

# Y a S transpozony

---

- Transpozony obsahující transponázy podobné serin a tyrosin rekombinázám (Fágové integrázy)
  - Nižší specifitu než fágové integrázy
  - Cirkulární intermediát – heteroduplexní sekvence (6 bp)
  - Netvoří přímé repetice
  - RecA nezávislé
  - Kovalentní vazba přes tyrosin/serin v aktivním centru rekombinázy
    - Tyrosin na jednom vlákně
    - Serin na obou vláknech
  - Tyrosin - Tn916
  - Serin – IS607

- Mechanisms of Site-Specific Recombination

Nigel D.F. Grindley , Katrine L. Whiteson , Phoebe A. Rice

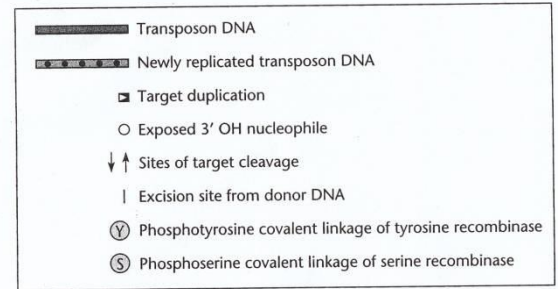
Annual Review of Biochemistry. Volume 75, Page 567-605, Jul 2006

# Y2 (RC) transpozony – ISCR elementy

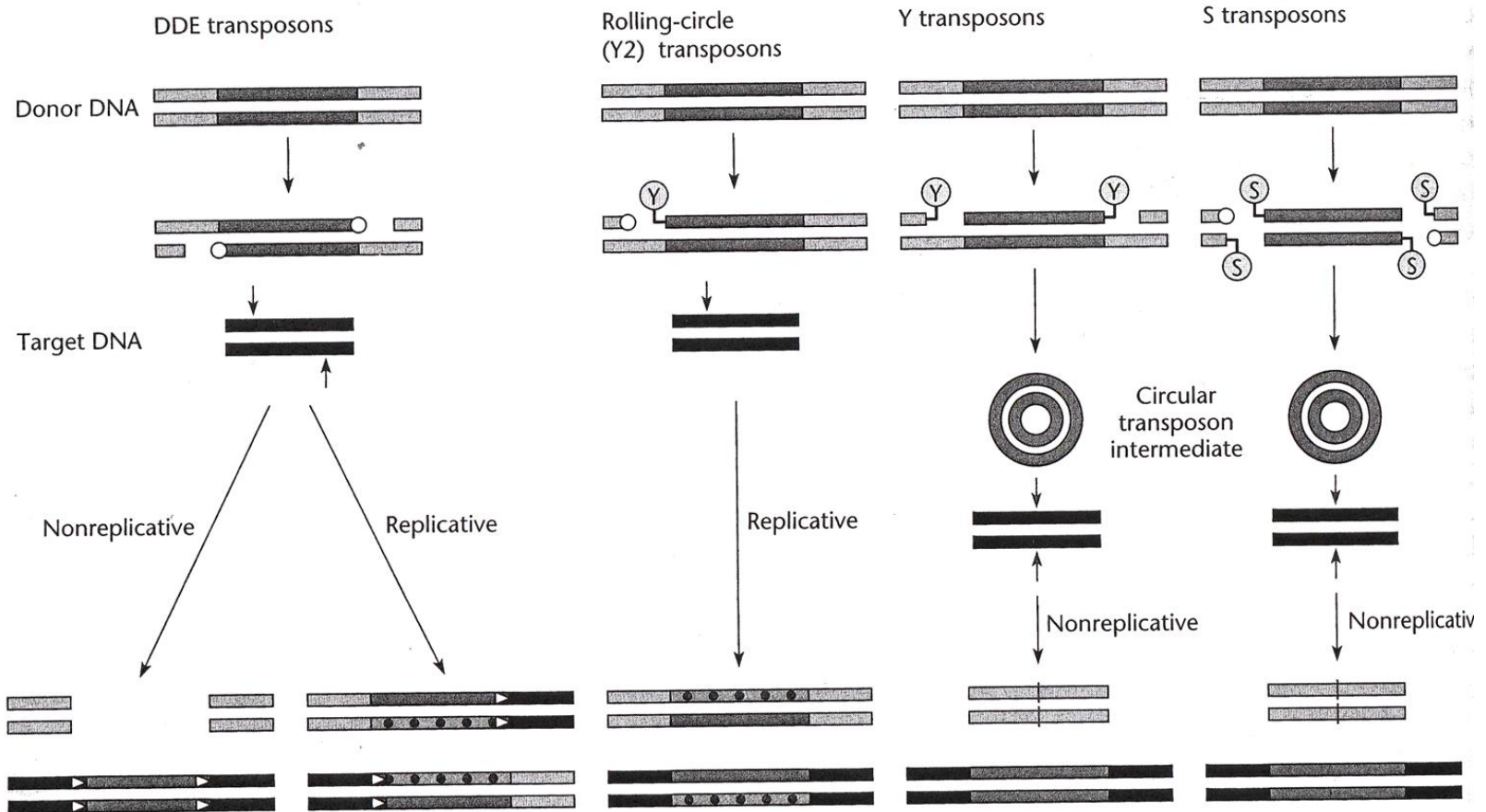
---

- Transponázy přemísťují DNA mechanismem valivé kružnice (rolling-circle)
  - 2 tyrosiny v aktivním centru transponázy
  - Podobné relaxazám konjugativních plazmidů
  - Odlišná struktura od DDE Tn
    - Nemají inverzní repetice na koncích elementu
    - Duplikují se během transpozice
  - Mechanismus transpozice není zcela objasněn
    - Jednořetězcový štěp na konci Tn - blízko *ori* místa
    - Kovalentní vazba na jeden tyrosin
    - Volná 3-OH skupina slouží jako primer pro polymerázu
    - Odstraněné vlákno je transponováno
  - IS91, IS200/IS605

