BAKTERIÁLNÍ TRANSPOZONY (mobilní elementy)

- **Transpozon = sekvence DNA schopná transpozice, tj. přemístění z jednoho místa v genomu do jiného místa**
- **Transpozice = proces přemístění transpozonu**
- **Transponáza (transpozáza) = enzym zprostředkující transpozici**

Základní typy bakteriálních transpozonů

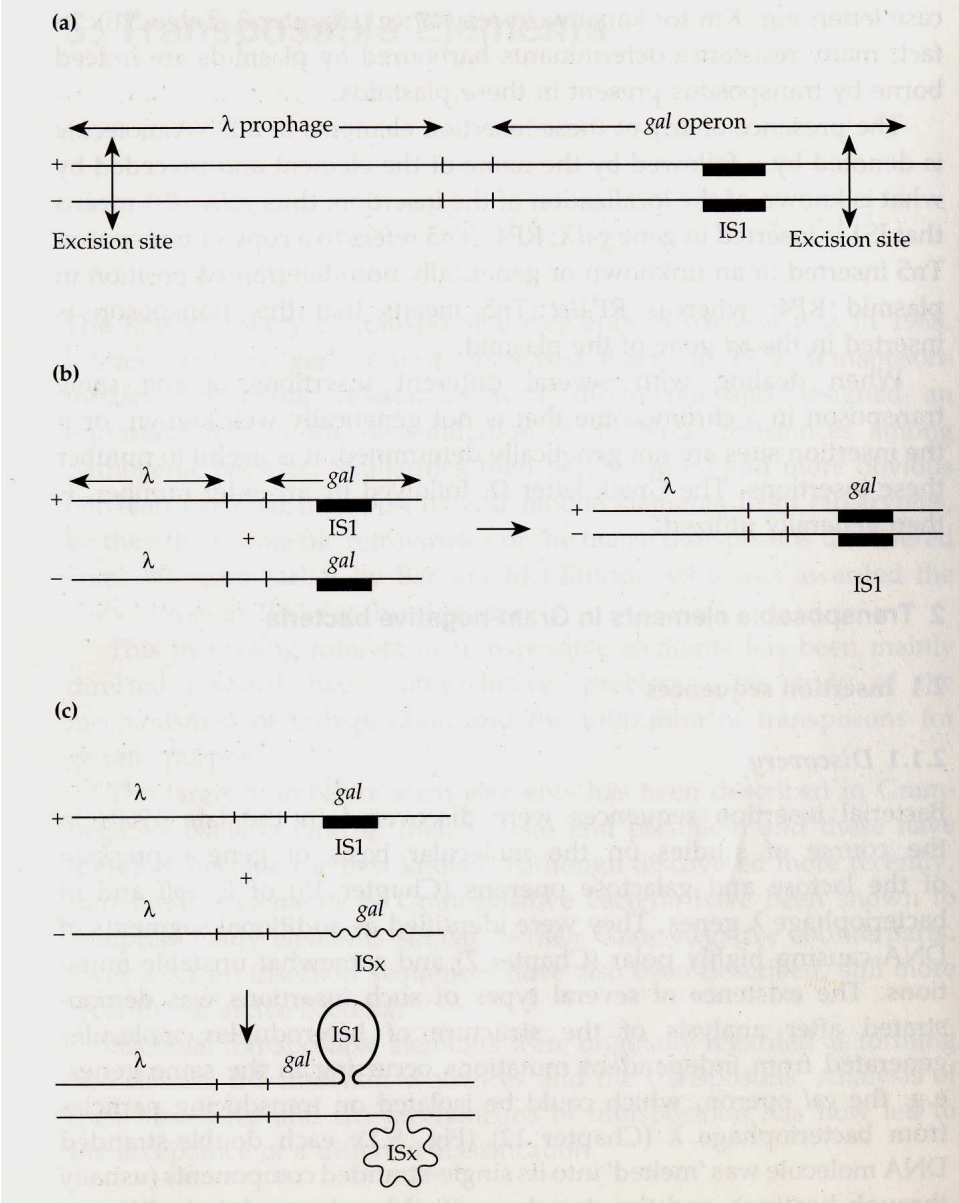
- **IS = inzerční sekvence (IS-elementy)**
- **Tn = transpozony (složené transpozony)**
- **Bakteriofág MU**
- ***Konjugativní transpozony***

- **Poprvé byly IS popsány v r. 1967 u *E. coli* analýzou mutant s těmito vlastnostmi:**
- Mutace byly vysoce polární - každá se mapovala v prvním genu operonu, ale nebyly syntetizovány proteiny genů po směru transkripce. Polarita byla důsledkem přítomnosti transkripčně-terminační sekvence inzerčního elementu.
- Tyto mutace nebylo možné revertovat analogy bází nebo frame-shift mutageny, takže podstatou mutací nemohly být substituce ani adice nebo delece bází.
- Jestliže byly do kmenů s mutacemi přeneseny plazmidy, podobné polární mutace (i když v jiných genech) se na nich občas objevovaly. Např. F´lac+ se stal lac-.
- Fyzikální studium plazmidů ukázalo, že plazmid s mutací je delší díky inzerci elementu.

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.**

DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI IS-SEKVENCÍ U *E. coli*

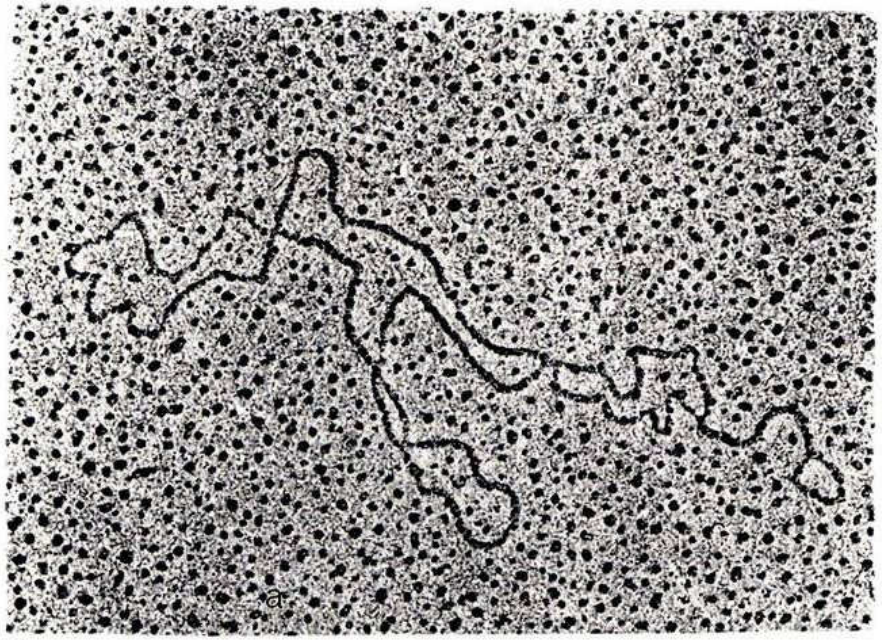


Vznik specificky transdukujících fágů

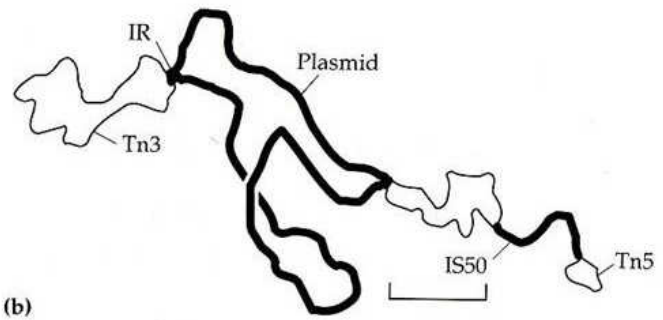
Vznik heteroduplexů

Mapování neznámých IS v gal operonu heteroduplexní analýzou

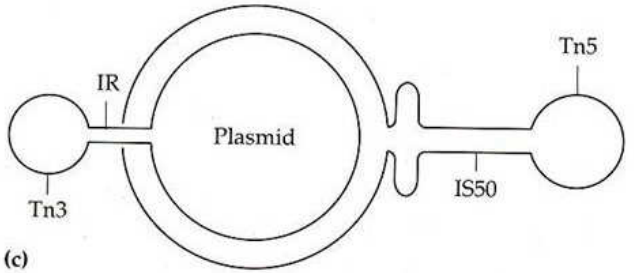
ZNÁZORNĚNÍ PŘÍTOMNOSTI TRANSPOZONŮ V ELEKTRONOVÉM MIKROSKOPU - HETERODUPLEXNÍ ANALÝZA



(a)



(b)



(c)

STRUKTURA IS SEKVENCÍ A SLOŽENÝCH TRANSPOZONŮ

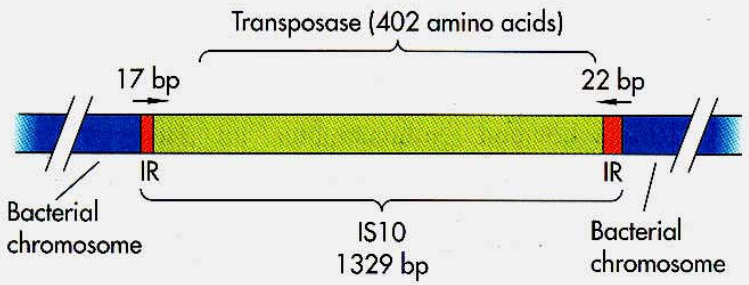


FIGURE **10-1**
Structure of IS10, a simple bacterial insertion sequence. IS10 is a 1329-bp transposable element found in *E. coli*. The element consists of a gene that encodes a 402 amino acid protein, thought to be the transposase enzyme required for IS movement, flanked by short inverted repeats (IR). The IRs are blocks of similar (but not identical) sequence in opposite orientation to one another. The IRs are recognized by the transposase enzyme in the first steps of transposition and therefore define the ends of the sequence to be transposed.

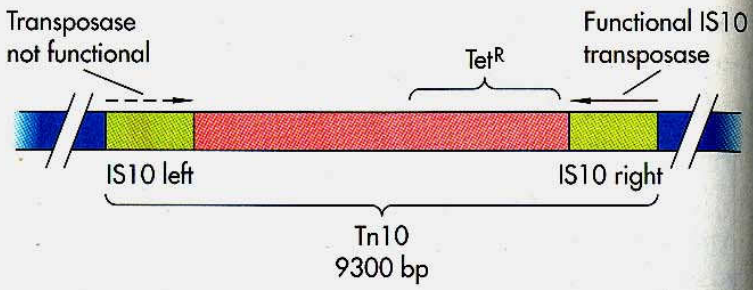


FIGURE **10-2**
Complex transposons are genes flanked by two IS elements. Tn10 is a 9300-bp-long movable element that encodes genes for resistance to the antibiotic tetracycline (Tet^R). Each end contains an IS10 insertion element (oriented in opposite directions). The right IS encodes a functional transposase that is required for movement of the transposon. The left IS10 element has accumulated mutations so that it no longer encodes an active transposase protein. Between the IS elements are genes required for tetracycline resistance. The IS elements can transpose individually or in tandem; in the latter case they carry the intervening DNA with them.

Struktura složených transpozonů

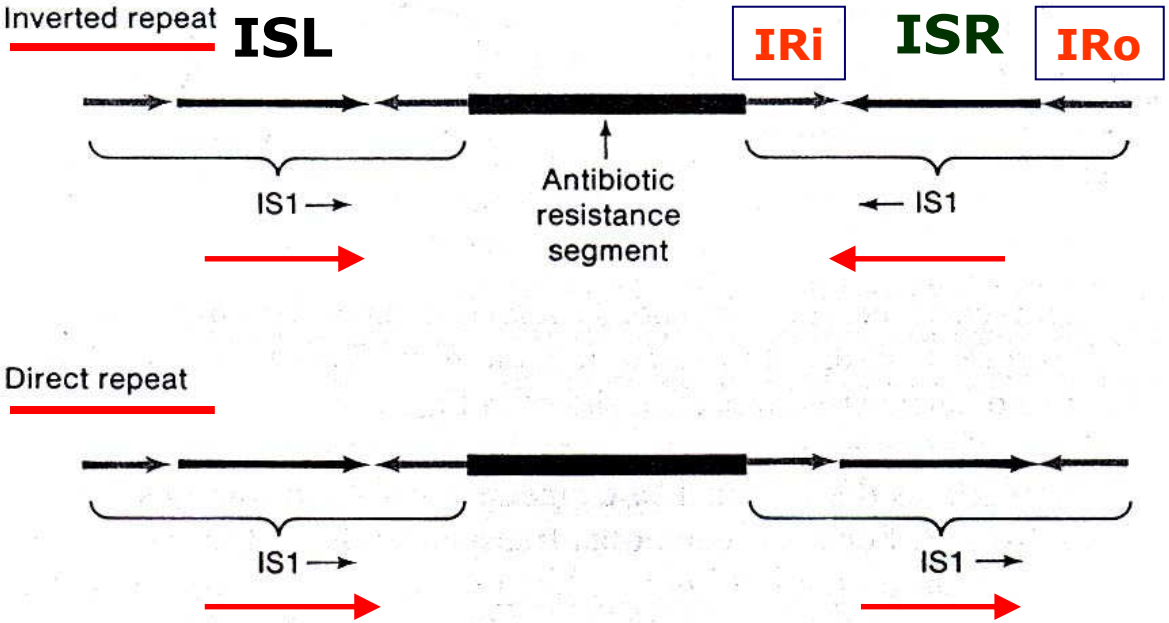
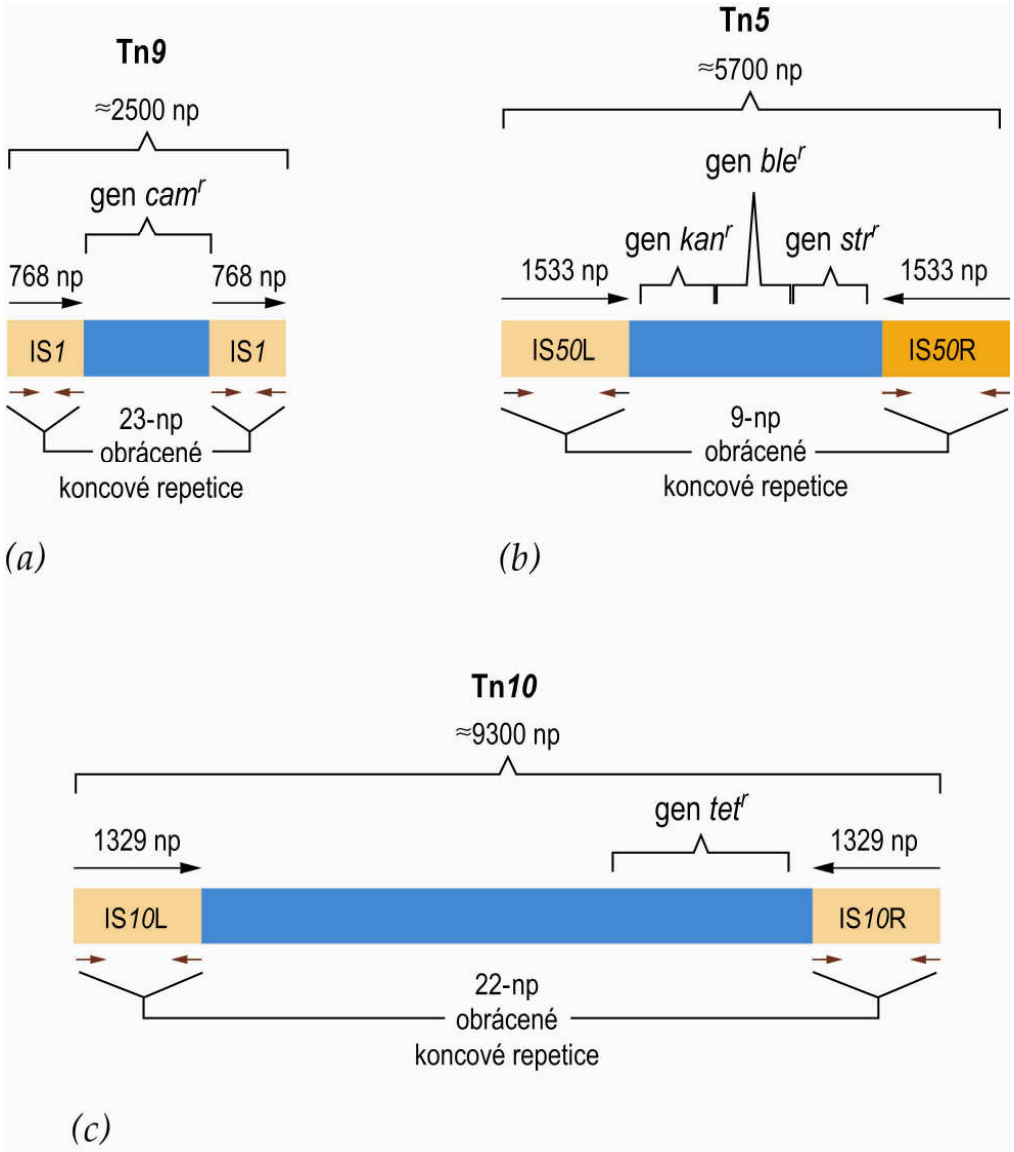


