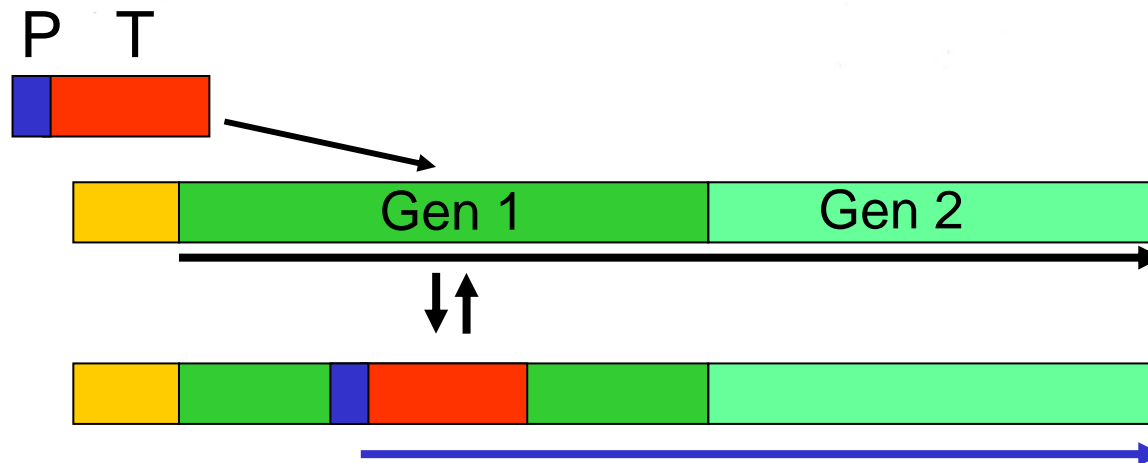


## **Transpozony - mobilní genetické elementy**

- **Tvoří pravidelnou součást genomu prokaryot i eukaryot (až 50% genomu)**
- **Navozují mutace genů (inzerční inaktivace, polární mutace, změny exprese genů)**
- **Jsou zodpovědné za přestavby chromozomů nebo plazmidů (tvoří "přenosné" úseky homologie, podmiňující homologní rekombinace, interakce mezi složkami genomu)**
- **Přenášejí nové znaky (např. AntR, onkogeny) mezi organismy (horizontální přenos genů)**

## Specifické rysy transpozice:

- cílová místa nejsou homologická s místy donorovými
- obvykle dochází k duplikaci přenášené sekvence, tj. transpozon zůstává i v původním donorovém místě
- v místě inzerce se zdvojují ve stejném směru sekvence DNA - transpozon je na obou koncích ohraničen přímými repeticemi, což je důsledek mechanismu transpozice
- po inzerci transpozonu do cílového místa dochází k inaktivaci genů, po excizi transpozonu se funkce obnovuje.



# Základní typy transpozonů a jejich klasifikace

## DNA-transpozony

- **Transpozony „cut and paste“** (prokaryota a eukaryota) – vyčlení se z původního místa a začleňují se do nového
- **Replikativní transpozony** (prokaryota) – během transpozice se replikují (jedna kopie zůstává v původním místě, druhá se objeví v novém místě)
  - **Konjugativní transpozony** (bakterie) – horizontální přenos

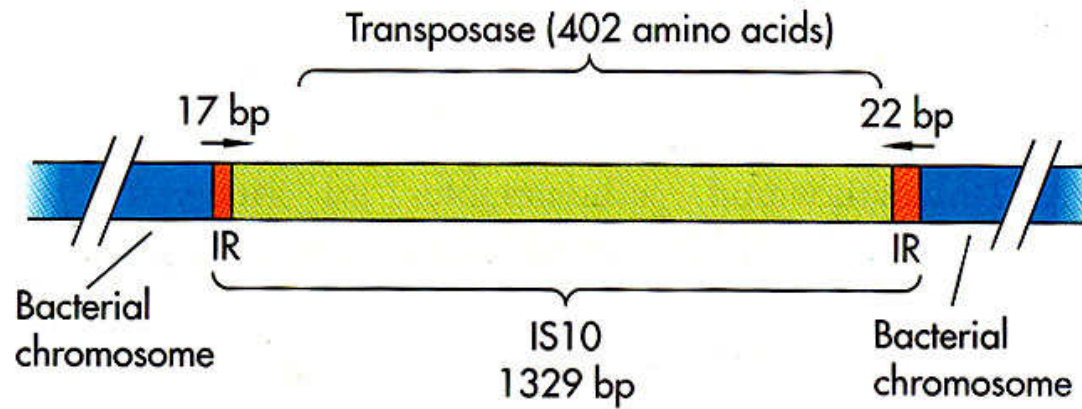
**Retrotranspozony** (eukaryota) – **během transpozice se transkripční sekvence transpozonu vytváří RNA**, která se převádí reverzní transkripcí na DNA, která se pak začleňuje do nového místa

- **retroviry**,
- **retrovirům podobné elementy, retropozony**
- **retrony** (bakterie)

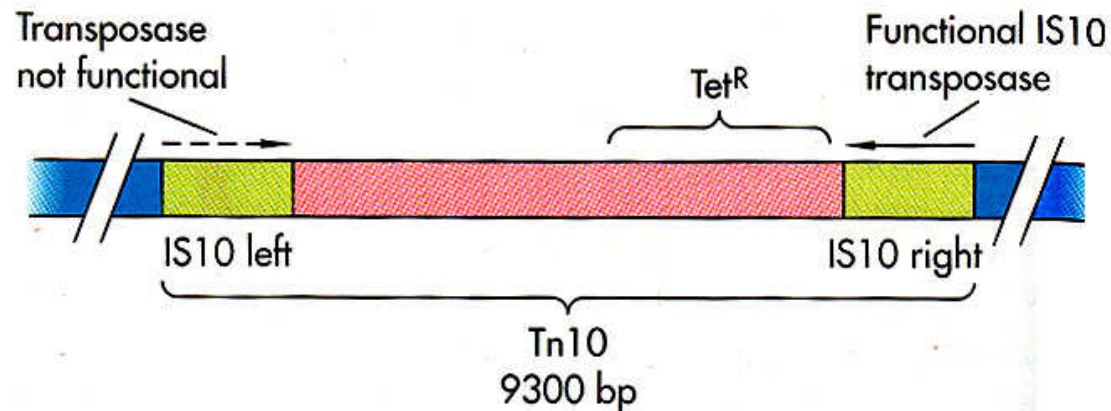
# Struktura mobilních elementů bakterií

## Inzerční sekvence (IS)

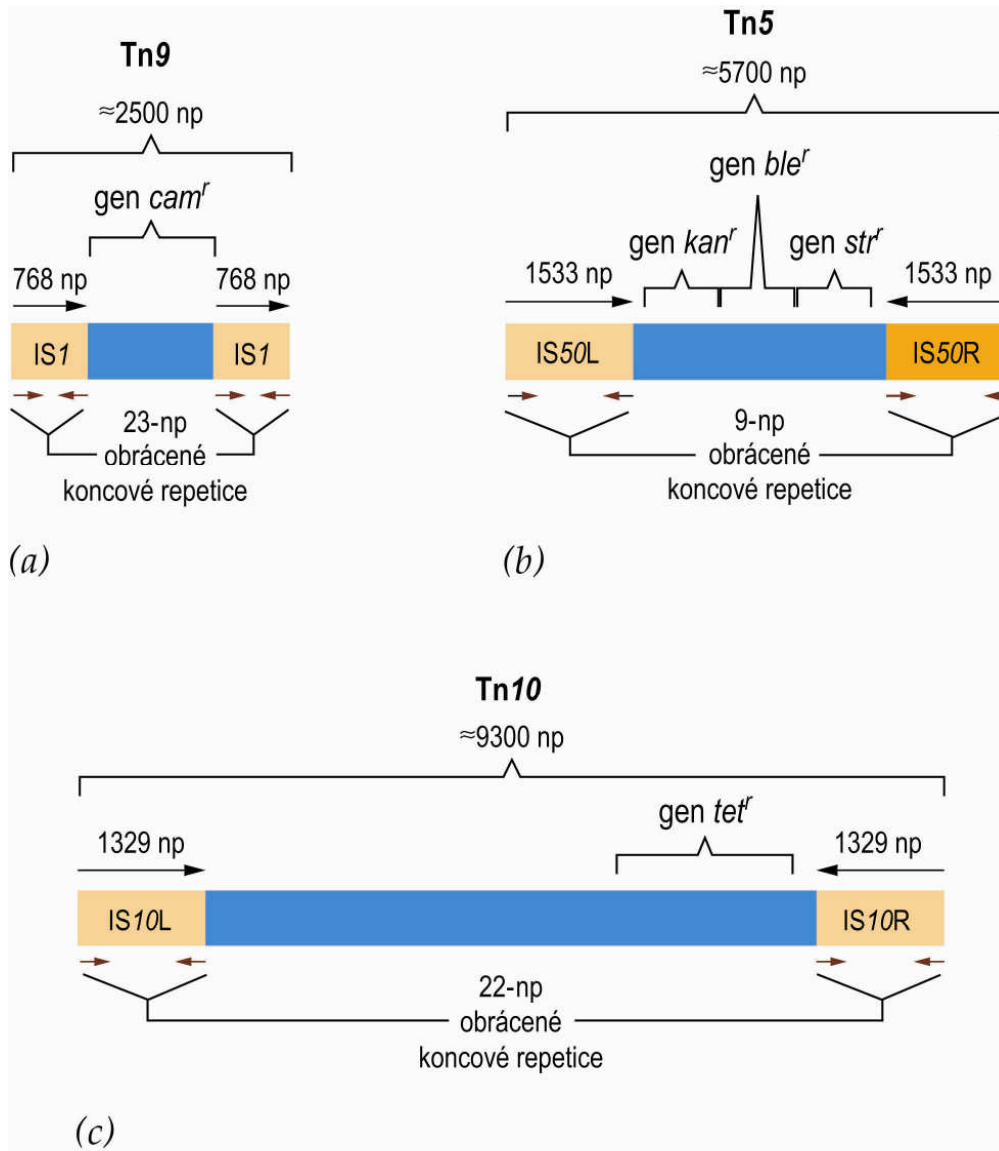
### transponáza



## Složené transpozony (Tn)



# Příklady složených transpozonů bakterií



**Rezistence k antibiotikům:**

**Kanamycin**

**Gentamycin**

**Ampicilin**

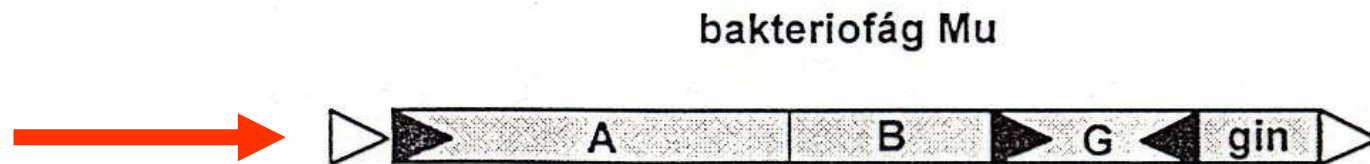
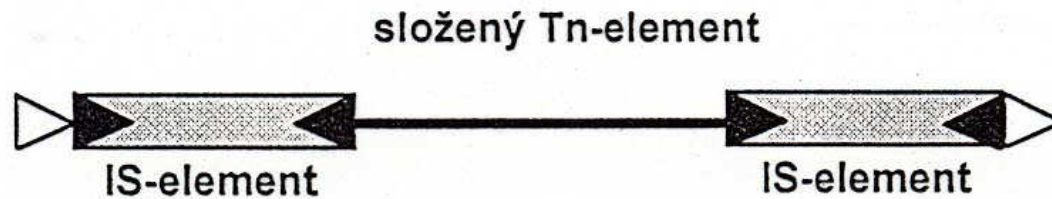
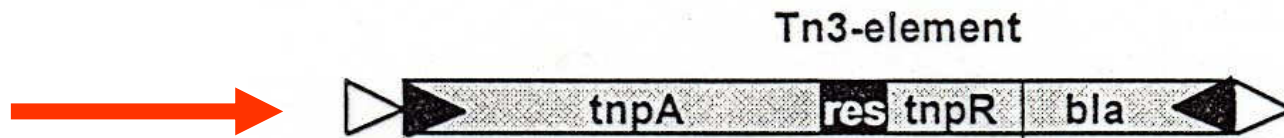
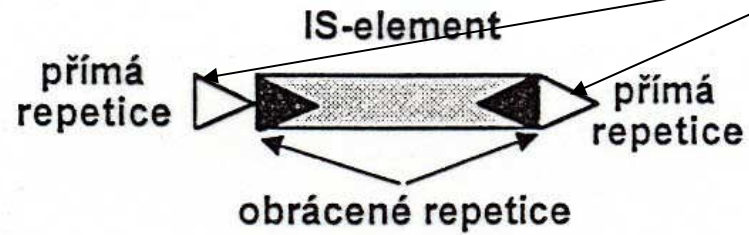
**Tetracyklin**

**Chloramfenikol**

**Streptomycin**

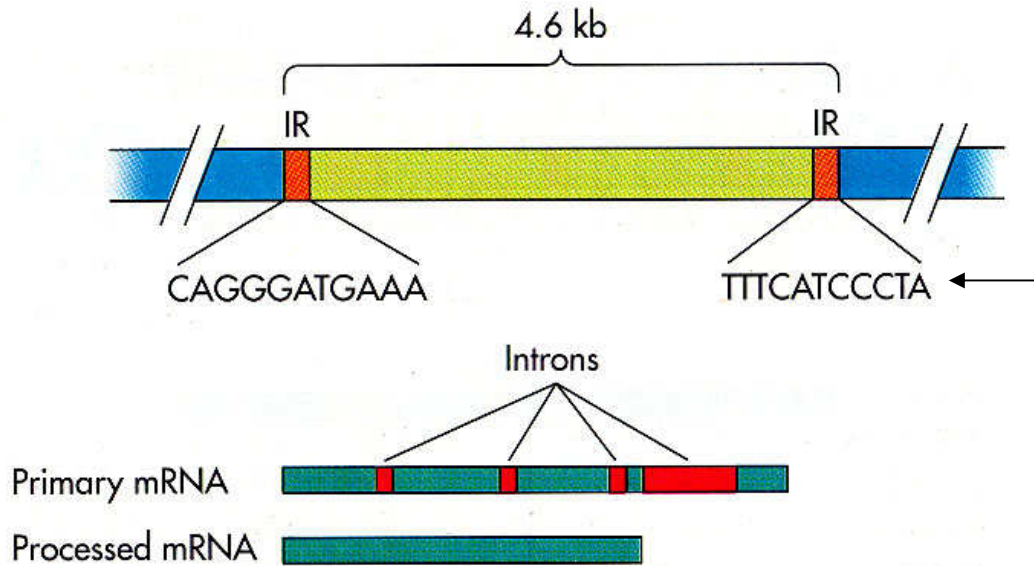
# prokaryotické transpozony

Vedle místa začlenění



# Mobilní elementy u kukuřice (Ac/Ds) (Elementy B. McClintockové)

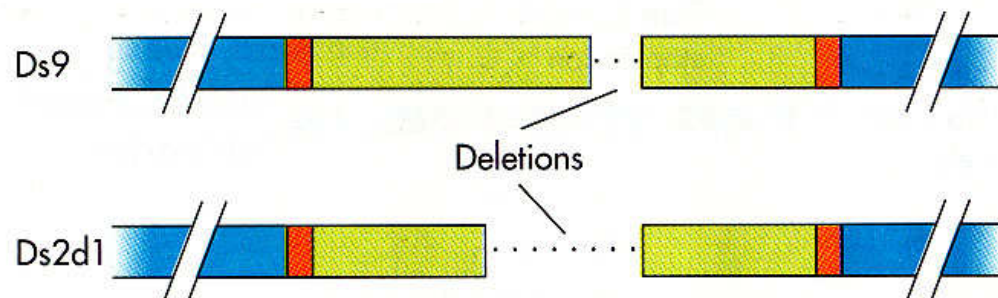
## Ac element



Autonomní elementy schopné zajistit vlastní transpozici

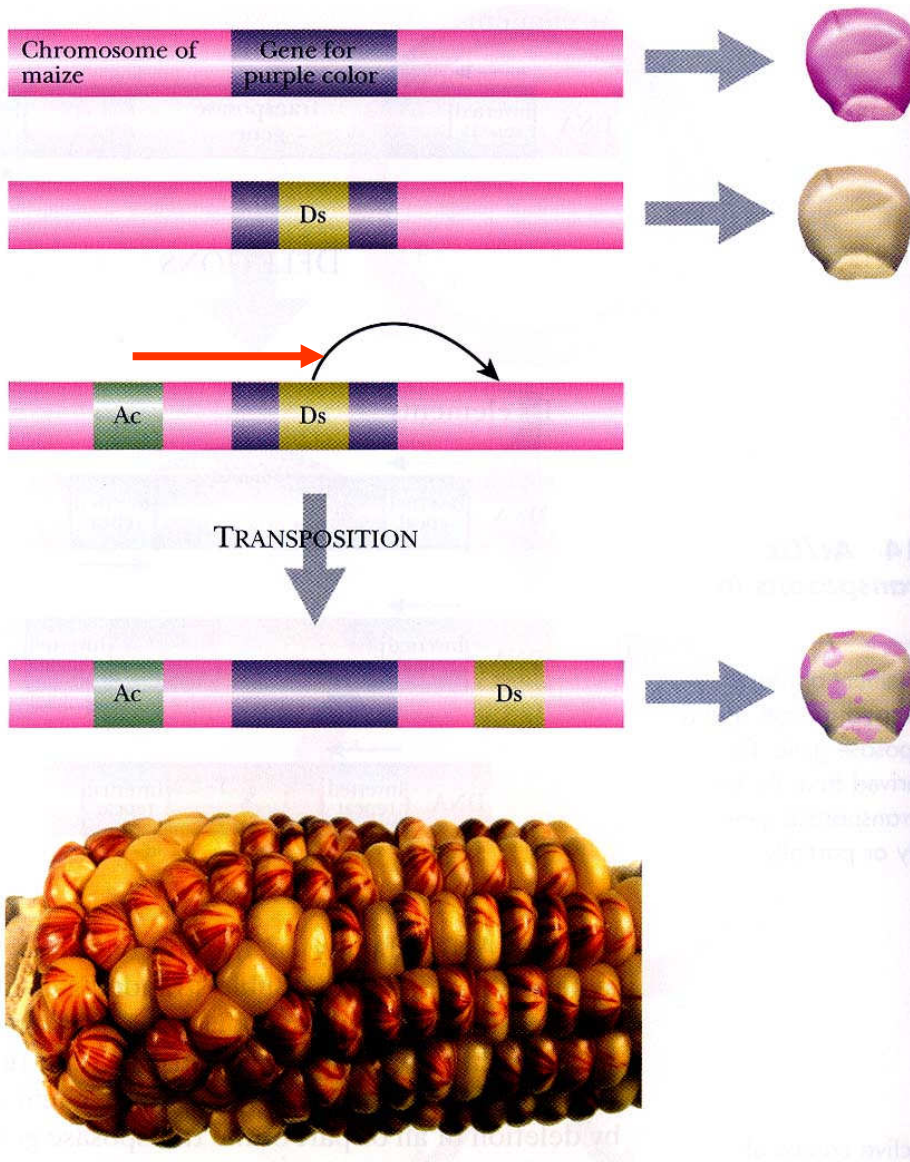
IR o délce 11 bp

## Ds elementy



Neautonomní elementy schopné transpozice za přítomnosti Ac elementů

# Transpozice Ds elementu u kukuřice



Funkční gen pro purpurovou barvu obilek

Gen pro purpurovou barvu obilek přerušeny transpozonem

Vyčlenění Ds elementu z genu zprostředkované transponázou Ac elementu

Znovunabytí funkce genu pro purpurovou barvu obilek v buňkách, v nichž došlo k vyčlenění transpozonu.