# Přehled mechanismů transpozice



## □ Srovnání mechanismů transpozice DDE, RC, Y, S



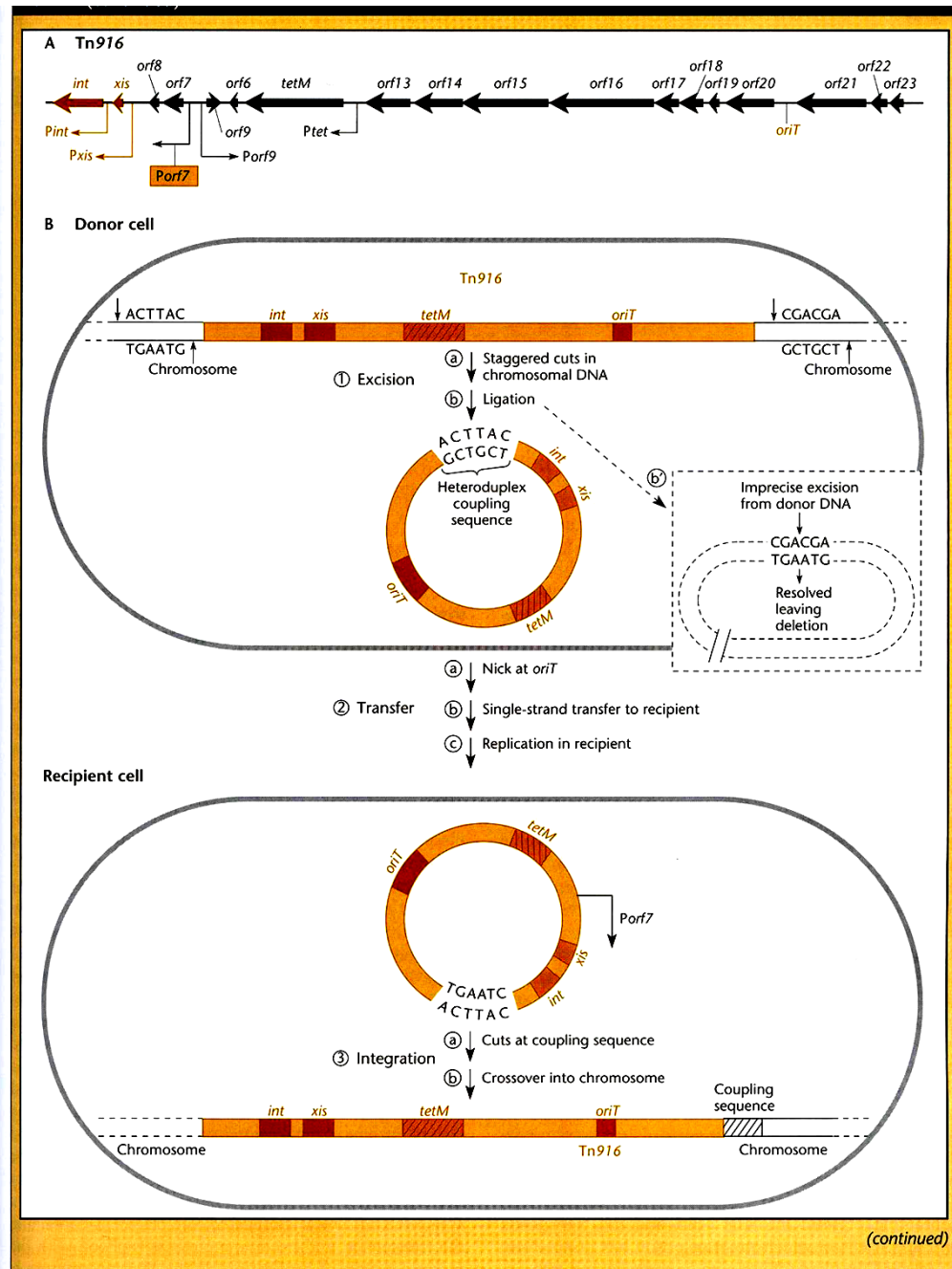
# Konjugativní transposony

---

## Transposony G+ bakterií

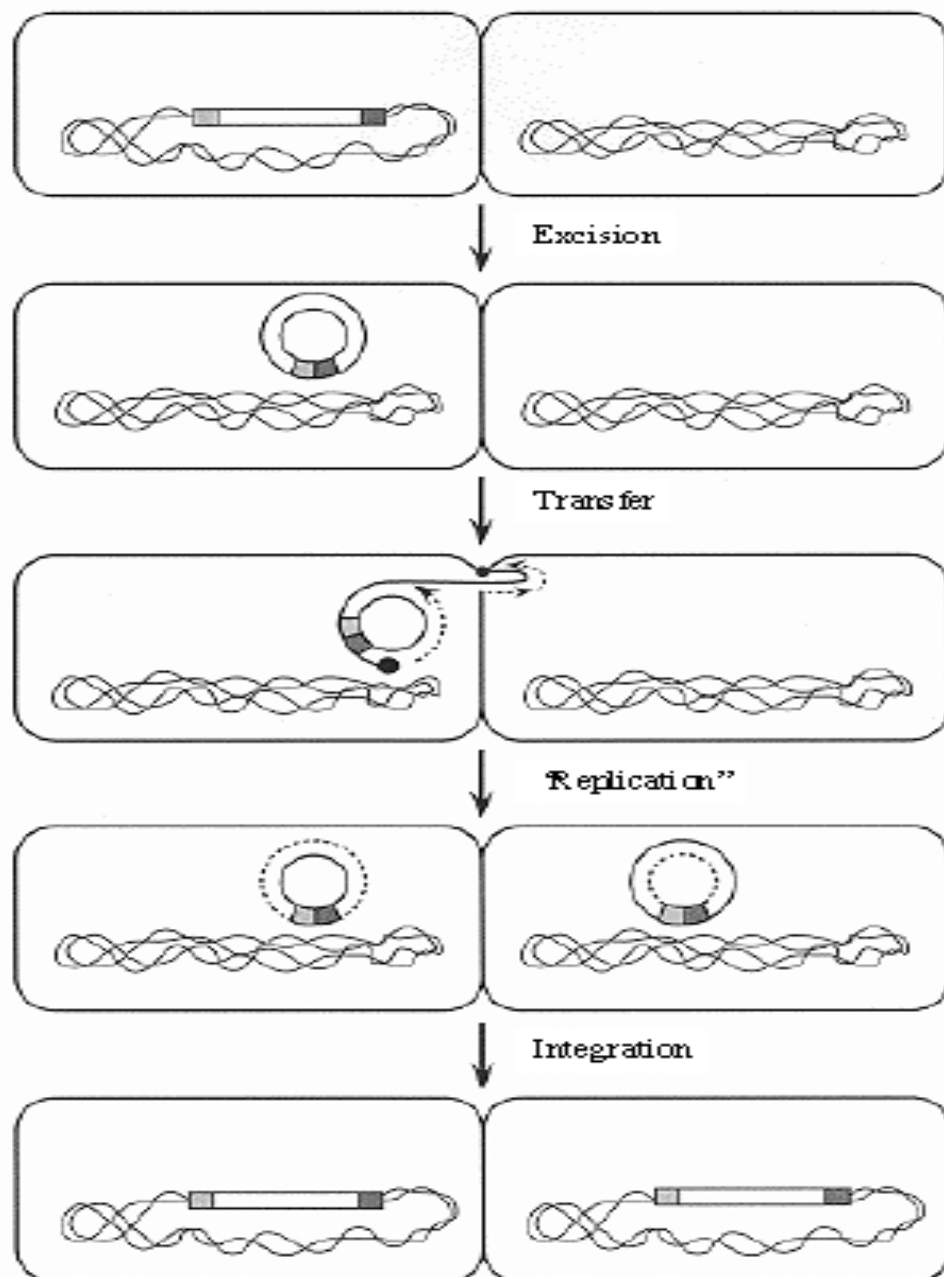
- jsou schopny intercelulární transpozice
- vyskytují se hlavně u rodu *Enterococcus* a *Streptococcus*, *Bacteroides*
- fenotypový projev je resistance k antibiotikům (Trc)
- hlavní zástupce: **Tn916** -18 kb, Trc(TetM) *Enterococcus faecalis*  
**CTnDOT** - Trc, *Bacteroides*  
**Tn1545** - 25 kb, Trc, Ery, Kan)
- lokalizovány na chromosomu, při přemísťování vzniká přechodně kruhová forma, která nemá schopnost replikace
- kódovány funkce, které jsou schopny jej přenést do druhé buňky konjugací podobnému procesu
- specifické místo oriT, slouží jako začátek konjugativního přenosu
- coupling sequences, ohraničují transposon, nejsou identické, podílí se na vystřížení
- v novém hostiteli opět dochází k transpoziční inzerci do chromosomu
- frekvence přenosu je od  $10^{-9}$  do  $10^{-4}$  (zvyšuje se při nízkých koncentracích kodovaného antibiotika)

# Konjugativní transposice



# Konjugativní transposice

---



# Integrony

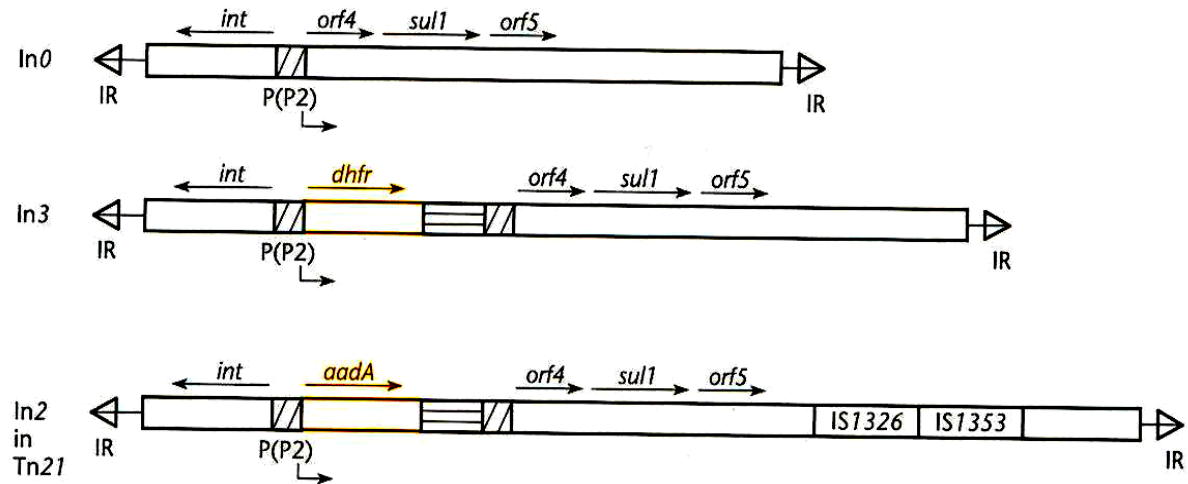
---

- **Objevení**
  - Při sekvenačních projektech podrobnou analýzou multiresistenčních plazmidů a transposonů.
  - v evoluci pravděpodobně sloužily k rozšiřování determinant resistance k antibiotikům případně i dalších genů
- **Vlastnosti**
  - Mohou **místně specifickou rekombinací** integrovat další geny pro resistance, pokud se tyto nacházejí v cirkulární formě a obsahují sekvenci nezbytnou pro reakci místně specifické rekombinace „attC site“
  - Mohou také gen pro resistenci vyrekombinovat a ten se může šířit dále
- **Struktura**
  - Integrony se skládají ze dvou konservovaných segmentů, mezi nimiž mohou být integrovány variabilní segmenty- genové kasety - nejčastěji kodující resistance k antibiotikům.
  - Konservované segmenty byly s ohledem na orientaci transkripce genu pro resistenci označeny jako 5'- a 3'- koncový segment.

# Integróny

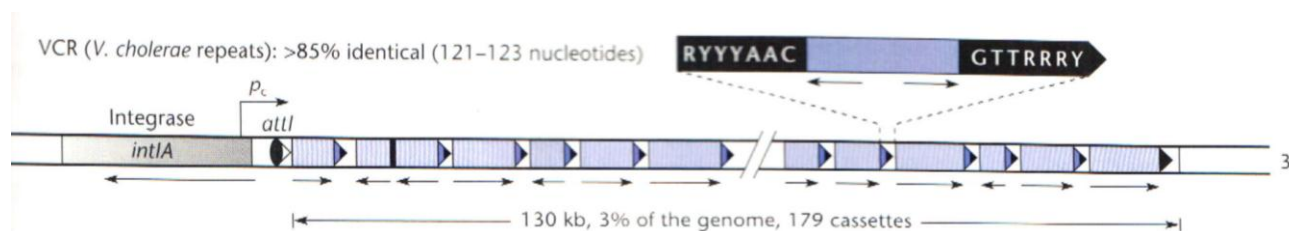
## Typ transposonu

- obsahují fágové integrázy
- P místo – místně specifická rekombinace
- Tn21



- int* Phage-like integrase
- sul1* Sulfonamide resistance
- dhfr* Trimethoprim resistance
- aadA* Streptomycin and spectinomycin resistance
- ▨ GTT
- ▨ 59-bp element
- P(P2) Strong promoter

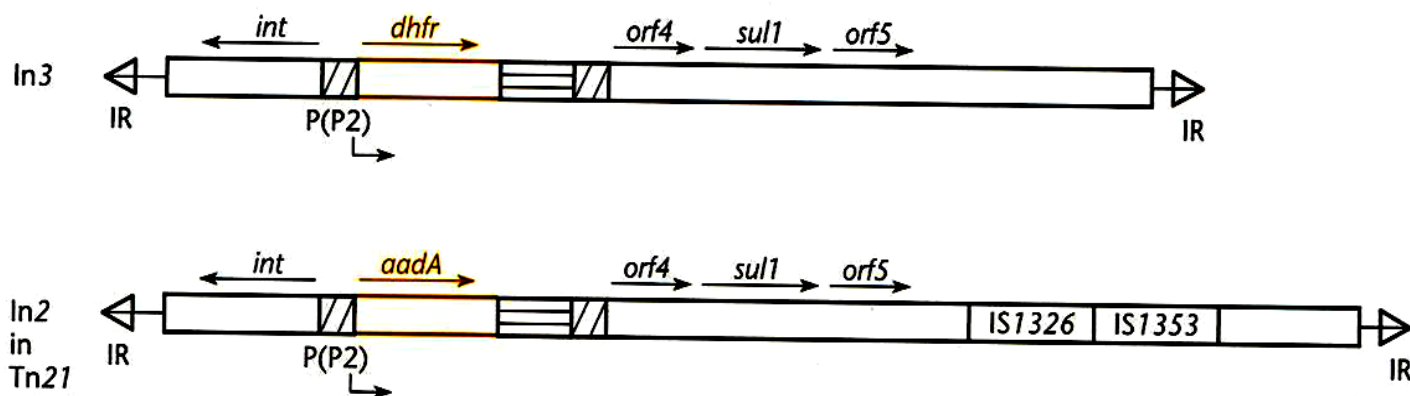
- Původ – chromosomální superintegróny – *Vibrio cholerae*





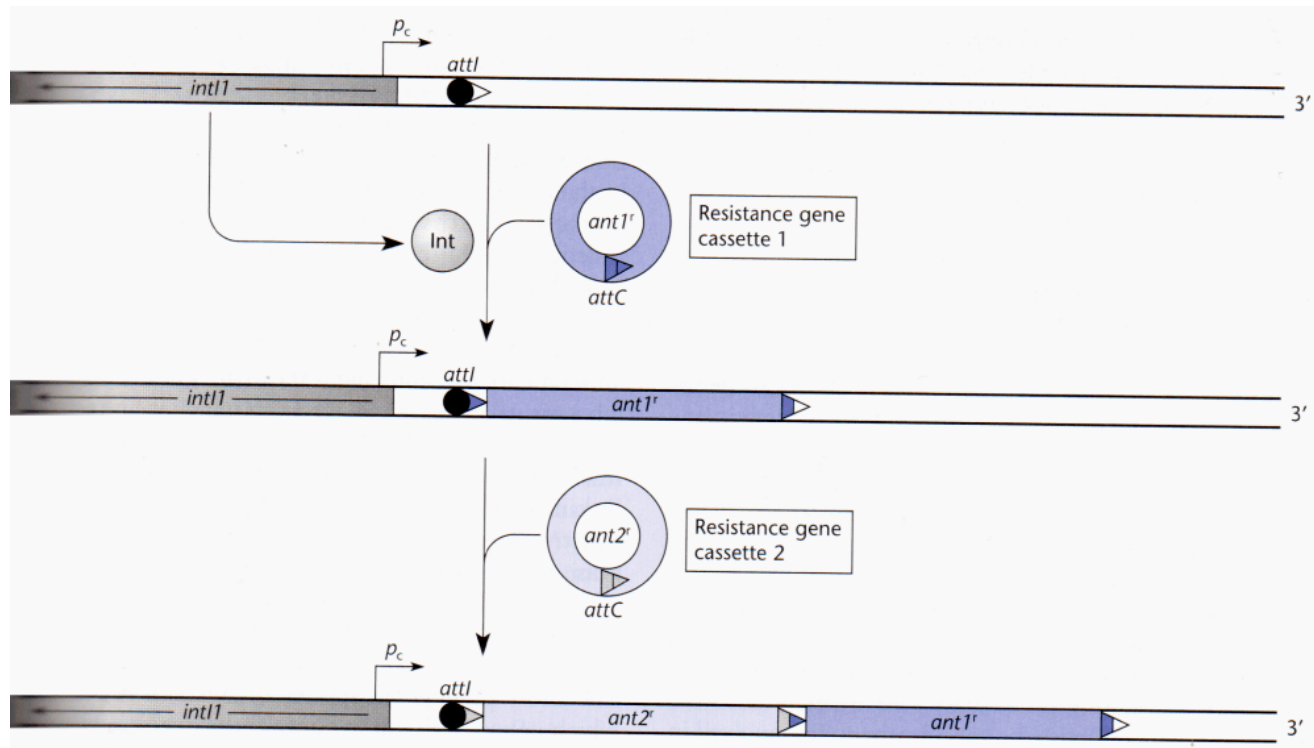
# Integróny - struktura

- 5'-koncový segment koduje místně specifickou rekombinázu (Int),
  - je příbuzná fágovým integrasám.
- Tento segment také obsahuje promotorovou oblast pro integrované genové kaskety, které většinou vlastní promotor nemají
- integrasy jsou rozdělovány do tří tříd podle charakteru rekombinací. Rekombinázy jsou identické asi z 50%.)
- 3'-koncový segment obvykle obsahuje gen pro resistenci k sulfonamidům (*sul1*) a další otevřený čtecí rámeček (třída 1) nebo s neznámou funkcí.
- Integrované kaskety genů kódují resistance k aminoglykosidovým antibiotikům, beta-laktamovým antibiotikům, trimethoprimu, chloramfenikolu atd.



