

# Transpozice a mobilní genetické elementy u bakterií

- .

# Transpozice

- umožňuje vedle mutací a obecné rekombinace
- změny v genetické informaci

# Obečná charakteristika transpozice

- Proces přemístění DNA sekvence z jednoho místa tzv. **donorového** do jiného místa tzv. **cílového**.
- **Transpozon je DNA sekvence schopná transpozice.**
- Transpozony se vyskytují jak u bakterií tak u eukaryí.

# Druhy transpozice

- K transpozicím dochází mezi molekulami DNA nebo uvnitř 1 molekuly DNA uvnitř 1 buňky. Rozlišuje se transpozice:
  - Intermolekulární – probíhá mezi donorovou a recipientní molekulou DNA (např. mezi plasmidem a chromosomem)
  - Intramolekulární - probíhá mezi donorým a recipientním místem na 1 molekule DNA (např. na molekule plasmidu)

# Terminologie

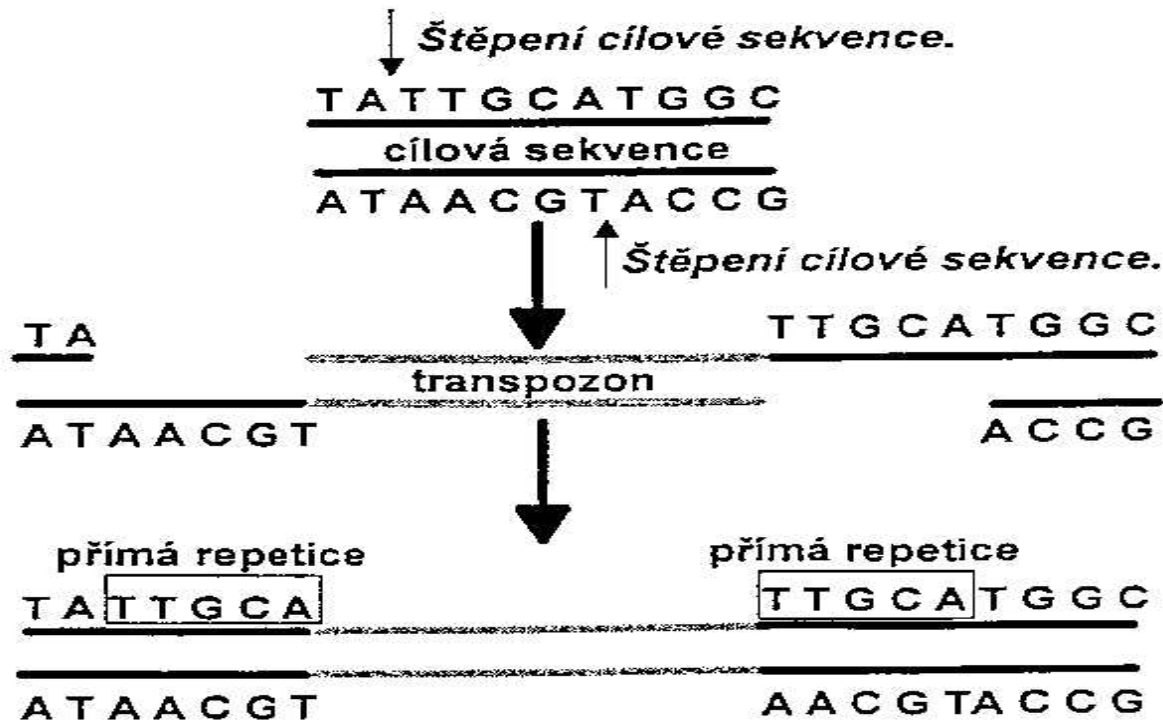
- Donorovým místem pro transpozon se rozumí místo na DNA obsazené transpozonem před jeho transpozicí
- Cílovým místem (recipientním) pro transpozon se rozumí místo na DNA, do něhož se vložil transpozon nebo jeho kopie
- Podobně rozlišujeme donorovou molekulu (donorový replikon) či
- Recipientní (cílovou) molekulu (replikon)

# Transpozony se vyznačují těmito vlastnostmi

- Společnou vlastností všech transpozonů je schopnost transpozice
- Transponáza je enzym, který katalyzuje transpozici
- Další vlastnosti:
  1. Cílová místa, do nichž se transpozony vkládají, nejsou s transpozony homologická.
  2. V místě inserce transpozonu se zdvojují ve stejném směru krátké sekvence DNA, takže transpozon je na obou svých koncích ohraničen přímými repeticemi.

# Vytvoření přímých repeticí ohraničujících transpozon (Rosypal 2003)

- V místě jeho inserce do cílového místa



Obr. 511

Vytvoření přímých repeticí ohraničujících transpozon  
v místě jeho inserce do cílového místa