Náhodnost procesu vyčlenění má za následek vznik skvrnitých obilek



## Transpozony u kukuřice



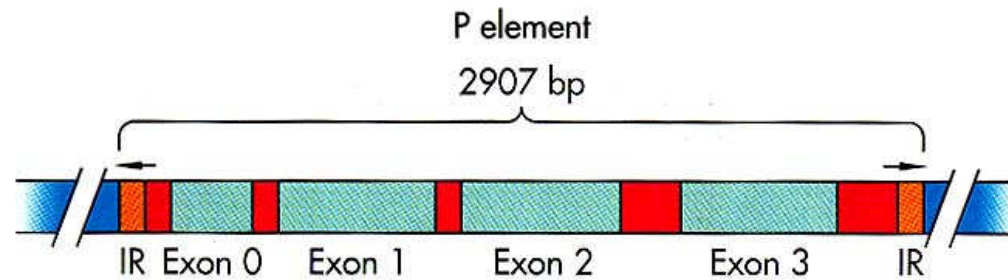
**Figure 21-42** Mosaicism through transposon mutagenesis in corn. These seeds represent genotypes in which a transposon has inserted into a gene that produces anthocyanin. Therefore, the cells of these seeds are predominantly lacking anthocyanin and are yellow; let us call the genotype  $A^T A^T$ . However, during development, the transposon can occasionally exit from the gene, forming a revertant cell of genotype  $AA^T$ . Cell division will result in a clone of revertant cells and hence a patch of pigmented cells. The three different rows represent corn lines in which the transposon exits early (large spots), late (small spots), or in between (intermediate spots).

## Transpozony u *Antirrhinum*

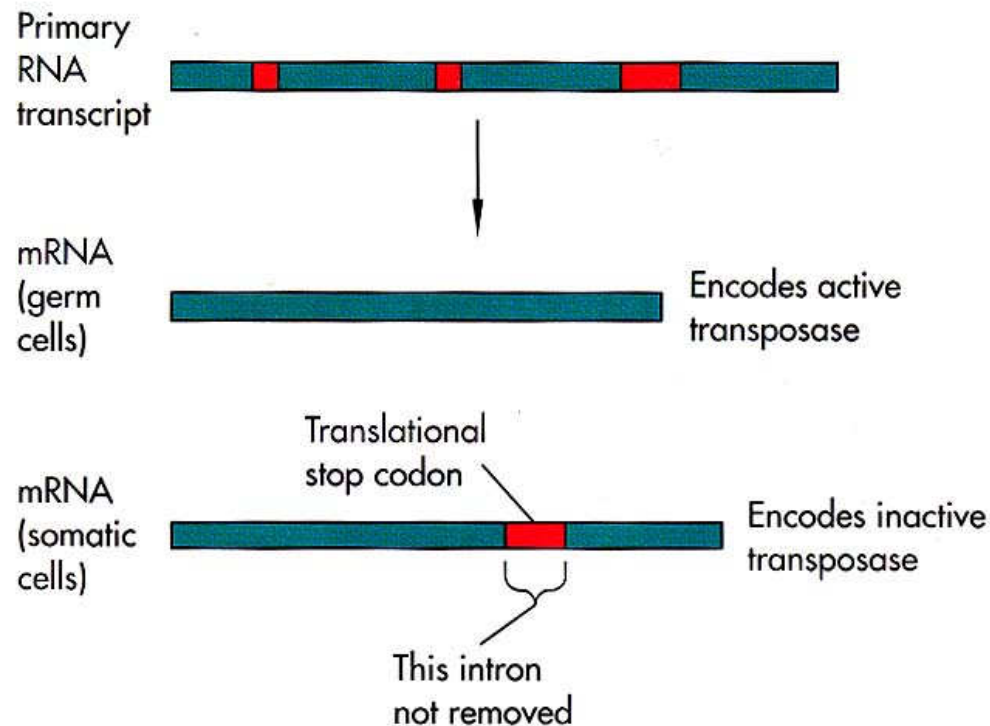


**Mozaikovitost květu je způsobena pohyby transpozonů, které jsou začleněny do obou alel genu pro anthokyanin. Vyčlenění transpozonů vede k vytváření červených sektorů.**

# Mobilní elementy *Drosophila melanogaster* - P elementy



Transpozony navozující dysgenezi hybridů



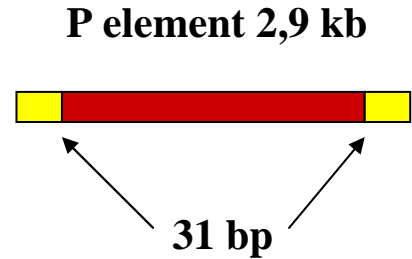
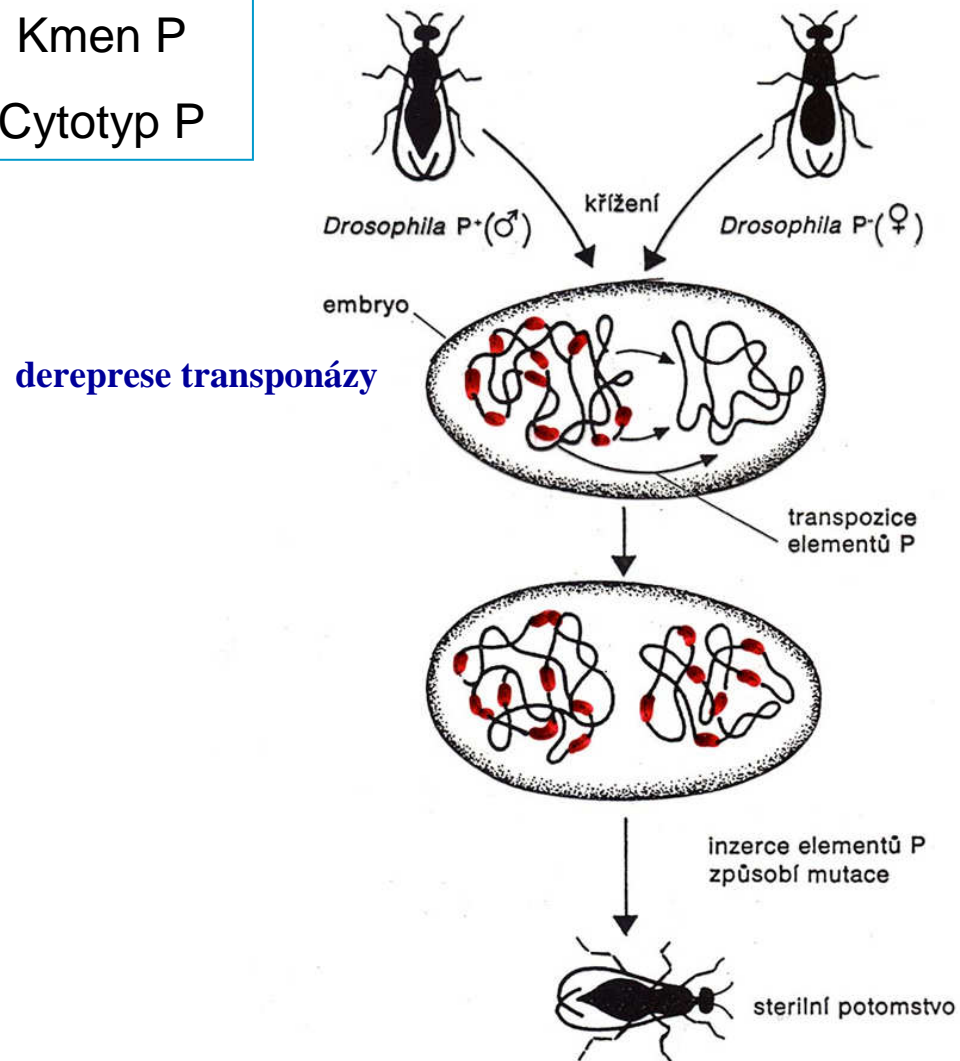
**K transpozici dochází jen v zárodečných buňkách, kde se tvoří aktivní transponáza – v somatických buňkách nedochází k sestřihu**

*mariner* – různé druhy drosofil a hmyzu, HGT.

# Dysgeneze hybridů navozená transpozicí P-elementů

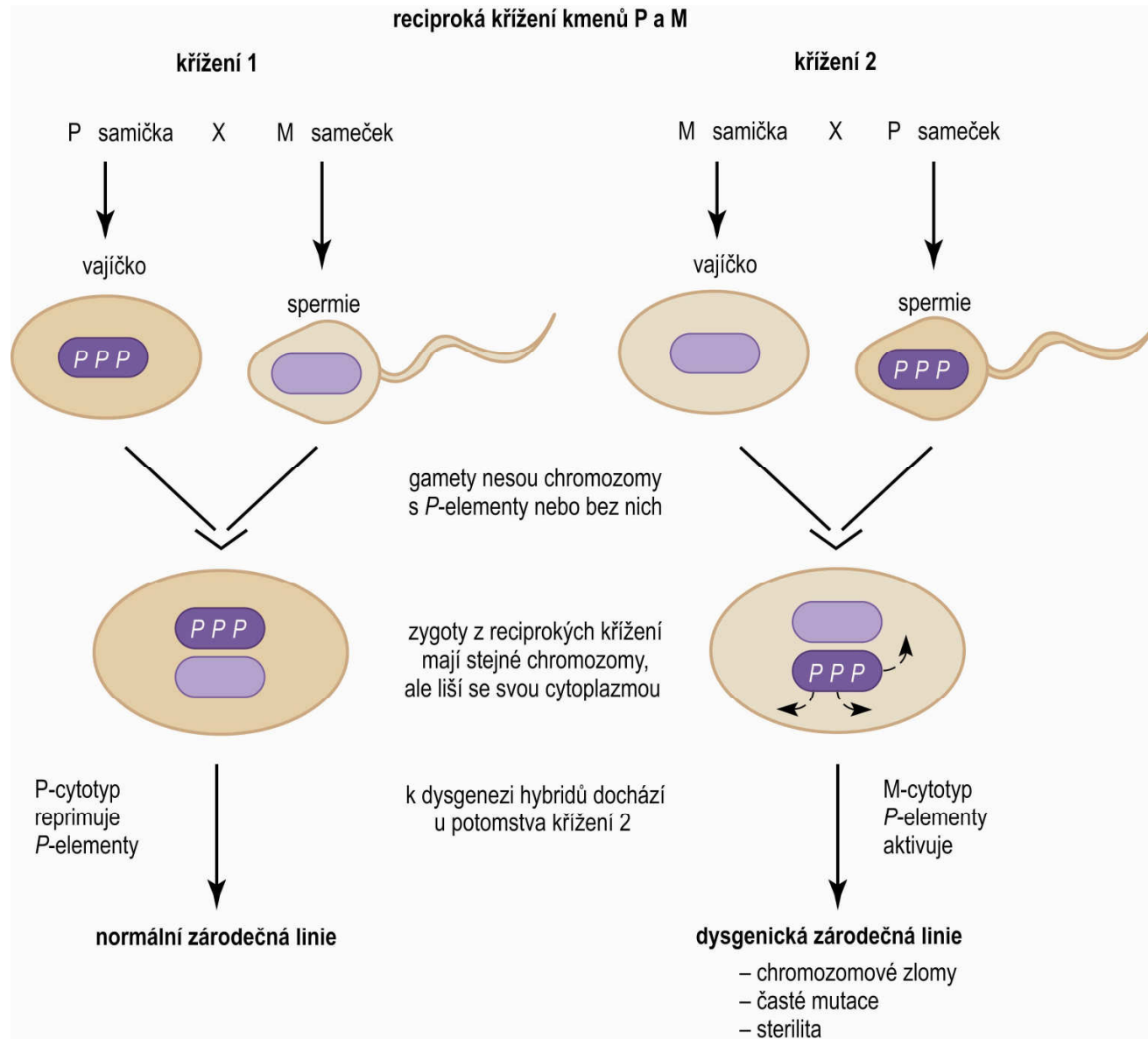
Kmen P  
Cytotyp P

Kmen M  
Cytotyp M



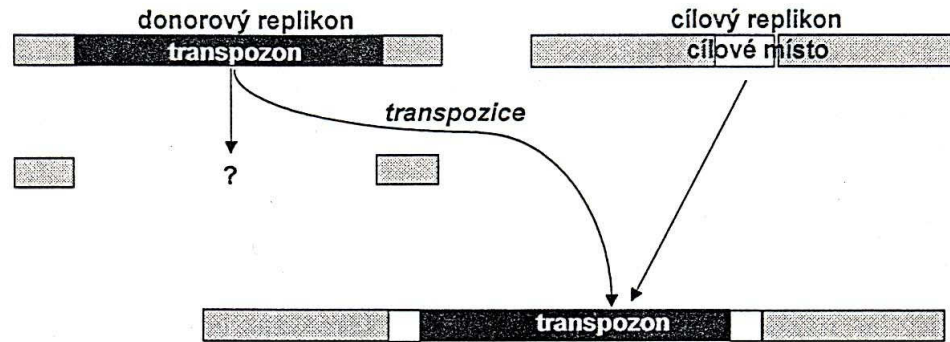
Vysoká frekvence mutací,  
chromozomové aberace,  
neschopnost tvorby gamet

# Dysgeneze hybridů navozená P-elementy



Buňky zárodečné linie drozofily mají způsob, jak minimalizovat poškození, která mohou *P*-elementy vyvolat. Nejúčinnější mechanismus využívá malé molekuly RNA, které jsou odvozeny od samotných *P*-elementů. Tyto RNA (délka 26-31 nts) vytvářejí komplexy se specifickou skupinou proteinů nazývanou „piwi proteiny“ (P-element Induced Wimpy testis); proto jsou označovány jako piwi-interagující neboli **piRNA**. Samičky *P*-kmenů vytvářejí piRNA a předávají je do svého potomstva prostřednictvím cytoplazmy vajíček. Jakmile je potomstvo obdrží, piRNA reprimují v zárodečné linii aktivitu *P*-elementů a zabraňují tak navození dysgeneze hybridů. Maternální přenos reprimujících piRNA proto vysvětluje, proč potomstvo křížení *P*-samiček a *M*-samečků stejně jako potomstvo křížení *P*-samiček a *P*-samečků není dysgenické.