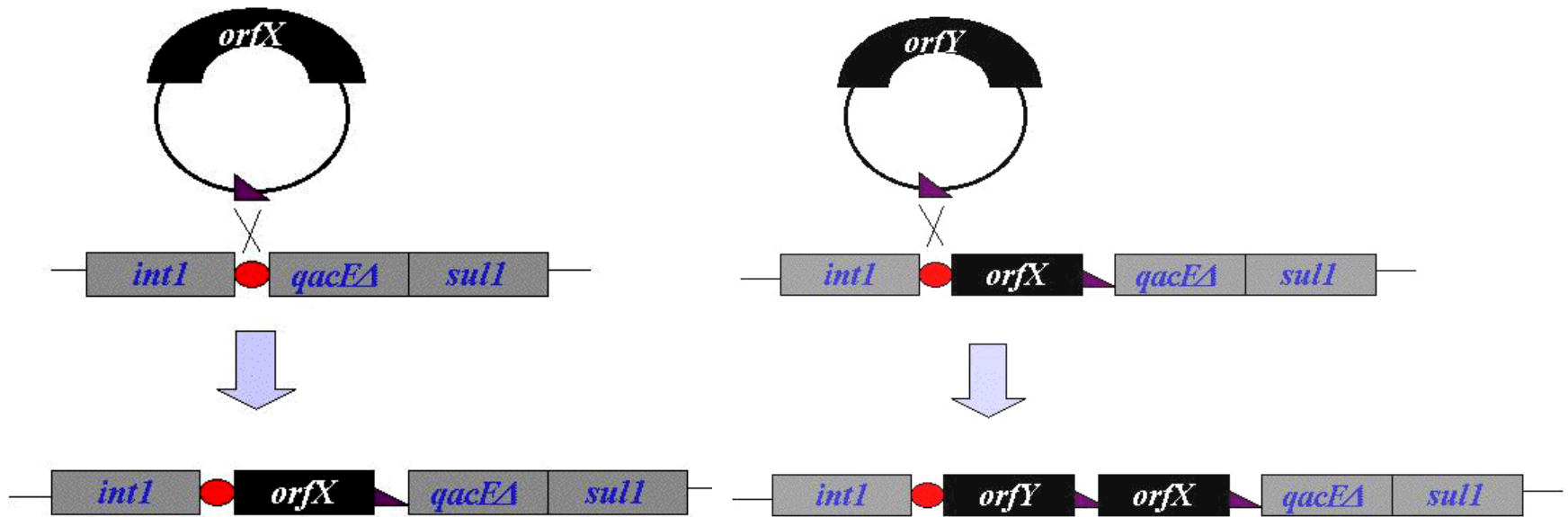
# Mechanismus integrace

- Primární integron obsahuje pouze integrázu a att místo
- Může integrovat rezistentní kazetu s attC místem



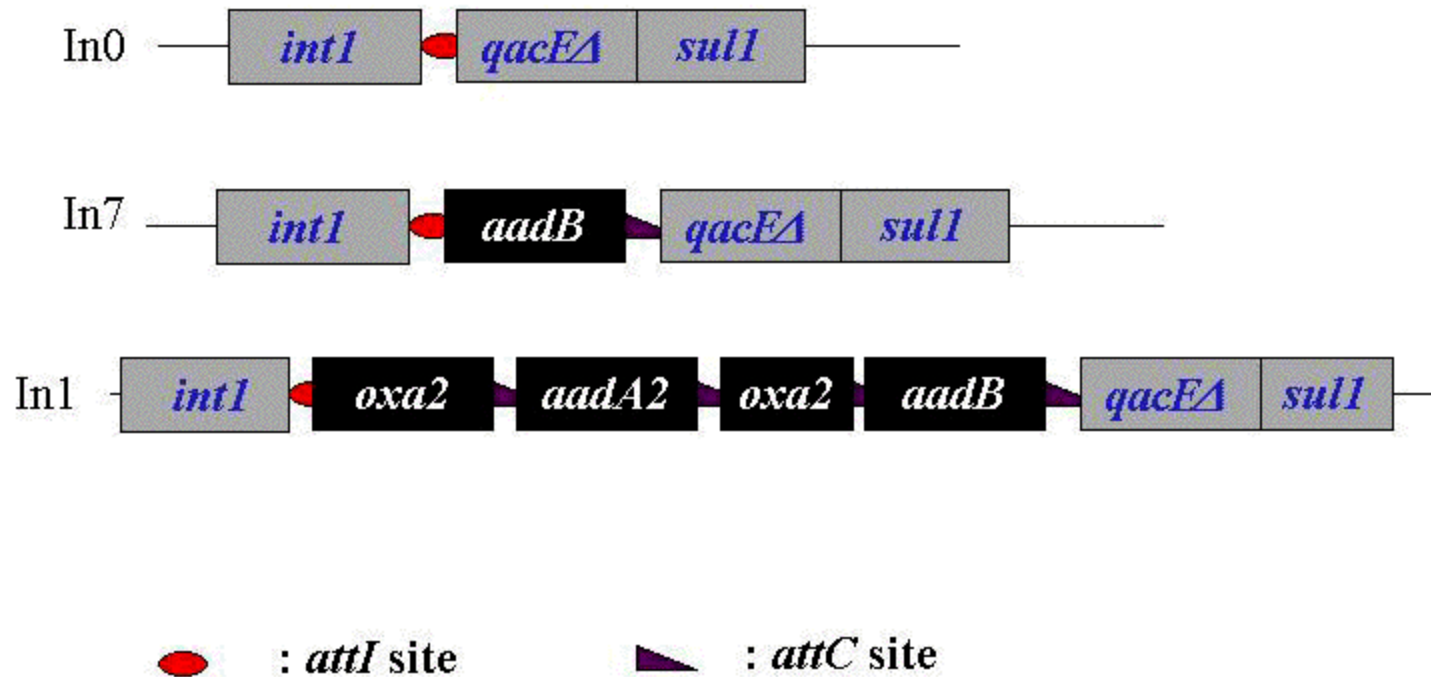
# Integrony - integrate

---



# Integracy

---

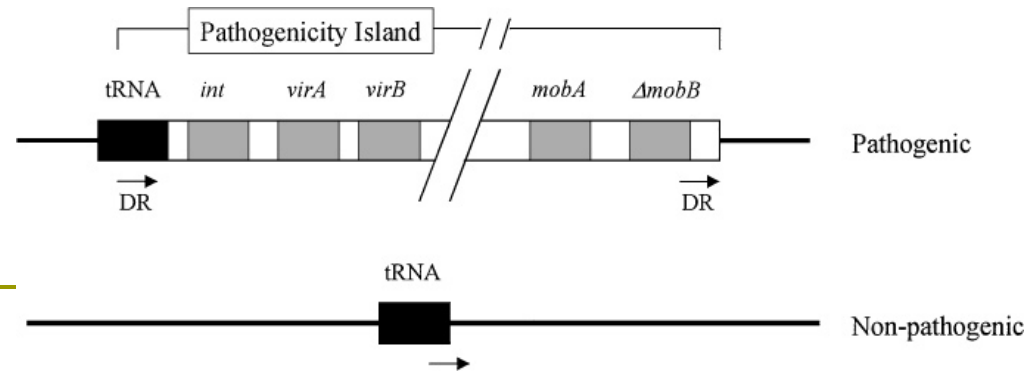


# Genomové ostrovy – GI (genomic islands)

---

- velké DNA elementy integrované do chromosomu
- nesou klastry genů umožňující bakteriím osidlovat specifická prostředí
- mohou být velké několik stovek kb a obsahovat stovky genů
- nemusí být vždy v celé populaci jednoho kmene (pathogenní kmeny)
- Kodují tyrosinové a serinové transponázy
  - někdy nefunkční
  - insertují se do hostitelské DNA, preferenčně do tRNA genů
- Jsou ohraničeny krátkými repeticemi – přímé i inverzní
  - podílejí se integraci a excisi
- mohou se přemísťovat intercelulárně –
  - využití satelitních virů (excise, replikace, maturace do fágových partikulí)
  - konjugativními plazmidy, některé mají vlastní konjugativní schopnost
- „Codon usage“ a G+C zastoupení je odlišné od hostitele
- přednostní inserce poblíž t-RNA genů, část t-RNA duplikovaná

