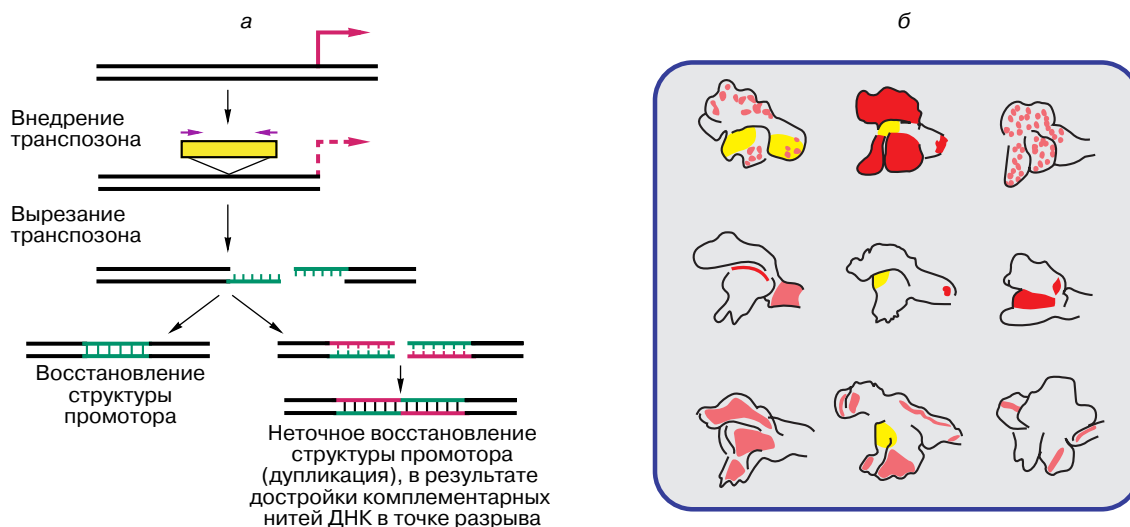


Рис. 3. След, оставляемый транспозоном в районе промотора; а – вызванная внедрением и последующим вырезанием транспозона модификация промоторного района гена, определяющего окраску цветков львиного зева; б – варианты окраски цветков, обусловленные следами пребывания транспозона в промоторе

цветка), то, напротив, обеспечивает активную экспрессию гена – розовую или яркую красную окраску участков цветка (рис. 3, б). Отбор таких мутантных вариантов львиного зева по промоторной области позволяет цветоводам выбирать особо интересные, необычные варианты окраски.

ПОДВИЖНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ МОГУТ МЕНЯТЬ ГРАНИЦЫ, ОБЕРЕГАЮЩИЕ ГЕН ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОКРУЖАЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК

Гены эукариот находятся в составе так называемых доменов, функционирующих относительно независимо друг от друга. Домены представляют собой связанные с белками петли ДНК, закрепленные на внутренней мембране клеточного ядра. Длина петлей сильно варьирует (от 20 до 200 тысяч нуклеотидных пар). В одной петле могут находиться несколько генов или всего один ген. Например, в одной петле находятся гены, кодирующие образование разных вариантов глобинов, образующих после присоединения гема и железа разные типы специфических гемоглобинов, избирательно функционирующих на разных стадиях развития позвоночных. Усилители транскрипции в этой петле регулируют последовательное включение генов глобинов в развитии. Известно, что усилители транскрипции могут быть расположены достаточно далеко от гена, например на расстоянии нескольких тысяч нуклеотидных пар. В таком случае возникает вопрос, каким образом усилители не путают мишени своего влияния – гены. Почему усилитель все-таки действует на определенный ограниченный набор близлежащих генов? Согласно современным представлениям, это определяется положением генов в одной петле. Петли разграничены друг от друга нуклеотидными последовательностями, получившими название инсуляторов (от англ. *insulate* – изолировать), с которыми взаимодействуют специфические белки, узнающие эти последовательности. Наличие короткой последовательности ДНК и белков, узнающих эту последовательность, обеспечивает функцию инсулятора. Гены в составе отдельной петли свободны от влияния близлежащих регуляторных последовательностей ДНК, если последние находятся в другой петле (рис. 4). Последовательности чужой петли, если они не ограничены инсулятором, могут оказаться вредными для гена, приводя к потере его активности. Это так называемый эффект положения гена, наблюдаемый, например, при искусственном перенесении гена в хромосомы организма-реципиента при получении трансгенных организмов. Оказалось, что некоторые подвижные элементы, например, ретротранспозон *gypsy* (цыган) у дрозофилы могут нести в своем теле как раз те короткие нуклеотидные последовательности, которые работают как инсуляторы. Последовательность инсулятора повторена в теле *gypsy* 12 раз. Чем больше повторов, тем больше молекул белка связывается с