# Transpozony vyvolávají

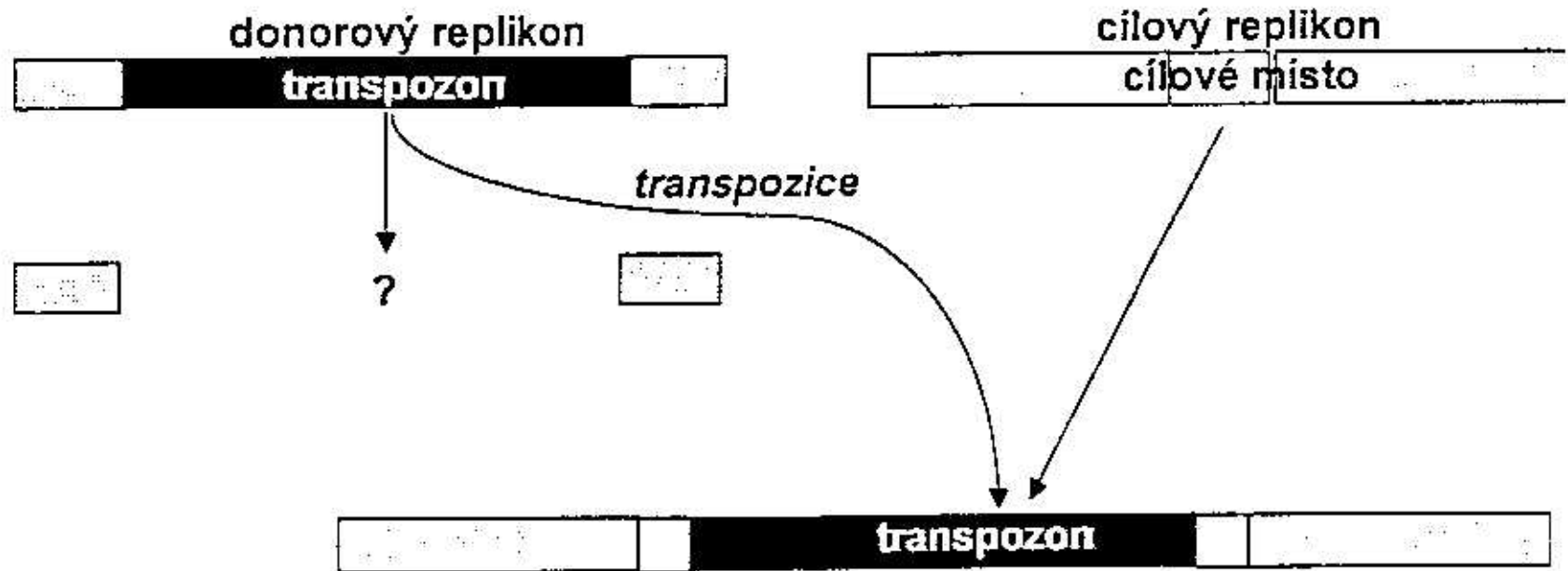
- změny v genetické informaci.
- Je-li cílovým místem transpozice gen, tak se mutačně změní (inserční mutace)
- Během transpozice může docházet k větším strukturálním změnám genomu (delece, přeskupování).



# Způsoby transpozice

- Konzervativní transpozice. Touto transpozicí se realizuje excise transpozonu z donorového místa a jeho inserce do místa cílového (Obr.512)

# Konzervativní transpozice (Rosypal 2003)

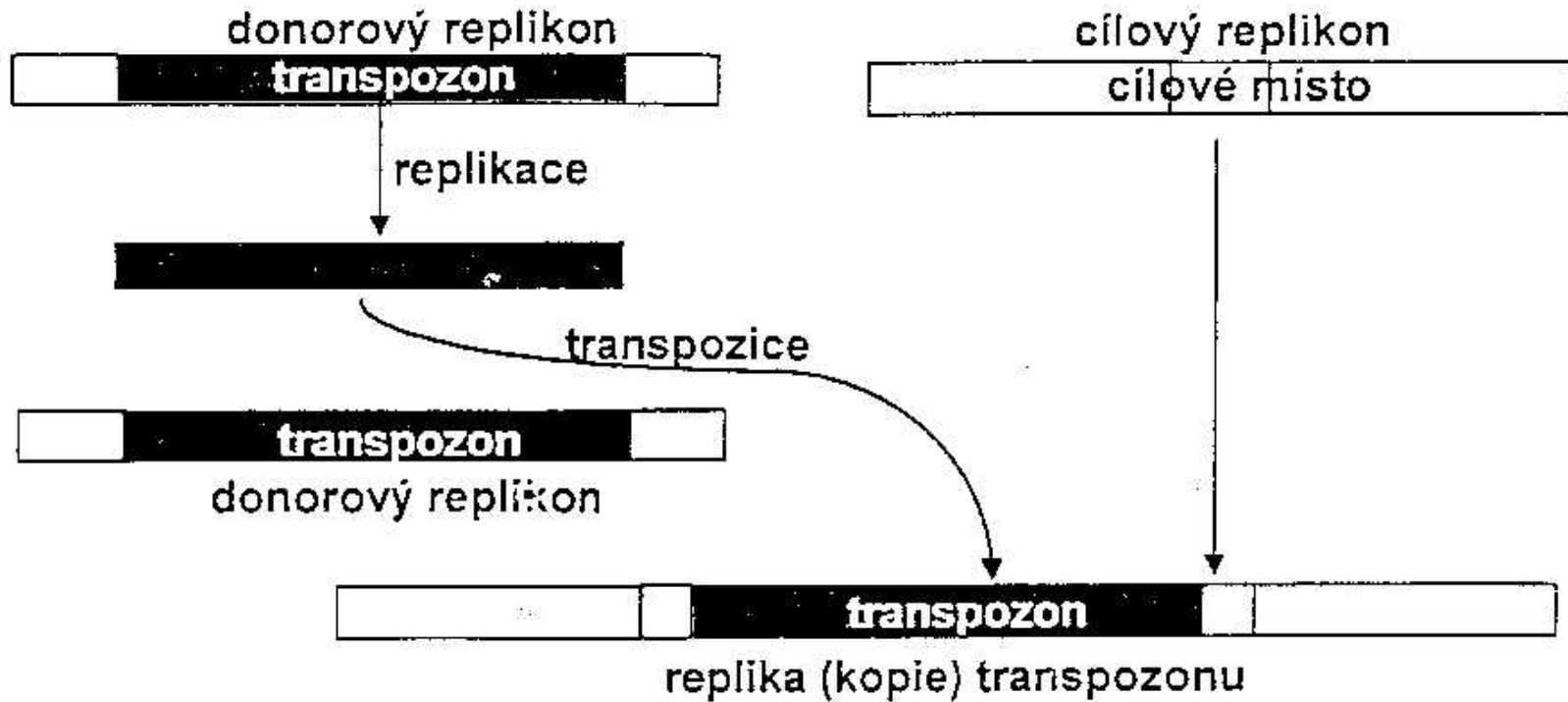


Obr. 512  
Konzervativní transpozice

# Replikativní transpozice

- Transpozon se v donorovém místě zreplikuje a jeho kopie (replika) se vkládá do cílového místa (Obr. 513)