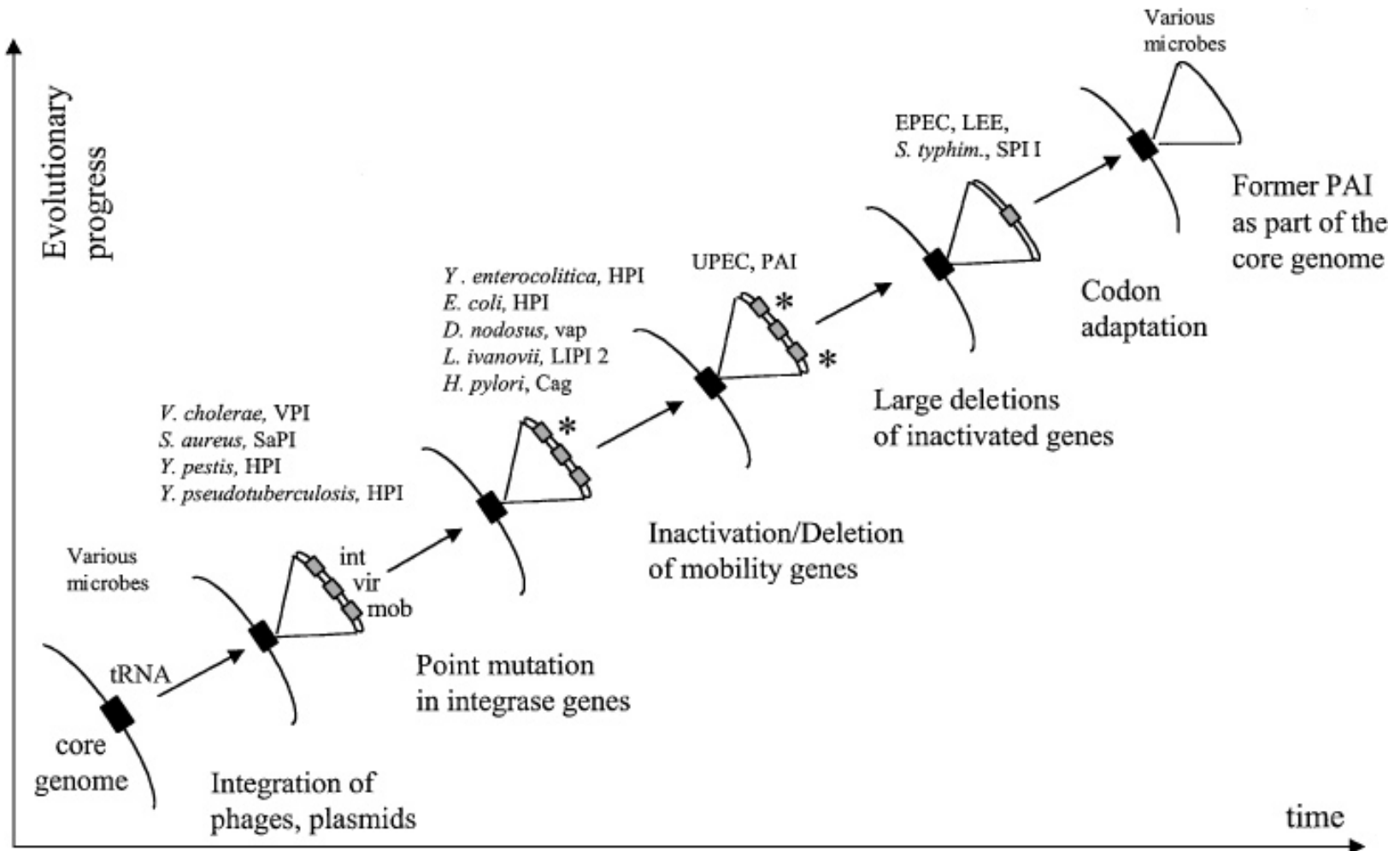
# Genomové ostrovy



## Pathogenní ostrovy

- Genomové ostrovy nesoucí geny způsobující virulenci
  - Geny pro adhezi, toxiny, transport železa, sekreční systémy
- Zatím nejsou zmapovány všechny
  - Geny pro iron scavenging u *Yersenie* ve zvířecích hostitelích
    - HPI<sub>yPS</sub> – *Yersinia pestis* – patogenní geny
  - Geny kodující sekreční systém typu IV, (*cag*) sekretující toxin u *Helicobacter pylori*
  - SaP11 patogenní ostrov *Staphylococcus aureus* – gen pro toxin.
    - Pouze ty organismy, které mají toxin mohou vyvolat nemoc
    - Jediný u kterého byl dokázán způsob pohybu – parazit fága 80α – obdoba P4 a P2
    - Sap11 je zcela závislý na fágovi i v tvorbě fágových partikulí
  - SSCmec – *Staphylococcus aureus* – rezistence
- Literatura: J. Hacker a J. B. Kaper. PATHOGENICITY ISLANDS AND THE EVOLUTION OF MICROBES Annu. Rev. Microbiol. 2000. 54:641–79

# Patogenní ostrovy - evoluce



Převzato: J. Hacker a J. B. Kaper. PATHOGENICITY ISLANDS AND THE EVOLUTION OF MICROBES Annu. Rev. Microbiol. 2000. 54:641–79

# Genomové ostrovy

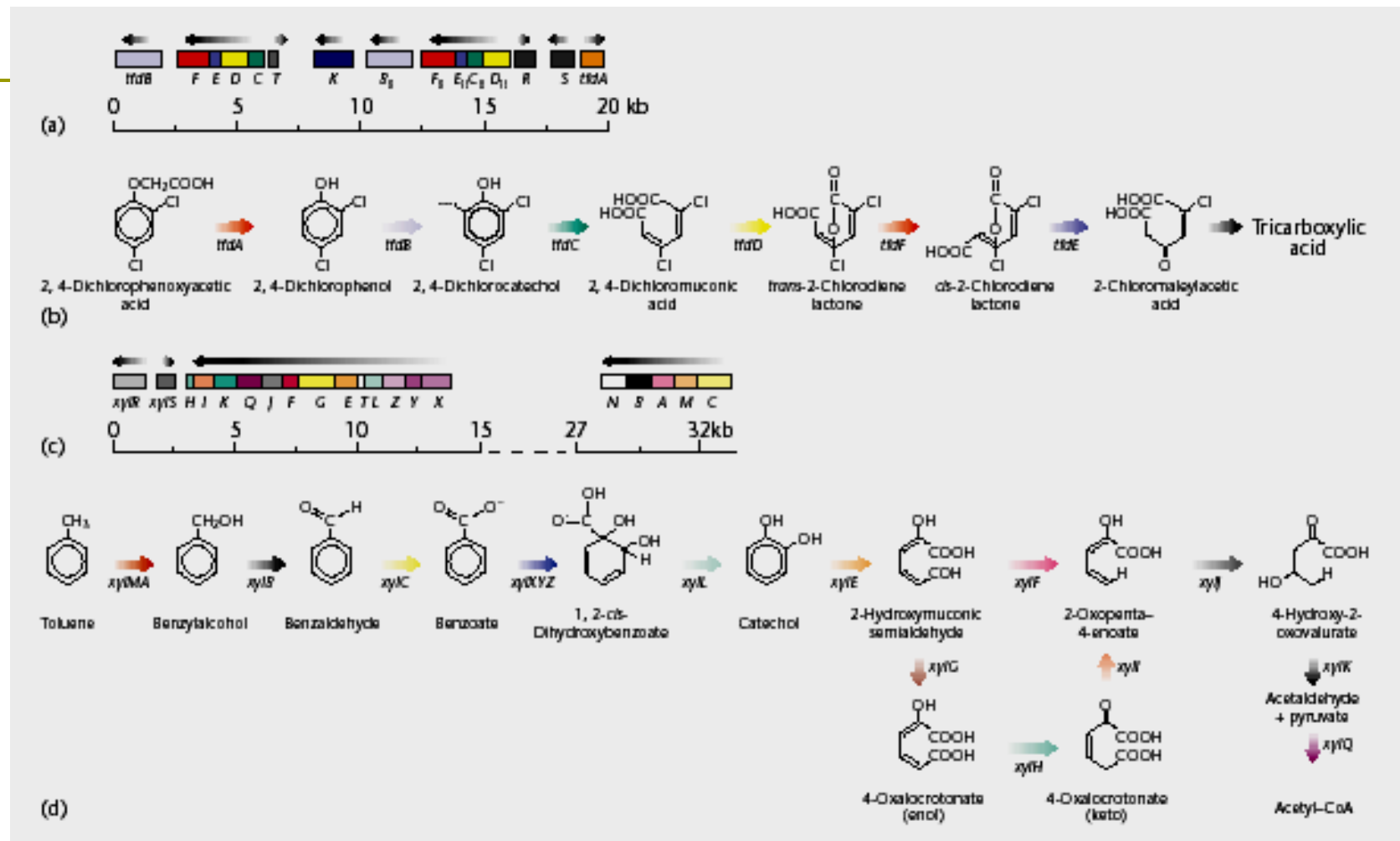
---

## Enviromentální ostrovy -

- genetické ostrovy nesoucí geny pro degradaci xenobiotik
  - vytváření nových katabolických drah skládáním horizontálně přenášených genů (patchworking)
  - katabolické geny degradace xenobiotik jsou vždy na MGE
    - nejvíce studovány plazmidy, pak transposony, poslední dobou genomové ostrovy
    - mobilní vlastnosti jsou dedukovány ze sekvencí
  - *clc* element - mineralizace chlorokatecholu -
    - *Pseudomonas* sp. degradující 3-chlorobenzoate
    - schopnost self konjugativního přenosu v rámci  $\beta$ - a  $\gamma$ - proteobakterií v různých enviromentech
    - insertují se do tRNA genů
  - Tn4371 -55 bp element - degradace CBR - *Ralstonia oxalatica* A5
    - mosaiková struktura několika strukturálních bloků, pravděpodobně z různých zdrojů
    - mají tyrosinovou rekombinázu - podobná fágovým integrázám
    - identifikován v ostatních CBP degradujících organismech
    - přenos pouze je-li insertován do plazmidu s širokým hostitelským rozhraním



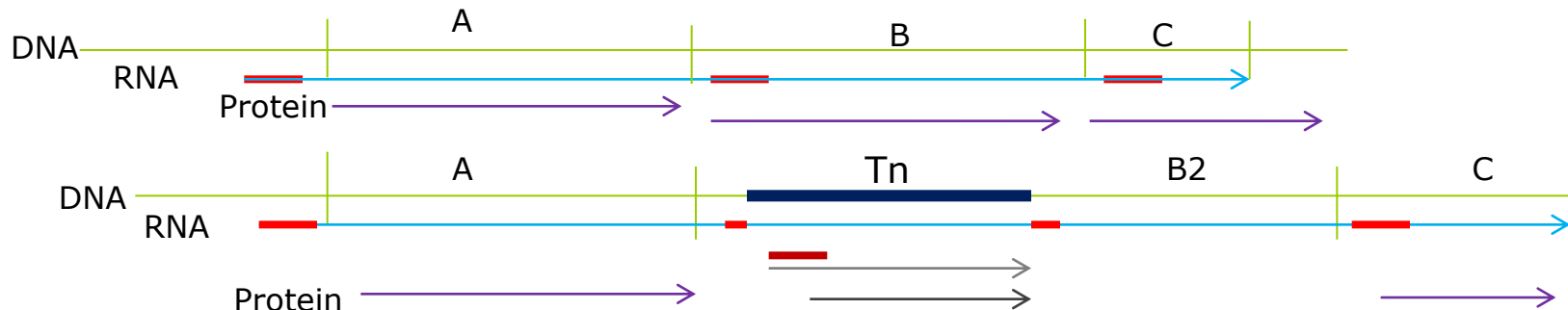
# Degradační dráhy aromatických uhlovodíků



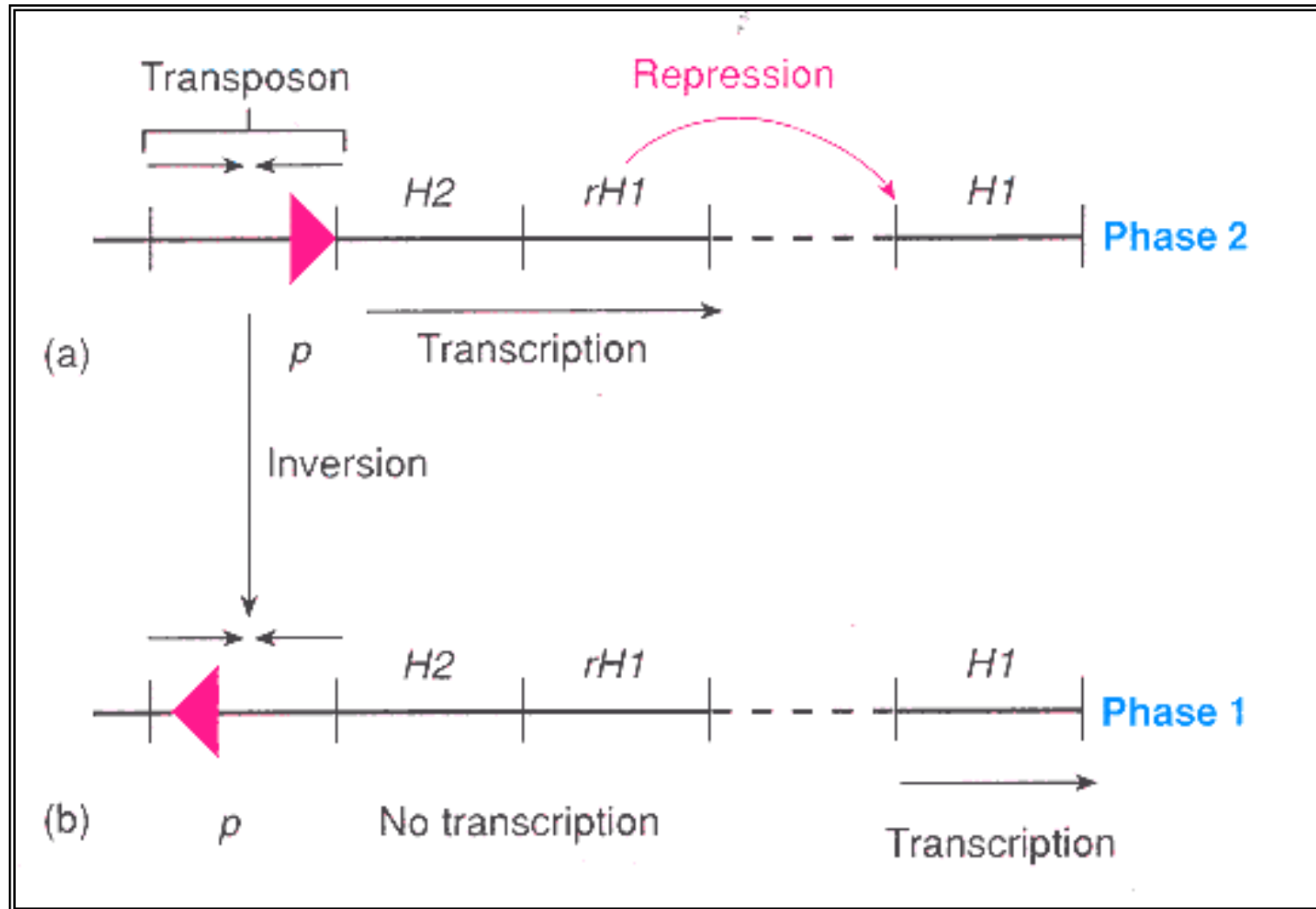
- Degradační dráhy pro přírodní i syntetické molekuly:
  - tfd regulon a pJP4, B) degradace 2,4 D pod regulací tfd, C) xyl regulon pWWD,
  - Degradace toluenu pod regulací xyl operonu