Table 12-2 Properties of selected composite type I transposons of *E. coli*

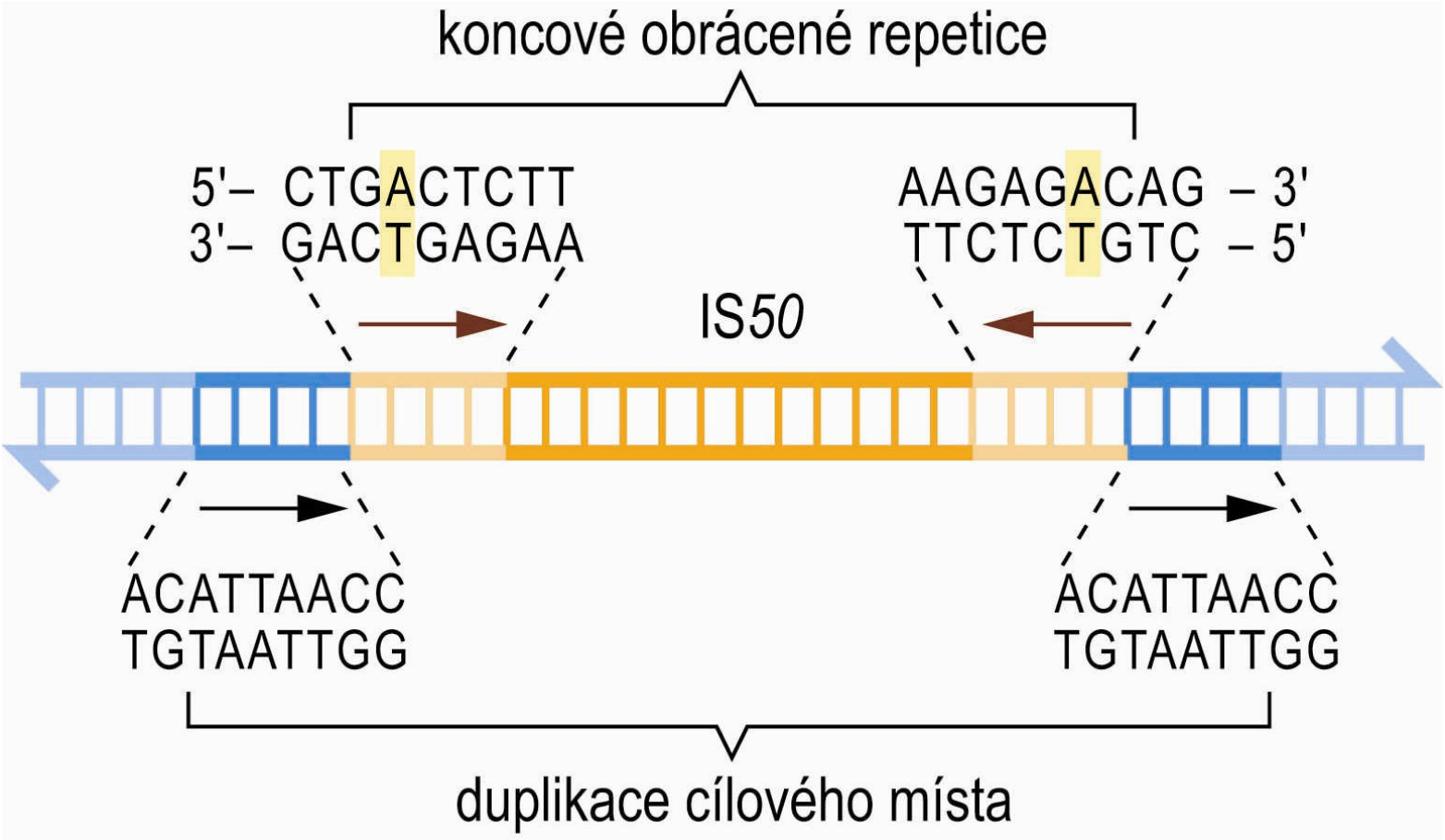
Element	Genes carried*	Size in base pairs	Terminal IS element and size in base pairs	Relative directions of terminal IS Elements
Tn*5*	*kan*	5818	IS*50* (1533)	Inverted
Tn*9*	*cam*	2638	IS*1* (768)	Direct
Tn*10*	*tet*	9300	IS*10* (1329)	Inverted
Tn*204*	*cam, fus*	2457	IS*1* (768)	Direct
Tn*903*	*kan*	3094	IS*903* (1057)	Inverted
Tn*1681*	*ent*	2088	IS*1* (768)	Inverted

**cam*, chloramphenicol; *ent*, enterotoxin; *fus*, fusidic acid; *kan*, kanamycin; *tet*, tetracycline.

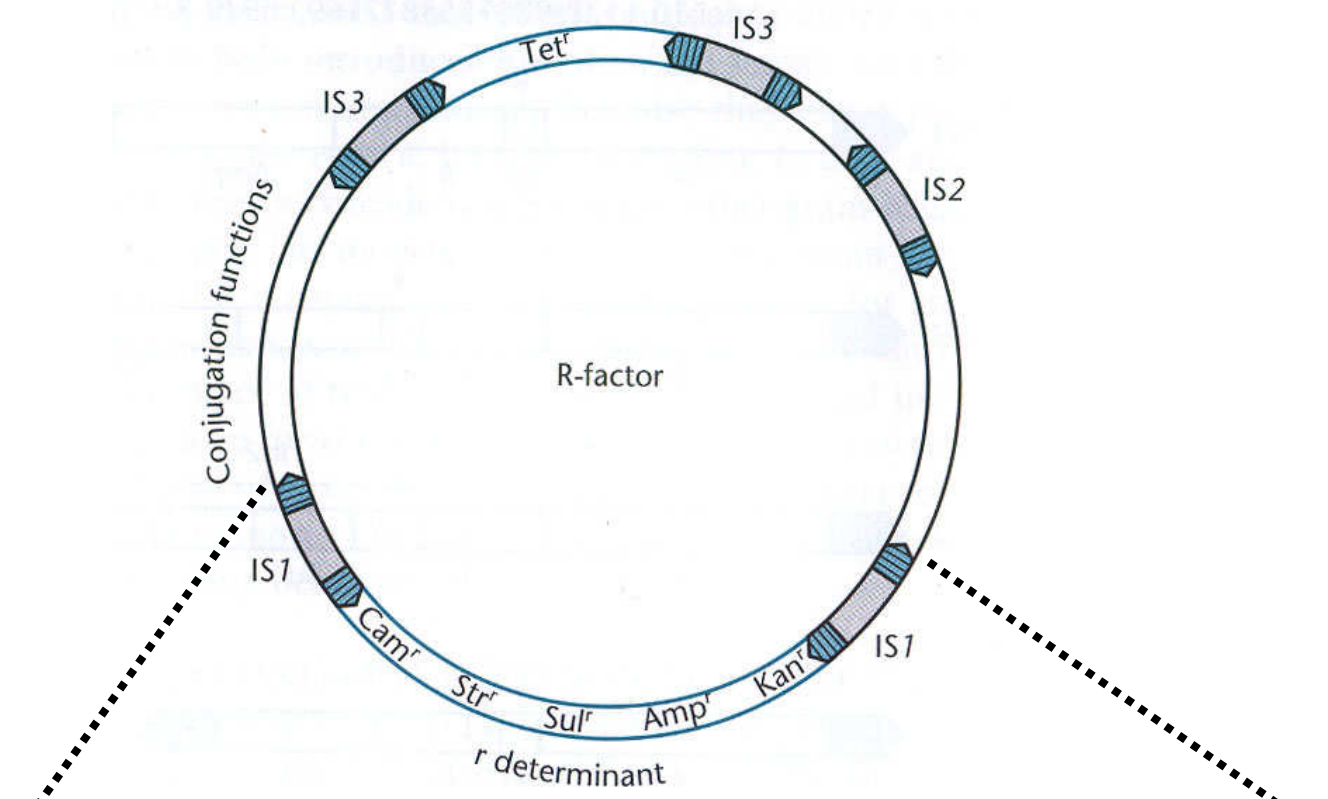
Příklady genetické organizace složených transpozonů



Struktura IS50

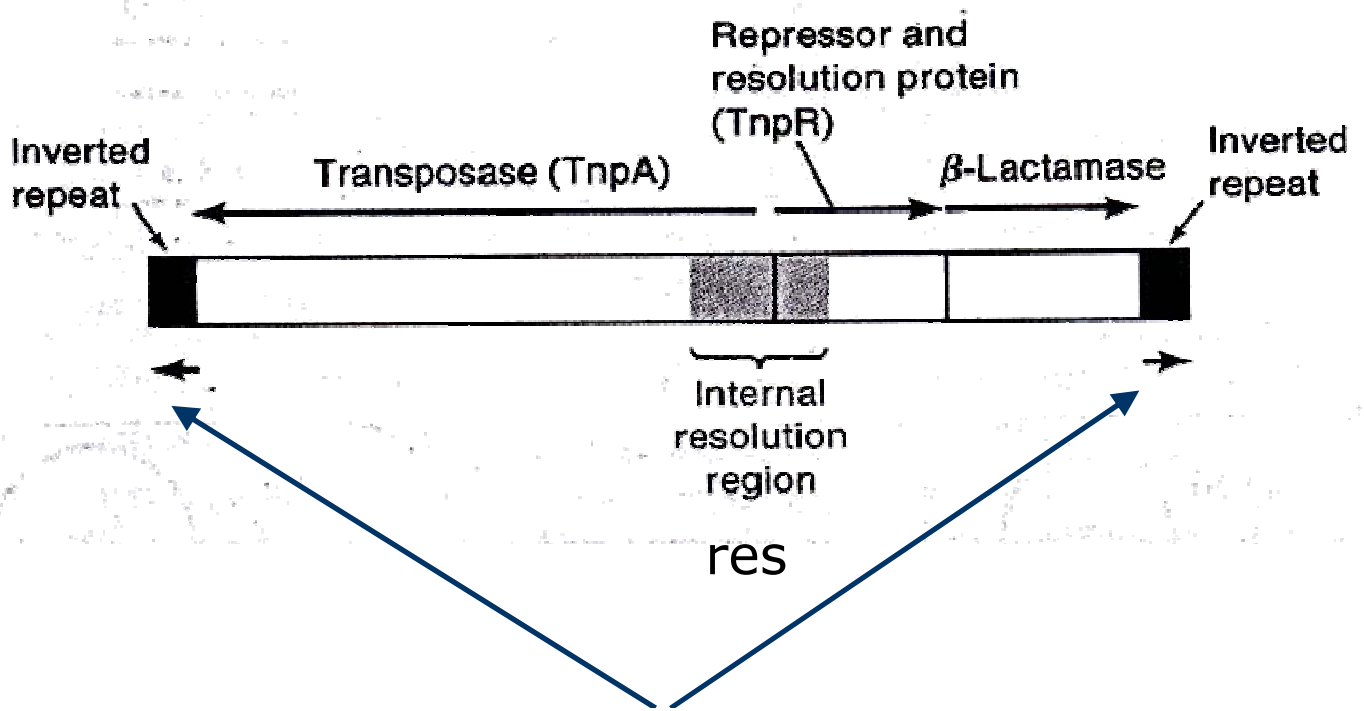


Obsah transpozonů v R plazmidu

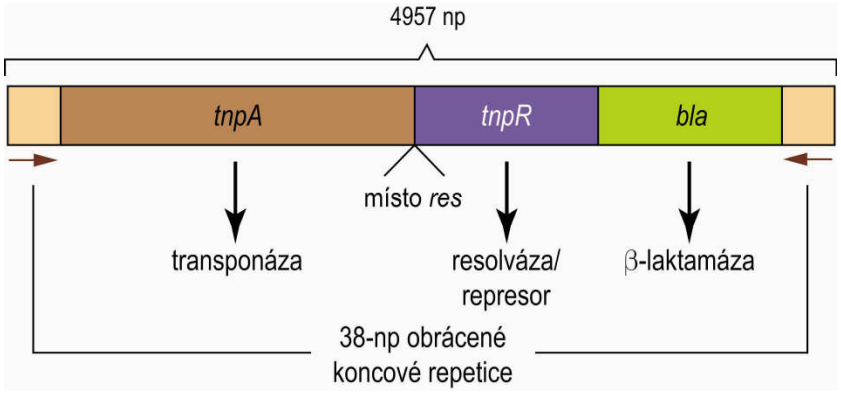


Vznik složených transpozonů tvořených dvěma IS, mezi nimiž se nachází gen nebo geny pro ANT^R

STRUKTURA TRANSPOZONU Tn3



38 bp obrácená opakování



IS U GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ

Designation	Host DNA and copy number	Size (in bp)	Inverted repeat[a] (in bp)	Target duplication (in bp)	Open reading frame (no.)	Special properties
IS1	Enterobacterial chromosomes, phages and plasmids (5–8 copies per strain)	768	20/23	9 (8–11)	8	Several Class I transposons are formed by inverted or direct repeats of IS1 (Tn9, Tn2350, Tn1681)
IS2	*E. coli* chromosomes, plasmids (F)	1327	32/41	5	2	Inverted repeats of Tn951
IS3	*E. coli* chromosomes (4–5 copies) Plasmid F (2 copies)	1258	39/39	3	3	Behaves as a mobile promoter
IS4	Chromosomes of *E. coli* K12 (1 copy at a single location)	1426	16/18	11, 12 or 14	2	1 specific insertion site
IS5	*E. coli* *Shigella* Phages λ, Mu	1195	15/16	4	3	The most abundant IS in *E. coli*; has a promoter activity by creation of a promoter
IS10	Tn10	1329	17/22	9	1	Tn10 inverted repeats
IS15	*E. coli* *Salmonella* Several plasmids					Tn1525 direct repeats

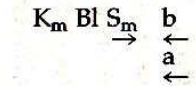
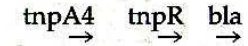
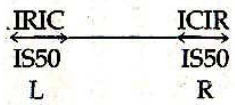
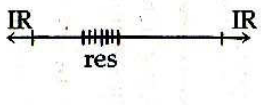
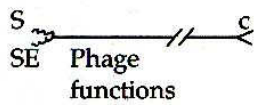
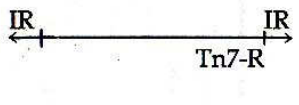
~1 kb rozdílnost IR jednotky bp transponáza součást Tn

IS U GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ

IS21	Inc P1 plasmids	2100				Mobile promoter active only when in tandem repeats
IS26	Tn2680	820	14/24	8	2	Tn2680 direct repeats
IS30	Phage P1 *E. coli*	1221	23/26	2	3	Insertion site quite specific
IS46	IncN plasmids	810				Mainly forms cointegrates
IS50R	Tn5	1534	8/9	9	2	Tn5 inverted repeats; only IS50R is active
IS52	*Pseudomonas savastanoi*	1209	9/10	4		
IS66	*Agrobacterium* plasmid pTiA66	2548				
IS102	Plasmid pSC102	1057	18	9	3	
IS136 (IS426)	*Agrobacterium tumefaciens* (pTC137)	1313	32/30	9	3	
IS200	*Salmonella typhimurium* (6–10 copies)					Only found in *Salmonella* species
IS222	*Pseudomonas aeruginosa* chromosome and phage D3	1350	40			
IS476	*Xanthomonas campestris*	1225	13	4		
IS4400	*Bacteroides fragilis*	1150				
ISRm2	*Rhizobium meliloti*	2700	24/25	8		

a, The two figures refer to the sizes of the two inverted repeats, when these are not identical.

ČTYŘI HLAVNÍ TŘÍDY TRANSPOZONŮ U G- BAKTERIÍ

	A Class I	B Class II	C Class III	D Class IV
Structure of a representative example	Tn5	Tn3	Phage Mu	Tn7
mRNAs				
DNA				
Size of Tn	5.7 kbp	5 kbp	39 kbp	14 kbp
Size of target duplication	9 bp	5 bp	None	5 bp
Markers[a]	Km, Sm, Bl	Ap	Phage functions	Tp, Sm, Sp
Transposition functions	ISR: a = active transposase; b = transposase inhibitor ISL: inactive	*tnpA* transposase *tnpR* resolvase	Two proteins: A and B	Five proteins necessary
Comments	Composite Tn, with two distal, nearly identical, ISs, of which the left one is inactive	IR 39 bp	Largest known transposon	IR 28 bp
Other well-studied elements	Tn9 (IS1) Cm Tn10 (IS10) Tc	Tn1 Ap Tn501 Hg Tn21 Hg, Sm, Ap, Su Tn1000 (γ^s) IS101 (209 bp)	Phage D108	

IR, IC, inverted repeats; res, site of co-integrate resolution; SE, c, striped ends. a, See Table 3.5 (p. 76) for explanation of the symbols.

IS A TRANSPOZONY U G+ BAKTERIÍ

Element	Hosts	Phenotype[a]	Size (kbp)	Terminal repeats	Target duplication	Class[b]
IS231	*Bacillus thuringiensis*	None	1.65	20	11	
ISS1	*Streptococcus lactis*	None	0.82	18	8	I (IS15)
IS110	*Streptomyces coelicolor*	None	1.55	10/15	ND	
IS257	*Streptococcus lactis*	None				I (IS15)
IS861	*Streptococcus*					I (IS50, IS3)
Tn4001	*Staphylococcus aureus*	Gm, Tm, Km	4.7	IS256	ND	I
Tn551	*Staphylococcus aureus*	Em	5.3	40	5	II
Tn917	*Streptococcus faecalis*	Em	5.27	38	5	II
Tn4430	*Bacillus thuringiensis*	None	4.194	38	5	II
Tn4451	*Clostridium perfringens*	Cm	6.2	12	ND	II
Tn4556	*Streptomyces fradiae*		6.62			II
Tn916	*Streptococcus faecalis*	Tc conjugative	16.4	Imperfect	0	V
Tn918	*Streptococcus faecalis*	conjugative	16	ND	ND	V
Tn919	*Streptococcus sanguis*	conjugative	16	ND	ND	V
Tn1545	*Streptococcus pneumoniae*	Tc, Em, Km conjugative	25.3	Imperfect	0	V
Minicircle	*Streptomyces coelicolor*	None	2.6	Imperfect	0	V
Tn554	*Staphylococcus aureus*	Em, Sp	6.69	0	0	V

a, See Table 3.5, p. 76 for explanation of symbols; Gm, gentamycin; ND, not determined; Tm, tobramycin.
b, The IS in brackets indicates Gram-negative elements having homologies with those described.