# Replikativní transpozice (Rosypal 2003)



Obr. 513  
Replikativní transpozice

# Retropozice – transpozice zpětnou transkripcí

- Je transpozice, která se uskutečňuje zpětnou transkripcí a to tak,
- Že transpozon v donorovém místě se přepíše do RNA, která se zpětnou transkriptázou přepíše do DNA vládající se do cílového místa.
- Transpozony schopné retropozice se označují jako retroelementy

# Retropozice

- Obr. 514

# Na základě způsobů transpozice transpozony dělíme do dvou skupin

- Skupina transpozonů, které uskutečňují transpozici konzervativně nebo replikativně a nevyznačují se retropozicí
- Retroelementy tj. skupina transpozonů vyznačujících se retropozicí

# Bakteriální transpozony

- se nevyznačují retropozicí.
- Jsou to: IS-elementy a Tn-elementy
- a integrony (In)



# IS elementy se vyznačují

- Délkou 650 až 1600 bp
- Obsahují **jen** geny pro svou vlastní transpozici, což je obvykle gen kódující **transponázu** (gen *tnp*)
- Všechny IS elementy mají na svých koncích obrácené repetice, které jsou rozeznávány transponázami

# Aktivity transponáz

- Rozeznávají koncové obrácené repetice transpozonu
- Štěpí cílové sekvence, do kterých se vkládá transpozon
- Po transpozici spojují cílové sekvence s vloženým transpozonem

# Inserční sekvence IS3

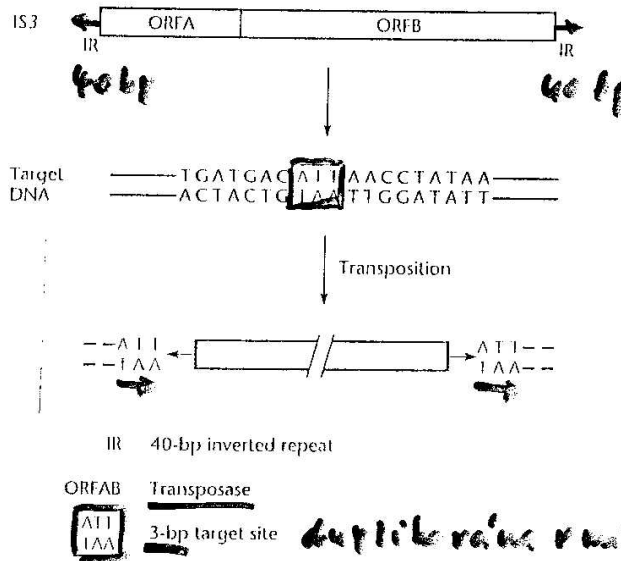
- Byla nalezena v chromozomu *E. coli* (vedle 6 kopií IS1, 7 kopií IS2, IS4; umožňují vznik Hfr kmenů)
- Má délku 750bp
- Obsahuje jen gen kódující transponázu a gen pro protein regulující transkripci transponázy
- na svých koncích má obrácené repetice délky 40 bp, které jsou rozeznávány transponázami
- Cílová sekvence, která je v místě inserce duplikována (a pro IS3 charakteristická) je dlouhá 3 bp
- Opbrázky Snyder aq spol. 2003

# Inserční element IS3

- Transpozitivy :
1. rozpoznávají koncové sekvence Tu
  2. řezají obě sekvence, do kterých se vloží
  3. po ukončení transpozice spojí obě sekvence a vloží je Tu

IS3  
750 bp

gen kódující  
transpozitázu  
gen pro proteiny  
regulující  
transkripční  
transpozitivy



duplikace v místě sekvence

**Figure 8.2** Structure of the insertion sequence element IS3. The inverted repeats are shown as arrows, and the 3-bp target sequence that will be duplicated after transposition is boxed.

# Tn-elementy

- Jsou bakteriální transpozony
- Mimo geny pro svou vlastní transpozici obsahují ještě strukturní geny,
- které se projevují ve fenotypu bakteriální buňky (obvykle geny, které kódují enzymy inaktivující antibiotika)
- Tn-elementy na plasmidu nebo na chromosomu bakteriální buňky udílejí buňce rezistenci na příslušné antibiotikum

# Tn-elementy se klasifikují do těchto skupin

- 1. Složené Tn-elementy
- 2. Tn3 a příbuzné elementy
- Obr. 515

# Složené Tn-elementy

- Jsou to Tn elementy, jejichž konce jsou tvořeny IS elementy
- Centrální část takového transpozonu může být tvořena genem, jehož produkt je příčinou rezistence bakteriální buňky k antibiotiku
- Mohou obsahovat i další strukturní geny projevující se ve fenotypu bakteriální buňky