# Mechanismy transpozice

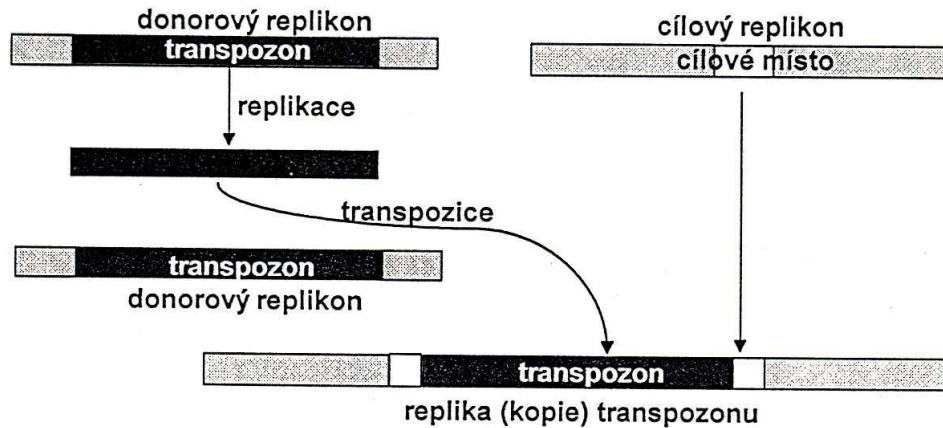


Obr. 403  
Konzervativní transpozice

„cut and paste“

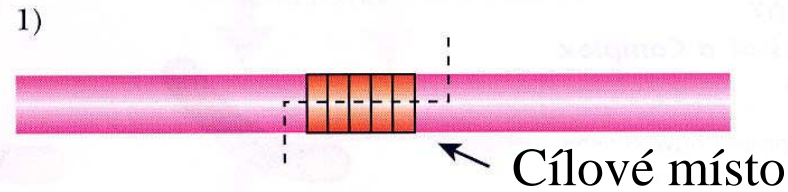
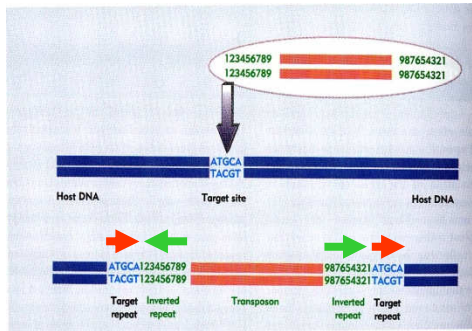
## Typy transpozice

- intramolekulární
- intermolekulární



Obr. 404  
Replikativní transpozice

# Vznik přímých repeticí v cílovém místě po začlenění transpozonu



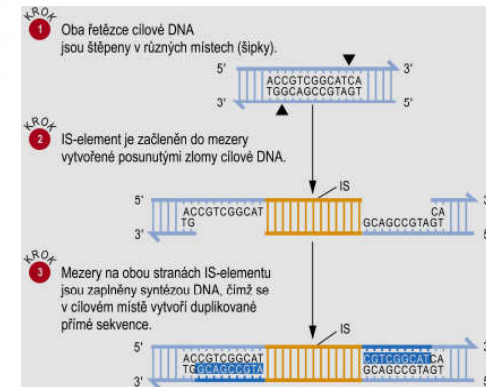
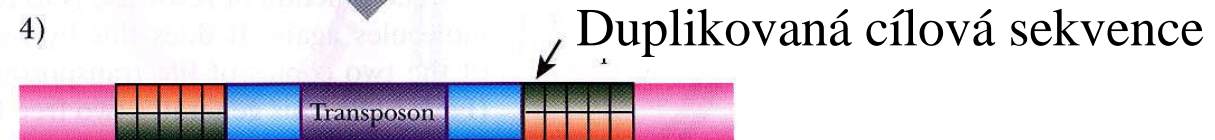
Vytvoření posunutých zlomů transponázou



Začlenění transpozonu do cílového místa

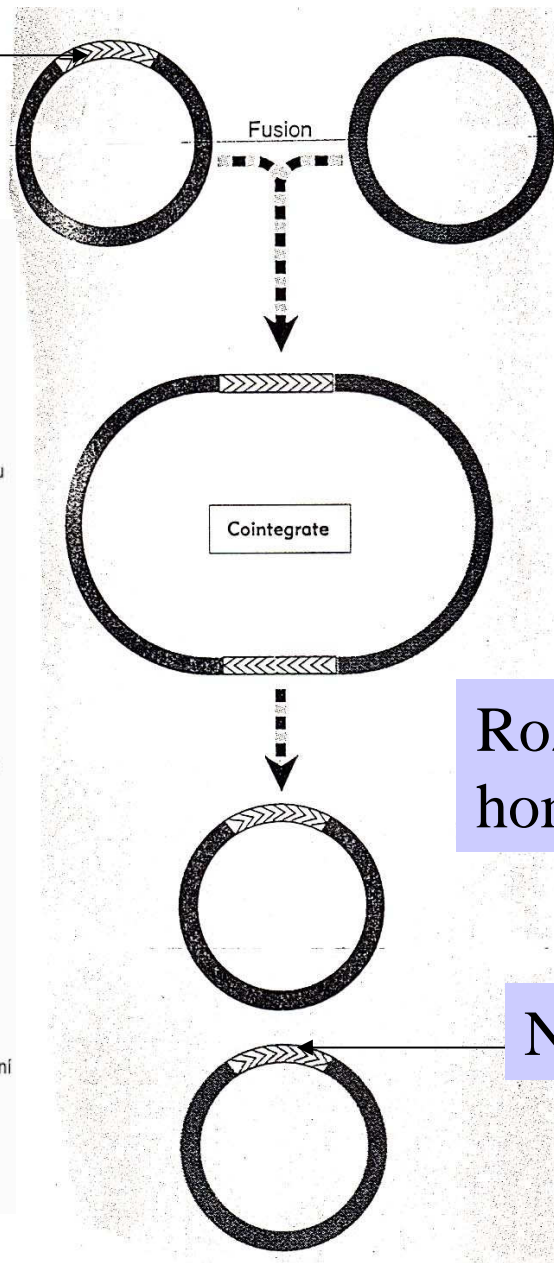
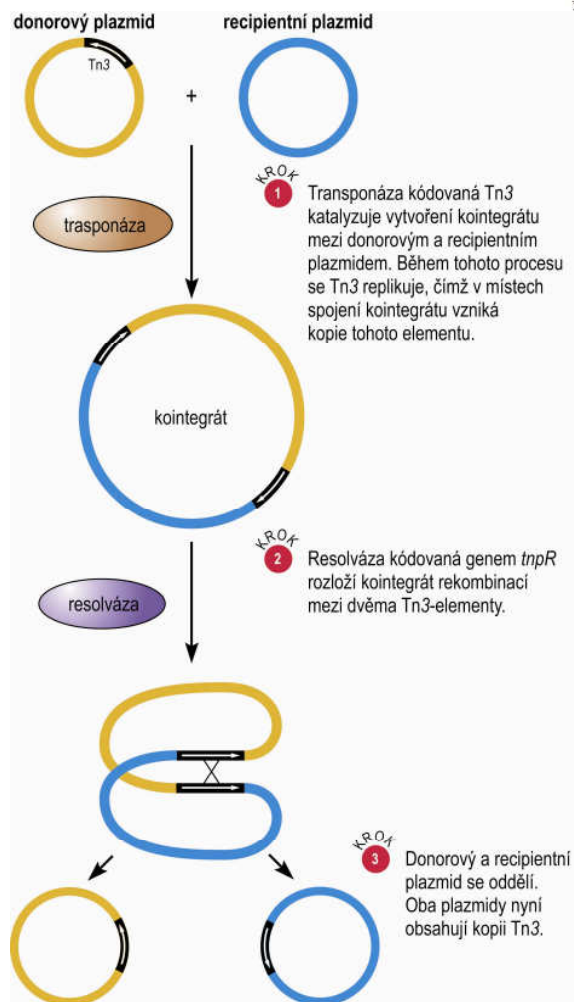


Doplnění komplementárních úseků



# Replikativní transpozice Tn3

transpozon



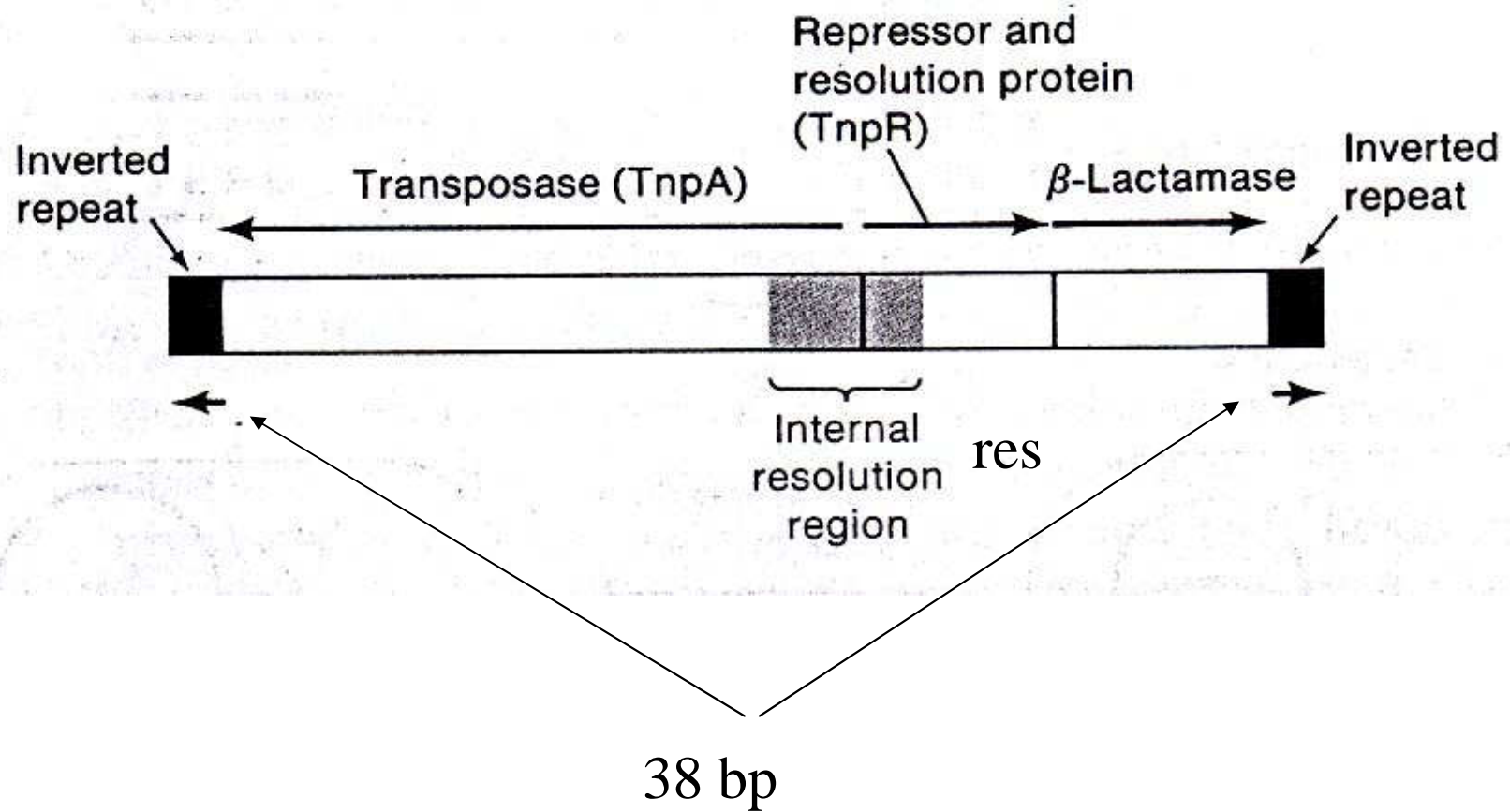
Vznik kointegrátu

Rozklad kointegrátu  
homologní rekombinací

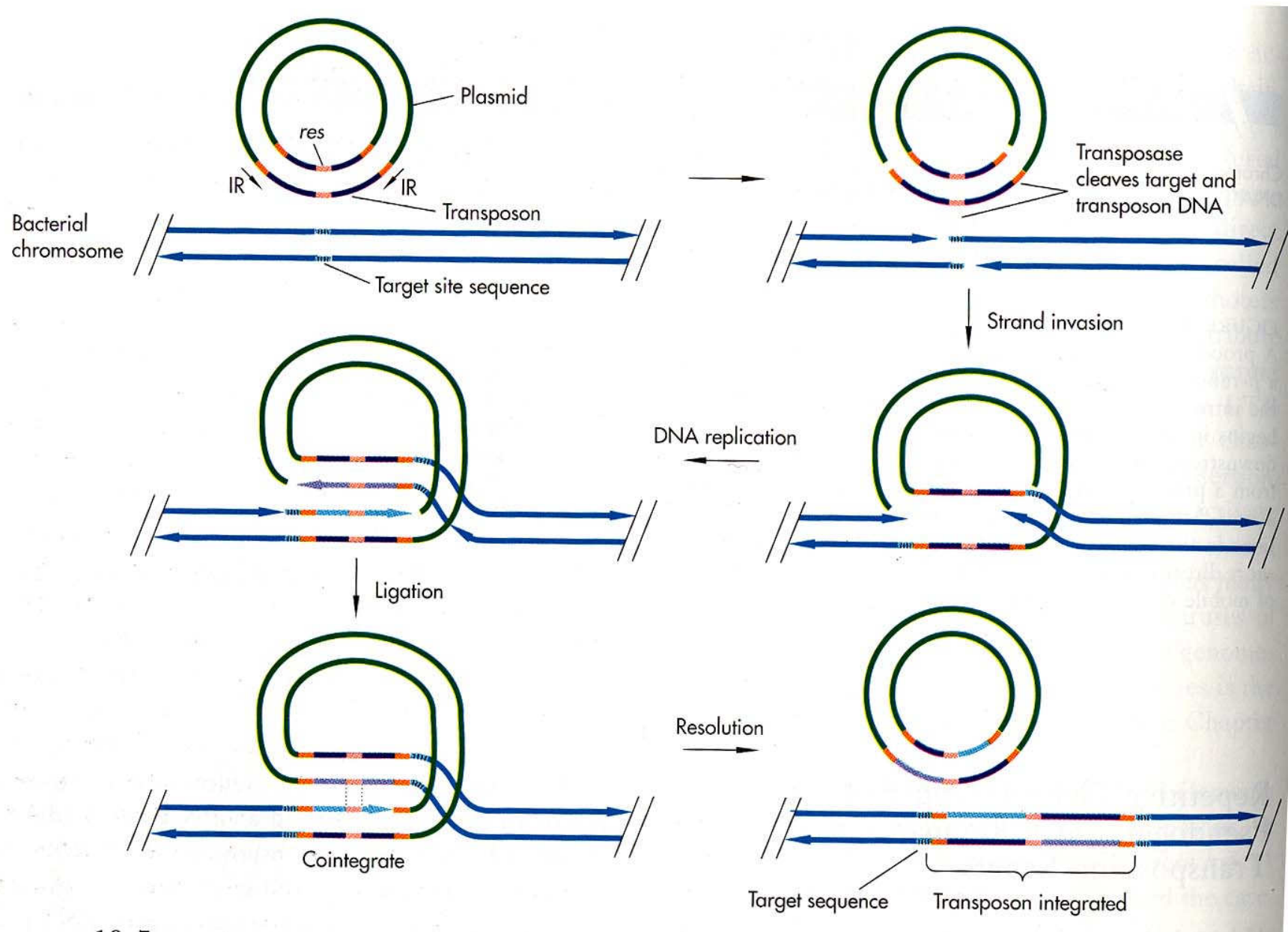
Nová kopie transpozonu



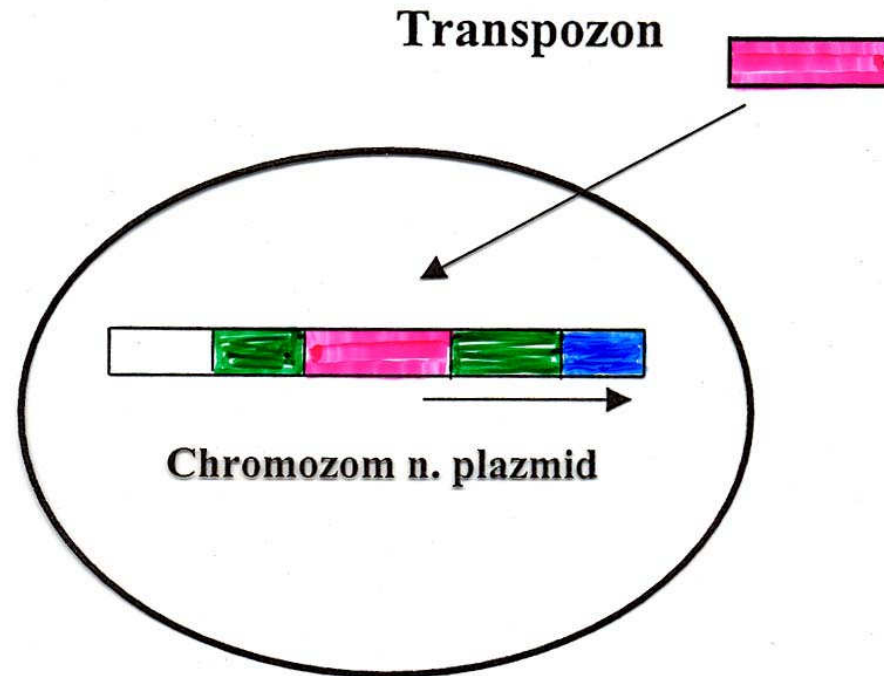
## Struktura transpozonu Tn3



# Mechanismus replikativní transpozice




# Důsledky začlenění transpozonů do genomu hostitele



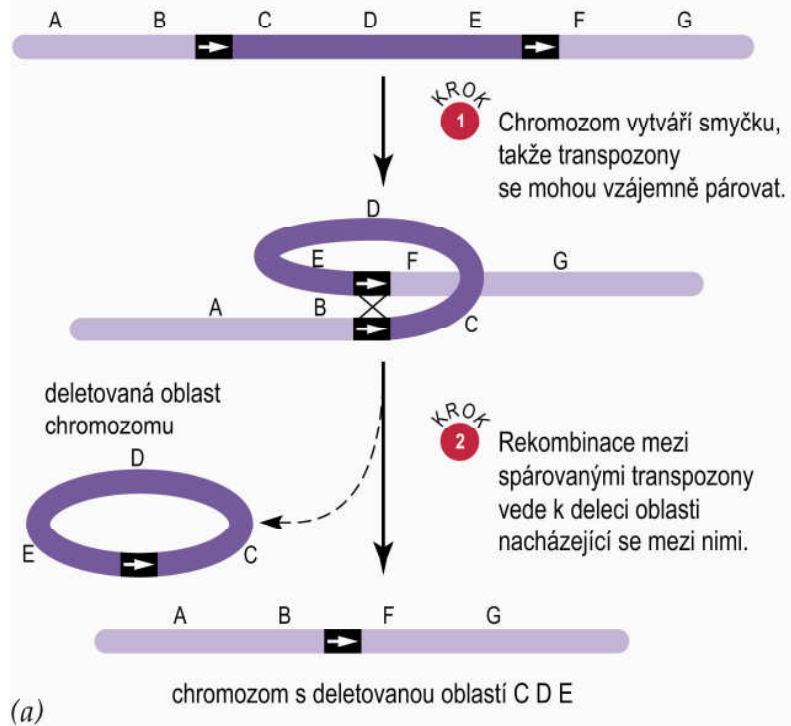
1. Inzerční inaktivace genu, do něhož se transpozon začlenil (negativní mutace) – změna fenotypu
2. Nabytí rezistence k antibiotiku (pozitivní mutace) – změna fenotypu
3. Polární mutace ovlivňující expresi sousedních genů – změna fenotypu
4. Označení místa, do něhož se transpozon začlenil