Nová třída V
- nemají IR
- netvoří TD

Konjugativní transpozony

IS U ARCHEÍ

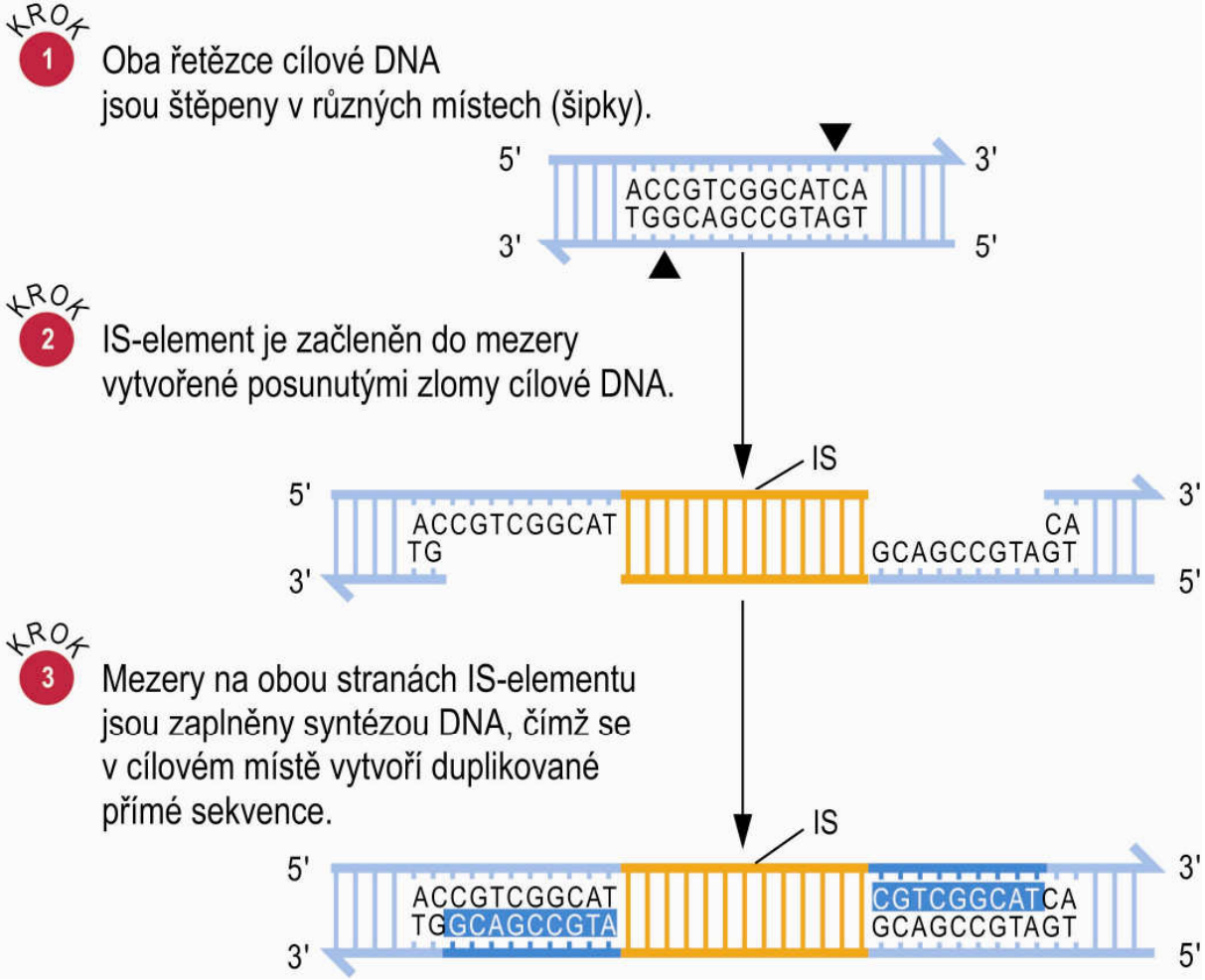
Element	Hosts	Size bp	Inverted repeats	Target duplication (bp)	ORFs
ISH1	*Halobacterium halobium*	1118	8/9	8	1
ISH2	*Halobacterium halobium*	520	19	10, 11 or 20	3
ISH25	*Halobacterium halobium*	588	none	none	
ISH50	*Halobacterium halobium*	996	23/29	none	2
ISHS1	*Halobacterium halobium*	1700	26/27	8	
ISH51	*Haloferax volcanii*	1371	15/16	3	

Table 12-1 Properties of some *E. coli* insertion elements

Element	Number of copies and location*	Number of base pairs
IS*1*	5–8 in chromosome	768
IS*2*	5 in chromosome; 1 in F	1327
IS*3*	5 in chromosome, 2 in F	1258
IS*4*	1 or 2 in chromosome	1426
IS*5*	Unknown	1195
Tn 1000 (γδ)	1 or more in chromosome; 1 in F	5980

Více kopií ⟶ přestavby genomu

VZNIK PŘÍMÝCH REPETICÍ V CÍLOVÉM MÍSTĚ PO ZAČLENĚNÍ TRANSPOZONU



Vytvoření posunutých zlomů transponázou

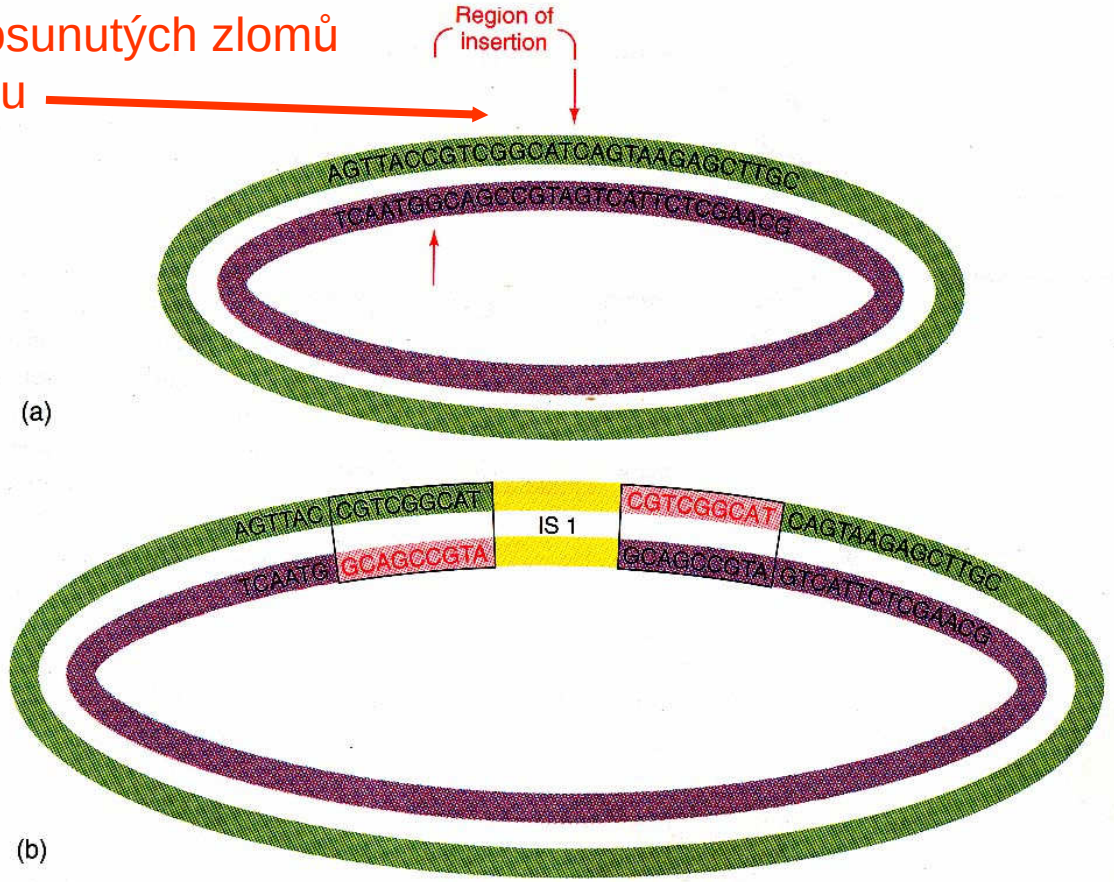
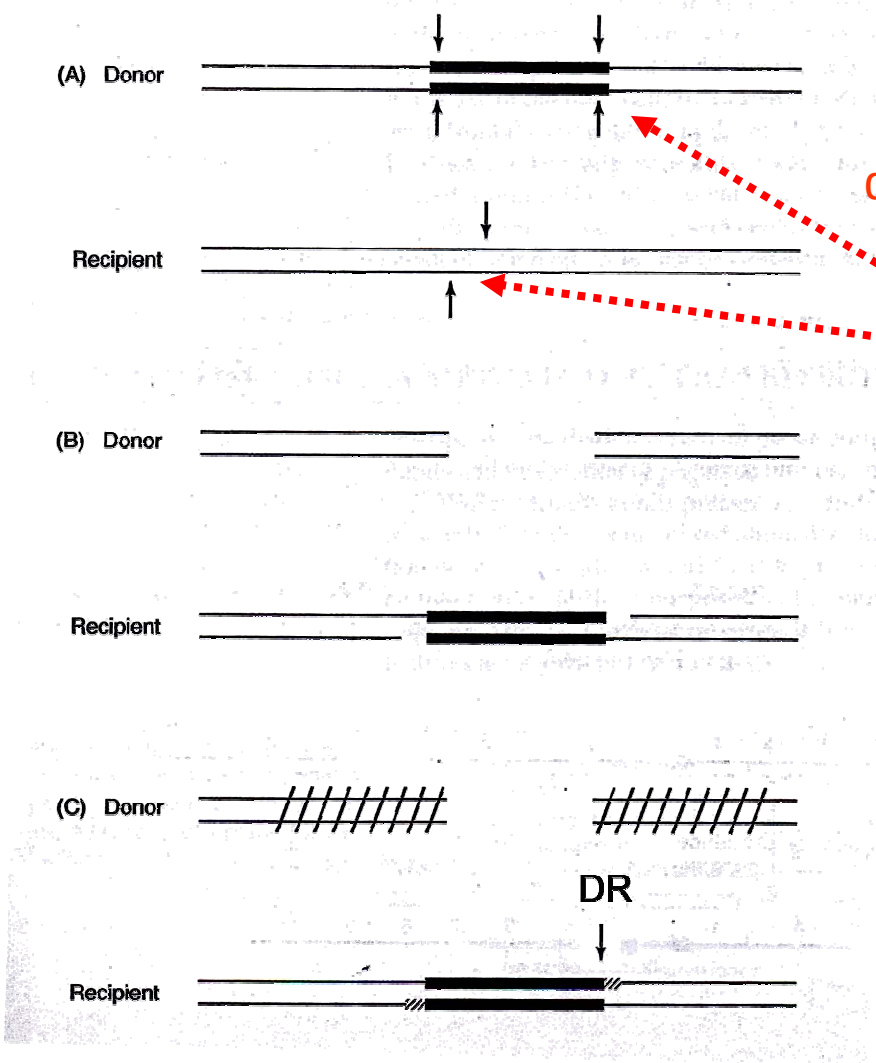


Figure 21-22 Duplication of a short sequence of nucleotides in the recipient DNA is associated with the insertion of a transposable element; the two copies bracket the inserted element. Here the duplication that attends the insertion of IS1 is illustrated in a way that indicates how the duplication may come about. IS1 insertion causes a nine-nucleotide duplication. If the two strands of the recipient DNA are cleaved (arrow) at staggered sites that are nine nucleotides apart, as shown in (a), followed by insertion of IS1 between the resulting single-stranded ends, then the subsequent filling in of single strands on each side of the newly inserted element, indicated by red letters in (b), with the right complementary nucleotides could account for the duplicated sequences (boxes). (From S. N. Cohen and J. A. Shapiro, "Transposable Genetic Elements." Copyright © 1980 by Scientific American, Inc. All rights reserved.)

MODEL NEREPLIKATIVNÍ TRANSPOZICE

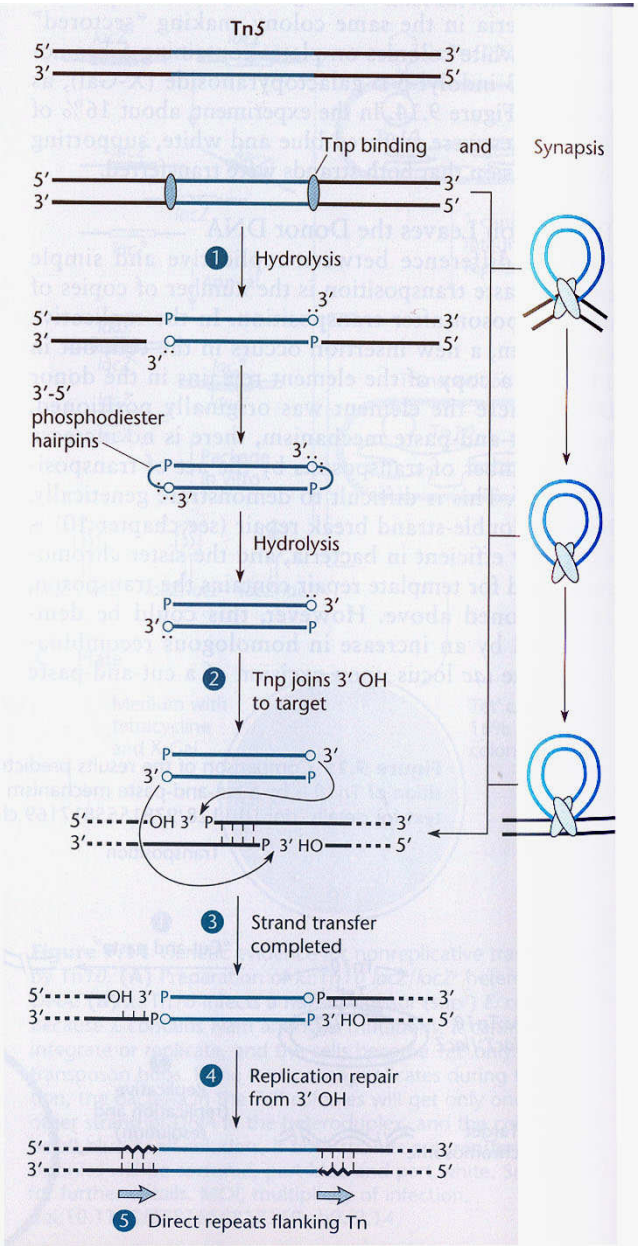
(KONZERVATIVNÍ, „cut and past“)