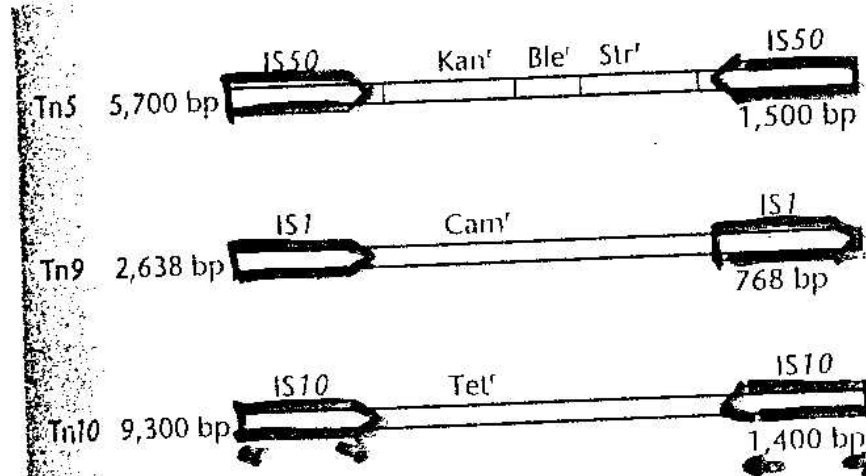
# Mezi složené Tn-elementy

- Patří např. transpozony Tn5, Tn9, Tn10
- Tn5 a Tn10 má IS elementy v opačné orientaci
- Tn9 má IS elementy ve stejné orientaci



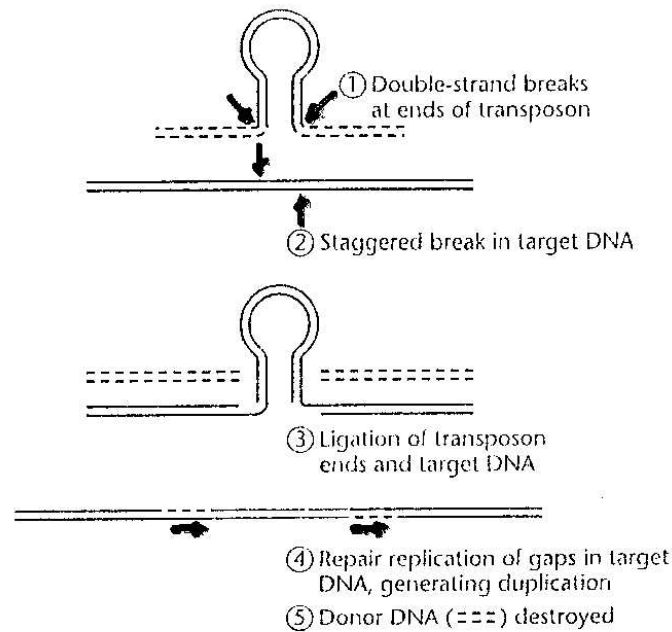
# Příklad složených transpozonů (Snyder 1997)

T<sub>6</sub>



**Figure 8.3** Structures of some composite transposons. The commonly used genes for kanamycin resistance, Kan<sup>r</sup>, and the gene for chloramphenicol resistance, Cam<sup>r</sup>, come from Tn5 and Tn9, respectively. The active transposase gene is in one of the two IS elements. Note that the IS elements can be in either the same or opposite orientation (arrows). Str<sup>r</sup>, gene encoding streptomycin resistance; Tet<sup>r</sup>, gene encoding tetracycline resistance; Ble<sup>r</sup>, gene encoding bleomycin resistance.

# Konzervativní transpozicen (Snyder 1997)



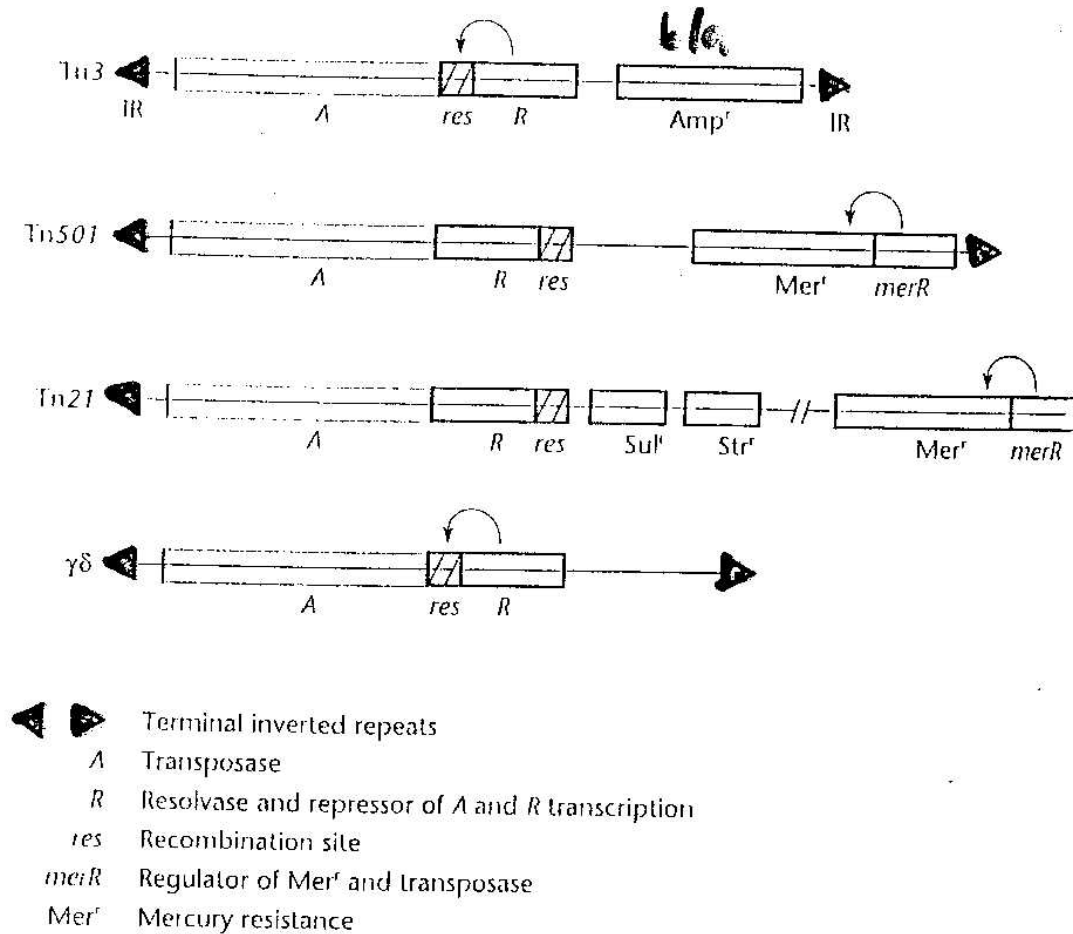
**Figure 8.11** Cut-and-paste transposition. (1) Double-strand breaks are made at the ends of the transposon (arrows). (2) Staggered breaks are made in the target DNA (arrows). (3) The free 3' ends of the transposon are ligated to the 5' ends of the target DNA. The dashed lines represent the donor DNA, which will be degraded. (4) DNA polymerase fills in the gaps of the target DNA, producing the short duplication of target DNA at the ends of the transposon. (5) Donor DNA is destroyed.