# Chromozomová přeskupení navozená transpozony

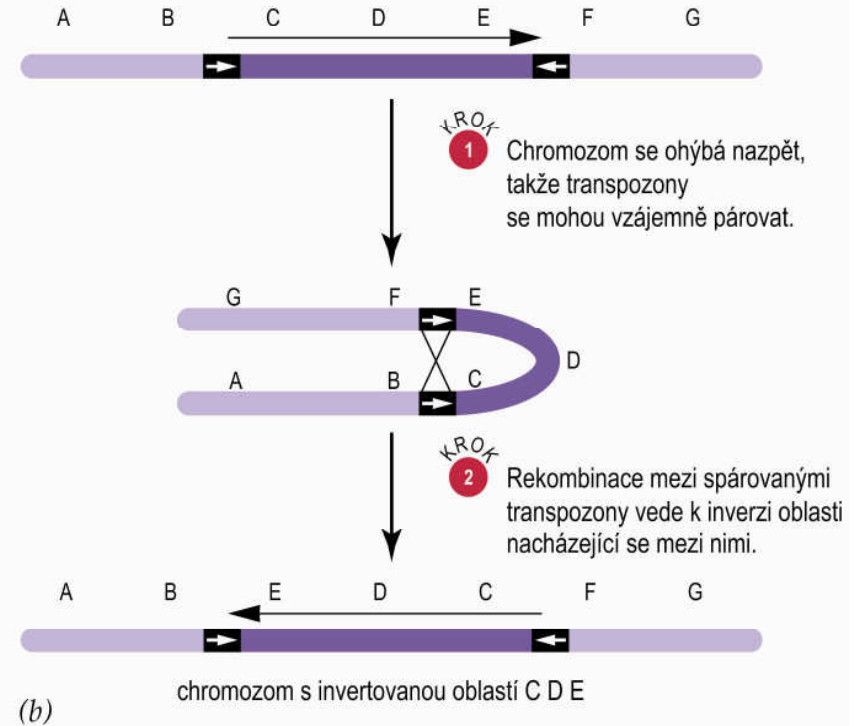
## (ektopické intrachromozomové výměny)

 = transpozon

chromozom se dvěma stejně orientovanými transpozony

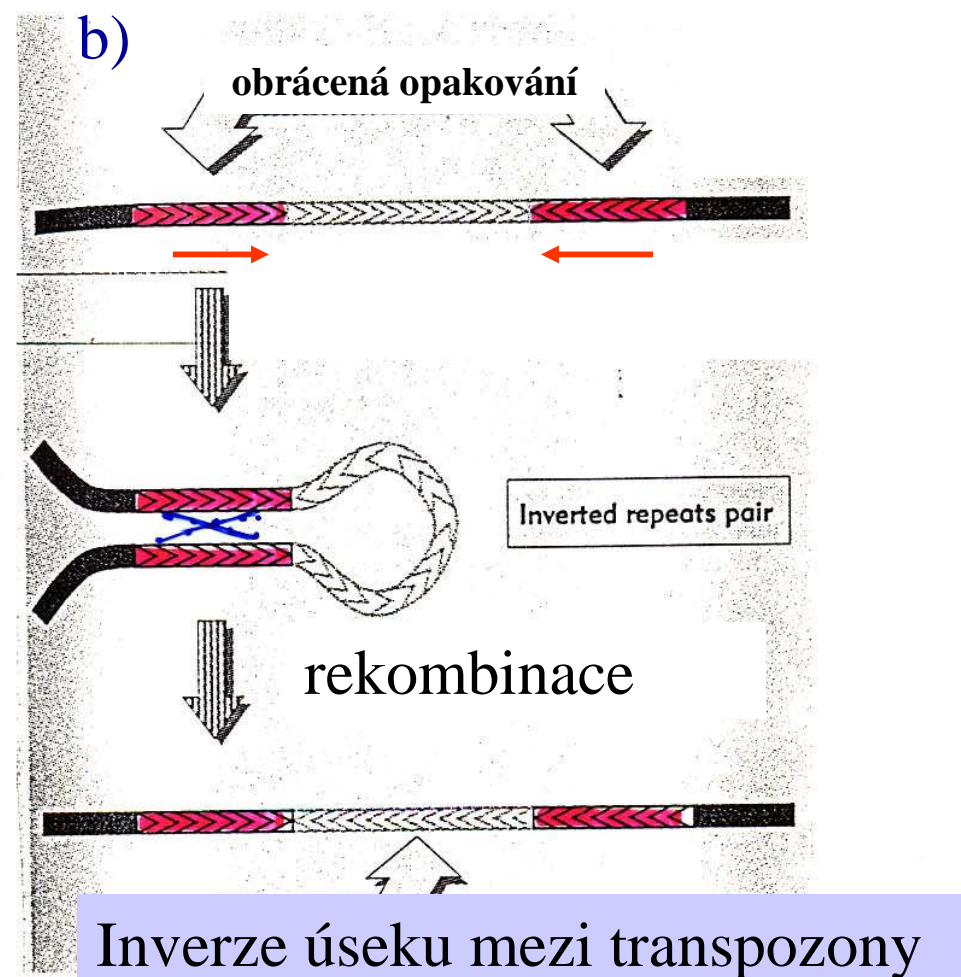
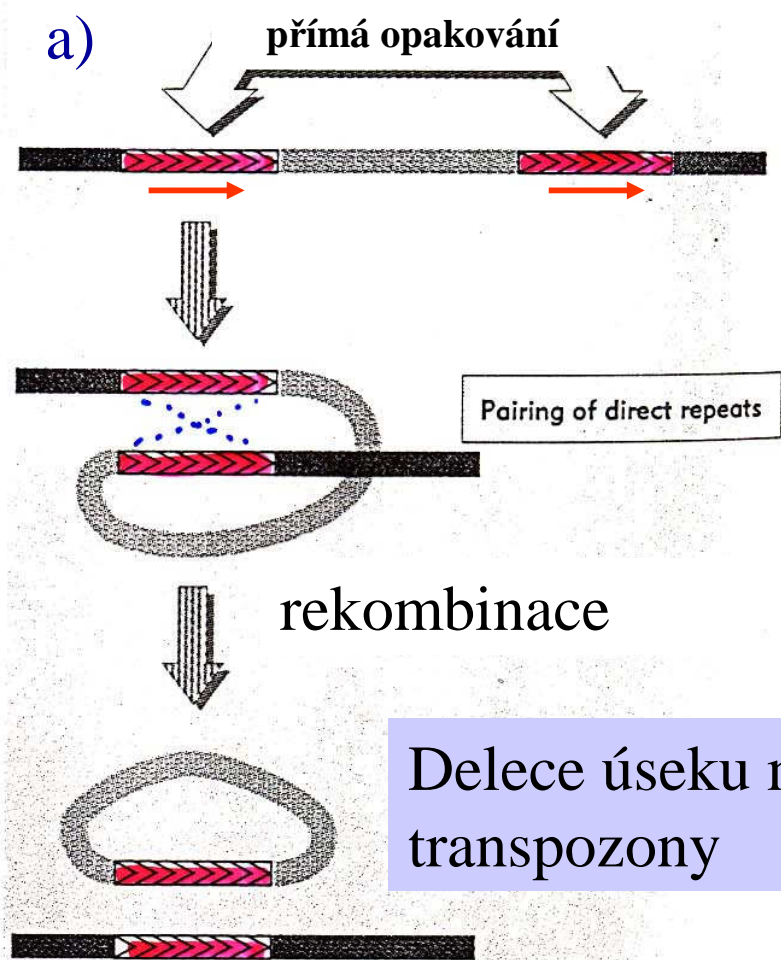


chromozom se dvěma opačně orientovanými transpozony

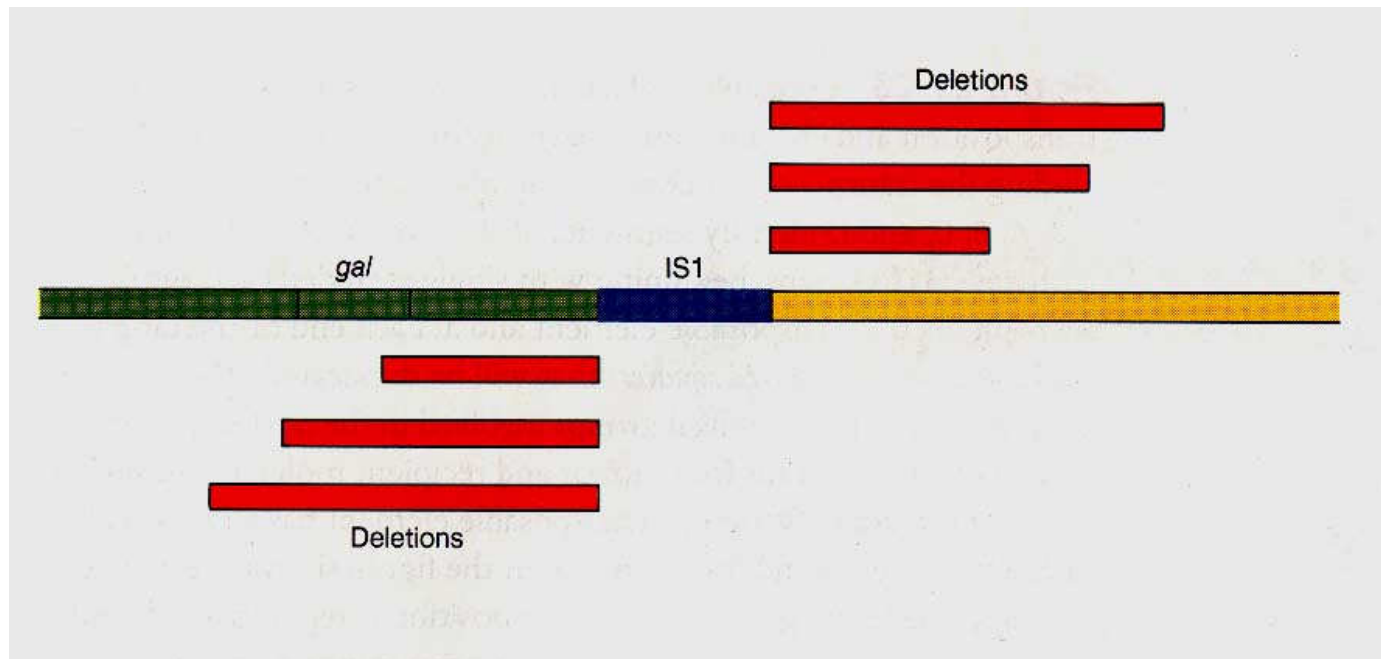


## Vznik delecí a inverzí

Dva stejné nebo podobné transpozony ve stejné (a) nebo obrácené (b) orientaci

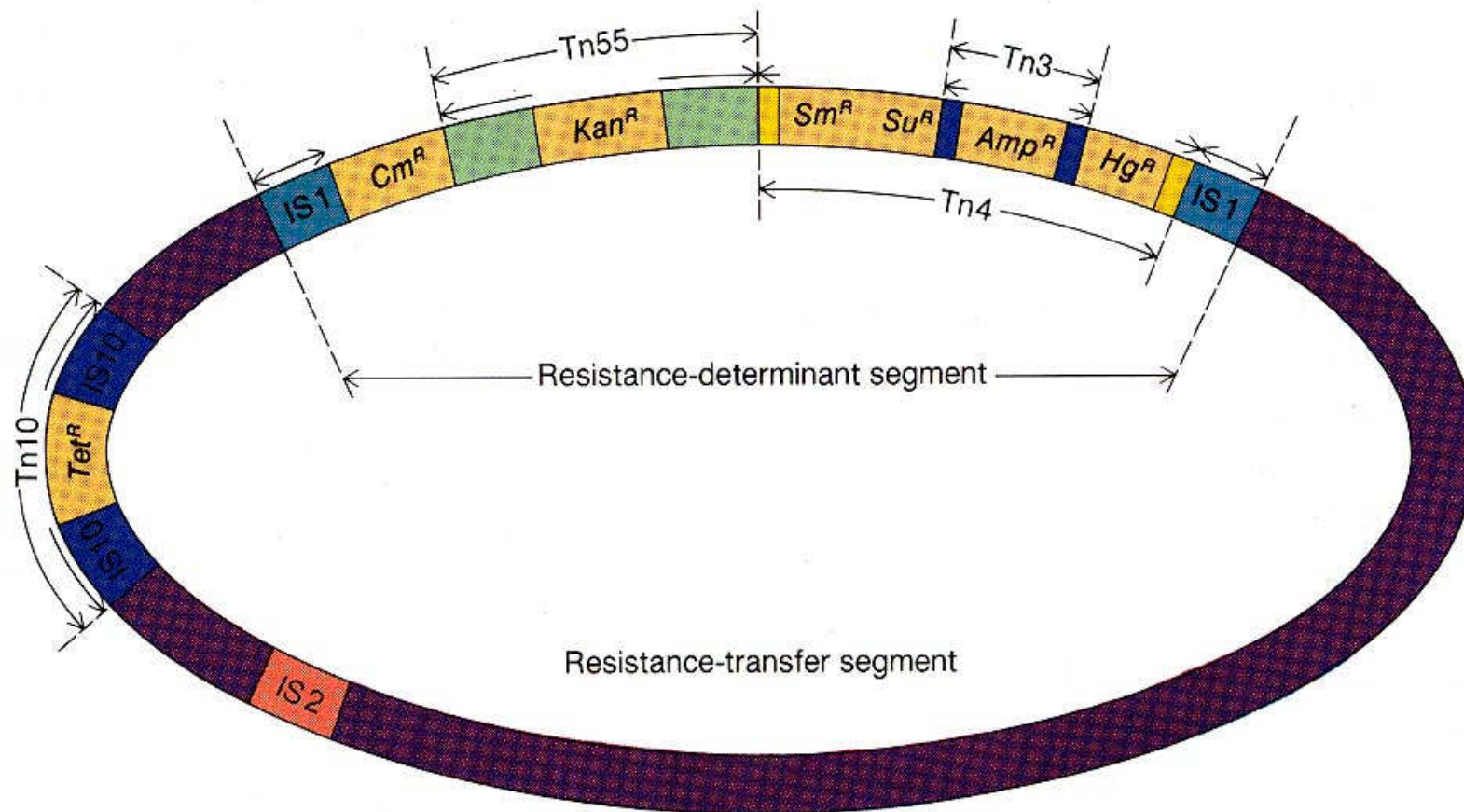


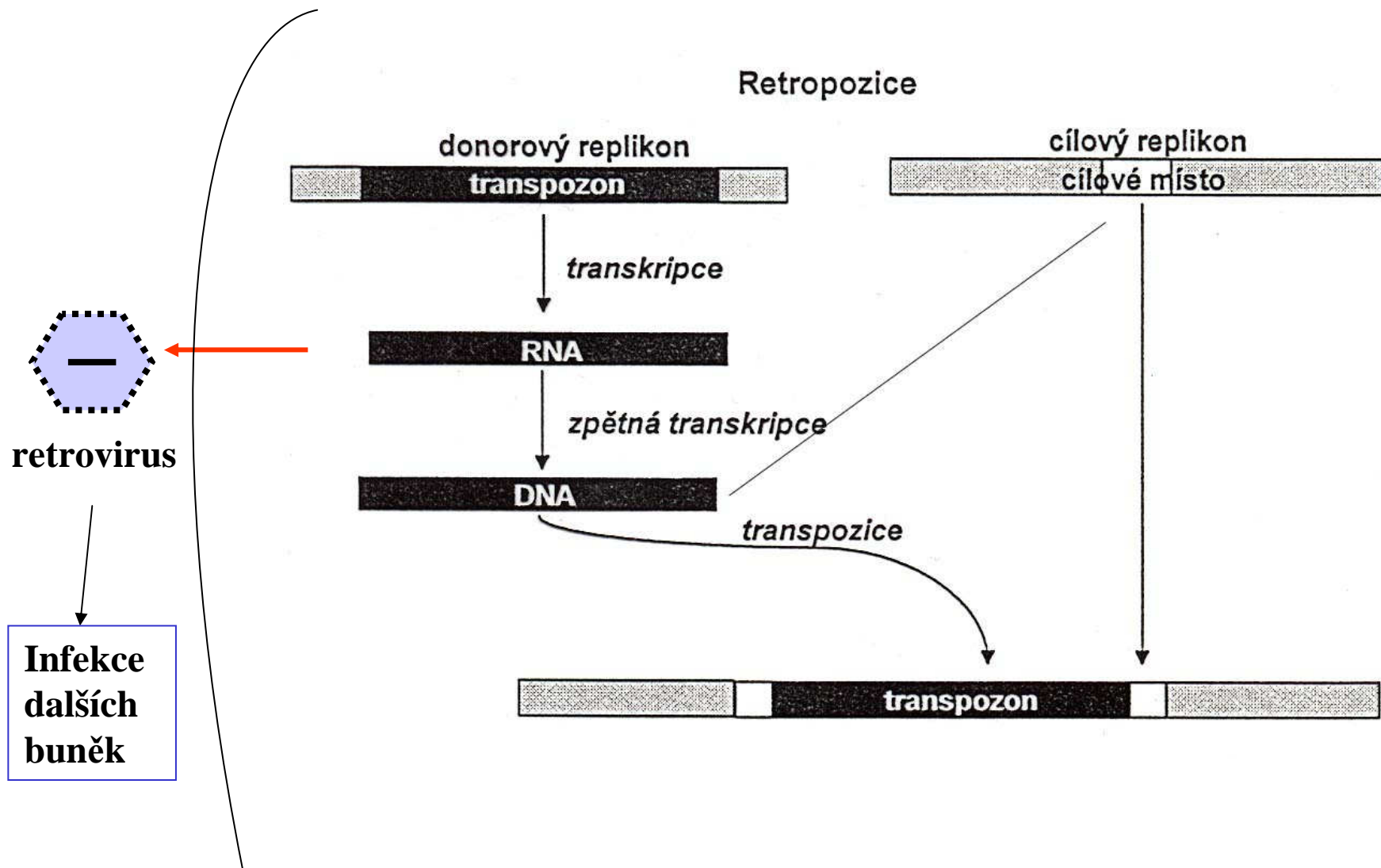
## Delece pozorované v místě začlenění IS1 v lokusu gal *E. coli*