# Polární efekt Tn

- Vnesení  $P_{out}$  – ovlivnění regulace sousedních genů up stream od Tn inserce
- Inzerce do klastru genů – ovlivnění vytvoření polycistronní mRNA
  - Ovlivnění i genů downstream od inserce
  - Je-li terminace transkripce – není mRNA i pro další down-stream geny
  - Není-li terminace transkripce – nemusí být RBS
  - Vytváření nepřepisované mRNA – nové interakce

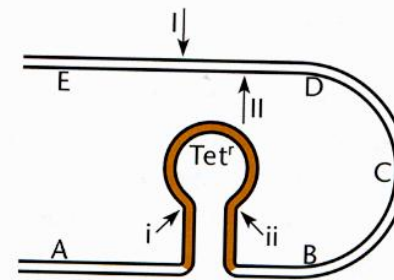


# Regulace genů pro flageliny u Salmonelly

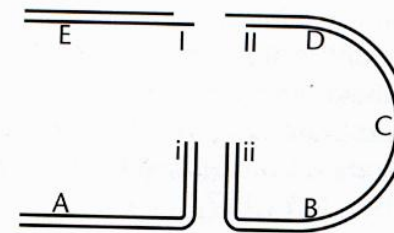


# Přilehlé delece a inverze - cut and paste

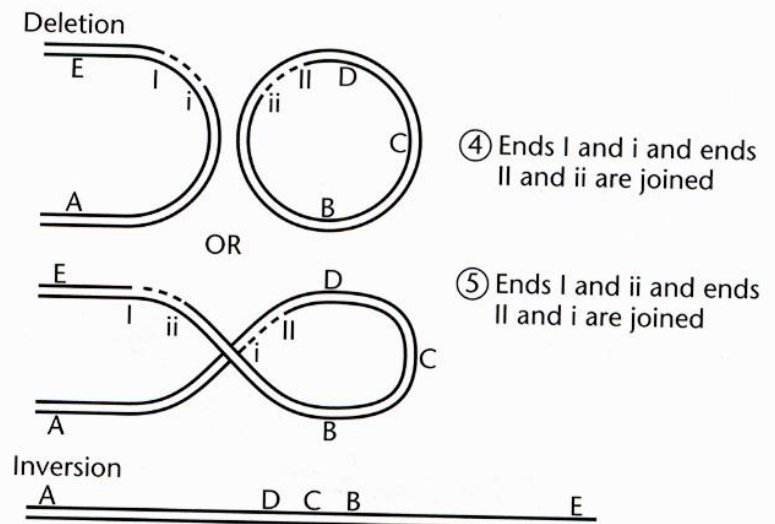
- ❑ přeskupení DNA při transpozici z vnitřních IR u kompositních transposonů
- ❑ část transposonu bez IR je rozložena aparátem buňky
- ❑ zda inverze či delece záleží na spojení konců DNA
  - delece - konce na „stejně“ straně, dojde k rozdělení řetězce DNA
  - inverze - dojde k „překřížení“ - vlákno DNA zůstane spojené, dojde k otočení pořadí genů
- ❑ možno použít na přípravu delecí



- ① Double-strand breaks at inside ends (i and ii) of transposon Tn10
- ② Staggered break (I and II) in target DNA

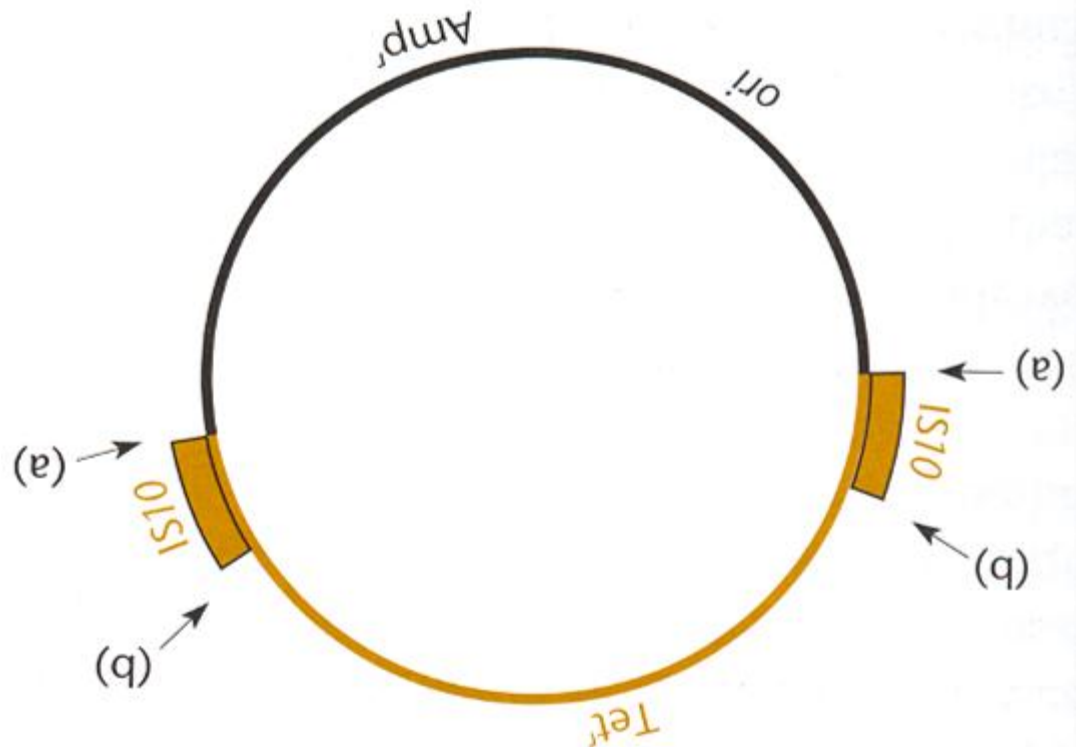


- ③ Tet<sup>r</sup> gene is destroyed

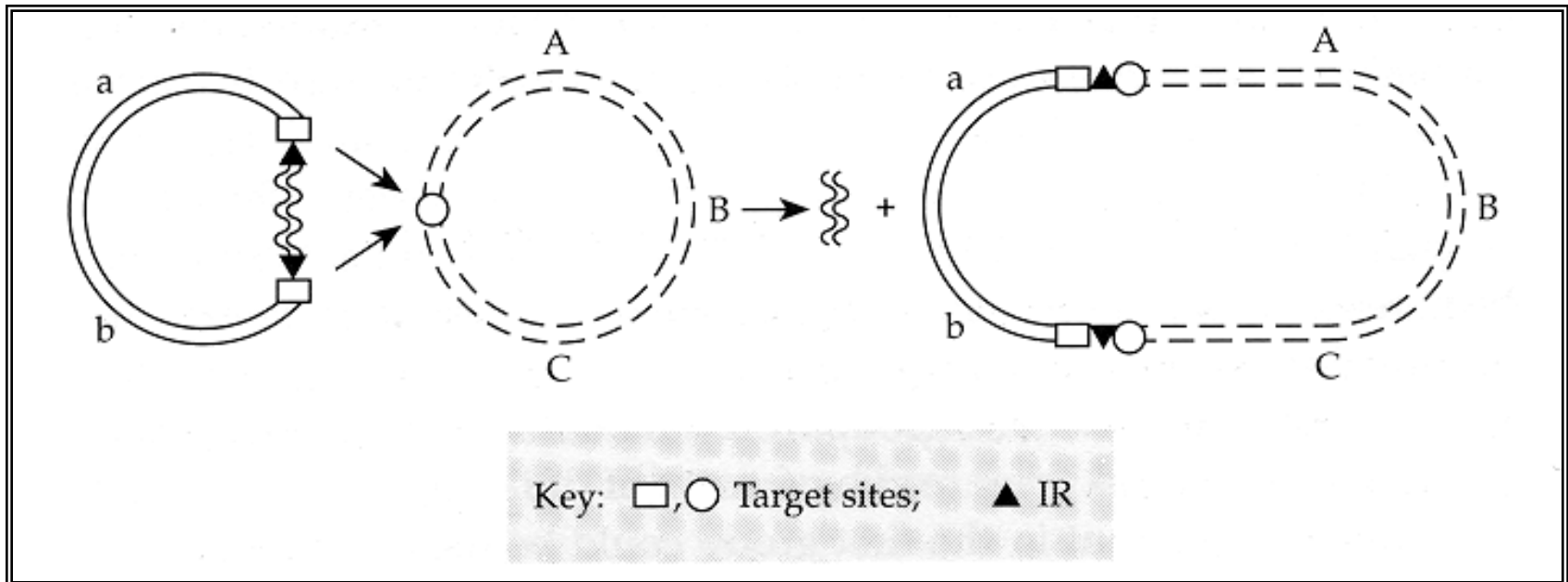


# Inverzní transpozice

- a) transpozice z vnějších IR
  - dojde k transpozici Tet resistance
- b) transpozice z vnitřních IR
  - dojde k transpozici plazmidu s ori i ampicilinovou resistencí
- vytváření nových transposonů