# Nesložené transpozony

- Patří sem např. transpozony Tn3, Tn501, Tn21,  $\gamma\delta$  (gamadelta)
- Všechny Tn-elementy podobně jako IS-elementy mají na koncích krátké obrácené opakování (invertované repetice).
- Obr.8.8

# Nesložené transpozony (Snyder 1997)

**Figure 8.8** Some examples of noncomposite transposons. The open reading frames encoding the proteins are boxed. The terminal inverted repeats ends are shown as hatched arrows. *A* is the transposase; *R* is the resolvase and repressor of *A* transcription; *res* is the site at which resolvase acts; *Mer<sup>r</sup>* is the mercury resistance region; and *merR* is the regulator of mercury resistance gene transcription. Tn3 was originally found on the broad-host-range plasmid pR1drd19, Tn501 was found on the *Pseudomonas* plasmid pUS1, Tn21 was found on the *Shigella flexneri* plasmid R100, and  $\gamma\delta$  was found on the chromosome of *E. coli* and on the F plasmid.



# Transpozony jsou nesený na plasmidech

Tn 3 plasmid pR1 / *Salmonella typhimurium*

Tn501 pUS1 plasmid *Pseudomonas*

Tn2 plasmid R.100 *Shigella flexneri*

γ<sup>+</sup> F plasmid *E. coli*

<sup>Tn3</sup>  
Geny: A ... transpozasa

R ... rezolúze a repress transkripce

geny A a R

res ... místo drůbeže rezolúze katalyzující  
rozklad kointegrace

kle ... kóduje R - faktory

# Tn3

- obsahuje 2 geny, jejichž produkty jsou využívány v procesu transpozice – gen *tnpA* kódující **transponázu** a gen *tnpR* kódující **resolvázu**
- Kromě těchto genů je na Tn3 specifické místo **res**, na které se váže resolváza při rozkladu kointegrátu
- Zbytek transpozonu je obsazen genem **bla**, který kóduje beta-laktamázu (enzym hydrolyzující beta-laktamová antibiotika)

# Resolváza je enzym

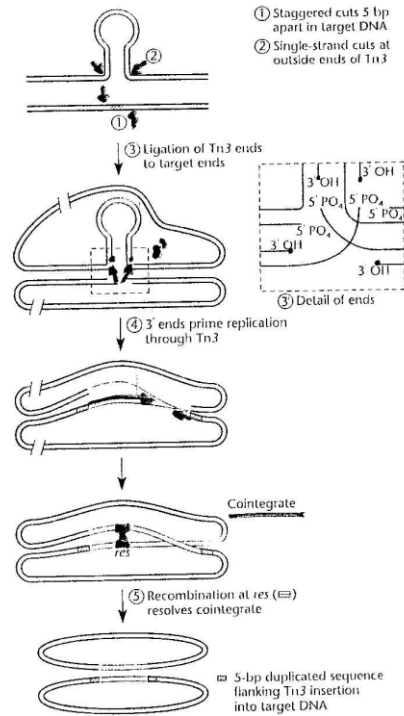
- který katalyzuje rozklad kointegrátu, což je meziproduct při intermolekulární transpozici (transpozice mezi plasmidem a chromosomem)
- vzniklý fúzí donorového a recipientního replikonu

# Produkt genu *tnpR* má 2 funkce

- Působí jako resolváza
- A jako represor regulující
- vlastní syntézu
- a syntézu transponázy
- Aby se transpozice uskutečnila, jsou potřebné obě obrácené repetice Tn-3 elementu.



# Schéma replikativní transpozice transpozonu Tn3 (Snyder 1997)



**Figure 8.10** Replicative transposition of Tn3 (blue) and the formation and resolution of cointegrates. At sites labeled 1 and 2, breaks are made in the target DNA and at the ends of the transposon, respectively. (3) The 3' OH ends of the transposon (dots) are ligated to 5' PO<sub>4</sub> ends of the target DNA. The inset (3) shows details of the ends. (4) The free 3' ends of target DNA prime replication in both directions over the transposon to form the cointegrate. (5) The cointegrate is resolved by recombination promoted by the resolvase TnpR at the *res* sites.