# Úloha transpozonů při evoluci R-plazmidů

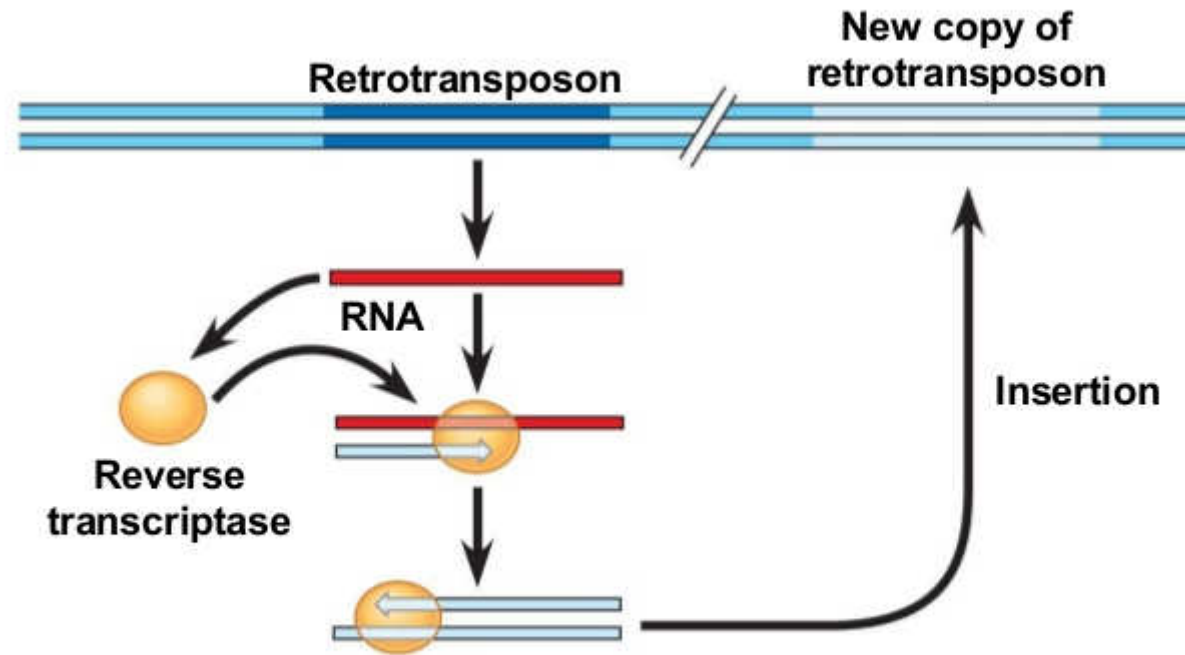
- každý transpozon může být přenášen nezávisle







# Přemístování retrotranspozonů



(b) Retrotransposon movement

Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings

# RETROELEMENTY



## 1. NEVIROVÉ RETROELEMENTY (LTR, reverzní transkriptáza, integráza)

### A. Retrotranspozony (obsahují LTR)

- \* Ty-elementy u kvasinek (6,3 kb)
- \* Copia-elementy u drozofily (5 kb)

### B. Retropozony (bez LTR)

- \* krátké sekvence SINE (short interspersed element) - <500 bp,  $10^5$  kopií - odvozeny z genů pro malé RNA, včetně tRNA (pseudogeny)
- \* dlouhé sekvence LINE (long interspersed element)- 6,5 kb, 20 000 - 50 000 kopií u savců

### C. Retrosekvence (cDNA geny) (bez LTR, reverzní transkriptázy a integrázy)

reverzní transkripty strukturálních genů - upravené přepisy bez intronů, s poly(A)

- \* Retrogeny - funkční retrosekvence kódující identický protein jako původní gen
- \* Retropseudogeny - nefunkční formy genů
  - Alu- sekvence (z 7SL RNA, 300 bp, u člověka 500 000 x)



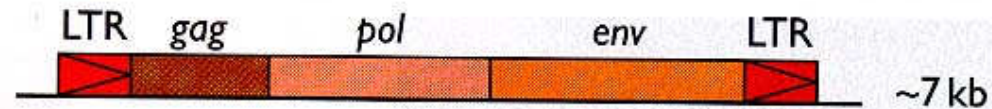
## 2. VIROVÉ RETROELEMENTY virus HIV

# Srovnání struktury čtyř typů retroelementů

(A) Retrovirus

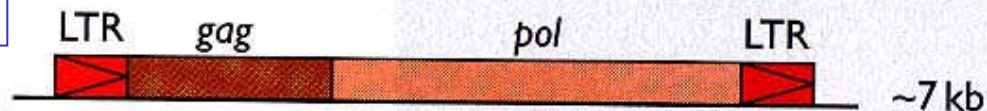
**gag** = proteiny virové částice; **pol** = reverzní transkriptáza/integráza

**env** = proteiny lipidového obalu



(B) *Ty1/copia* retrotransposon

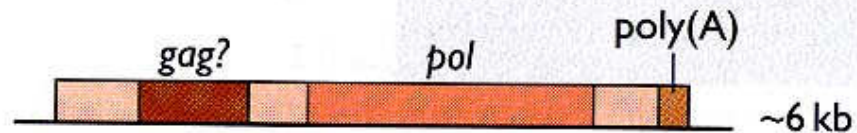
endogenní retroviry



(C) LINE Long interspersed nuclear elements

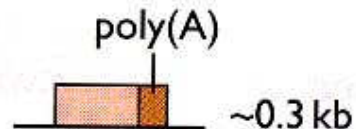
Dlouhé rozptýlené  
jaderné elementy

nemají LTR

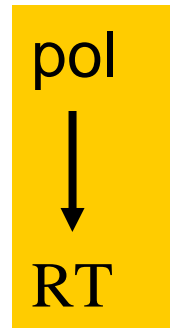


(D) SINE Short interspersed nuclear elements

Krátké rozptýlené  
jaderné elementy



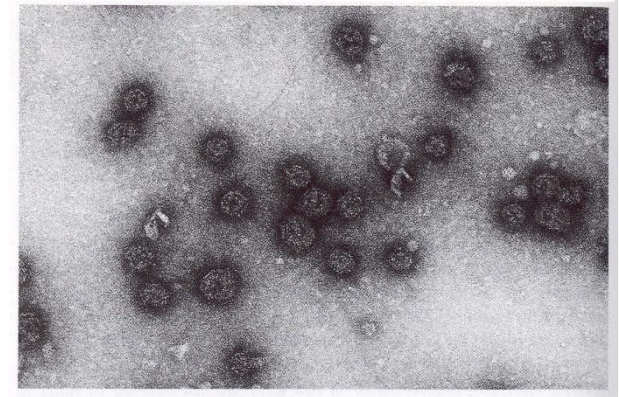
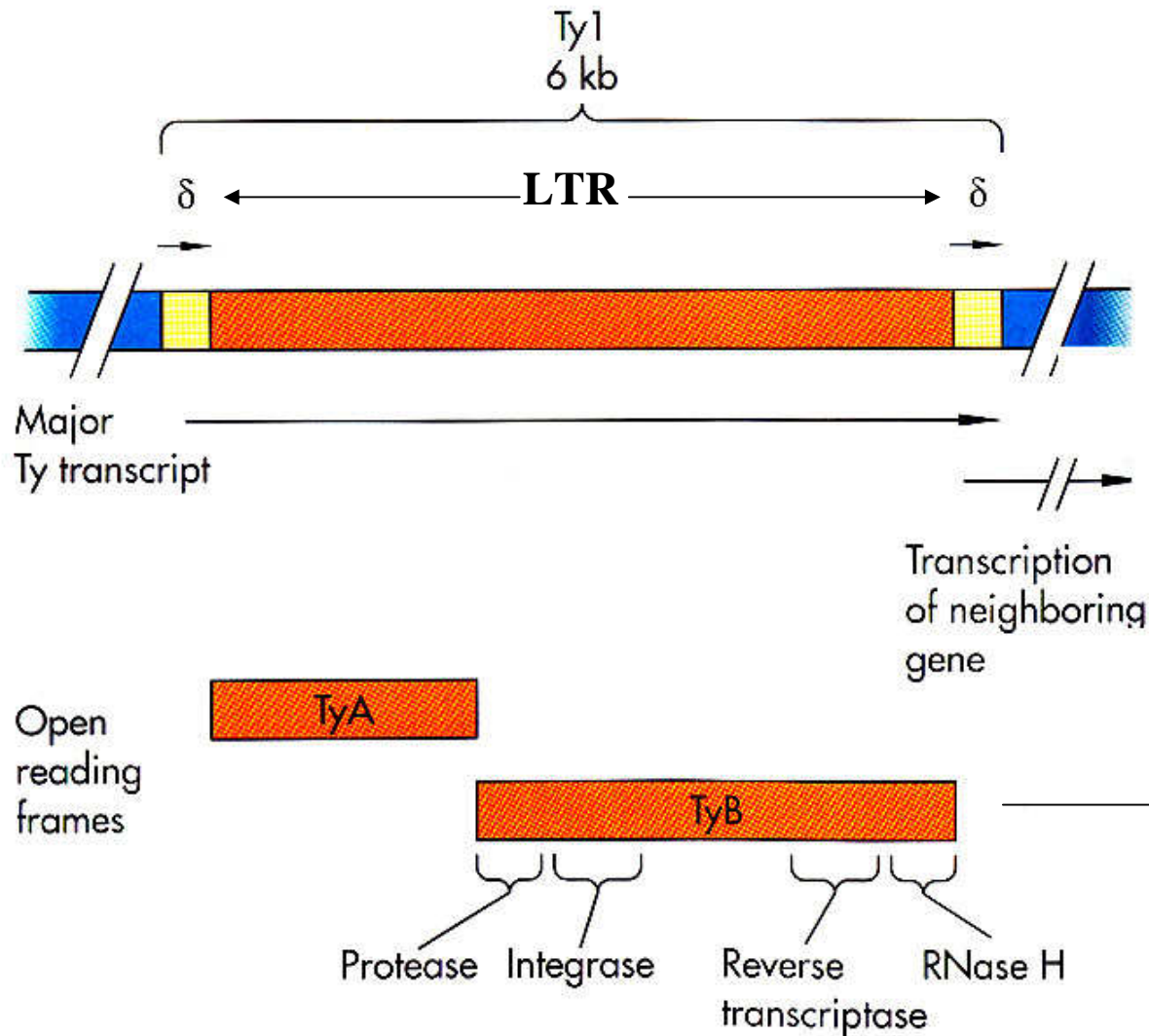
neautonomní



# Mobilní elementy kvasinek - Ty elementy

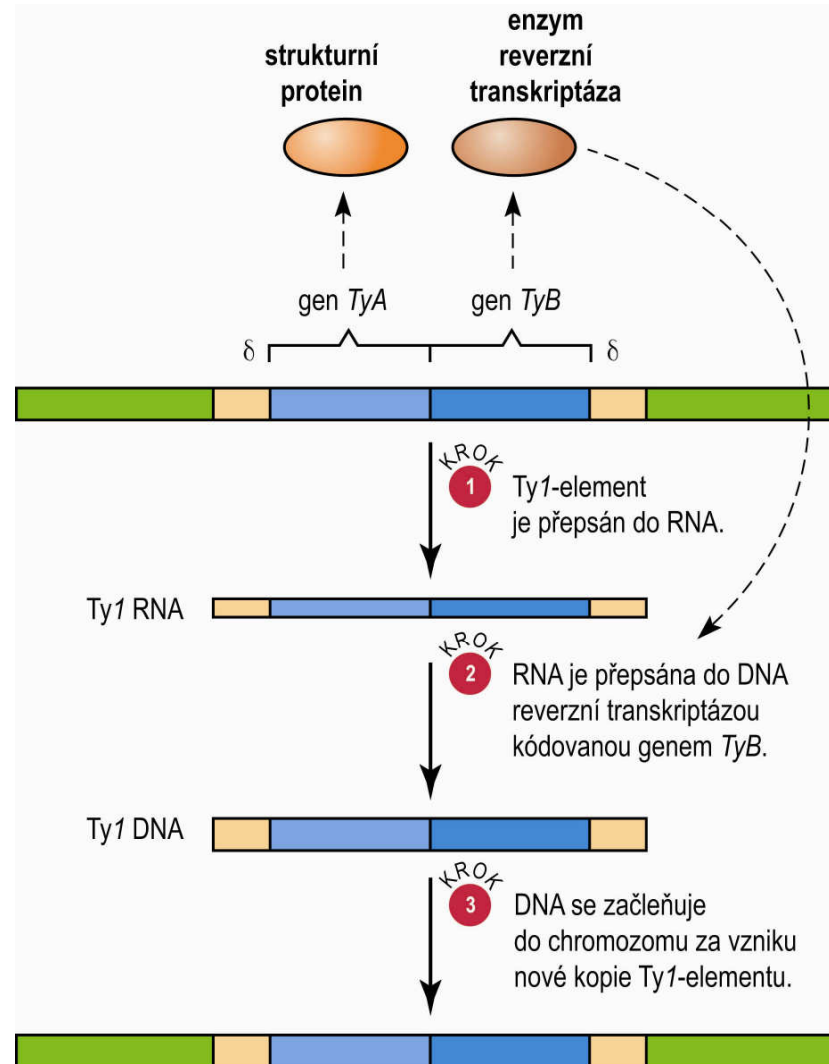
Retrovirům podobné elementy - Virus like particles (VLP)

Virům podobné částice odvozené z Ty elementů

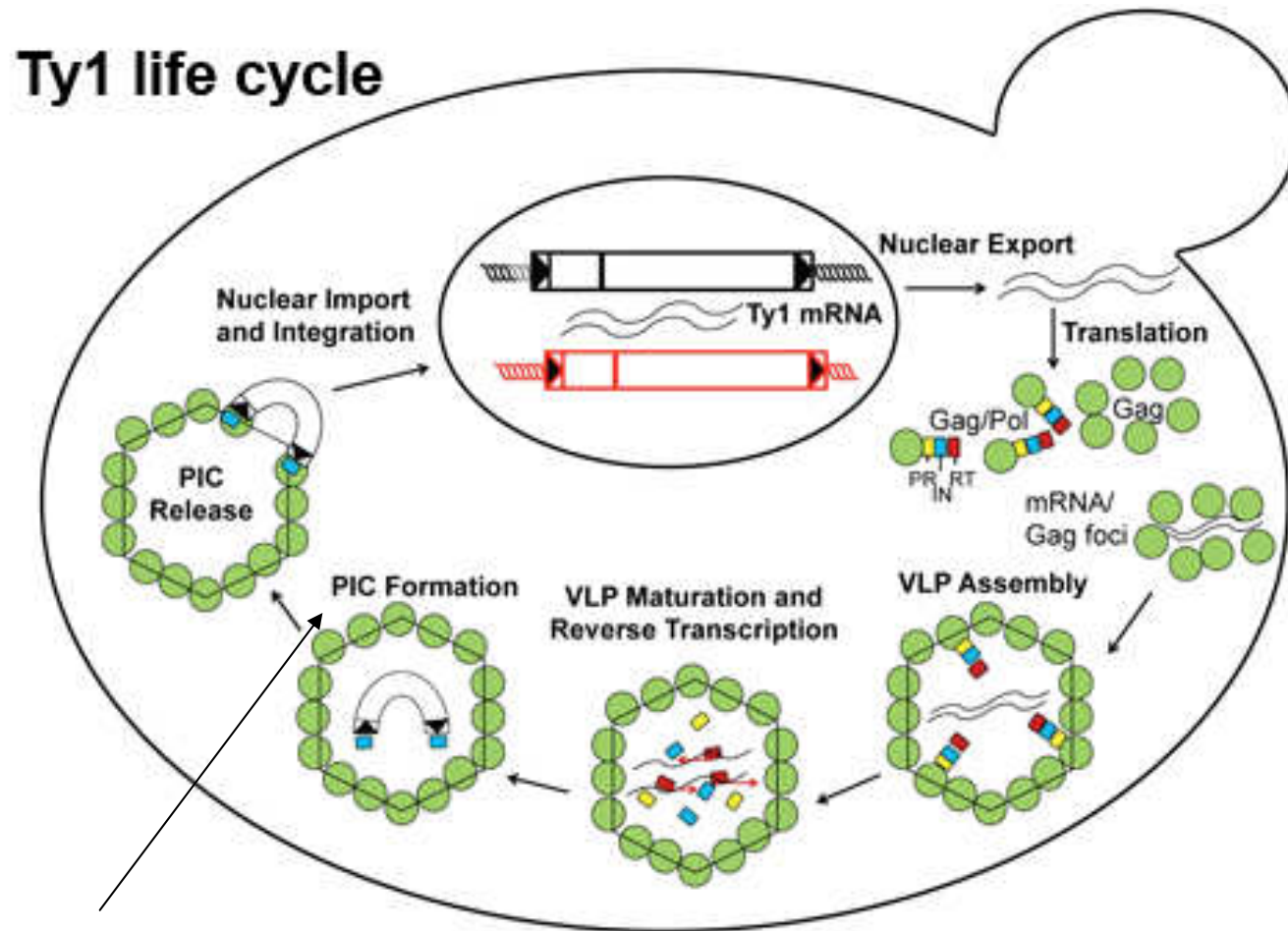


Enzymy zajišťující zpětnou transkripci a integraci DNA do nových míst v genomu

# Transpozice kvasinkového Ty1-elementu



# Životní cyklus retroelementu Ty1



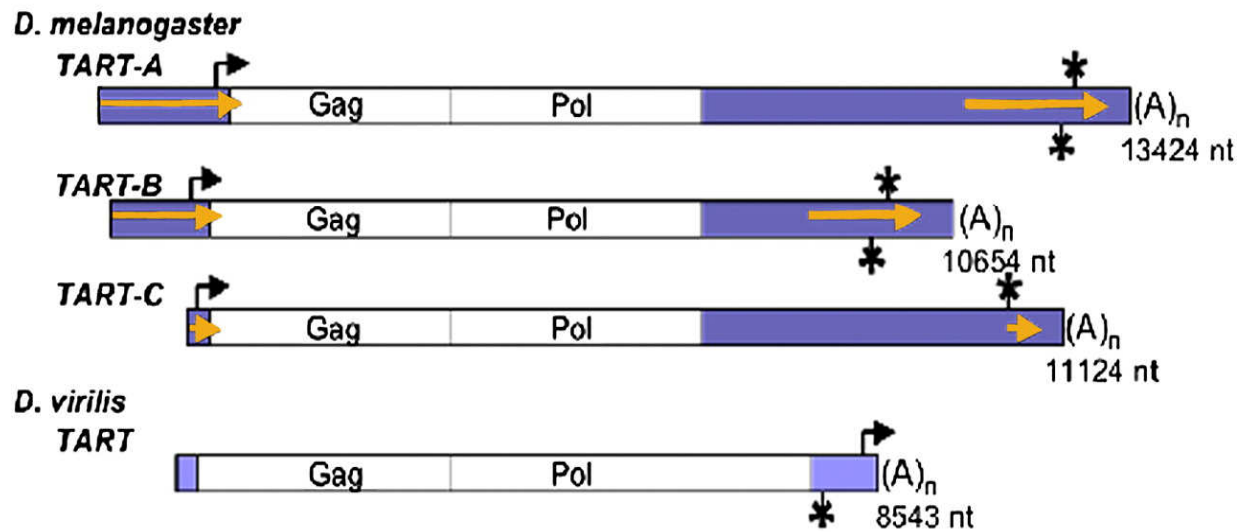
PIC = preintegrační komplex: cDNA + integráza