Vytvoření
dvouřetězcových zlomů

Působení
transponázy

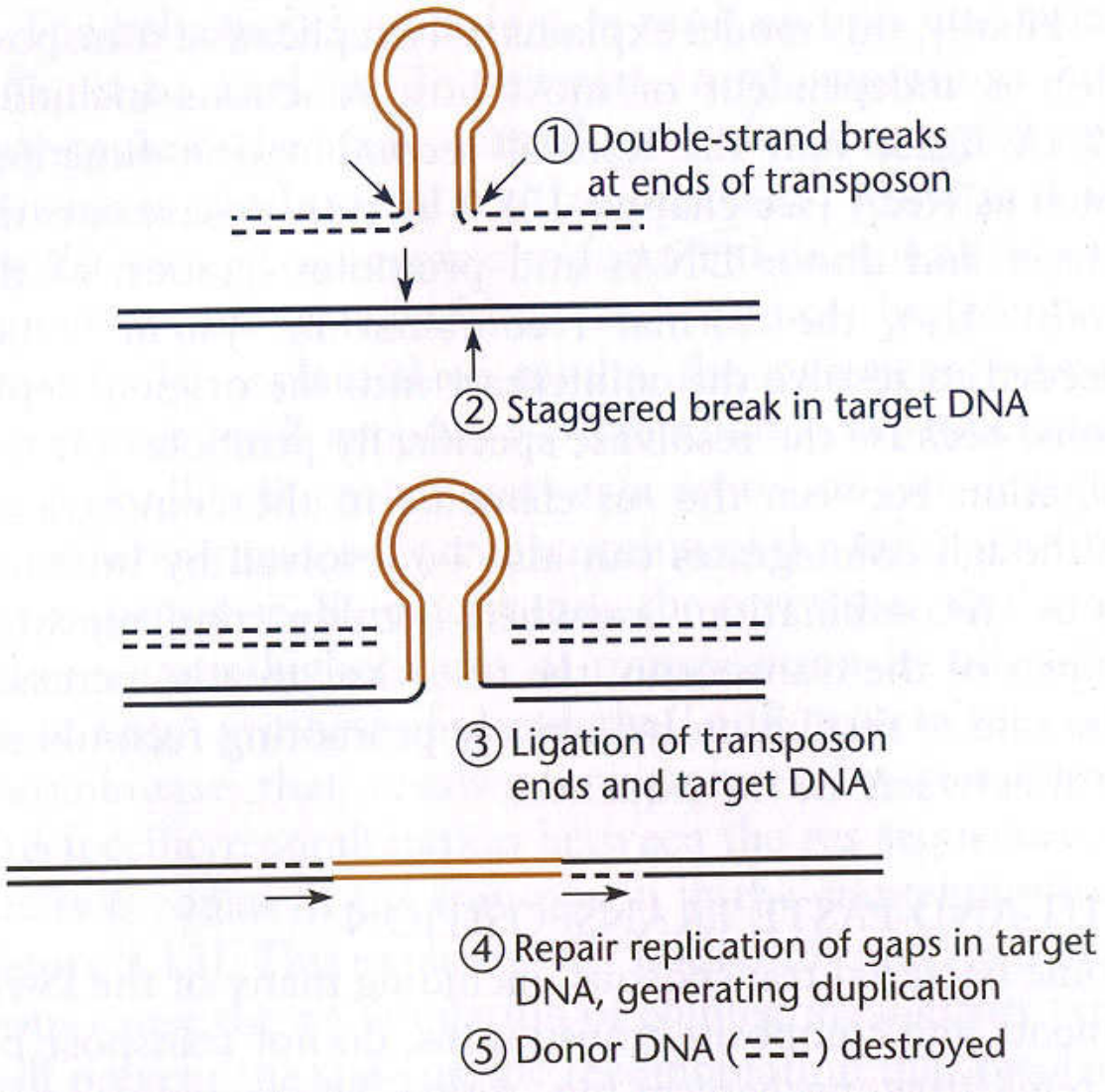
**Degradace
donorové molekuly**



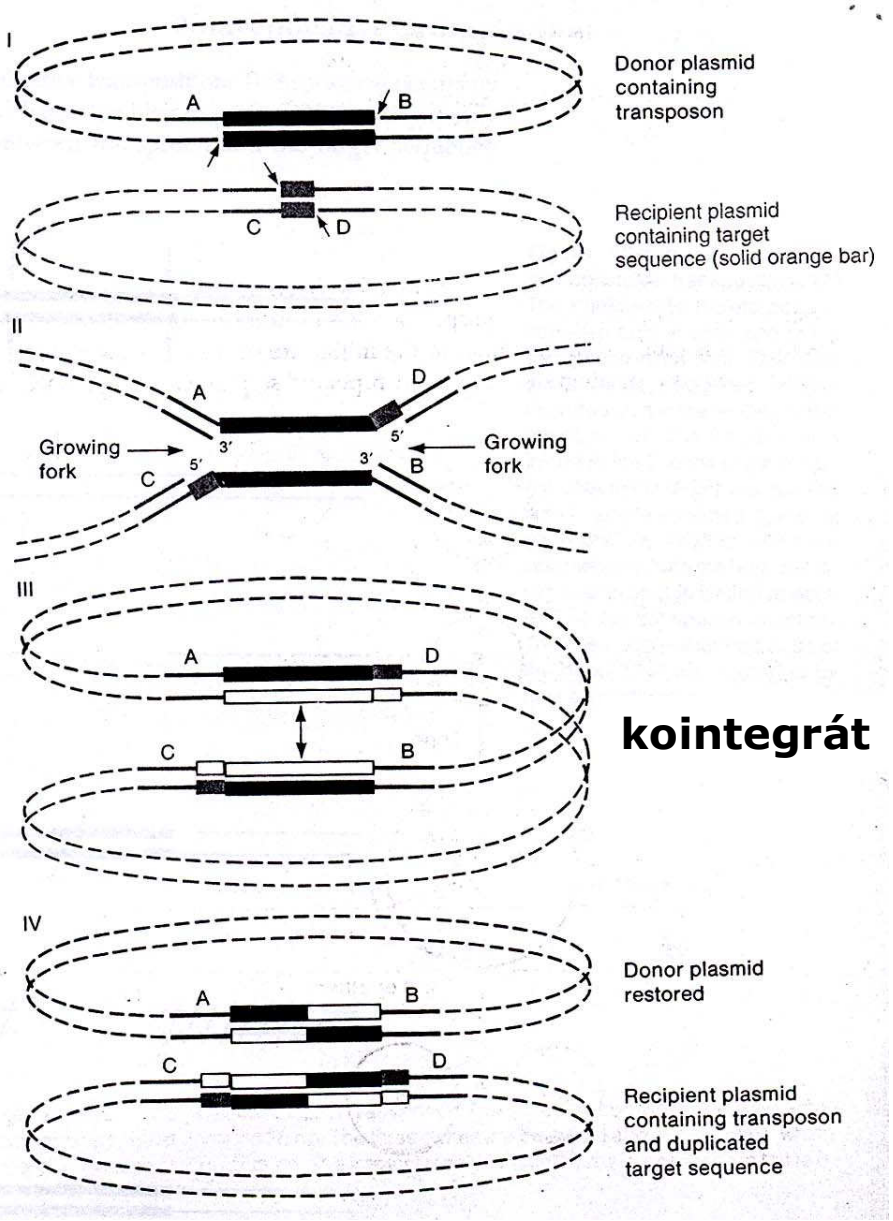
Mechanismus transpozice Tn5

Molekuly transponázy se vážou na konce transpozonu, pak se tyto molekuly spojí za vzniku synapse. Proběhnou zlomy a znovuspojení, čímž se transpozon vyčlení z donorové DNA a na jeho koncích se vytvoří vlásenky. Tyto vlásenky se pak zlomí a konce transpozonu se spojí s řetězci v cílové DNA, v nichž transponáza vytvořila posunuté zlomy (9 bp). Proběhne reparace mezer doreplikováním chybějících úseků, čímž se vytvoří duplikace (přímá opakování) v místě začlenění transpozonu.

Průběh konzervativní transpozice



MODEL REPLIKATIVNÍ TRANSPOZICE



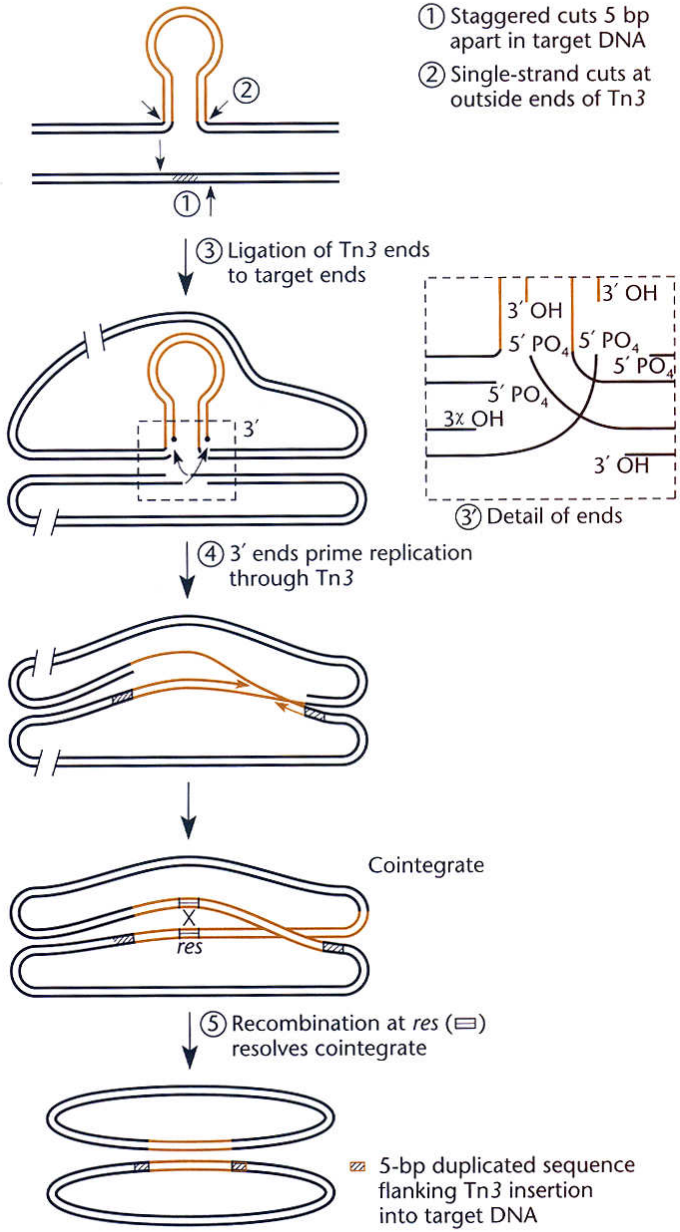
1. **Vytvoření jednořetězcových zlomů v donorové a cílové DNA transponázou, spojení volných konců**
2. **Replikace transpozonu**
3. **Vznik kointegrátu**

4. **Rozklad kointegrátu:**

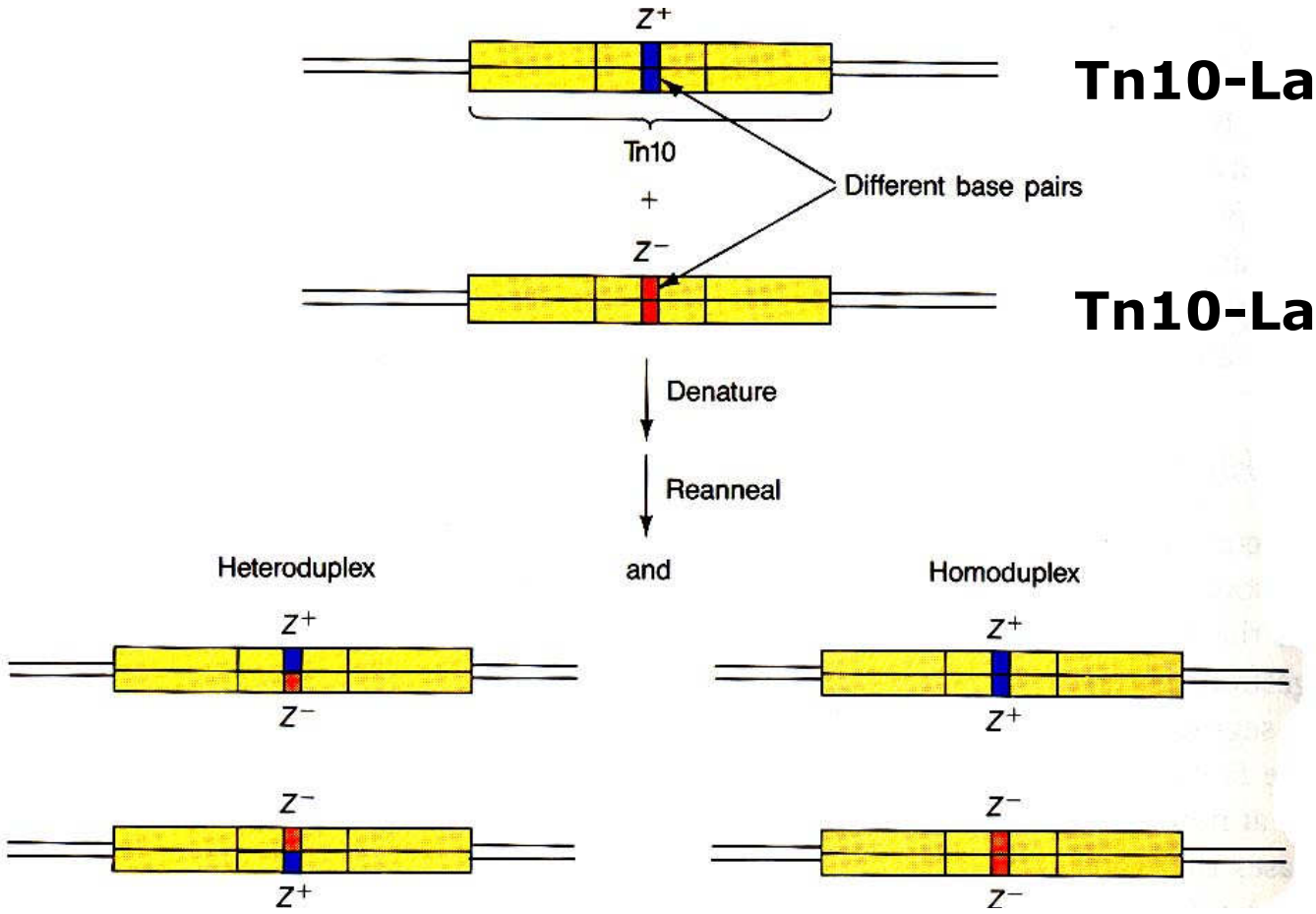
a) homologní rekombinací v recA+

b) místně specifickou rekombinací působením resolvázy

Replikativní transpozice Tn3



DŮKAZ KONZERVATIVNÍ TRANSPOZICE Tn10



Vytváření směsi heteroduplexů a homoduplexů z transpozonů Tn10, které nesou alely genu lacZ lišící se toliko 3 bázemi. Tn10 je přítomen v transdukujících fágách lambda.

Donor (fág)

Cílová molekula

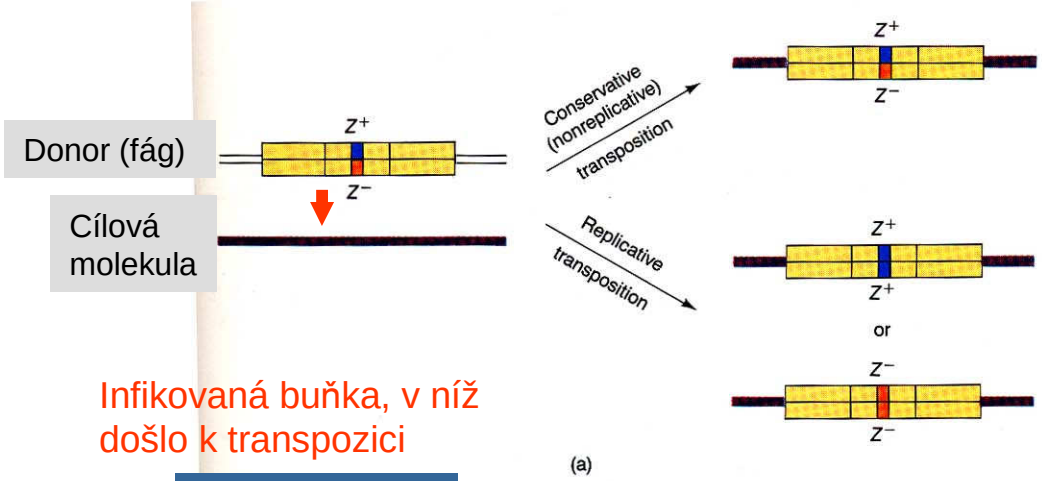
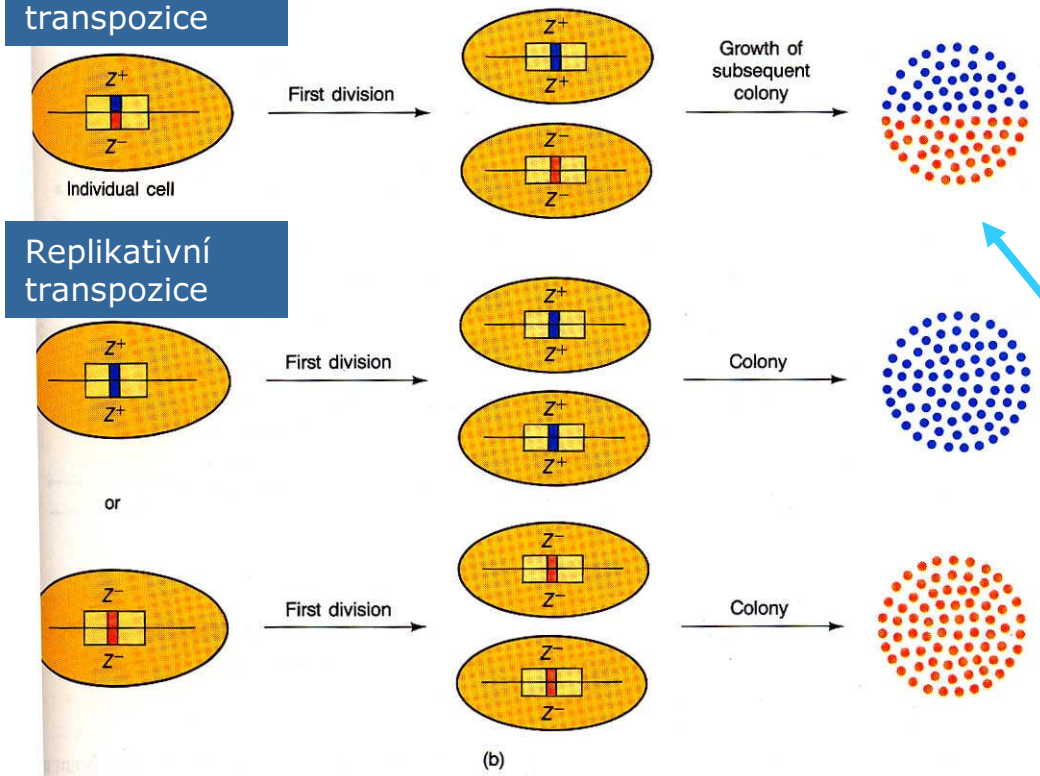


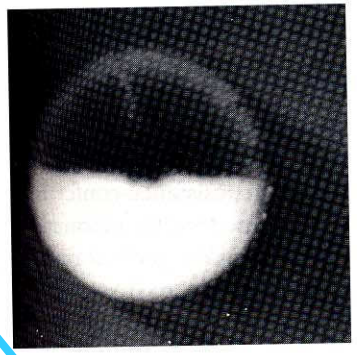
Figure 21-20 Consequences of conservative and replicative transposition. (a) The heteroduplex of homoduplex nature of DNA (see Figure 21-19) is transposed into a target gene. If the starting DNA is heteroduplex, then the resulting DNA will still be heteroduplex only in a conservative, or nonreplicative, pathway. (b) Because the heteroduplex results in a transposed cell that maintains the heteroduplex nature of the DNA during conservative transposition, colonies will arise that are part Z^+ and part Z^-. However, in a replicative pathway, transposition results in individual cells that are either all Z^+ or all Z^-, and all the colonies will either be Z^+ or Z^-.