# Bakteriofág Mu (*E. coli*)

- Se množí transpozicí
- Měří asi 38 kb
- Geny A a B jsou potřebné jak k transpozici tak i k replikaci fágové DNA
- Segment G je ohraničen obrácenými repeticemi
- Gen *gin* má podobnou funkci jako gen *tnpR*
- Jako i jiné transpozony způsobuje fág Mu duplikaci sekvencí v cílovém místě recipientního replikonu, neobsahuje však na koncích obrácené repetice
- Produkt genu A je transponáza.

# Konjugativní transpozony

- U G+ bakterií
- Mohou transponovat z 1 buňky do druhé bez vektoru (plasmidu)
- Kódují nezbytné funkce pro excisi z donorové molekuly, přenos do jiné buňky a transpozici do cílové sekvence druhé buňky.
- Nedochozí přitom k duplikaci bazí v místě inserce
- Z donoru se mohou transponovat i netransponované sekvence

# Transpozony a přeskupování genomu

- U složených transpozonů
- Vznikají delece a inverze
- Může vzniknout nový transpozon

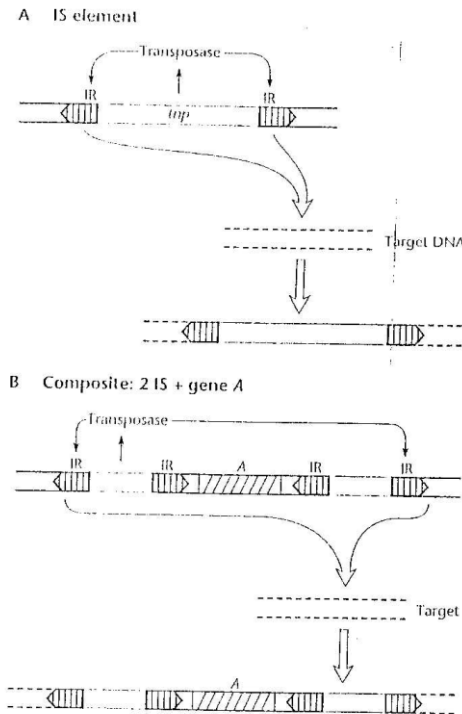
# Každý IS element složeného transpozonu

- Se může transponovat nezávisle, protože transponáza může působit na obou koncích elementu
- Konce obou IS elementů jsou shodné a transponáza kódovaná jedním IS elementem rozpoznává konce druhého
- Většinou pouze jeden IS element transpozonu kóduje funkční transpozázu, druhý gen bývá vyřazen mutací

# Působí-li transponáza

- Na vzdálenějších, vnějších koncích IS sekvencí složeného transpozonu
- transponují se oba IS elementy jako jednotka spolu s geny, jež se nacházejí mezi nimi (může se jednat o jakékoliv geny)
- Obr.

# Dva IS elementy mohou transponovat DNA mezi nimi (Snyder 1997)



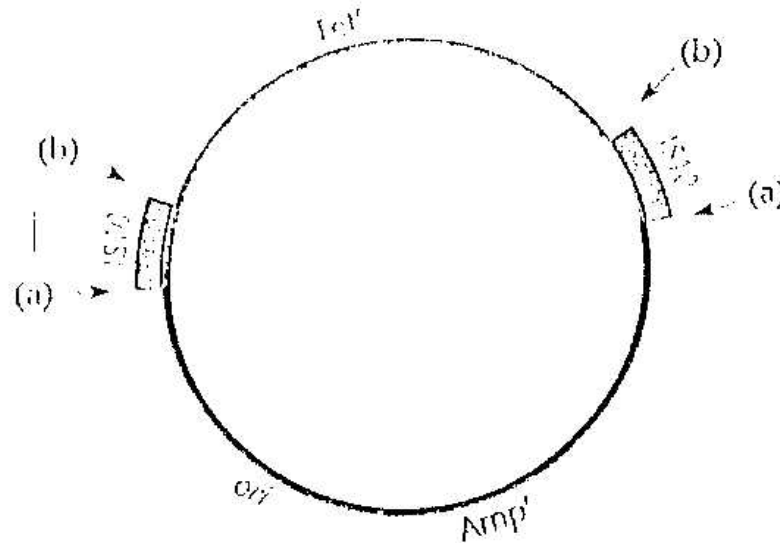
**Figure 8.4** Two IS elements can transpose any DNA between them. (A) Action of the transposase at the ends of an isolated IS element causes it to transpose. (B) Two IS elements of the same type are close to each other in the DNA. Action of the transposase on their outside ends causes them to transpose together, carrying along the DNA between them. A denotes the DNA between the IS elements (hatched bar), and arrows indicate the inverted repeated (IR) sequences at the ends of the IS elements. Dashed lines represent the target DNA.

# Transponáza

- Kódovaná IS elementem složeného transpozonu může působit i na vnitřních koncích IS elementů
- Díky transpozici využívající vnitřních konců se může transponovat i jiná DNA např. počátek replikace plasmidu
- Obr. 8.5



# Zbik nového transpozonu (Snyder 1997)



**Figure 8.5** The outside or inside ends of the IS elements in a composite transposon can be used for transposition. Outside-end (a) transposition will transpose Tn10 (blue), including the gene encoding tetracycline resistance (Tet<sup>r</sup>), whereas inside-end (b) transposition will transpose the plasmid, including the origin of replication and the gene for ampicillin resistance (Amp<sup>r</sup>).