## Retroelementy u drozofily

*Copia* elementy (element podobný retrovirům) } podobné Ty-  
*Gypsy* elementy (element podobný retrovirům) } elementům  
*F*, *G* a *I*-elementy (retropozony – nemají LTR)

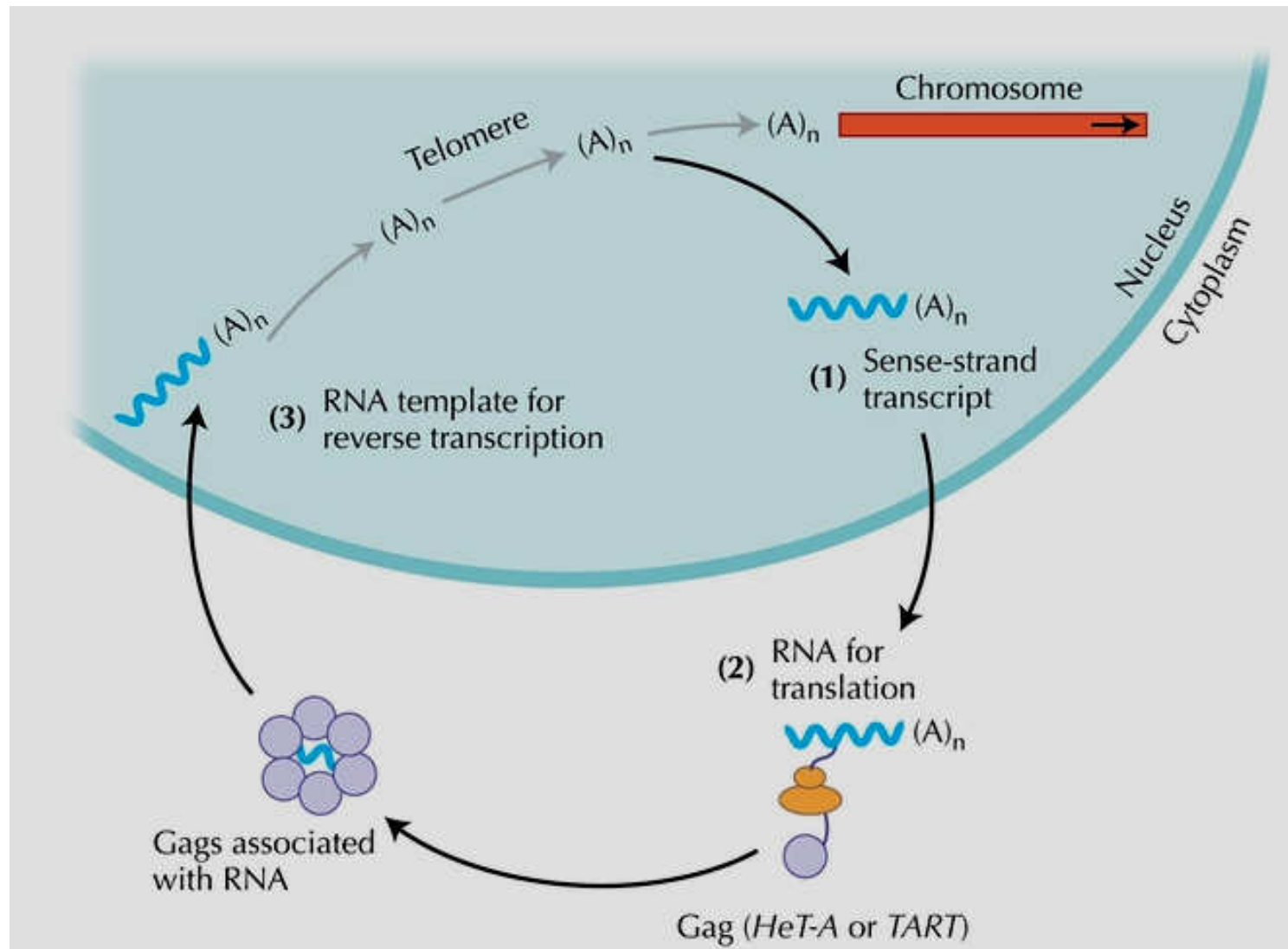
*HeT-A*, *TART* (telomere associated retrotransposons) – transpozice v telomerách, regenerace konců chromozomů ztracených při replikaci

# Struktura retrotranspozonů TART u drozofily





# Mechanismus prodlužování telomer u drozofily pomocí retrotranspozonů HeT-A nebo TART



### 4 třídy rozptýlených repeticí v genomu člověka

			Length	Copy number	Fraction of genome
LINES	Autonomous	ORF1 ORF2 (pol) AAA	6–8 kb	850,000	21%
SINEs	Non-autonomous	A B AAA	100–300 bp	1,500,000	13%
Retrovirus-like elements	Autonomous	gag pol (env)	6–11 kb	450,000	8%
	Non-autonomous	(gag)	1.5–3 kb		
DNA transposon fossils	Autonomous	transposase	2–3 kb	300,000	3%
	Non-autonomous		80–3,000 bp		

Alu

Endogenní retroviry

45% lidského genomu



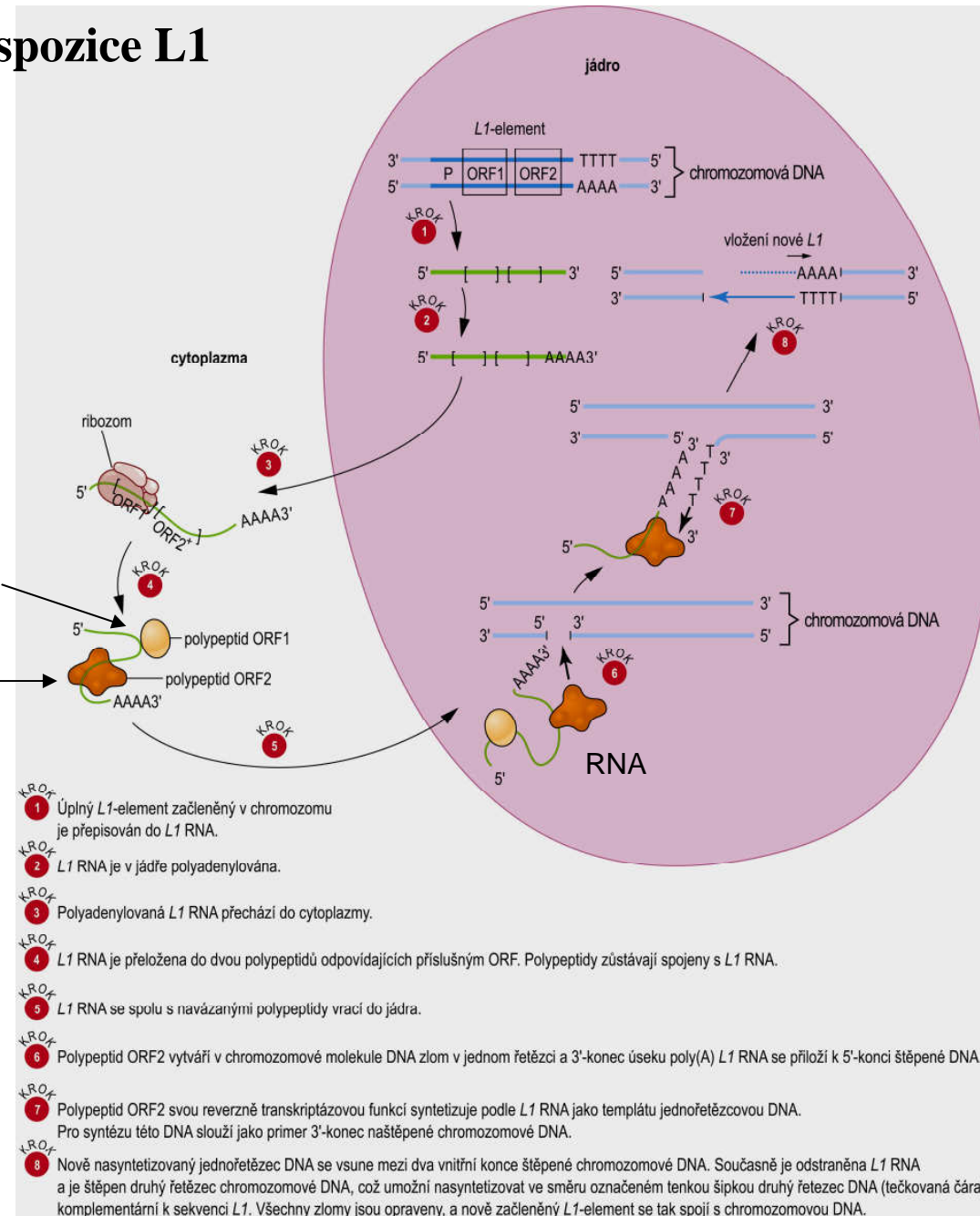
Inaktivní nejméně 50 milionů let

Repetitivní DNA – genetické haraburdí, junk DNA, selfish DNA

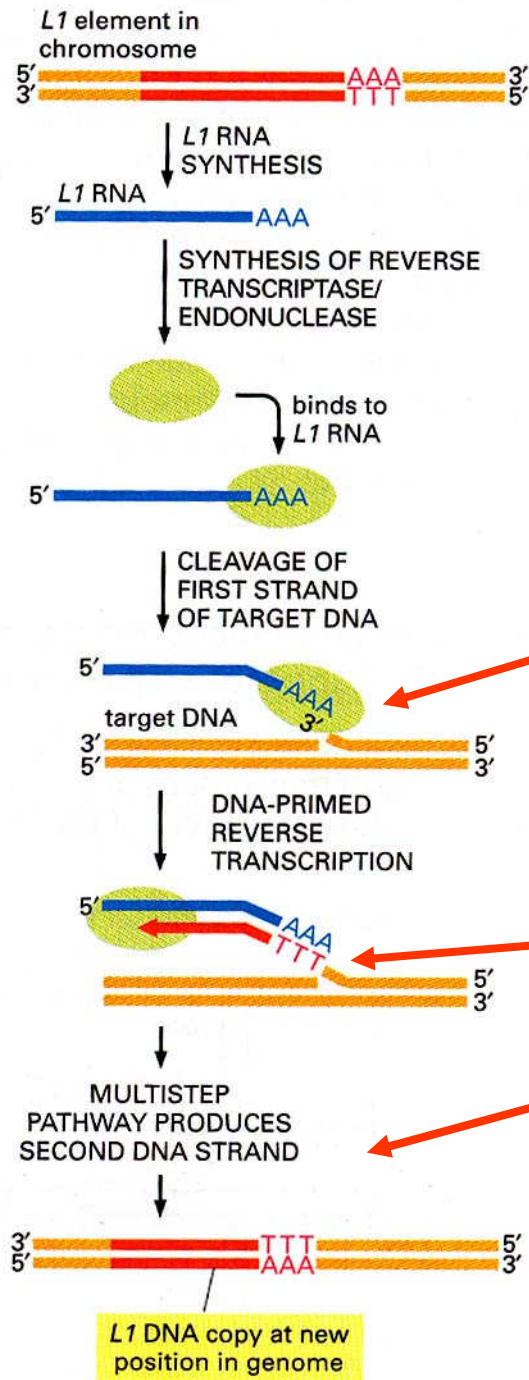
# Mechanismus transpozice L1 v lidském genomu

ORF1: polypeptid zodpovědný za transport L1 RNA do jádra?

ORF2: endonukleáza, reverzní transkriptáza



## Transpozice neretrovirových retrotranspozonů (sekvence LINE 1) místně specifickou rekombinací



Iniciační fáze, při níž endonukleáza (součást RT) připojená na L1 RNA štěpí cílovou sekvenci - uvolněná 3'OH skupina funguje jako primer pro reverzní transkripci - vytváří se ssDNA napojená na cílovou DNA.

V dalším kroku se vytvoří dsDNA, která se začlení do cílového místa

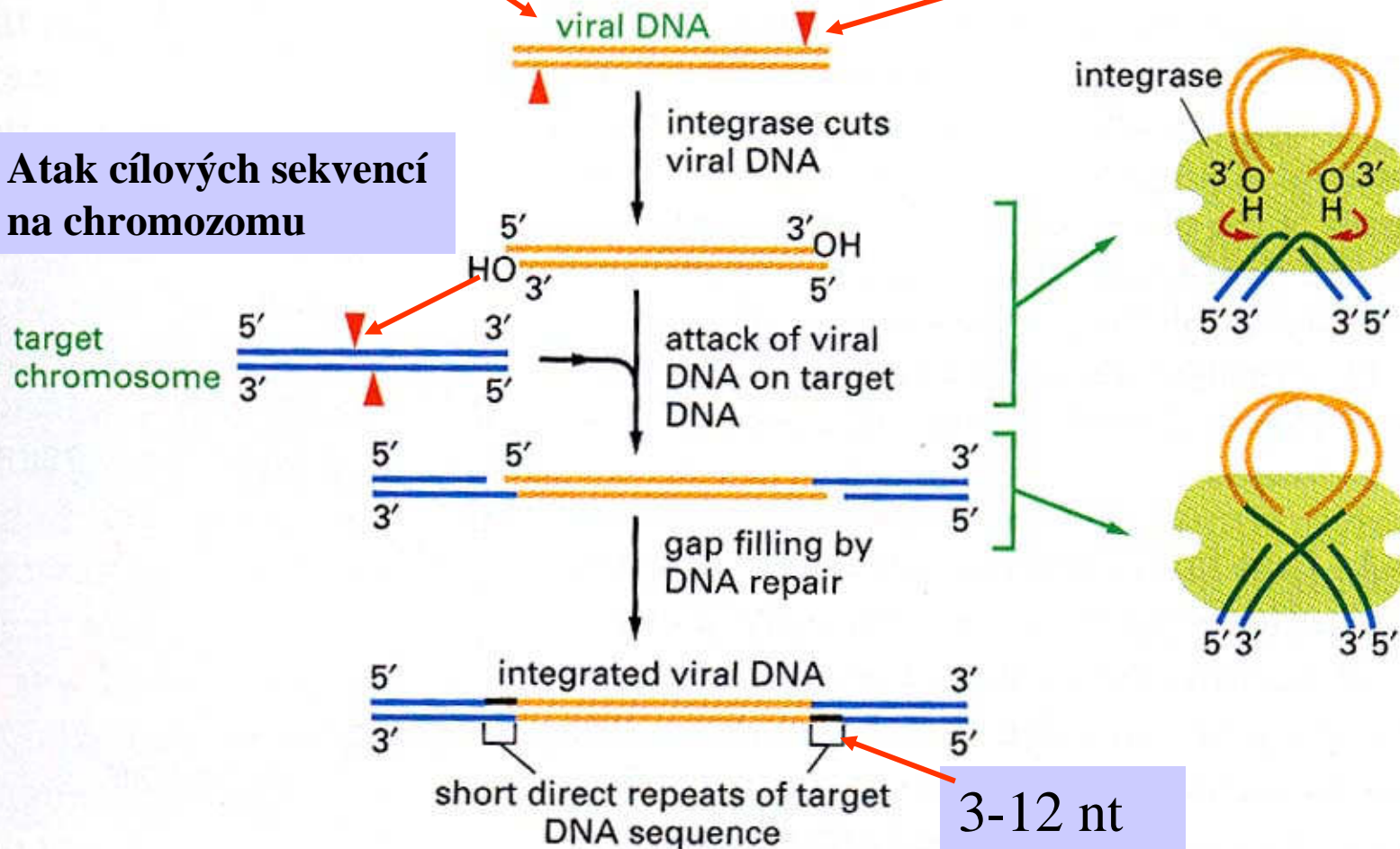
# Transpozice retrovirů nebo retrotranspozonů místně-specifickou rekombinací