Infikovaná buňka, v níž došlo k transpozici

Konzervativní transpozice

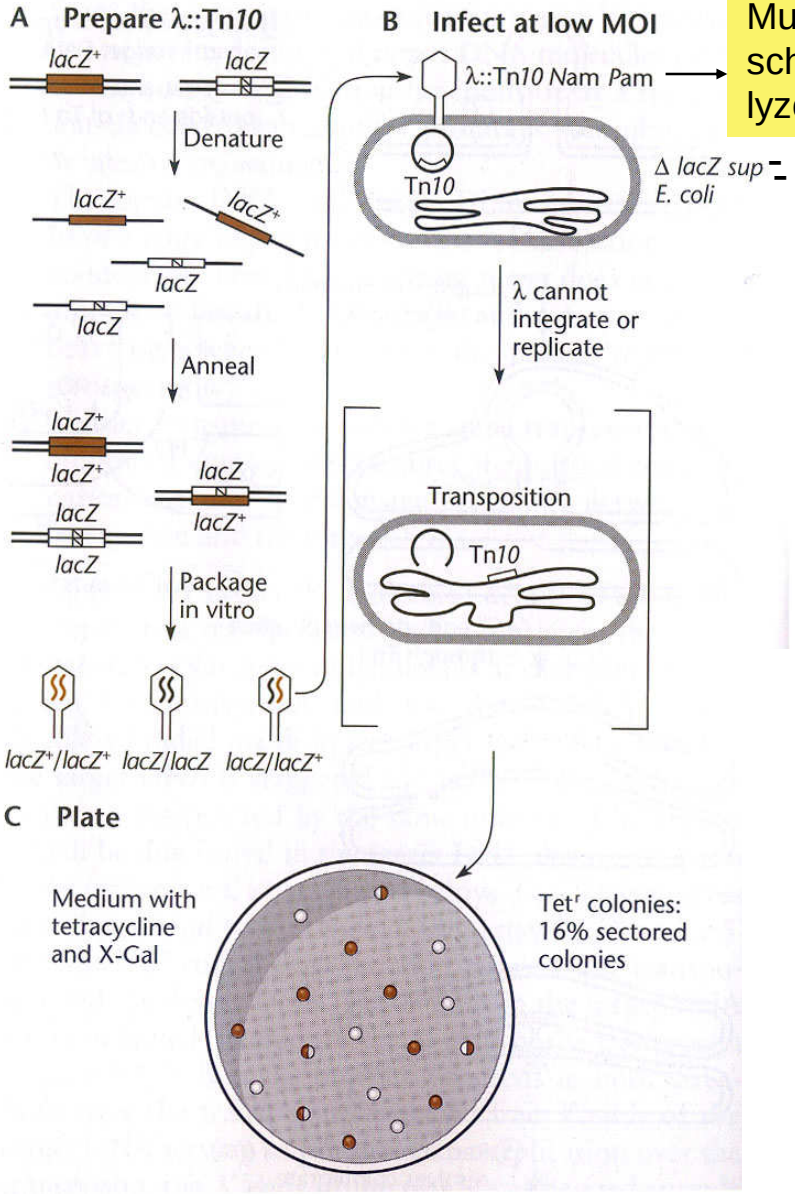
Replikativní transpozice





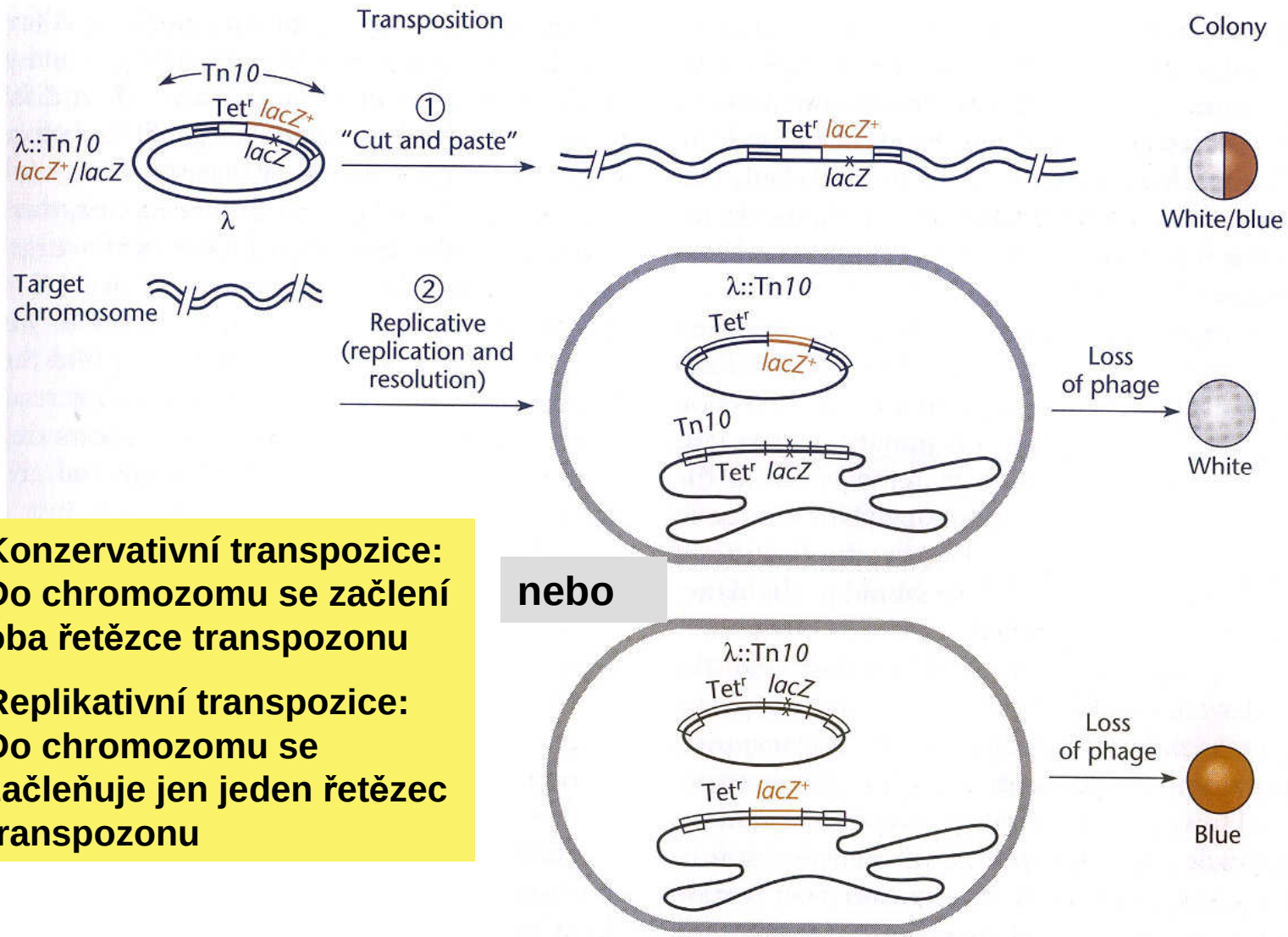
Většina případů

Důkaz konzervativní transpozice



Mutace *N*am a *P*am – fág není schopen se replikovat ani lyzogenizovat v kmeni sup-

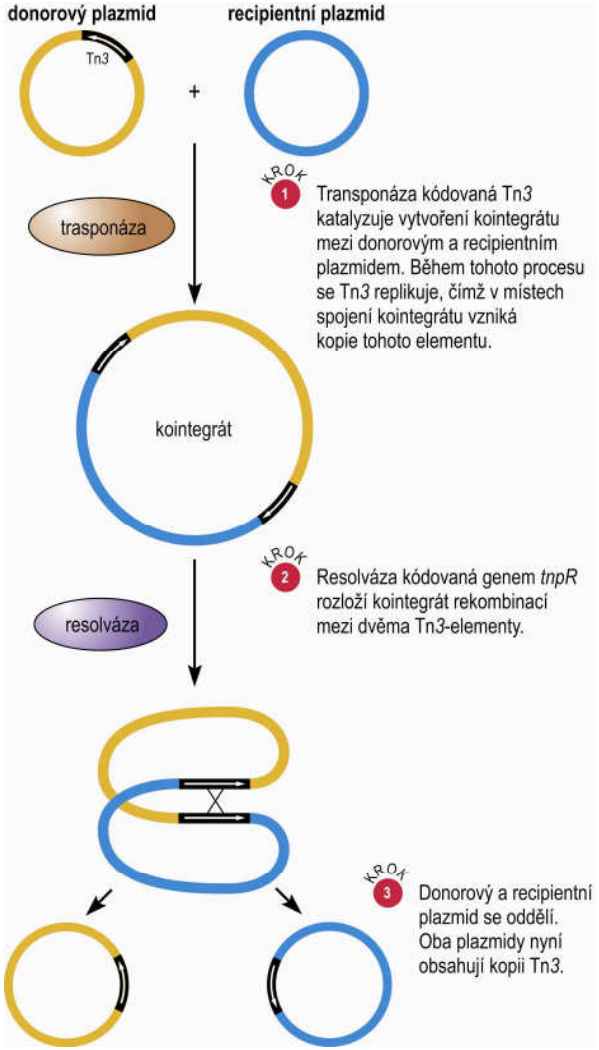
Výsledky konzervativní a replikativní transpozice transpozonu Tn10



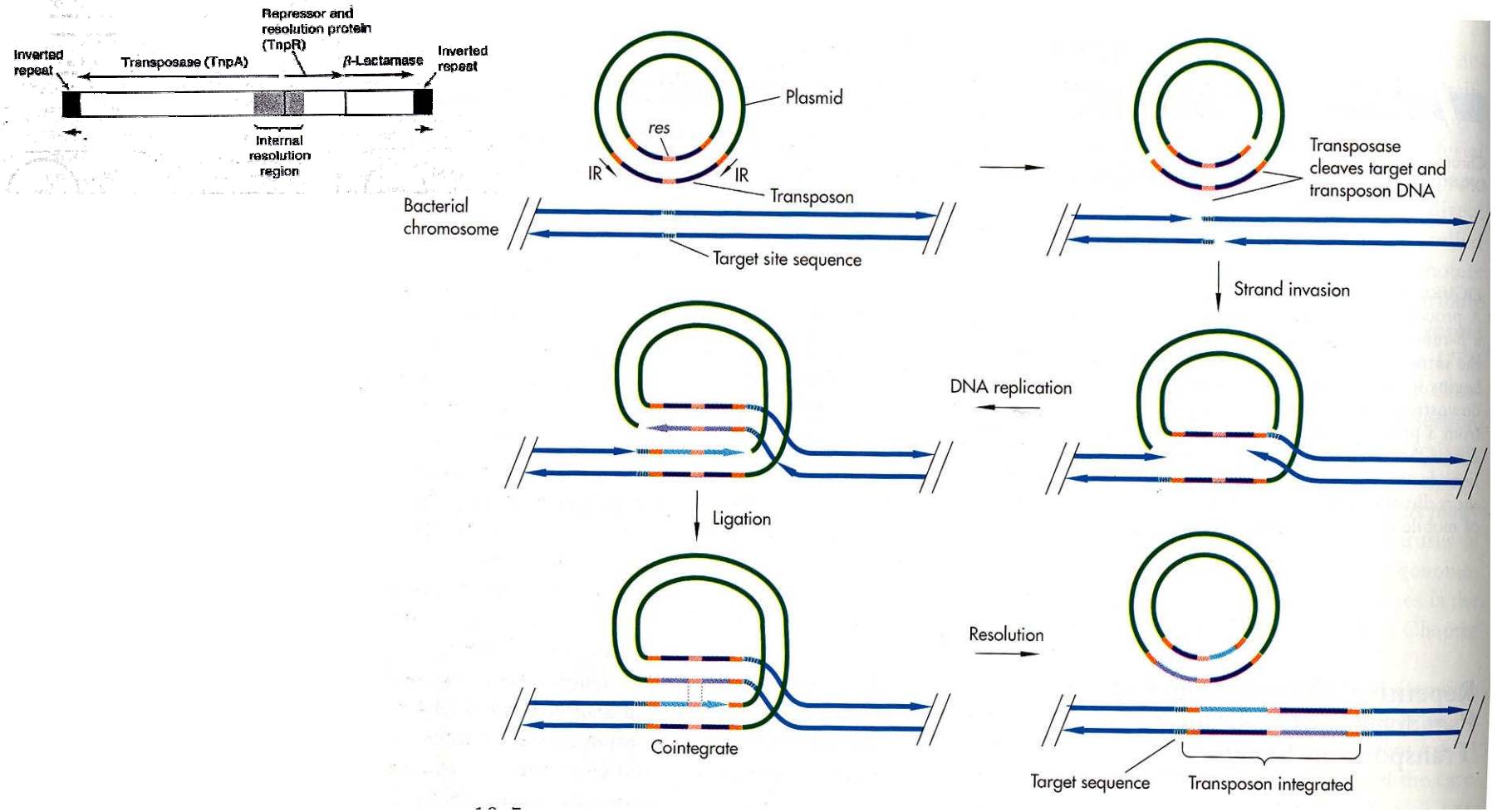
1. **Konzervativní transpozice: Do chromozomu se začlení oba řetězce transpozonu**
2. **Replikativní transpozice: Do chromozomu se začleňuje jen jeden řetězec transpozonu**

MODEL TRANSPOZICE PROSTŘEDNICTVÍM TVORBY KOINTEGRÁTU

(meziprodukt replikativní transpozice Tn3)

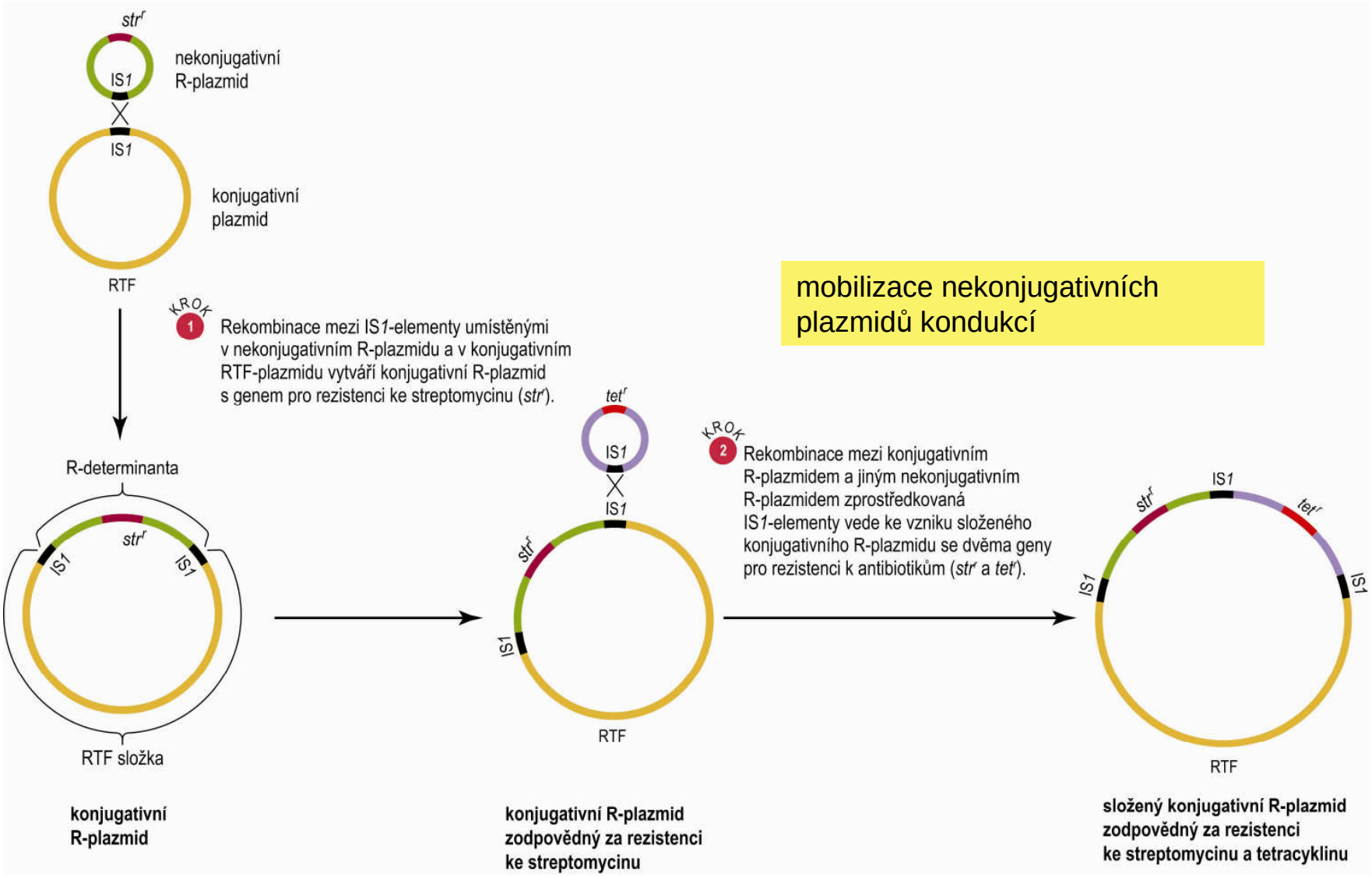


MECHANISMUS REPLIKATIVNÍ TRANSPOZICE



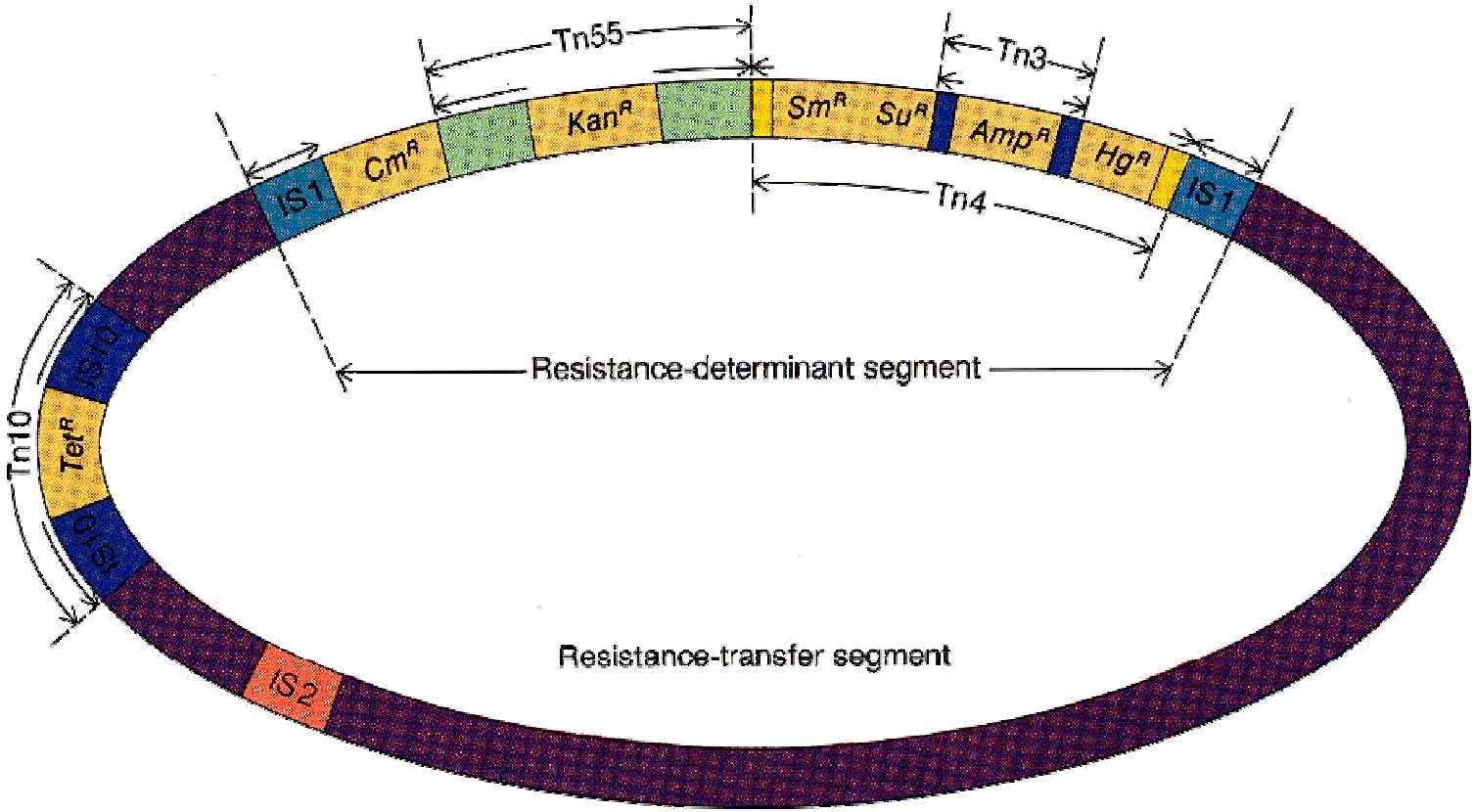
Rozklad kointegrátu zprostředkovaný místně-specifickým enzymem kódovaným transpozonem (resolváza u Tn3) nebo rekombinačním aparátem hostitelské buňky (RecA)