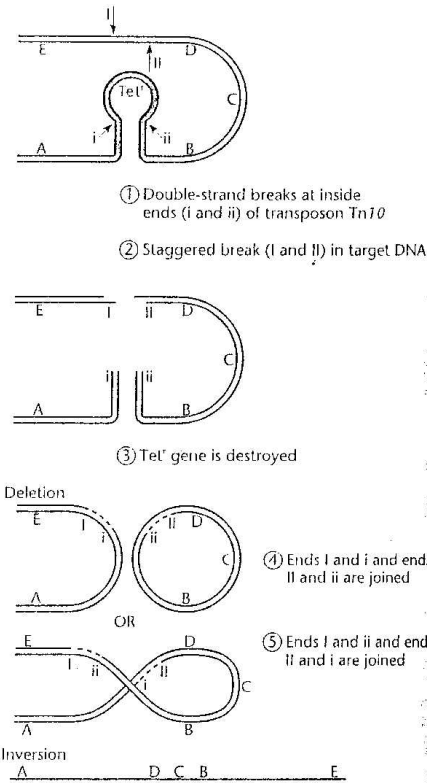
# Vznik nového transpozonu

- s genem pro ampicilin resistenci a s ori místem
- Když tento transpozon transponuje do DNA bez ori oblasti, získá DNA ori oblast spolu s transpozonem a může se sama replikovat

# Díky transpozici využívajících vnitřních konců IS elementů

- Mohou při přenosu na jiné místo DNA molekuly vzniknout delece nebo inverse

# Přeskupování DNA způsobené složenými transpozony – vznik delece a inverse (Snyder 1997)



**Figure 8.6** Rearrangements of DNA caused by composite transposons. Attempts to transpose by the inside ends of a composite transposon to a neighboring target sequence can cause either a deletion or an inversion of the intervening sequences, depending upon how the ends are attached. For an explanation of steps 1 and 2, see Figure 8.11.

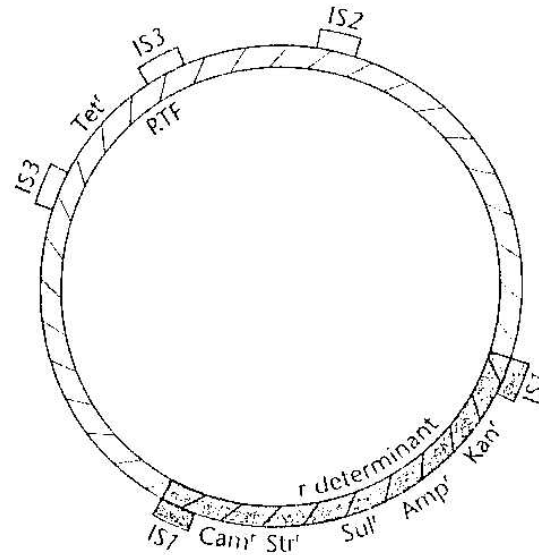
# Transpozony

- Mohou být přeneseny konjugativním plasmidem do recipientní buňky a pak z tohoto plasmidu na jiný plasmid nebo na chromosom buňky
- Jsou významným faktorem šíření rezistence k antibiotikům, zvláště u patogenních bakterií, neboť jsou na nich lokalizovány geny kódující enzymy, jimiž jsou antibiotika inaktivována.

# R faktory

- Jsou plasmidy nesoucí mnoho genů pro rezistenci na antibiotika
- Kromě genů rezistence na antibiotika nesou i jiné geny (např. pro rezistenci vůči těžkým kovům)
- Obsahují transpozony a integrony
- Obr.

# Struktura multiresistentního R plasmidu (Snyder 1997)



**Figure 8.7** R-factors, or plasmids containing many resistance genes, may have been assembled by IS elements. The tetracycline resistance (Tet<sup>r</sup>) gene is bracketed by IS3 elements, and the region containing the other resistance genes (the r determinant, blue) is bracketed by IS1 elements. Reprinted with permission from H. Saedler, in A. I. Bukhari, J. W. Shapiro, and S. Adhya (ed.), *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes*, p. 66, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1977.

# Integrony - In

- Jsou mobilní genové kazety
- Umožňují horizontální přenos genů
- Můžou zachytit úseky cizorodé DNA
- Zodpovědné za distribuci genů rezistence na antibiotika a
- za evoluci bakteriálního genomu



# Známe 2 skupiny integronů

- Multirezistentní integrony (MRI) – komponenty mobilních elementů (plasmidy, transpozony, konjugativní transpozony)
- Superintegrony (SI) detekované v bakteriálních chromosomech (větší struktury, které mohou nést stovky genů)

# Struktura integronů

- Jedná se o DNA elementy
- Rozlišujeme 2 části:
  - - platforma
  - - genová kazeta (malý mobilní element)

# Genové kazety

- Jsou jedinečné malé mobilní elementy
- Obsahují pouze ORF (bez P)
- A rekombinační místo attC: 59 base element (59be) rozpoznávané integrázou
- Mohou existovat jako volné cirkulární molekuly neschopné replikace
- Nebo se mohou integrovat do attI místa integronové platformy

# Struktura integronu (Midlin 2010)

MINDLIN et al.