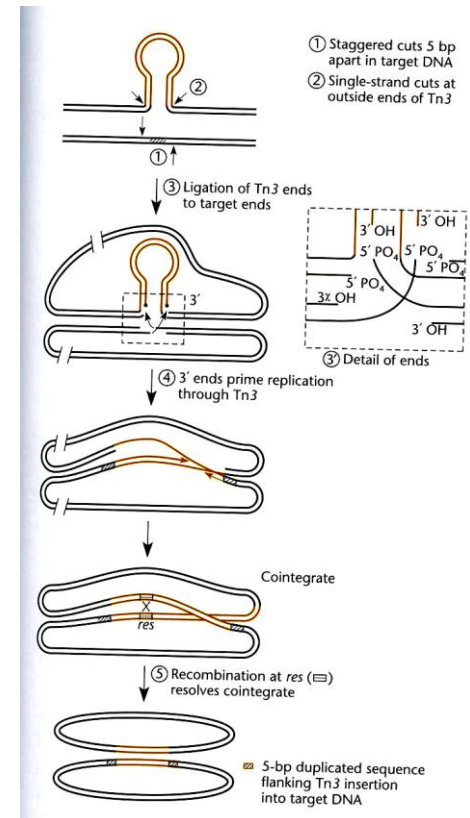
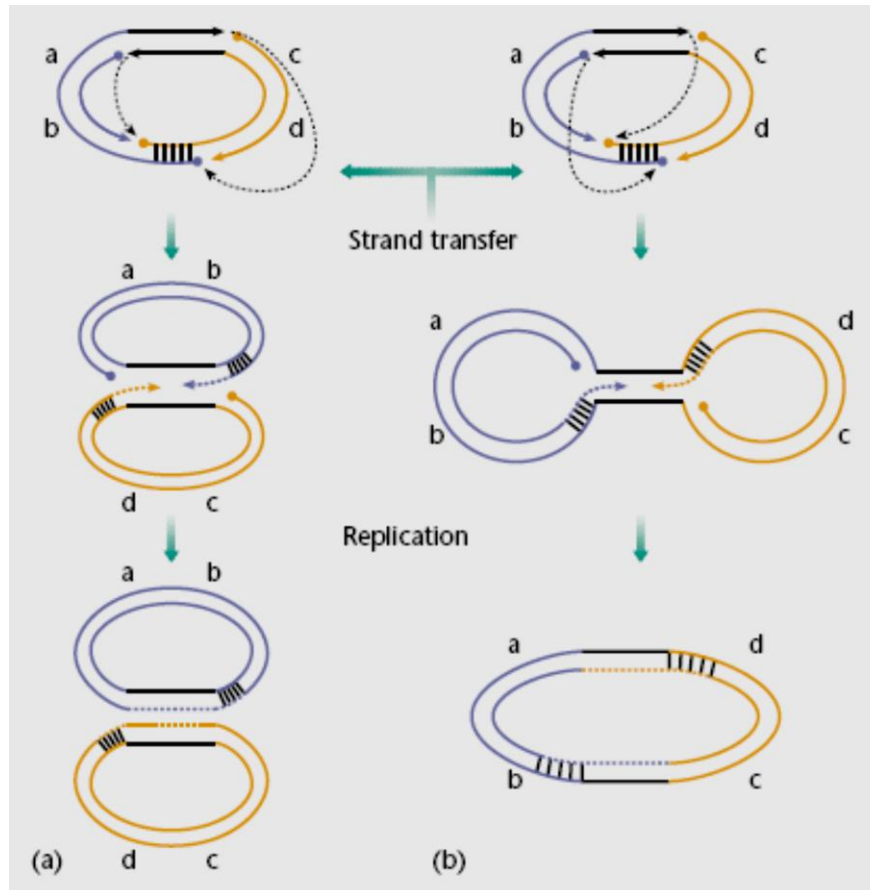


# Inverzní transposice – vytváření plazmidů



# Přilehlé delece a inverze - replikativní

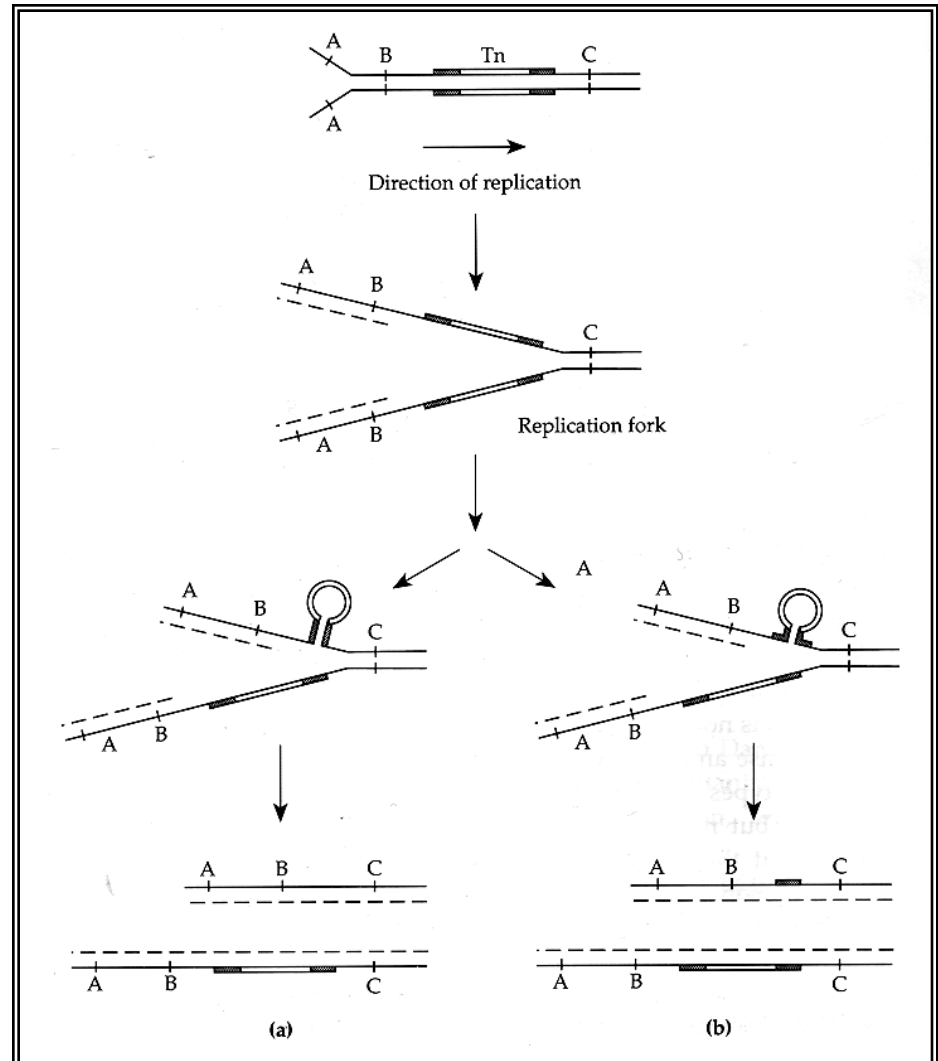
- Přilehlé delece a inverze vznikající při replikativní transpozici
- A) – delece
  - B) - inverze



# Chromosomální aberace spojené s transpozicí

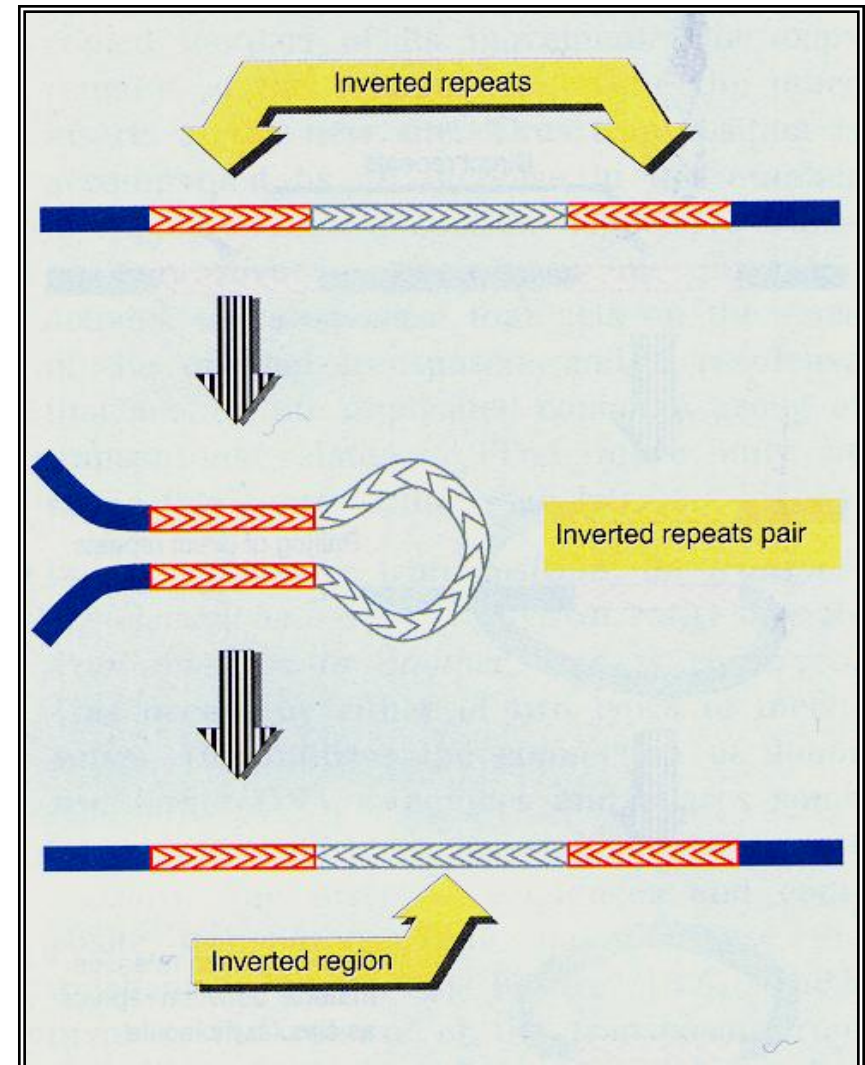
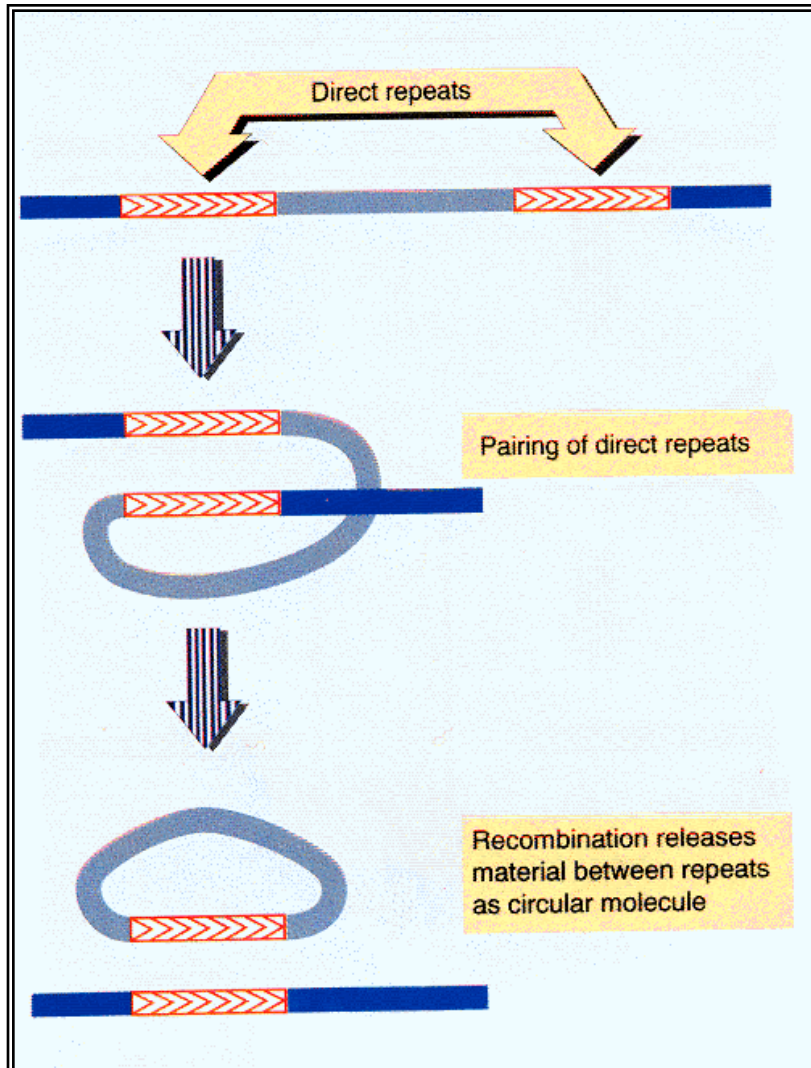
## □ Přesné či nepřesné excise TE –

- při replikaci, kdy TE vytvoří palindrom (zcela nebo částečně) ve frekvencích  $10^{-9}$  až  $10^{-1}$
- při přesné dojde k reversi mutace
- při nepřesné inserce části transposonu tandemové duplikace přímých repeticí