Evoluce konjugativních plazmidů obsahujících geny pro rezistenci k antibiotikům

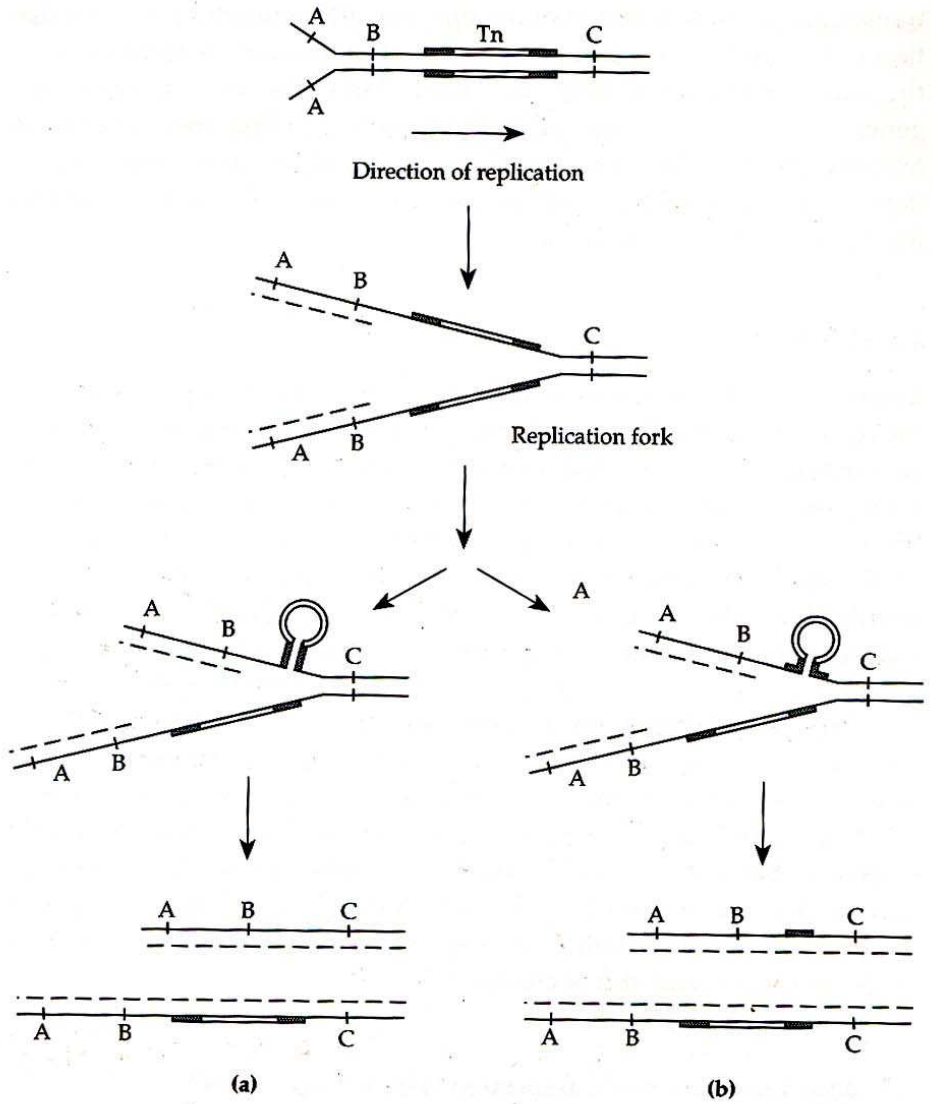


ÚLOHA TRANSPOZONŮ PŘI EVOLUCI R-PLAZMIDŮ

každý transpozon může být přenášen nezávisle



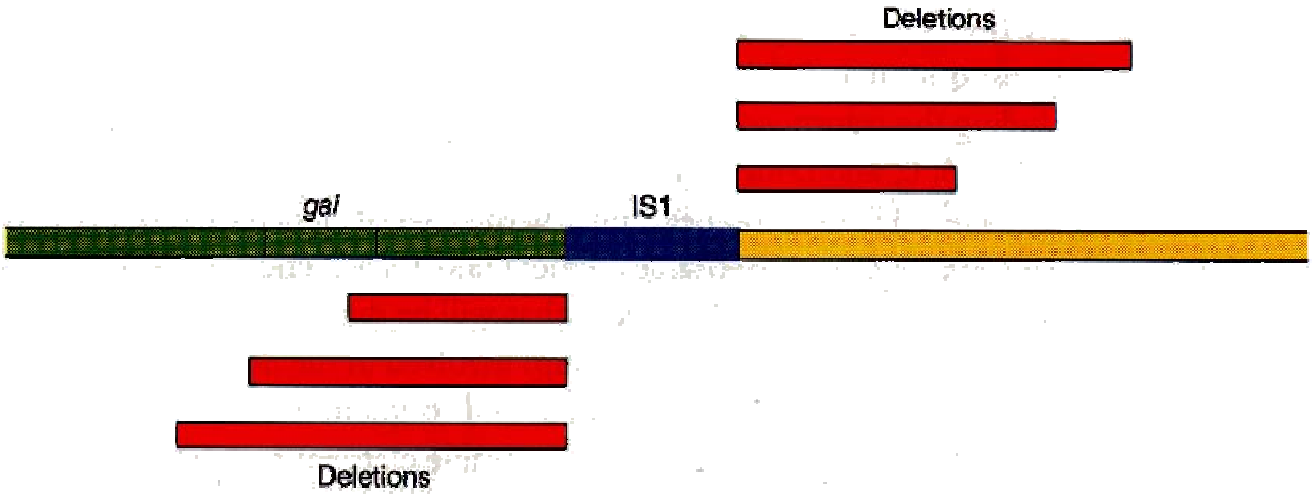
přesná excize – úplná ztráta transpozonu



nepřesná excize – ztráta části transpozonu

Fig. 5.5 Excision of a transposable element during replication of host DNA. Excision takes place by formation of a stem-and-loop structure, during the transient single-strand form of the DNA at the replication fork. Excision is shown in one strand only (although it may occur in both strands), involving the whole element (precise excision, a) or part of it (imperfect excision, b).

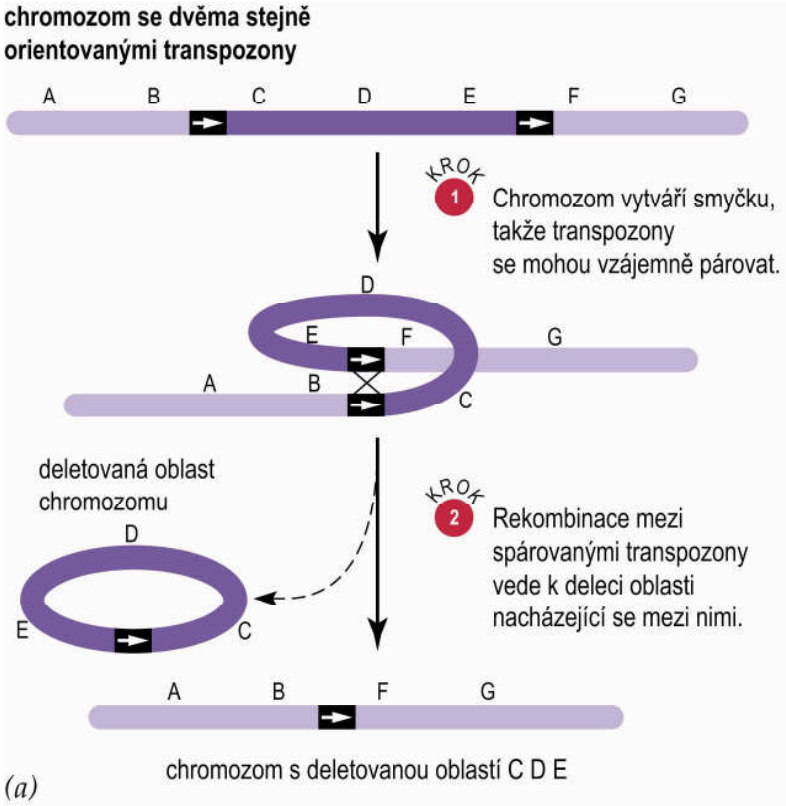
DELECE POZOROVANÉ V MÍSTĚ ZAČLENĚNÍ IS1 V LOKUSU GAL *E. coli*

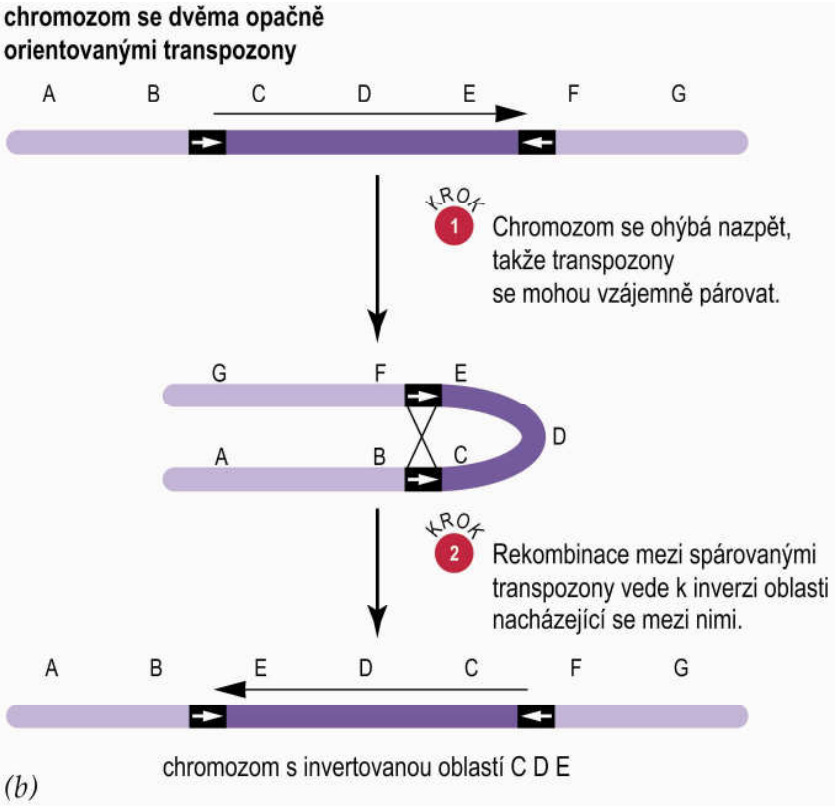


Chromozomová přeskupení navozená transpozony

a. Vznik delece intrachromozomovou rekombinací mezi dvěma stejně orientovanými transpozony

b. Vznik inverze intrachromozomovou rekombinací mezi dvěma opačně orientovanými transpozony





VZNIK DELECÍ A INVERZÍ PO TRANSPOZICI

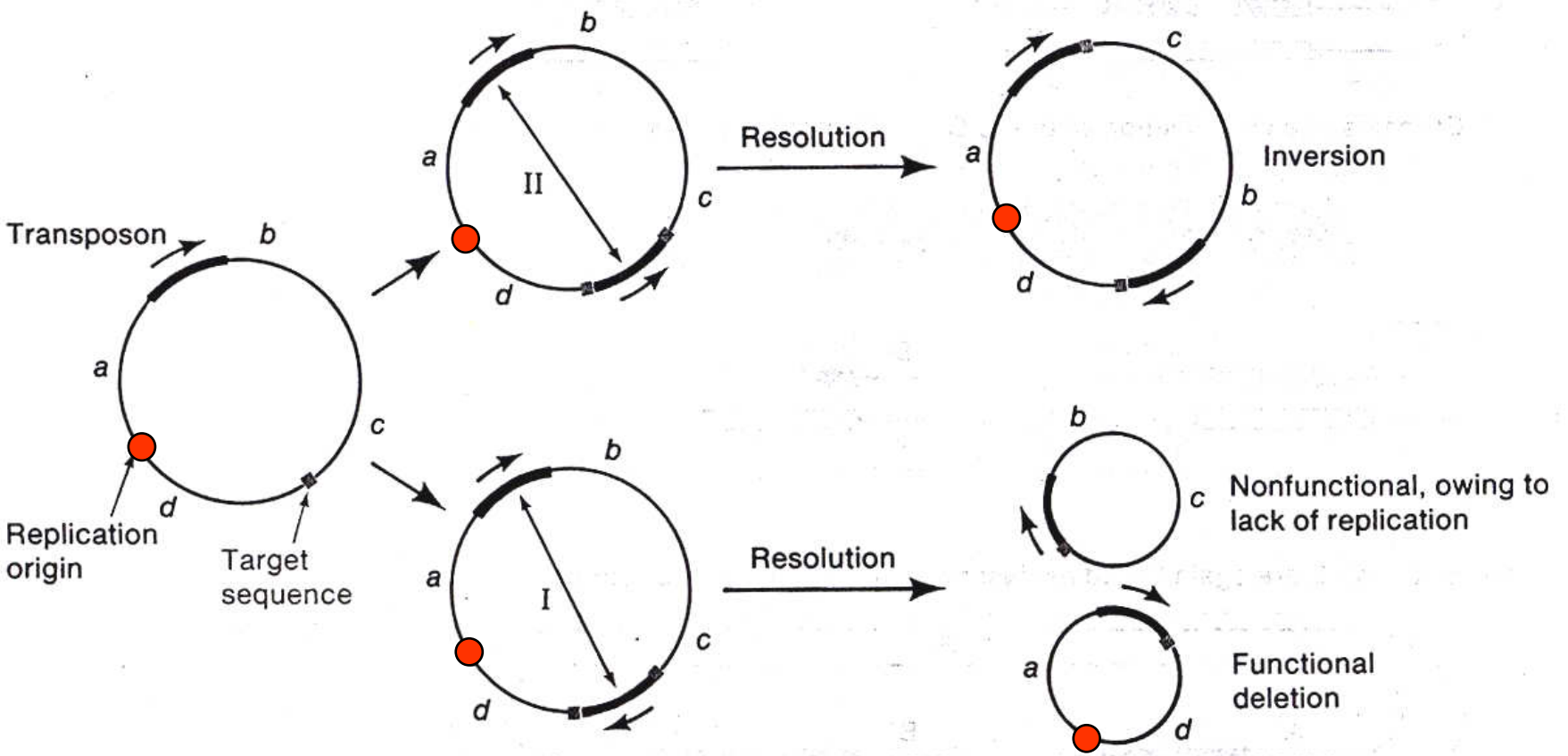


Figure 12-17. Model for production of genetic deletions and inversions. The transposon DNA is inserted into the target sequence in orientation I or II. The circle could be a plasmid or the chromosome. Resolution by a site-specific strand exchange at sites indicated by double-headed arrows or by exchange in homologous sequences yields a deletion from I and an inversion from II.