RNA

RT

Štěpení konců  
transpozonu integrázou

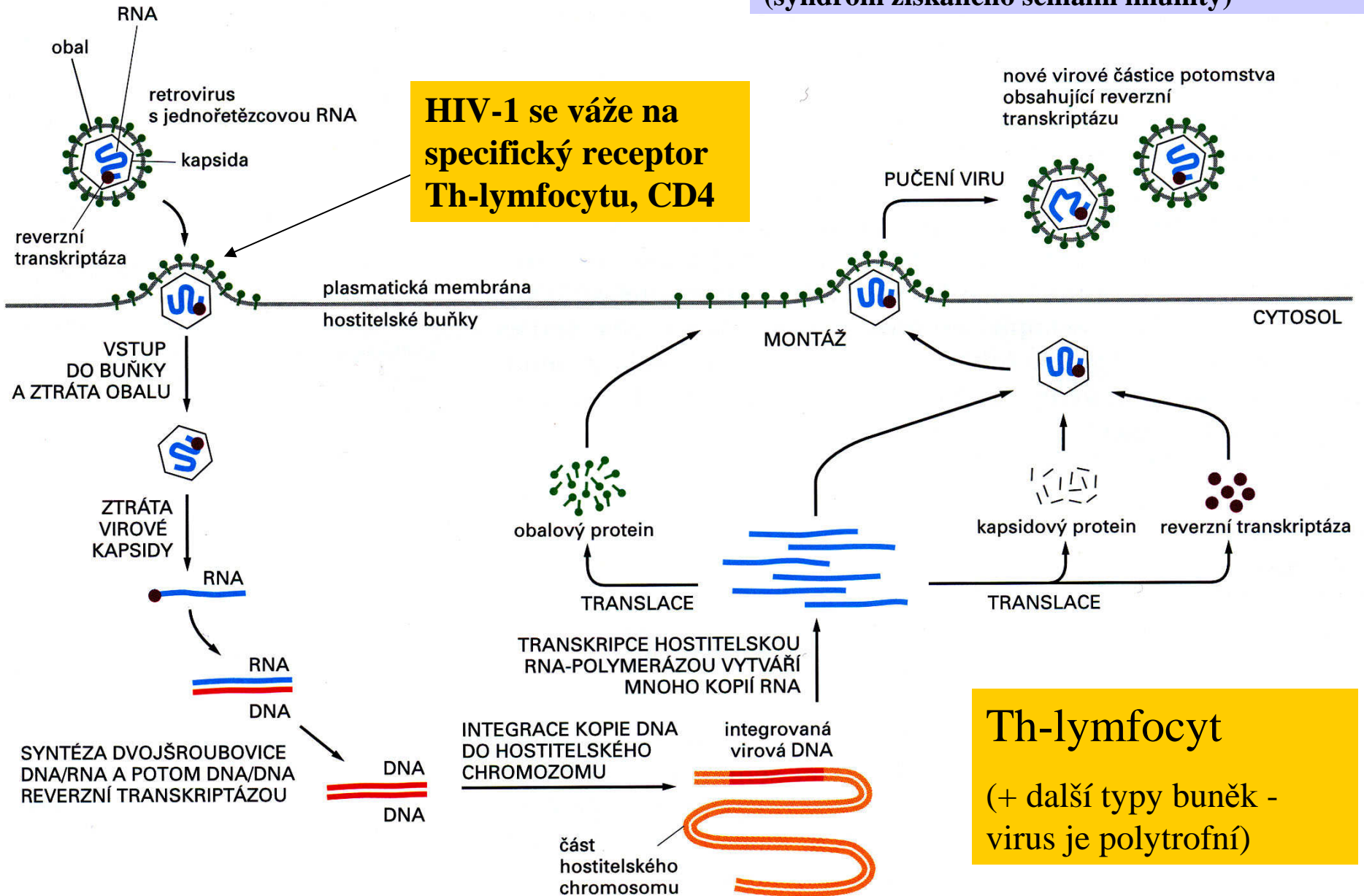
Atak cílových sekvencí  
na chromozomu



3-12 nt

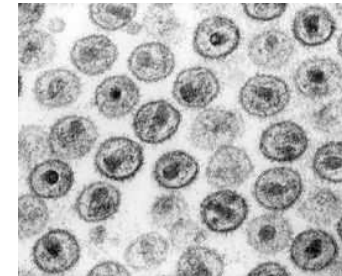
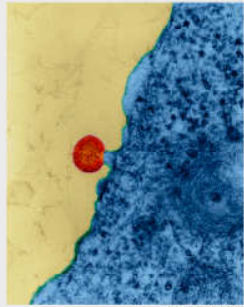
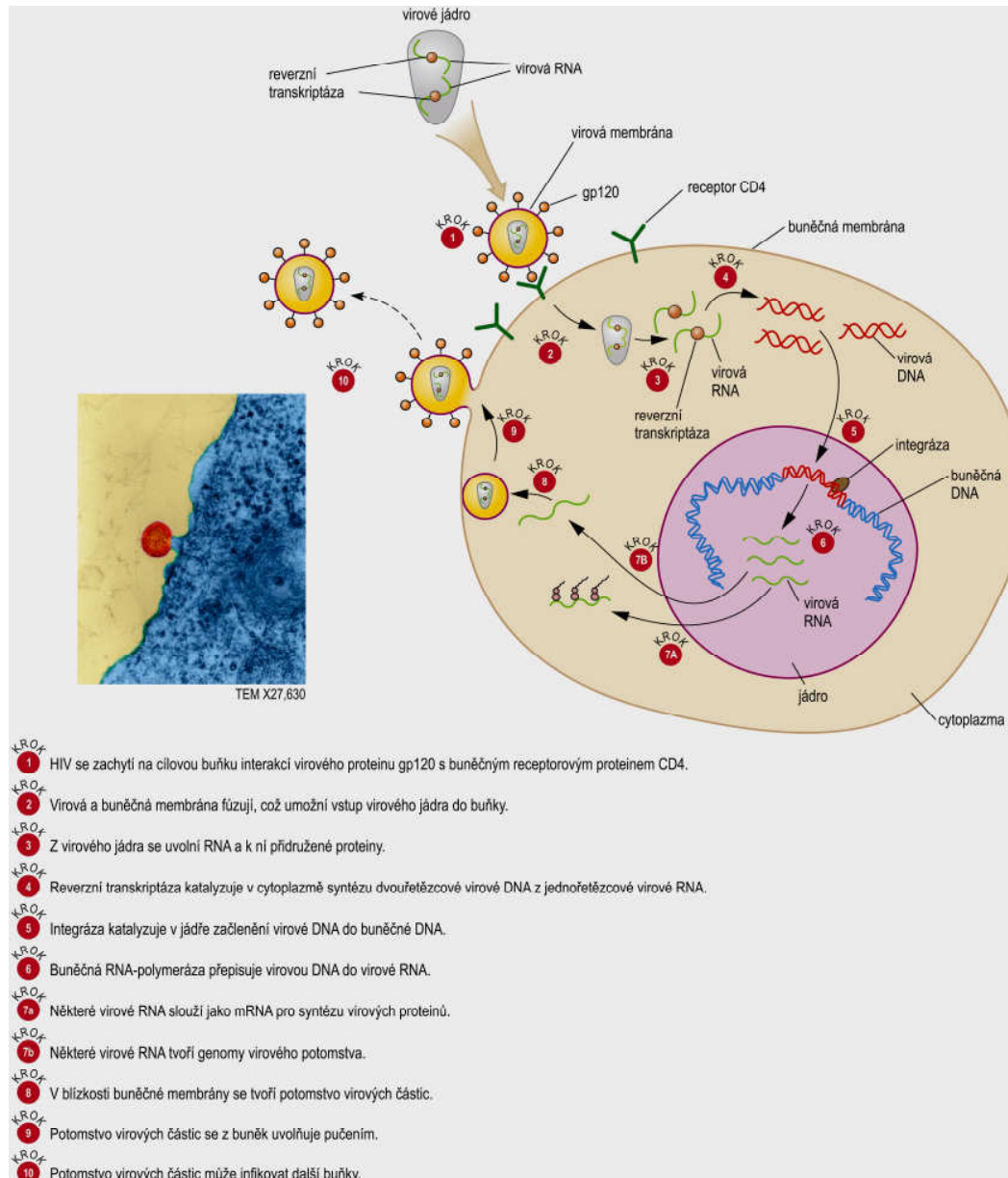
**HIV - Human immunodeficiency virus**  
**AIDS = acquired immune deficiency syndrom**  
**(syndrom získaného selhání imunity)**

**Životní cyklus retroviru**

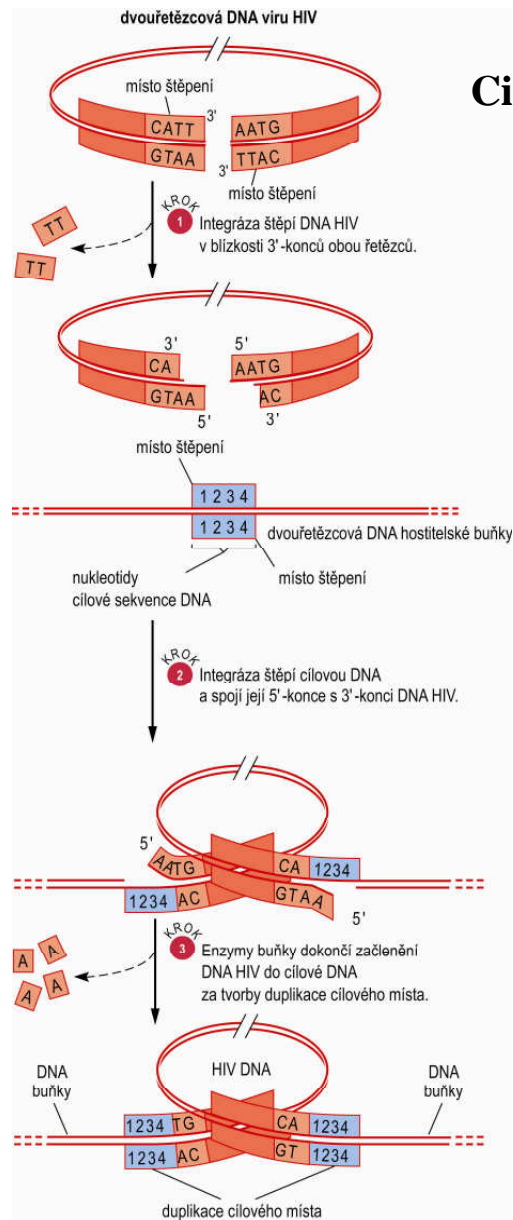


**Th-lymfocyt**  
**(+ další typy buněk - virus je polytrofní)**

# Životní cyklus viru HIV



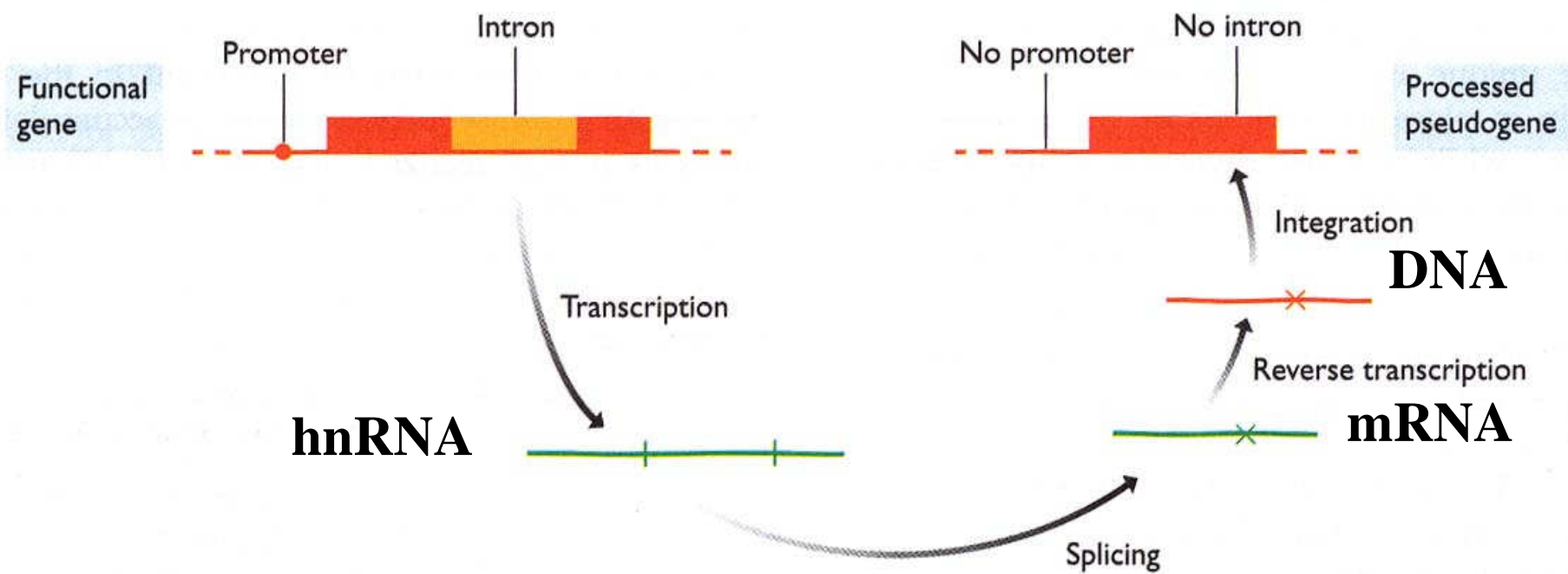
# Začlenění dsDNA viru HIV do chromozomu hostitelské buňky



## Cirkulární forma dsDNA



## Upravené pseudogeny vytvořené reverzní transkripcí



# Vznik upravených pseudogenů



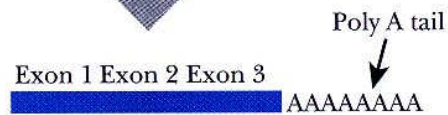
Původní funkční gen



Primary transcript



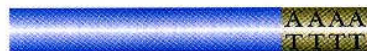
mRNA



Sestřih a připojení polyA



cDNA



Reverzní transkriptáza některé transkripty konvertuje na cDNA (**působením endogenní reverzní transkriptázy**)

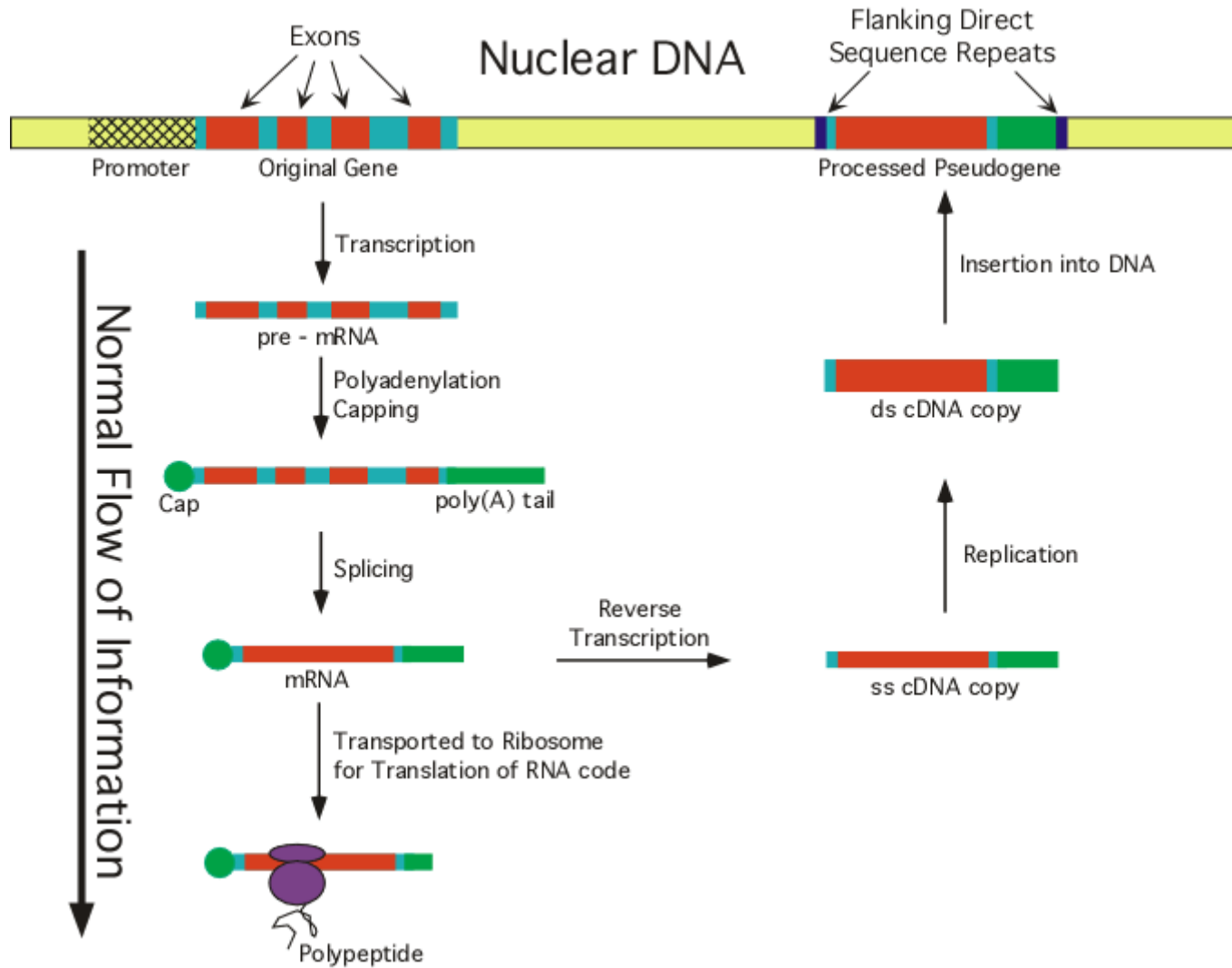


Another site in DNA

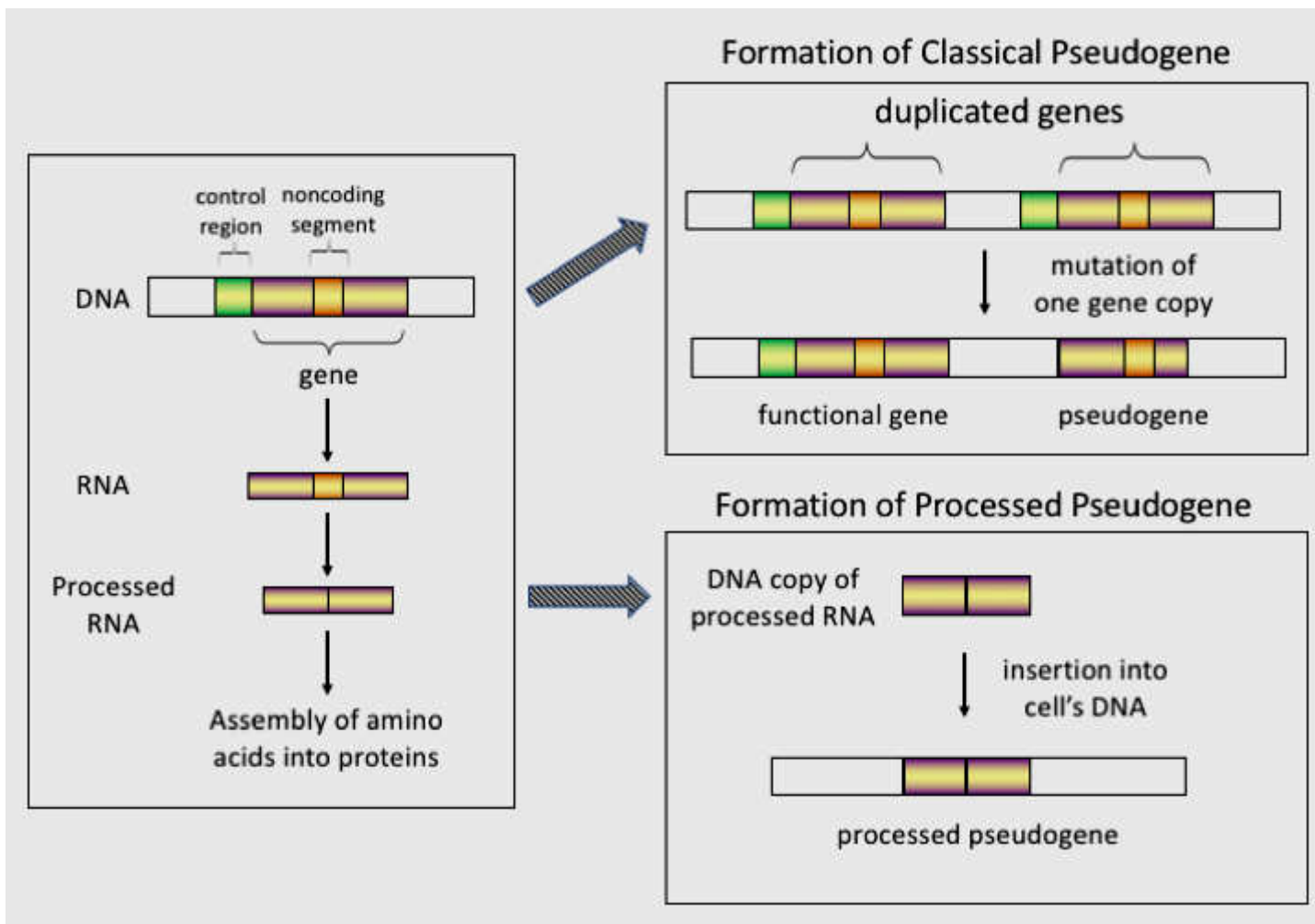


Vytvořená cDNA je začleněna do jiných míst genomu - vzniká pseudogen, který není funkční v důsledku chybění promotoru