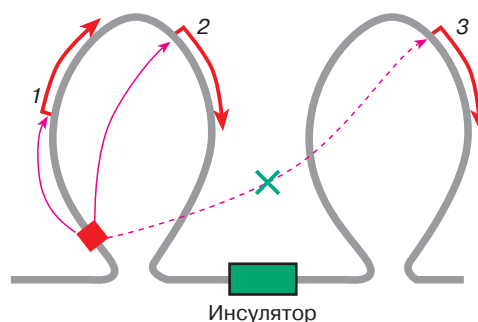


Рис. 4. Нарушение активности гена 3 в результате изменения границы петли – регуляторного домена. Усилитель (красный квадрат) перестает активировать ген 3 после внедрения ретротранспозона, несущего нуклеотидную последовательность со свойствами инсулятора

инсулятором и тем сильнее воздействие инсулятора. Если ретротранспозон *gypsy* внедряется между усилителем и промотором, то согласованное функционирование этих регуляторных районов будет нарушено, в результате чего ген будет полностью или частично инактивирован. Таким образом, перемещения подвижных элементов могут сопровождаться изменением границ петель, каждая из которых включает гены, работающие под управлением определенного усилителя. Небольшой фрагмент тела *gypsy*, включающий вышеупомянутые повторяющиеся последовательности, способен имитировать эффект инсулятора. Теперь представим себе, что элемент как подвижный дегенерировал, перестал транскрибироваться и, следовательно, уже не может перемещаться с участием ревертазы. Однако сохранение короткой последовательности инсулятора позволит сохранить границу между двумя функциональными доменами-петлями, первоначально возникшую в результате внедрения *gypsy*.

Рассмотренные способы влияния подвижных элементов на активность генов подкрепляют распространенное представление о том, что эволюция организмов шла в большей степени по пути изменения систем регуляции активности генов, а не по пути изменения структуры гена и кодируемого им белка.

РОЛЬ ПОДВИЖНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПЕРЕСТРОЙКАХ ХРОМОСОМ

Известно, что хромосомы могут обмениваться своими частями по районам гомологии, происходит перекрест (кроссинговер), или рекомбинация участков хромосом. Это нормальный процесс, вносящий свой вклад в так называемую рекомбинативную изменчивость всего генома и отдельных хромосом [5]. Наличие в хромосомах нескольких одинаковых по нуклеотидной последовательности копий подвижного элемента позволяет в редких случаях осуществить рекомбинацию по районам их

локализации. В результате происходит так называемый неравный кроссинговер, возникают нехватки (делеции) отдельных участков или, наоборот, дубликации (рис. 5). Общепринято, что дубликации открывают возможность возникновения новых генов за счет дальнейшей изменчивости одного из дублированных участков, если другой сохраняет свои прежние функции. Внутривромосомная рекомбинация между двумя элементами может также привести к инверсии – повороту участка хромосомы на 180°. Инверсия участка хромосомы может быть вредна для организма. В то же время инверсии могут способствовать эволюции генома, поскольку они помогают передать потомству случайно сложившееся благоприятное сочетание генов, препятствуя перекресту (кроссинговеру). Если кроссинговер осуществится между нормальной хромосомой и инверсией, то он приведет к потерям частей хромосом (см. рис. 5), и смертельному исходу. Другими

словами, потомство получит только хромосому с благоприятным сочетанием генов.

Хромосомные перестройки с участием подвижных элементов, в первую очередь нехватки участка хромосомы, могут быть губительными для организма. У человека недавно обнаружен транспозон *maginer*, очень сходный по структуре с транспозонами червей и насекомых. Неравный кроссинговер по районам его локализации приводит к нехватке участка в коротком плече хромосомы 17 человека. Если это событие произойдет в зародышевой клетке при созревании гамет, то хромосома с нехваткой будет передана потомкам. Такая нехватка приводит к наследственным заболеваниям нервной системы – невропатиям и параличам. Нарушение нормальной структуры гена вследствие неравного кроссинговера по местам локализации ретротранспозона у человека приводит к наследственным болезням, обусловленным повышенным содержанием холестерина в крови.

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА

С открытием ретровирусов, которые могут заражать клетку и размножаться с образованием копий ДНК, способных встраиваться в геном, встал вопрос о возможности переноса генетического материала от одного эукариотического организма к другому без полового процесса. При заражении вирусом генетический материал может переходить от одного вида к другому, преодолевая так называемые барьеры межвидовой изоляции, в основе которой лежит неспособность разных видов скрещиваться или давать плодовитое потомство. Инфекционные ретровирусы могли бы заражать организмы, принадлежащие к разным видам, и переносить собственный генетический материал, образуя копии ДНК, встраивающиеся в геном. Таким образом могли распространяться ретротранспозоны, составляющие существенную часть генома растений и животных. Подобный способ передачи генов получил название горизонтального в отличие от вертикального наследования генов из поколения в поколение. Обсуждение проблемы горизонтального переноса генов можно найти в книге Р.Б. Хесина [6]. С тех пор появились интересные данные, позволяющие предполагать горизонтальный перенос транспозонов у эукариот. Широкое распространение транспозона *maginer* среди филогенетически отдаленных групп организмов может отражать эволюционную историю генома, когда мобильные элементы неоднократно и повторно переходили от вида к виду. Хотя рассмотрение проблемы горизонтального переноса генов прочно заняло страницы международных журналов, ученые избегают касаться вопроса о том, каков может быть механизм этого процесса в случае переноса транспозонов. Предполагалось, например, что паразитирующие на разных видах дрозофил