INVERZNÍ TRANSPOZICE

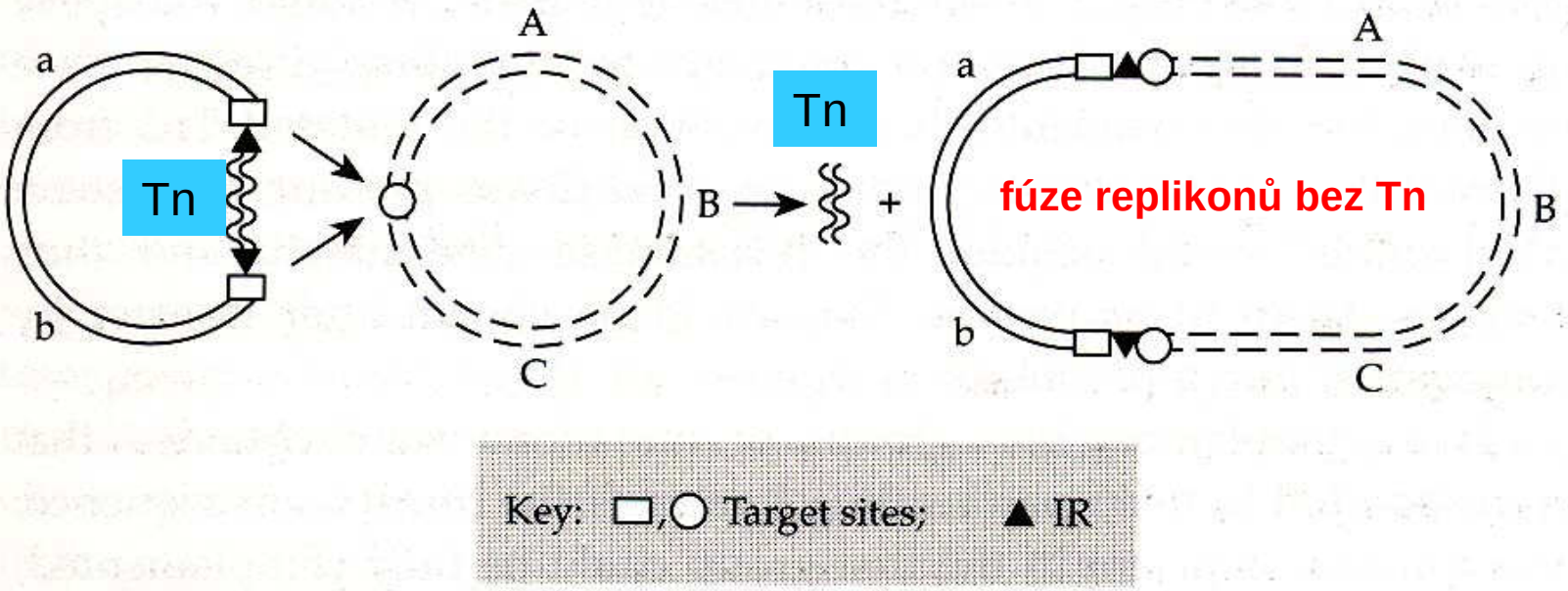
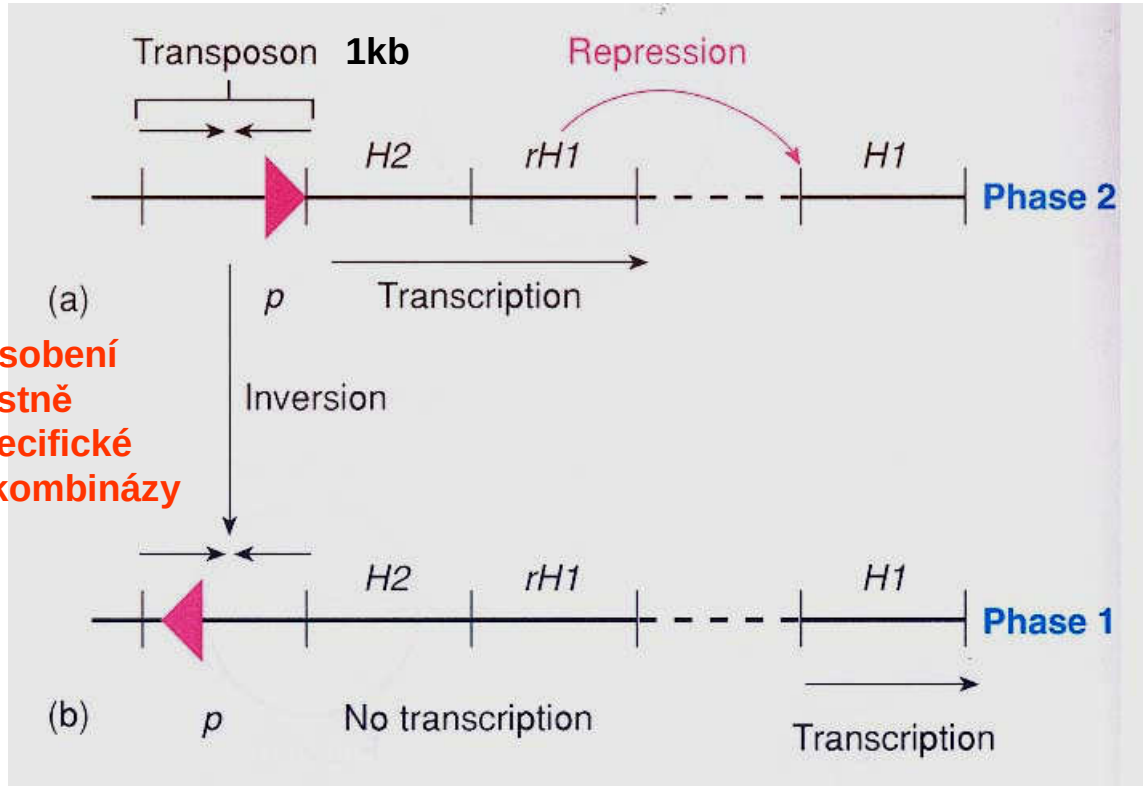


Fig. 5.8 Inverse transposition. The replicon carrying the mobile element is inserted into the second replicon instead of the mobile element.

Změna typu flagelinu jako důsledek změny orientace transpozonu u *Salmonella typhimurium (variace fází)*

Promotor *p* řídí expresi flagelinového genu *H2* a represoru *rH1*



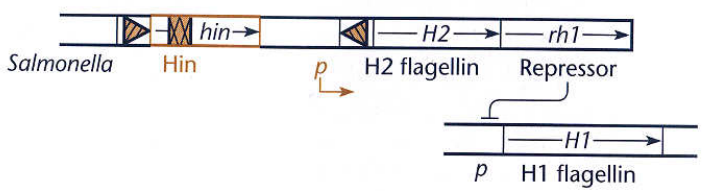
působení místně specifické rekombinázy

Z promotoru *p* je exprimován *H2* a *rH1*, je tvořen *H2*, exprese *H1* je potlačena

Není exprimován *H2* a *rH1*, exprese *H1* probíhá

Změna typu flagelinu jako důsledek změny orientace transpozonu u *Salmonella typhimurium (variace fází) - II*

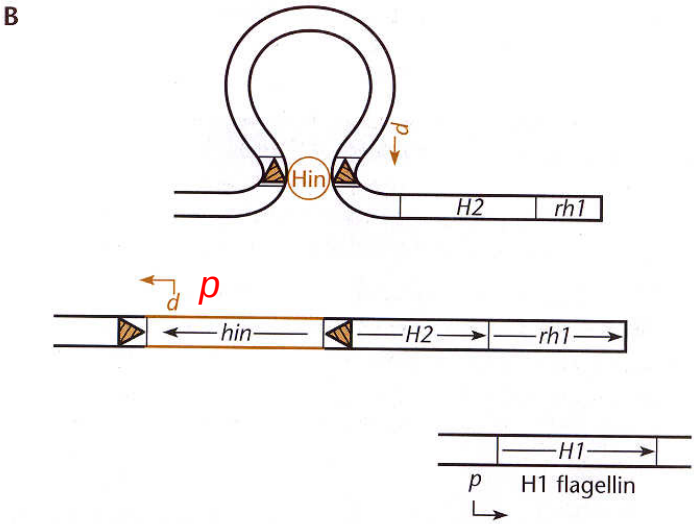
A



Z promotoru *p* je exprimován *H2* a *rH1*, je tvořen *H2*, exprese *H1* je potlačena

Inverze úseku obsahujícího promotor prostřednictvím Hin-invertázy

B



Není exprimován *H2* a *rH1*, exprese *H1* probíhá

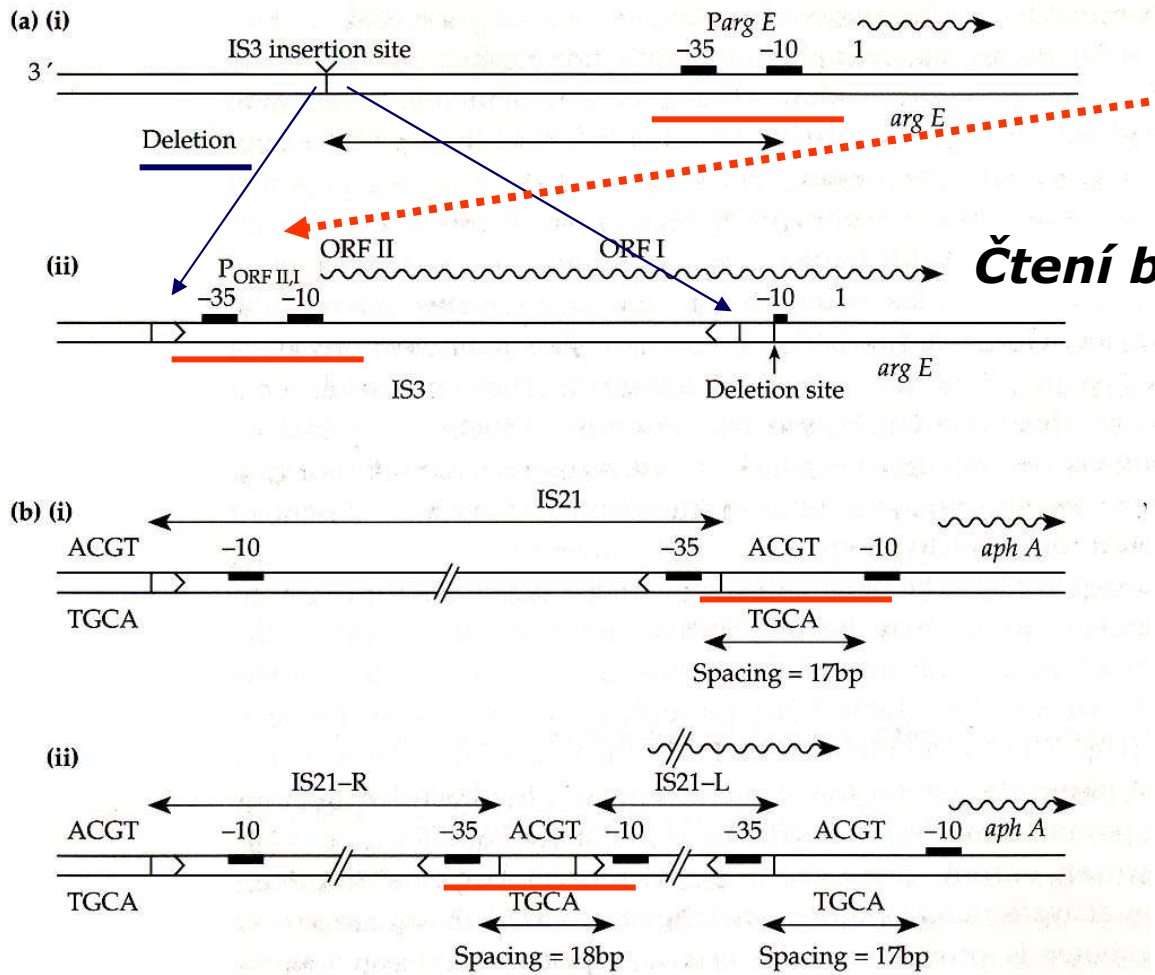


Fig. 5.4 Role of insertion sequences as mobile promoters. (a) IS3 as a mobile promoter for *argE* in *E. coli* (i). IS3 can insert upstream of *argE*. A deletion, as indicated, removes the -35 part of the *argE* promoter (ii). Transcription of *argE* is still performed, but starts from a promoter site inside IS3. (b) IS21 as a mobile -35 promoter region. (i) Insertion of one copy of IS21 in plasmid RP4. Its -35 region can complete the -10 region of *aphA* (Km^r), allowing its transcription. (Standard spacing between the two regions for the *E. coli* σ factor of RNA polymerase: 16–18 base pairs). The IS21 is not transcribed. (ii) Two tandem direct copies of IS21 into plasmid R6845. Formation of a complete and functional promoter using the -35 region of IS21-R and the -10 region of IS21-L allows transcription of IS21. Transcription of *aphA* is still possible.

IS3 působí jako mobilní promotor

Čtení bez zastávky

Vznik kompletního promotoru kombinací promotorových sekvencí -35 a -10

Vznik funkčního promotoru inzercí dvou IS21 (R a L)

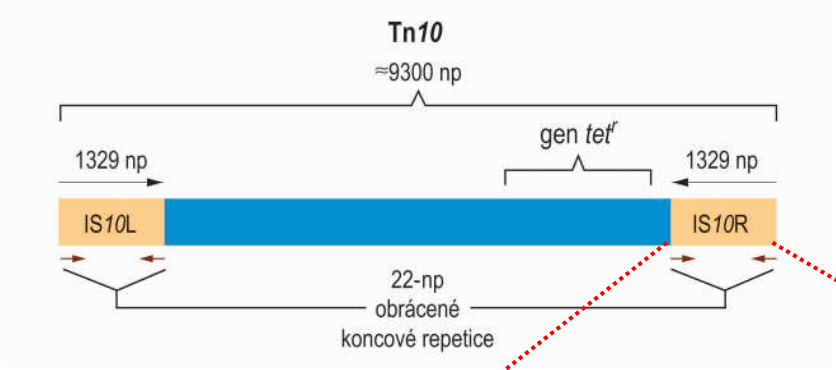
CHARAKTERISTICKÉ RYSY TRANSPOZICE

- frekvence transpozice 10^{-4} až 10^{-7}/cílový replikon
- specifita začlenění je pro různé elementy různá, liší se pro různé replikony (chromozom x plazmidy) – využití malých definovaných plazmidů
- mutace v genu pro transponázu ovlivňuje specifitu místa začlenění
- transpozice vyžaduje neporušenost koncových IR
- u Tn3 je známa imunita k transpozici podmíněná přítomností sekvencí IR

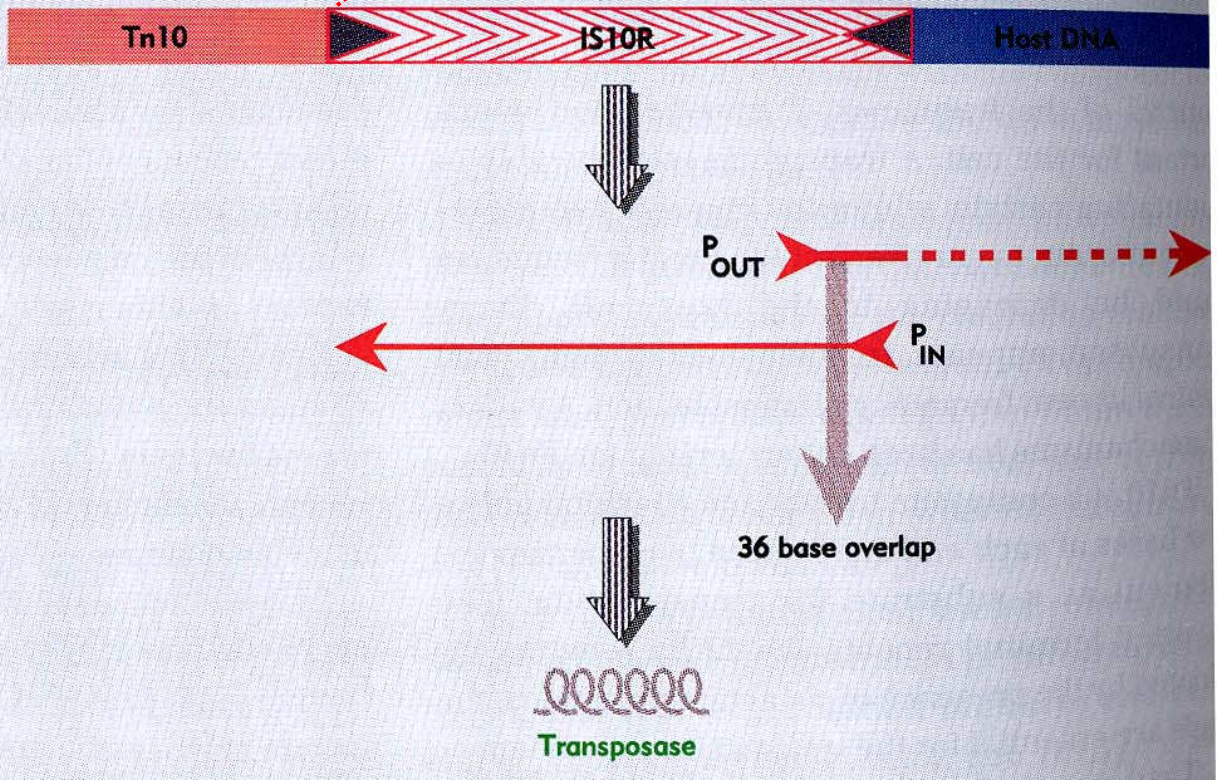
FREKVENCE TRANSPOZICE

- **transponáza je v buňkách přítomna ve velmi nízkých koncentracích (0,15 molekuly na buňku)**
- **aktivita transponázy se obtížně detekuje**
- **preference působení transponázy v *cis*: působí přednostně na DNA, z níž byla transkribována**
- **po uvolnění z DNA dochází k rychlému rozkladu transponázy**