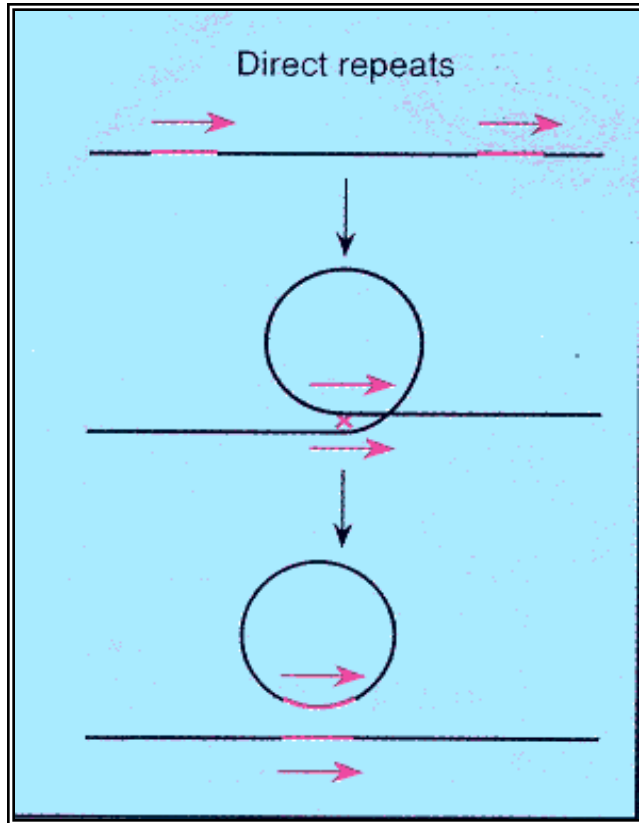




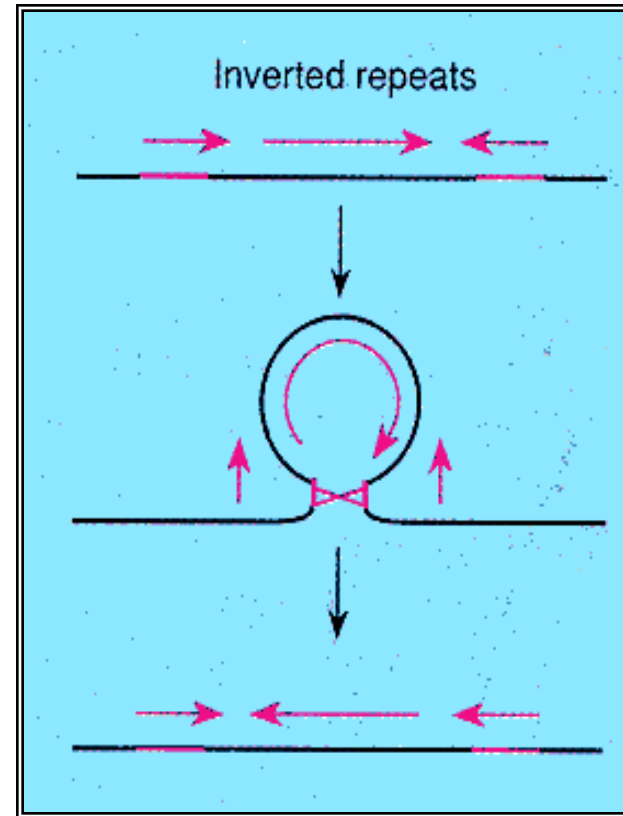
# Delece a inverze – homologní rekombinací IR



# Delece a inverze



mechanismus delece

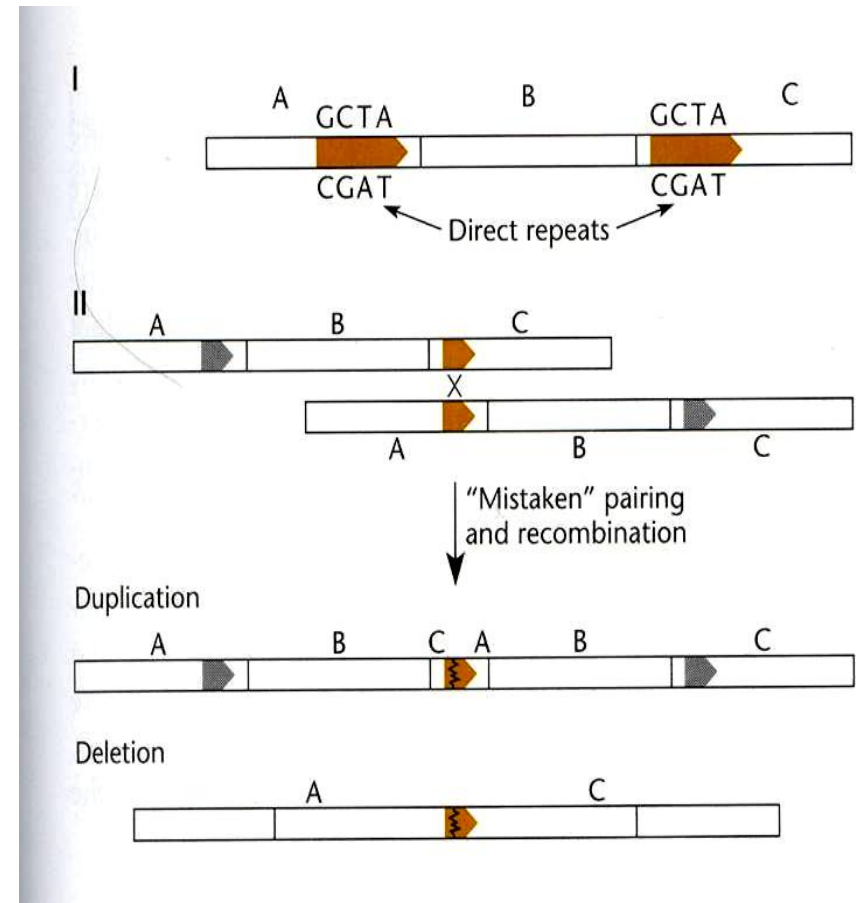


mechanismus inverze

# Delece, duplikace,

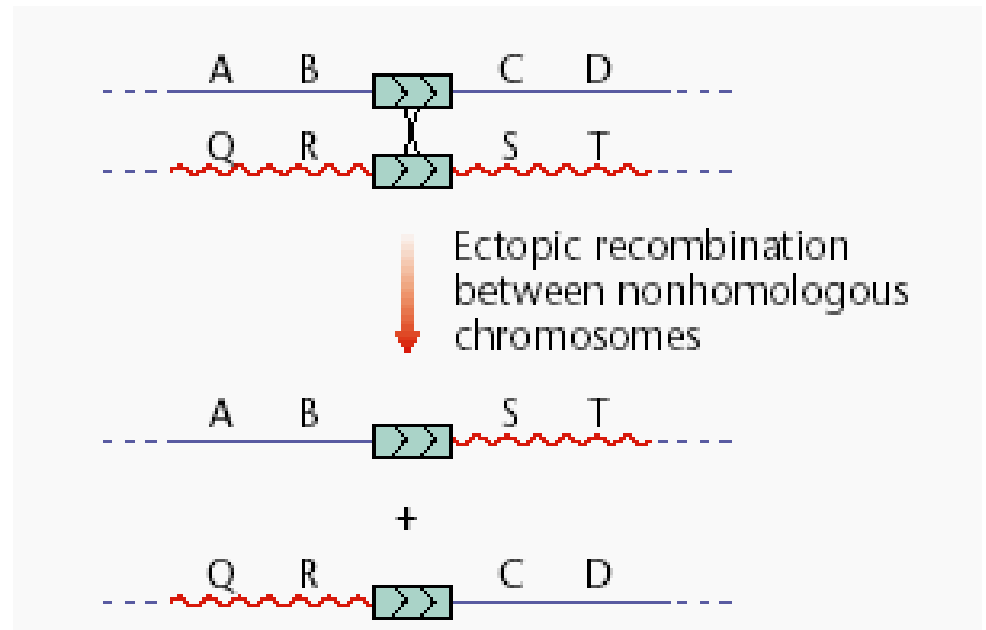
## Duplikace a delece genů

- Vznikají rekombinací mezi přímými repeticemi na jiném vlákně DNA
  - vznik duplikace genu mezi repeticemi na jednom vlákně
  - současně dojde k deleci genu mezi repeticemi na druhém vlákně
  - fenotypově se nerozezná, pouze projevuje-li se duplikace genu
  - duplikace jsou nestálé a dochází k rekombinaci a obnovení původního stavu



# Záměna genů

- Rekombinace mezi různými částmi chromosomu



# Chromosomální aberace spojené s transpozicí

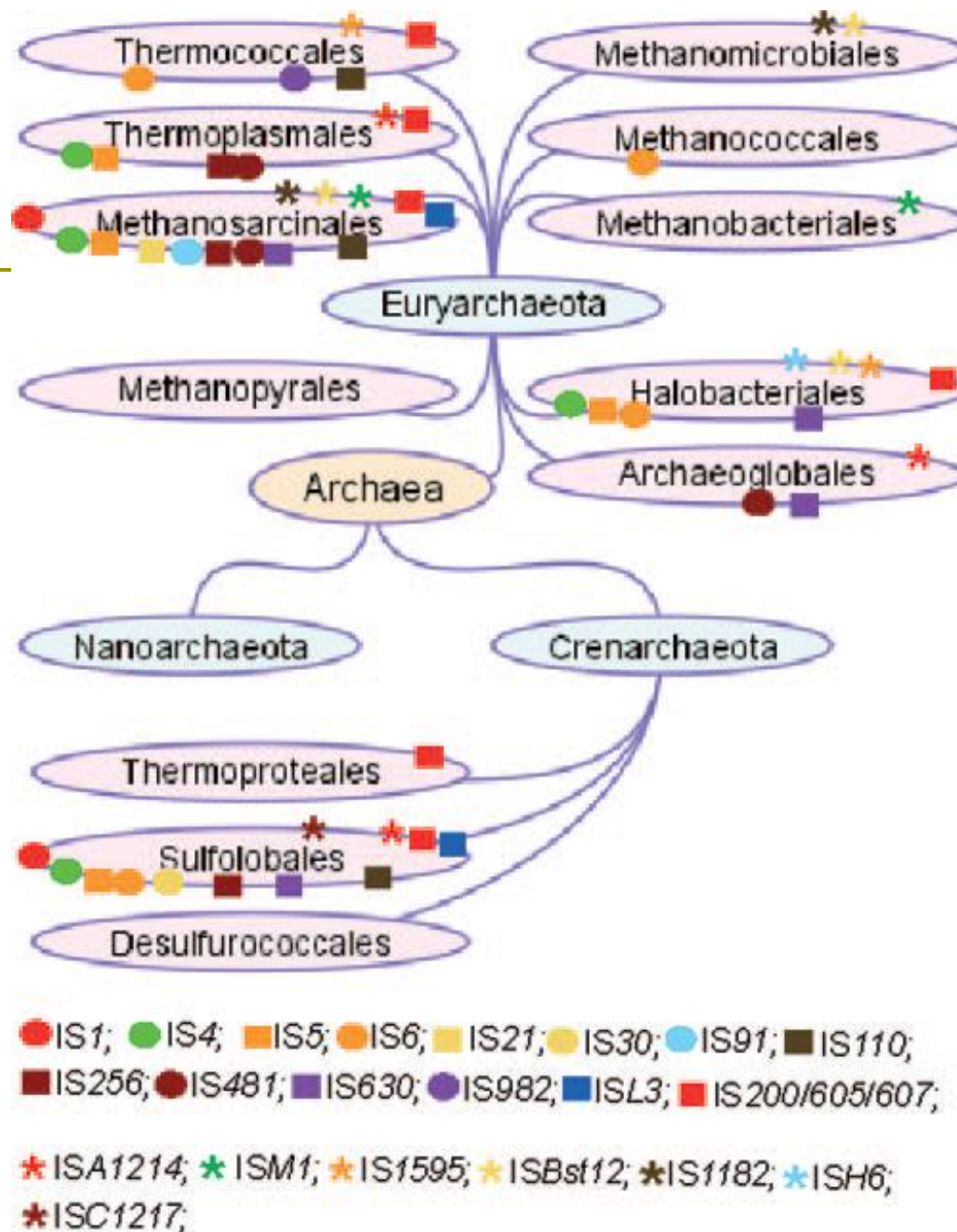
---

- **Přesné či nepřesné excise TE** - vznikají
  - při replikaci, kdy TE vytvoří palindrom (zcela nebo částečně).  
ve frekvencích  $10^{-9}$  až  $10^{-1}$
  - při přesné dojde k reversi mutace
  - při nepřesné inserce části transposonu
- **Přilehlé delece a inverse** - vznikají
  - při inverzní transpozici kompozitních TE, pokud je transpozice iniciovaná na vnitřních koncích IS elementů.
  - při intramolekulární transpozici, která následuje po vytvoření kointegrátu
  - při aberantní transpozici jen na jednom konci TE
- **Inverzní transpozice** - vznikají
  - pokud transposony I. třídy jsou součástí malého plazmidu, pak mohou transponovat plazmid, místo své vlastní sekvence.
- **Delece, inverse i duplikace** - vznikají
  - při homologní rekombinaci mezi dvěma kopiemi TE, přítomny jak v přímé či inverzní orientaci a to na jedné molekule či jiné molekule DNA