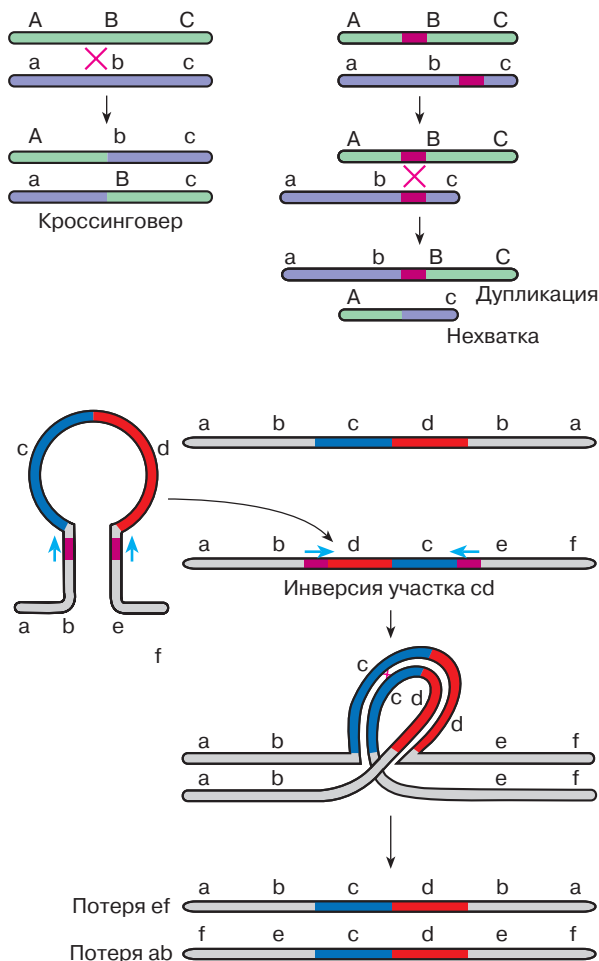


Рис. 5. Перестройки хромосом, обусловленные присутствием в хромосомах одинаковых повторяющихся последовательностей, представленных подвижными элементами

клещи могли осуществлять такой перенос, работая наподобие иглы со шприцем. Можно представить себе, что поедание организмов друг другом может лежать в основе горизонтального переноса, поскольку показано, что ДНК переваривается не до конца, и отдельные молекулы могут попадать из кишечника в клетку и ядро, а затем интегрироваться в хромосому. Вопрос о механизмах горизонтального переноса транспозонов остается открытым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вероятно в статье можно усмотреть определенную тенденциозность, связанную с преувеличением роли подвижных элементов в эволюции генома. Однако в ней были отражены лишь те результаты исследований и дискуссии о роли подвижных элементов, которыми изобилуют серьезные международные журналы. Автор опустил данные, полученные в его лаборатории Е.С. Беляевой, Е.Г. Пасюковой и в совместной работе с профессором Л.З. Кайдановым (Санкт-Петербургский государственный университет), показывающие, что одновременные внезапные транспозиции сразу нескольких типов ретро-транспозонов у дрозофилы не только не вызывают мутаций, но и повышают жизнеспособность особей и их приспособленность к окружающей среде. Это так называемые адаптивные транспозиции, роль которых в эволюции генома могла быть чрезвычайно существенной. Роль подвижных элементов в эволюции геномов следовало бы продемонстрировать методами экспериментальной биологии. Реальность такого подхода не подлежит сомнению.

Можно направленно вводить чужие подвижные элементы в геномы так называемых модельных, быстро размножающихся организмов (дрожжи, дрозофила) и в последующих поколениях следить как за судьбой подвижных элементов в геноме, так и за признаками особей, несущих эти элементы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гвоздев В.А.* Механизмы регуляции активности генов в процессе транскрипции // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 2. С. 22–31.
2. *Гвоздев В.А.* Регуляция активности генов при созревании клеточных РНК // Там же. 1996. № 12. С. 11–18.
3. *Гилберт С.* Биология развития. М.: Мир, 1995. Т. 3. 352 с.
4. *Кулаева О.Н.* Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 2. С. 5–13.
5. *Общая биология: Учебник для 10–11-х классов школ с углубленным изучением биологии.* М.: Просвещение, 1993. 544 с.
6. *Хесин Р.Б.* Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с.

* * *

Владимир Алексеевич Гвоздев, доктор биологических наук, профессор, зав. отделом молекулярной генетики животных Института молекулярной генетики РАН. Лауреат Государственной премии СССР. Область научных интересов: структура и функция генов. Соавтор учебника по молекулярной биологии, автор более 120 работ.