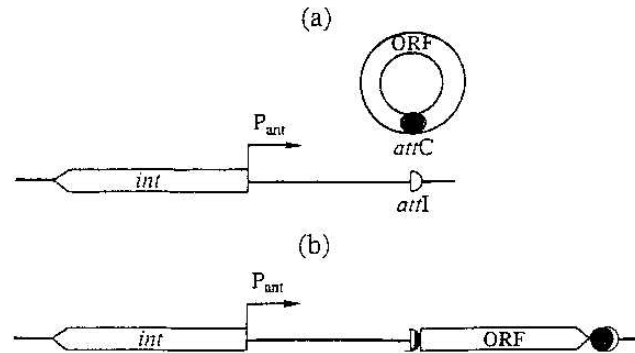


Fig. 4. The structure of an integron (scheme) (taken from [84], with modifications). (a) The structure of a stationary integron platform and a gene cassette in a free circular form. Designations: *int*, integrase gene;  $P_{ant}$ , cassette promoter; *attI*, simple recombination site (depicted as a white semicircle); ORF, open reading frame of the gene cassette; *attC*, the *attC* site (shown as a dark oval). (b) An integron with one cassette inserted into the integron platform. Recombination sites *59-be/attI* formed after cassette integration are shown as black-white elements.

# Platforma integronů

- Obsahuje gen pro integrázu *int*
- Silný promotor  $P_{ant}$
- a místo attI pro rekombinaci

# Integráza katalyzuje

- místně specifickou rekombinaci mezi sekvencemi attC a attI
- Což vede k integraci genové kazety do integronové platformy pod  $P_{ant}$  promotor, díky čemuž může dojít k expresi genů na kazetě.

# Většina genových kazet

- Nemá promotory
- Exprese jejich genů může být indukována až po včlenění do integronové platformy

# Integrony mohou obsahovat

- Více kazet exprimovaných z Pant promotoru



# Dnes je známo

- 5 tříd integronů zodpovědných za rezistenci k více ATB, obsahují víc jak 70 různých kazet
- Víc jak 14 integrázových genů
- Kazety v superintegronech obsahují bakteriální geny virulence
- Kazetové geny jsou bez P (až na 1 vyjímku)
- Stejně geny se mohou vyskytovat ve 2 stavech: jako aktivní a v kazenách (neaktivní)

# Integrony s určitými kazetami

- Byly prokázány na konjugativních plasmidech
- Uvnitř transpozonů
- V dalších plasmidech – R plasmidech

# R plasmidy

- Vznikly intergrací mobilních elementů (hlavně transpozonů a integronů) do plasmidové DNA
- Do plasmidu se integruje integron a v něm postupně přibývá kazetových genů
- Dochází k integraci 1 transpozonu do druhého
- Transpozony nesou integrony s více geny pro rezistenci (např. rodina Tn21 nese integrony)
- Výsledkem je mosaiková struktura plasmidů
- Obr.5 plamid pTP10

# Plasmid pTP10 (Midlin 2010)

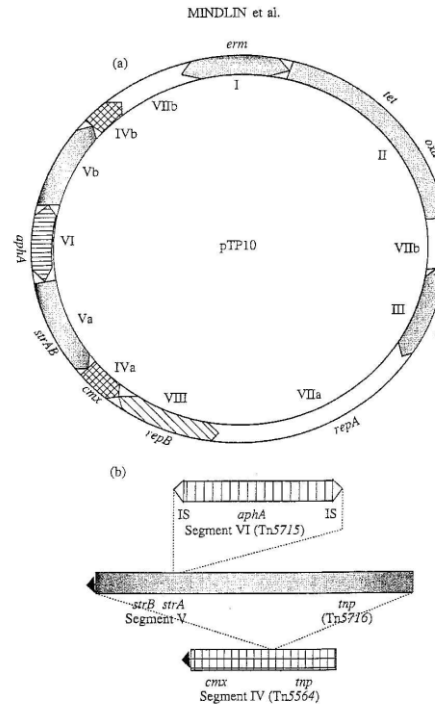


Fig. 5. The molecular-genetic structure of plasmid pTP10 from *Corynebacterium striatum*. Based on the figure from [99], with modifications and additions. (a) The genetic map of pTP10. Designations: I-VIII, plasmid segments. Segment I contains transposon Tn5432 for resistance to erythromycin. Identical sequences have been found in plasmid pNG2 from *Corynebacterium diphtheriae*. Segment II contains *tetA*B genes homologous to genes of *Mycobacterium smegmatis* together with five genes homologous to genes of *Mycobacterium tuberculosis*. Segment III contains the transposon of resistance to chloramphenicol Tn5564. A highly homologous region has been found in plasmid pXZ10145 isolated from the soil strain *Corynebacterium glutamicum* 1014. Segment IV contains an exact copy of transposon Tn5564 carrying a transposase gene with the integrated transposon of resistance to streptomycin Tn5716. Segment V contains the transposon of resistance to streptomycin Tn5716 with integrated Tn5715 (see segment VI) and ISJ250a. Identical sequences have been found in plasmid pEA34 from *Erwinia amylovora* (see the text also). Segment VI contains the transposon of resistance to kanamycin/neomycin Tn5715 flanked by IS26. A highly homologous region has been found in plasmids of a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* and the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. Segment VII consists of two uncoupled regions and contains genes encoding plasmid vital functions, including genes related to *parA* and *repA*. The product of the latter gene is homologous to replicase of *Shigella flexneri*. Segment VIII contains gene *repB*, which encodes a replicase related to that of *Corynebacterium diphtheriae*. (b) Sequential stages of the formation of the pTP10 region containing segments IV, V, and VI.

# Integrony s genovými kazetami

- Neznámé funkce
- Byly ve velkém počtu (víc jak 1000)
- Identifikovány v chromosomech mnoha druhů bakterií

# Horizontální přenos genů

- Mezi G+ a G- baktériemi je velmi častý