# Inserční sekvence archaea

---

- ❑ IS – první 1987 Pfeifer –
- ❑ Nyní 50 IS rodin – genom i plasmidy, mnoho kopií
- ❑ Struktura stejná jako u bakterií
  - Inverzní repetice, přímé repetice, transponáza
  - Většinou DDE
- ❑ Klasifikace podle Tn a repetice -
- ❑ Halobakterium halobium – inverzní repetice 15 bp a ORF 334 bp
  - 10% genomu
- ❑ Haloferax – ISH51 – pHV2
- ❑ Methanobacterium – na plasmidech – pFV1- ne v chromosomu
- ❑ Stejně třídy jako bakterie – IS1, IS3, IS4
  - Rozsáhlá distribuce, přes rozdíly archaea a bakterie – replikace (DNAG primasa), RNA polymeráza – cirkulární intermediát
  - Probíhá HGT bakterie – archaea – asistence proteinů archaea při expresi Tn
- ❑ Unikátní pro archaea – ISA1214, ISC1217, ISH6 – DDE Tn – halofilní bakterie
- ❑ RCR a S – též se začínají nacházet – bioinformatické studie
  - IS91 a IS200/605 – vždy též MITES v genomu – M. burtonii, Sulfolabes, Halobacterium
- ❑ Zatím pouze sekvence 28 archaea – (2007) – možnost dalších



# Inserční sekvence archaea

---

- Způsobují dynamiku genomu – rekombinací - přeskupování genů, delece
  - Mechanismus udržování „únosného“ počtu kopií
  - Neaktivní fragmenty IS
- Regulace exprese Tn – málo prozkoumána
  - Stejná jako u bakteriálních Tn (transkripční iniciace, translační iniciace a elongace, frameshifting, ncRNA, mRNA stabilita, interakce s proteiny hostitele)
- MITES – miniature inverted-repeat transposable elements
  - poprvé u eukaryot –
    - 50 až 300 bp repetitivní sekvence
    - Absence Tn ani dalšího ORFs
  - pohyb – neautonomní IS element – málo prozkoumáno – pravděpodobně in trans Tn z jiné části genomu – Y2 nebo Y,S
- Literatura:
  - Brügger, K. et al. Mobile elements in archaeal genomes. FEMS Microbiology Letters 2002, 206:131-141.
  - Filée, J. et al. Insertion sequence diversity in archaea. Microbiol. Mol. Rev. 2007, 71: 121-157.

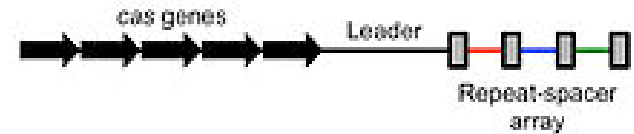


# Transposony archaea

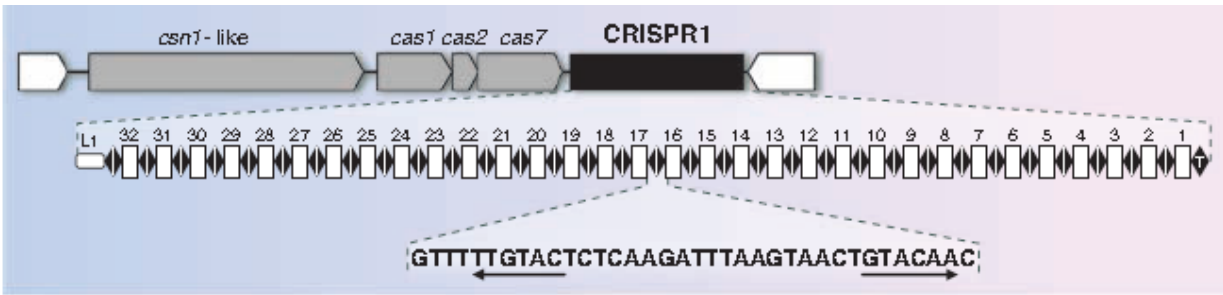
---

- Transposony – nebyly zatím objeveny
  - Neověřený kompositní transposon – dva *ISMba2 (IS1)*
    - Ohraničují 6,912-bp DNA segment
    - Fe-S oxidoreductasa, a tRNA nucleotidyltransferasa
    - a 3 necharakterizované geny
    - mutace v L vnitřní repetici – netransponovatelný jako IS
- Rekombinantní transposony – pro genetické manipulace –
  - Odvozené od eukaryotních - *Methanothermobacter*
  - odvozené od ISH
  - ISH2, ISH26, ISH28 – *Halobacterium* –
    - Jsou sekvenované
    - Jsou velmi mobilní
    - Jsou nespecifické
    - Gen pro mevinolinovou rezistenci
    - Klonované do E.coli plazmidu
    - Problémy -

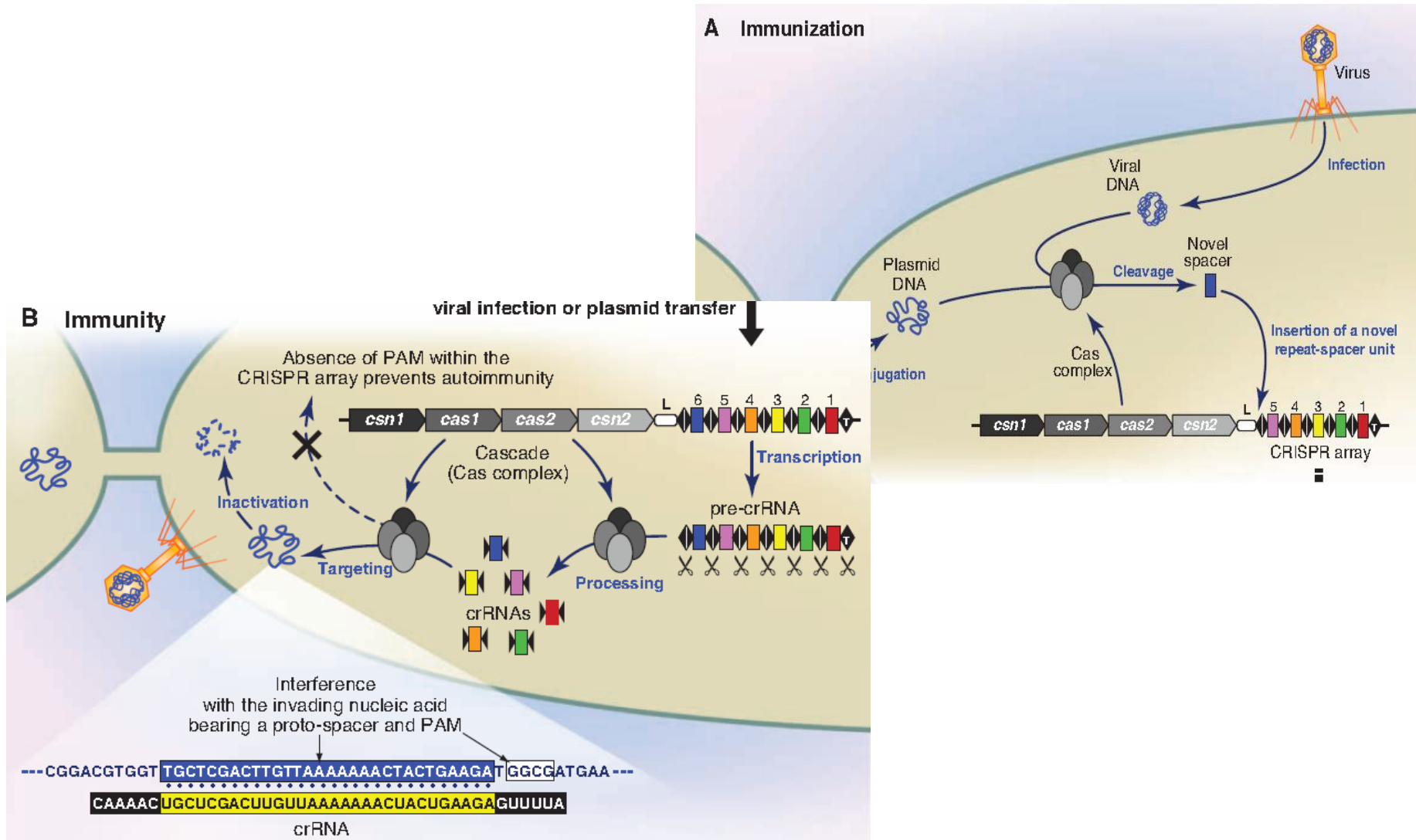
# Unikátní repetitivní elementy



- CRISPR – regularly interspaced short palindromic repeats
  - nalezeny ve všech studovaných archaea i jejich plazmidech
  - posléze i v některých bakteriích
  - přímé repetice – 4 až 100 kopií oddělené nerepetitivními nekodujícími úseky DNA o stejné sekvenci - 25 až 40 bp (spacery)
  - opakování vytváří klastr
  - sekvence spacerů odvozená od virů a plazmidů –
    - určitá forma „paměti“ po předchozí expozici fágem
  - někdy asociované z proteiny – vytvářejí imunitní ochranu proti virům
    - mechanismus neznámý - informace elsnat 2008- mechanismus znám 2011
  - podobné v různých druzích – přenesené HGT



# CRISPR



# Introny a inteiny

---

- Introny I i II typu
  - Podobné bakteriálním
- Nalezeny v některých genech kodující stabilní RNA – 16S a 23S rRNA, tRNAs
  - Podobné eukaryotickým tRNA – podobné mechanismy sestřihu
- Několik v genech pro proteiny – DNA polymerase
  - Methanocaldococcus

# Introny a inteiny - bakteriální

---

- nekodující DNA – uprostřed kodující
  - vyštěpuje se z RNA – introny
  - Vyštěpuje se z proteinu - intein
- Introny I a introny II – podle mechanismu vyštěpování
  - InI – iniciace štěpení – volný guanosin –
    - iniciace štěpení na 5 konci intronu
    - bakteriofágové geny (T4) a tRNA
    - pohybují se – pomocí kodované endonukleasy do stejného místa, jiného řetězce DNA – homing
    - okolí důležité pro vyštěpení z RNA
  - InII – specifický adenin – „lariat structure“
    - Analogický eukaryotnímu mechanismu
    - Konjugativní plazmidy a transposony
    - maturase protein- reverzní transkriptáza – endonucleasa - navodí strukturu vhodnou pro self-splicing – přepis do DNA a znova zaštěpení do chromosomu
- Inteiny – bakterie až člověk – iniciační serin, cystein
  - Fúze části proteinu v rámci jednoho genu i různé části jiných genů (i vzdálených)
  - Narušení diesterové vazby OH skupinou z postraního řetězce aa

# Introny a inteiny - bakteriální

## □ Introny