# Vytváření upravených pseudogenů



# Srovnání vzniku klasických pseudogenů a upravených pseudogenů (retro-pseudogenů)



# Retrotranspozice „homing retro-intronů“ skupiny II

Intron začleněný v  
jedné z kopií genu



kopie genu  
neobsahující intron



TRANSCRIPTION

mRNA

TRANSLATION

Vytvoření enzymu s  
dvojitou aktivitou



ENDONUCLEASE  
ACTIVITY

Štěpení genu v cílovém místě

REVERSE TRANSCRIPTASE  
ACTIVITY

Intron

dsDNA kopie intronu

dvouřetězcový zlom

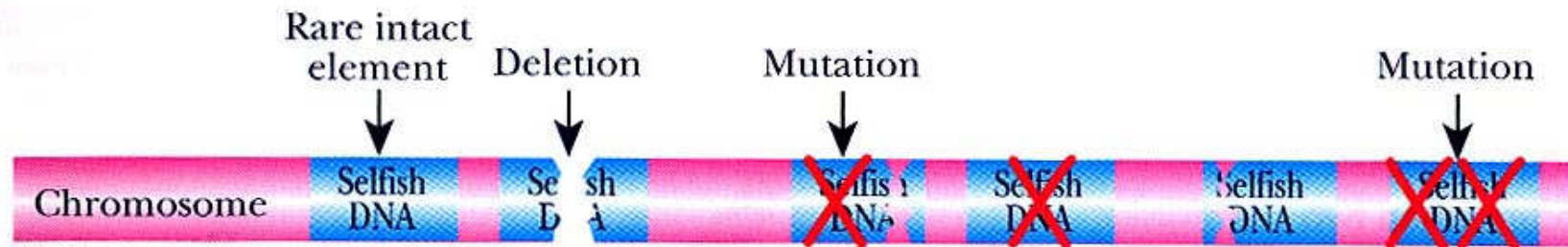


# Vznik „odpadní“ DNA jako důsledek transpozice a následné inaktivace mobilních elementů

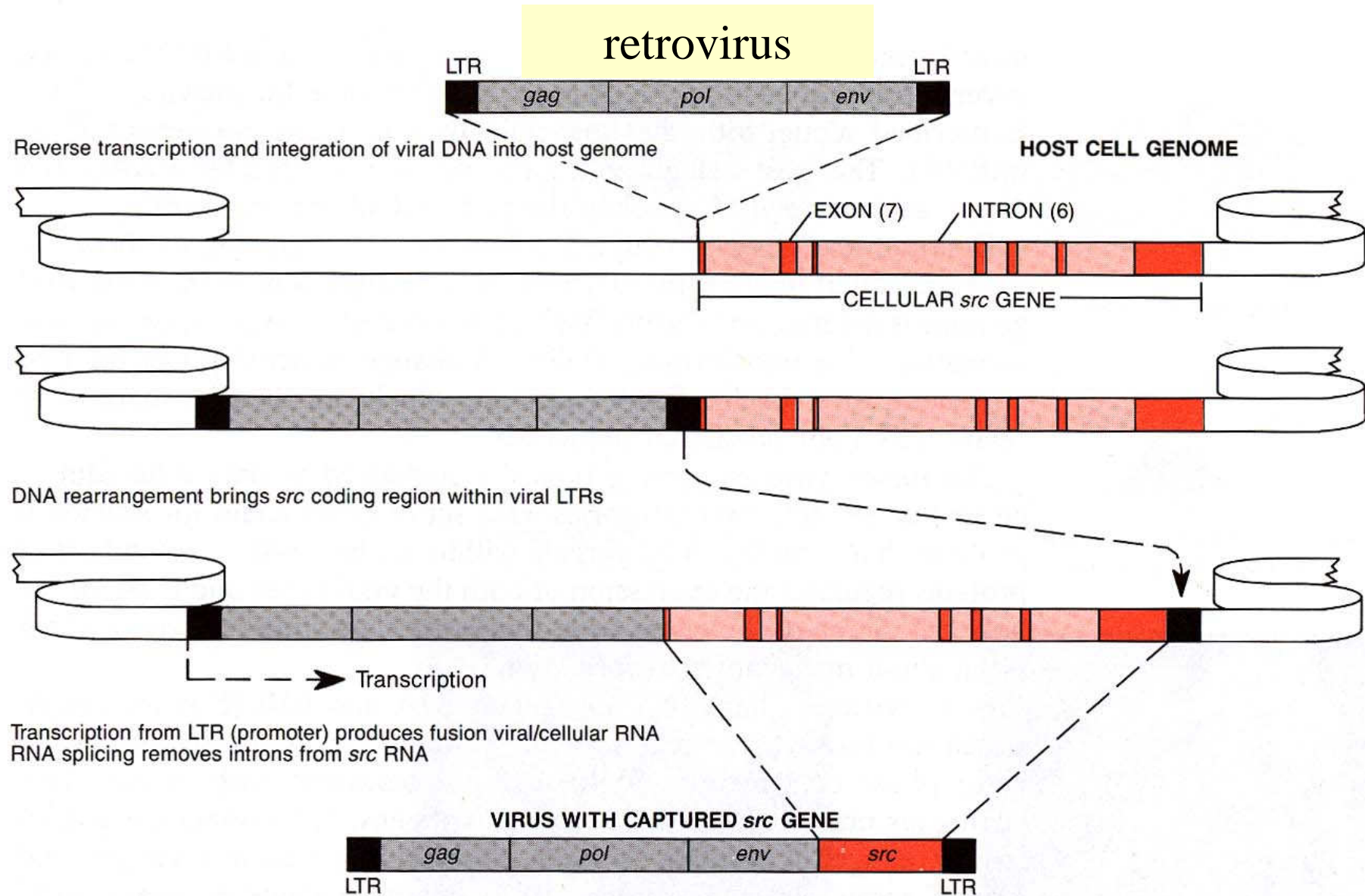
**mobilní elementy**



**po mnoha generacích**



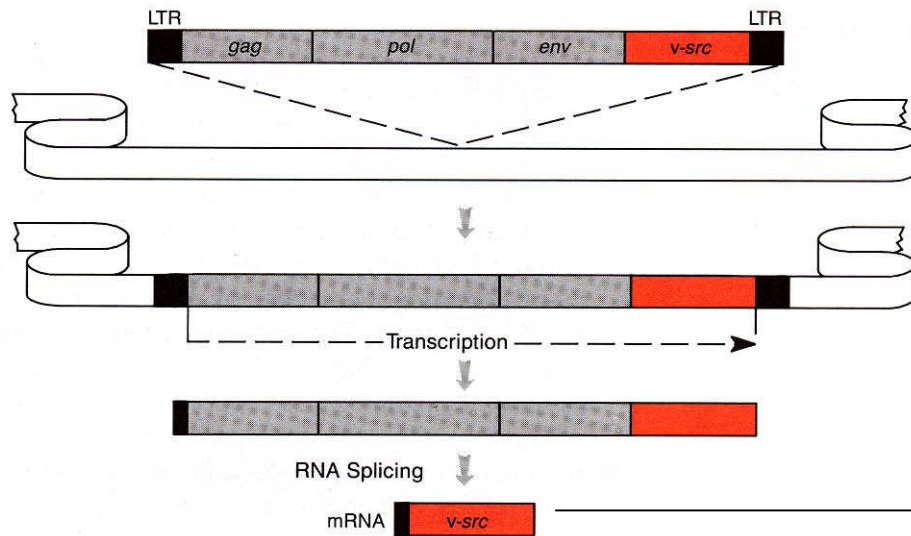
# Vznik retrovirů přenášejících onkogeny



**Capture of the Cellular *src* Oncogene by a Progenitor Rous Sarcoma Virus**

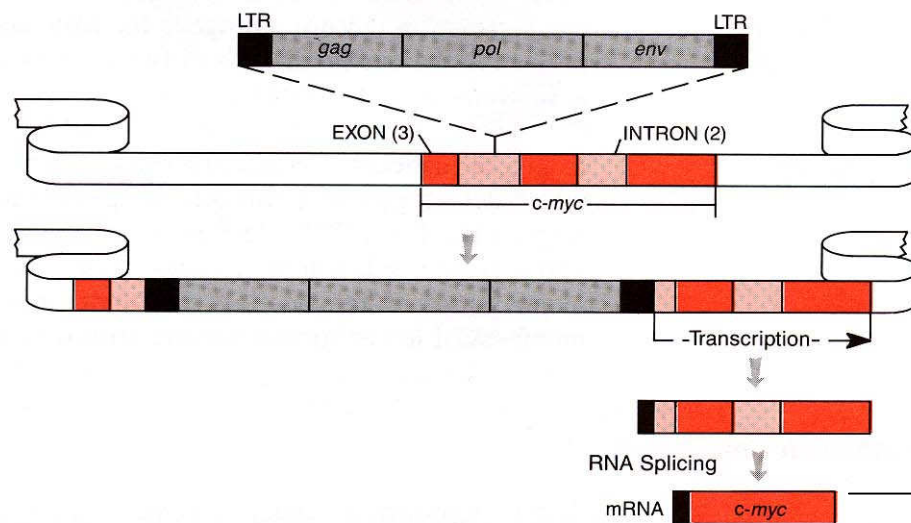
# Akutně a pomalu transformující retroviry

ACUTE TRANSFORMATION: ROUS SARCOMA VIRUS (RSV)



Transdukce onkogenu akutně transformujícími retroviry

CHRONIC TRANSFORMATION: AVIAN LEUKOSIS VIRUS (ALV)



Inzerční aktivace protoonkogenu pomalu transformujícími retroviry

Acute vs. Chronic Transformation by Retroviruses

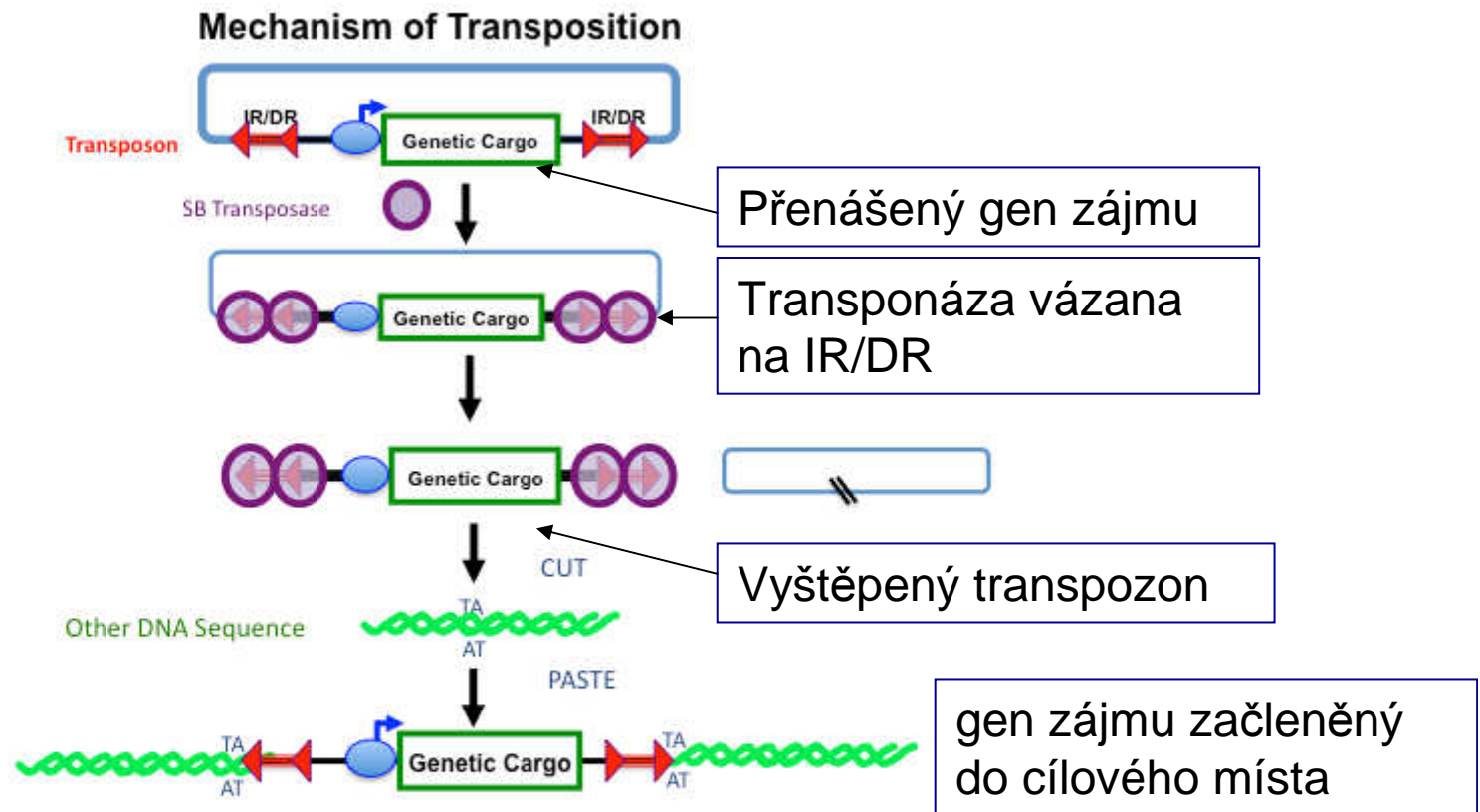


## Význam transpozonů v evoluci genomů

- vytváření mutací (inzerční inaktivace, posunové mutace)
- přestavby chromozomů (delece, inverze, duplikace)
- interakce složek genomů (chromozomů, plazmidů...)
- horizontální přenosy genů (onkogenní retroviry)

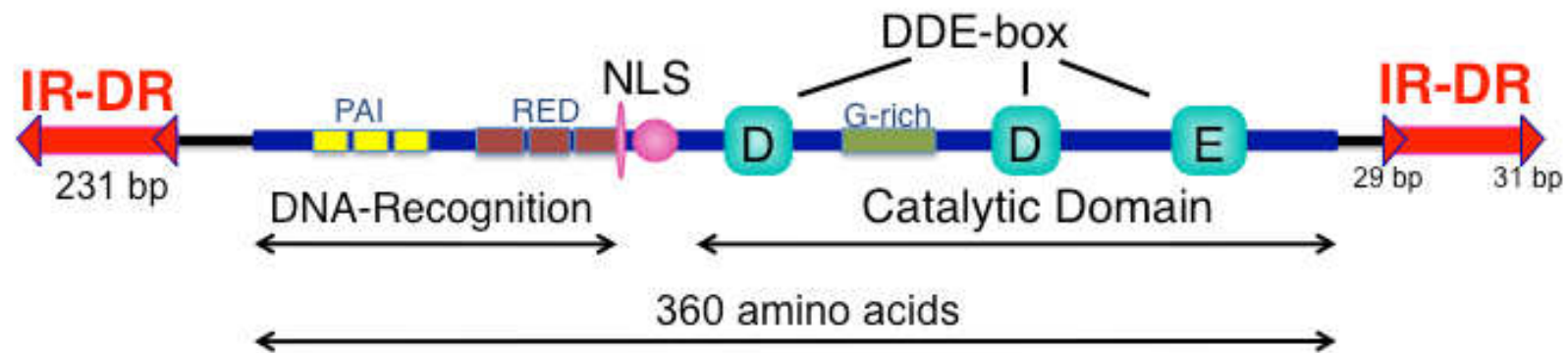
**Využití transpozonů: vektory pro přenos genů**

# Sleeping beauty – uměle rekontruovaný transpozon



**Figure 1. Mechanism of SB-mediated transposition.** *Top line:* A transposon, defined by the inverted sets of red, double arrows (IR/DRs), is shown as contained in another DNA molecule (e.g., a plasmid shown by the blue lines). The transposon in this example harbors an expression cassette comprised of a promoter (blue oval) that can direct transcription of the gene or other DNA sequence labeled "genetic cargo". *Middle lines:* *Sleeping Beauty* (SB) transposase binds to the IR/DRs as shown and cuts the transposon out of the plasmid (the cut sites are indicated by the two black slashed lines in the remaining plasmid). *Bottom two lines:* Another DNA molecule (green) with a TA sequence can become the recipient of a transposed transposon. In the process, the TA sequence at the insertion site is duplicated.

## Putative Structure of a Tc1-like Transposon in Fish



**Figure 2. Structural features of SB transposase.** The 360-amino acid polypeptide has three major subdomains - the amino-terminal DNA-recognition domain that is responsible for binding to the DR sequences in the inverted IR/DR sequences of the transposon, a nuclear localization sequence (NLS), and DDE domain that catalyzes the cut-and-paste set of reactions that comprise transposition. The DNA-recognition domain has two *paired* box sequences that can bind to DNA and are related to various motifs found in some transcription factors; the two *paired* boxes are labeled PAI and RED. The catalytic domain has the hallmark DDE (sometimes DDD) amino acids that are found in many transposase and recombinase enzymes. In addition, there is region that is highly enriched in glycine (G) amino acids.