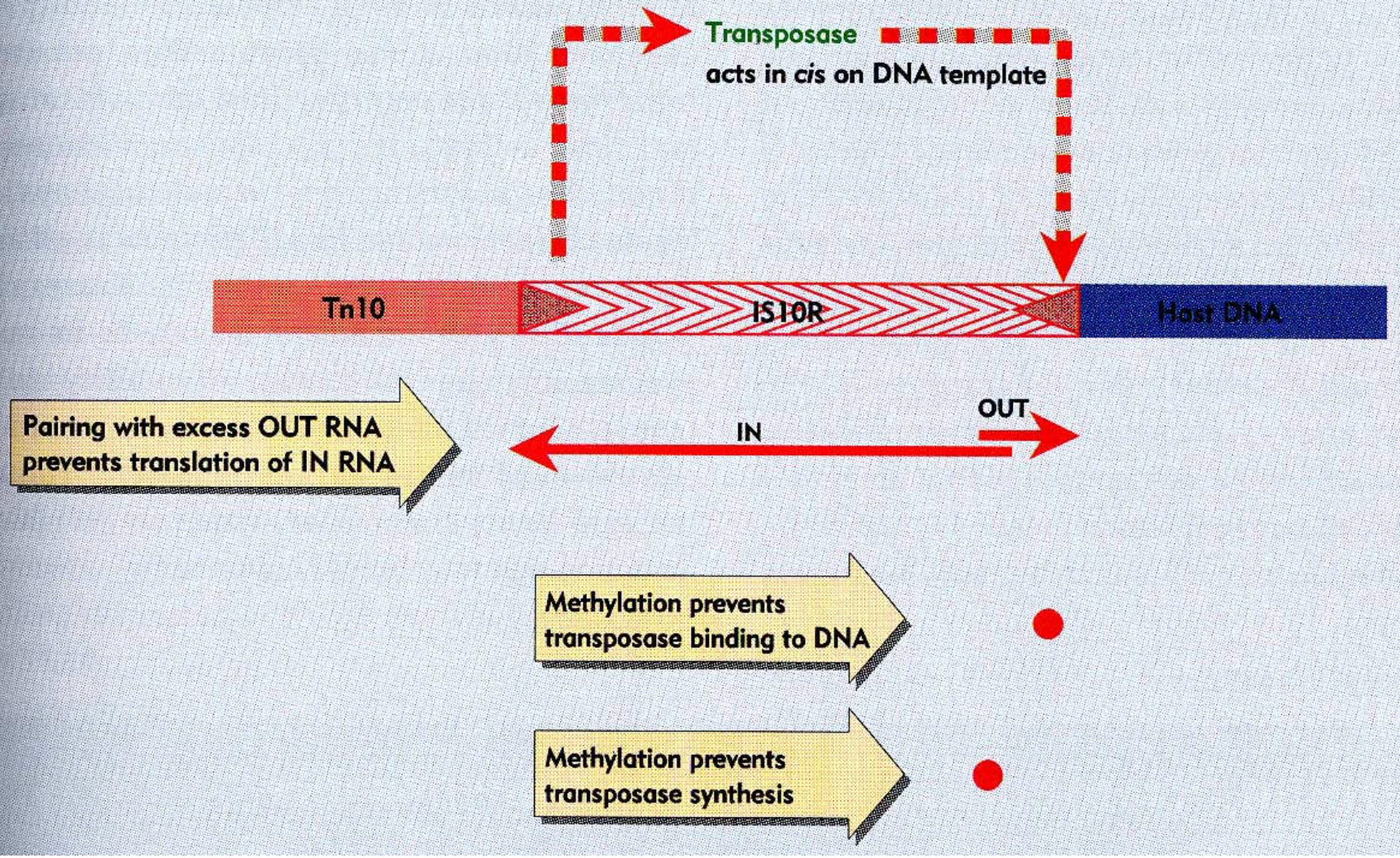
REGULACE TRANSPOZICE Tn10



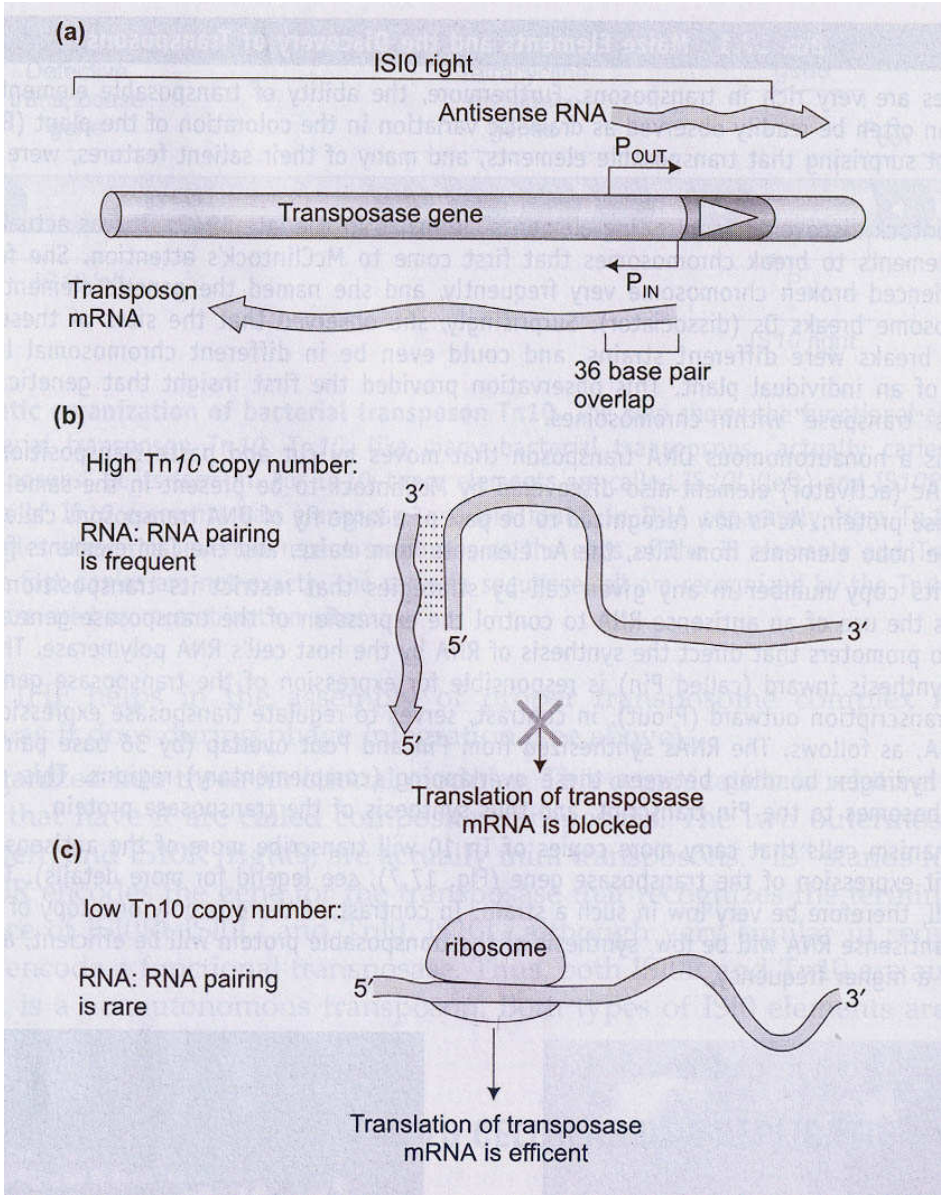
Two promoters in opposite orientation lie near the outside boundary of IS10R. The strong promoter P_{OUT} sponsors transcription that may continue into the flanking host DNA. The weaker promoter P_{IN} starts transcription of an RNA with a coding region that extends the length of IS10R and represents a 47,000 dalton protein. The "OUT" and "IN" transcripts have a 40-base overlap.



Several mechanisms restrain the frequency of Tn10 transposition, by affecting either the synthesis or function of transposase protein. Transposition of an individual transposon is restricted by methylation to occur only after replication. In multicopy situations, *cis*-preference restricts the choice of target, and OUT/IN RNA pairing inhibits synthesis of transposase.



Regulace transpozice Tn10 prostřednictvím antisense RNA



Pin řídí transkripci transponázového genu,

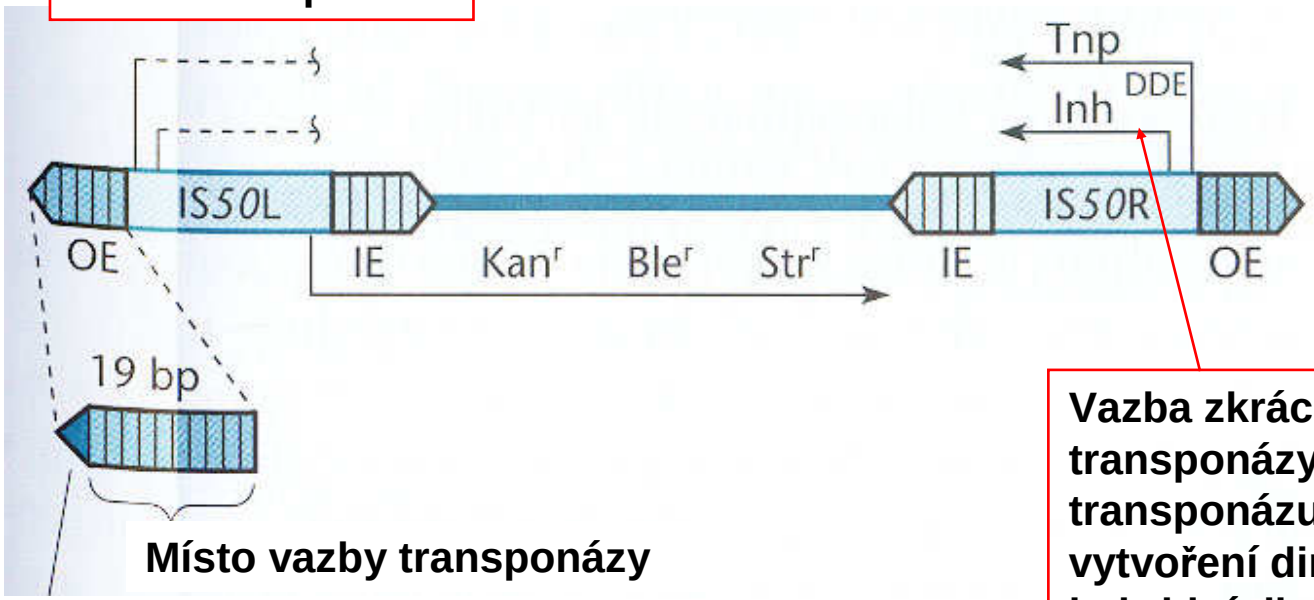
Pout řídí transkripci antisense RNA, která je stabilnější než mRNA

Při vysokém počtu kopií Tn10 je párování antisenseRNA a mRNA častější, k transpozici nedochází

Při nízkém počtu kopií Tn10 dochází k párování antisenseRNA s mRNA jen vzácně a transpozice probíhá

Regulace transpozice Tn5

Defektní Tnp a Inh



Místo vazby transponázy

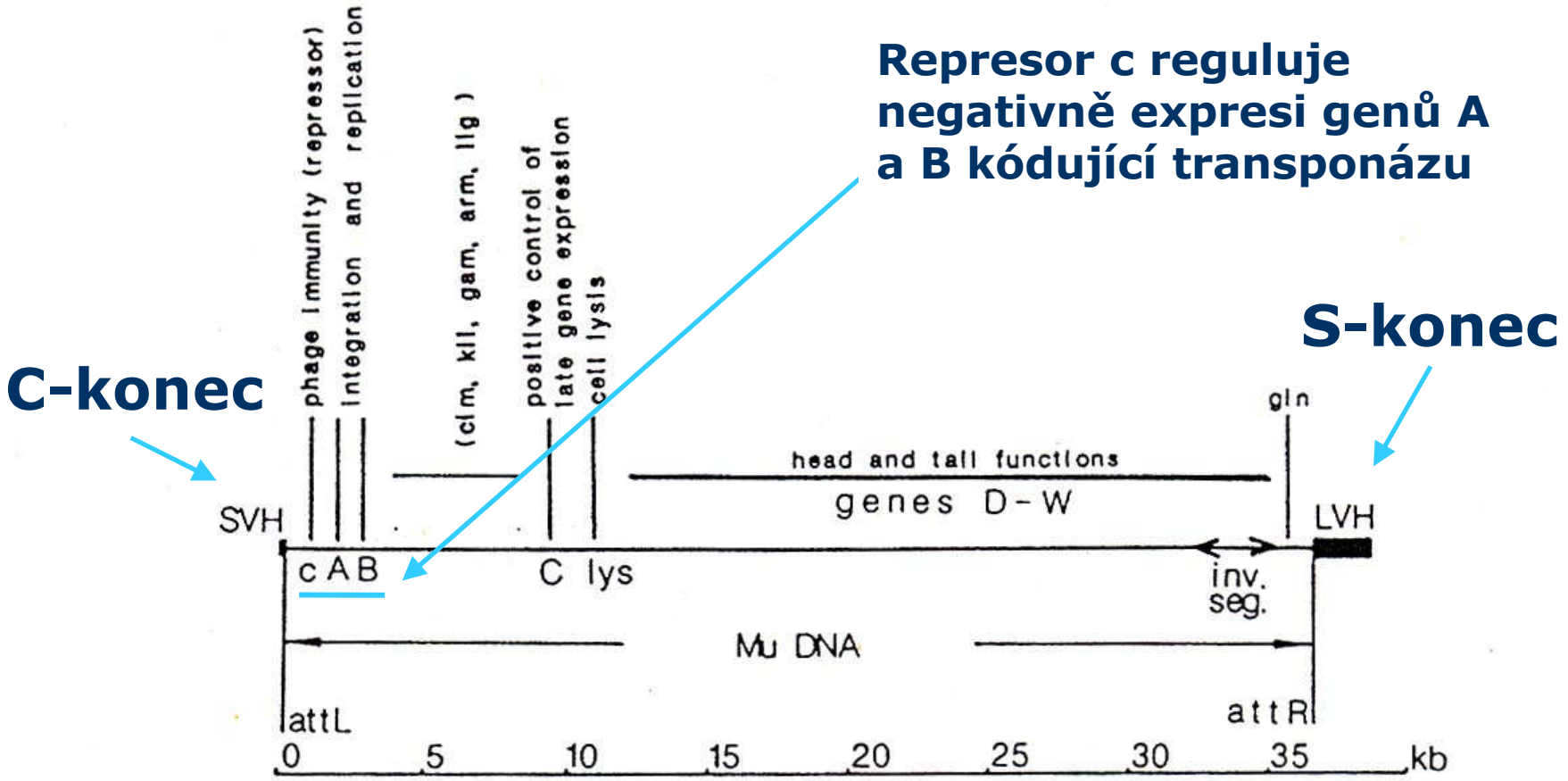
Koncová sekvence (TIP)

Vazba zkrácené verze transponázy (Inh) na transponázu vede k vytvoření dimeru. Tento hybridní dimer je anaktivní.

IE = inside end; OE = outer end

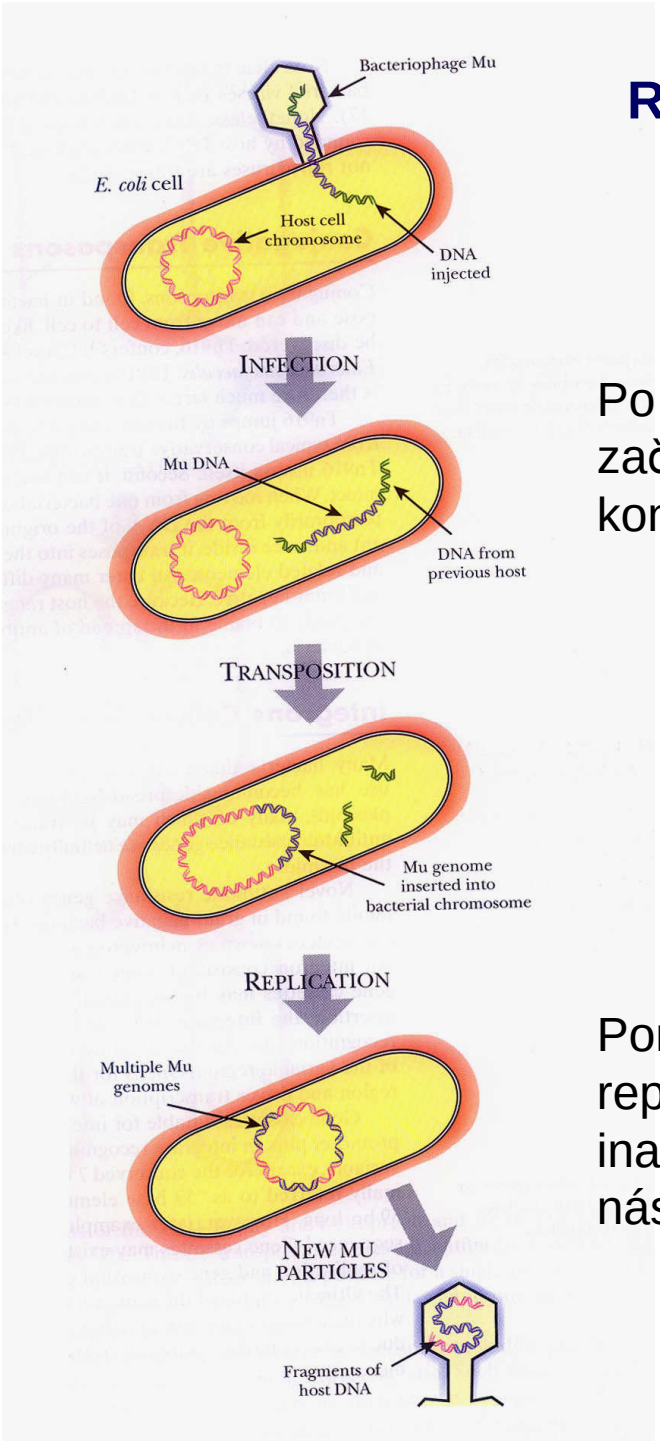
Tnp = transponáza; Inh = inhibitor transponázy

GENOM BAKTERIOFÁGA Mu (dsDNA, 37 kb)



A protein se váže ke koncům genomu Mu, což stimuluje B protein. Vazba probíhá na 22 bp sekvencích. Vzniklý komplex = transpososom. Na 3´koncích vznikají zlomy, stejně je zlomena DNA v hostitelském chromozomu.

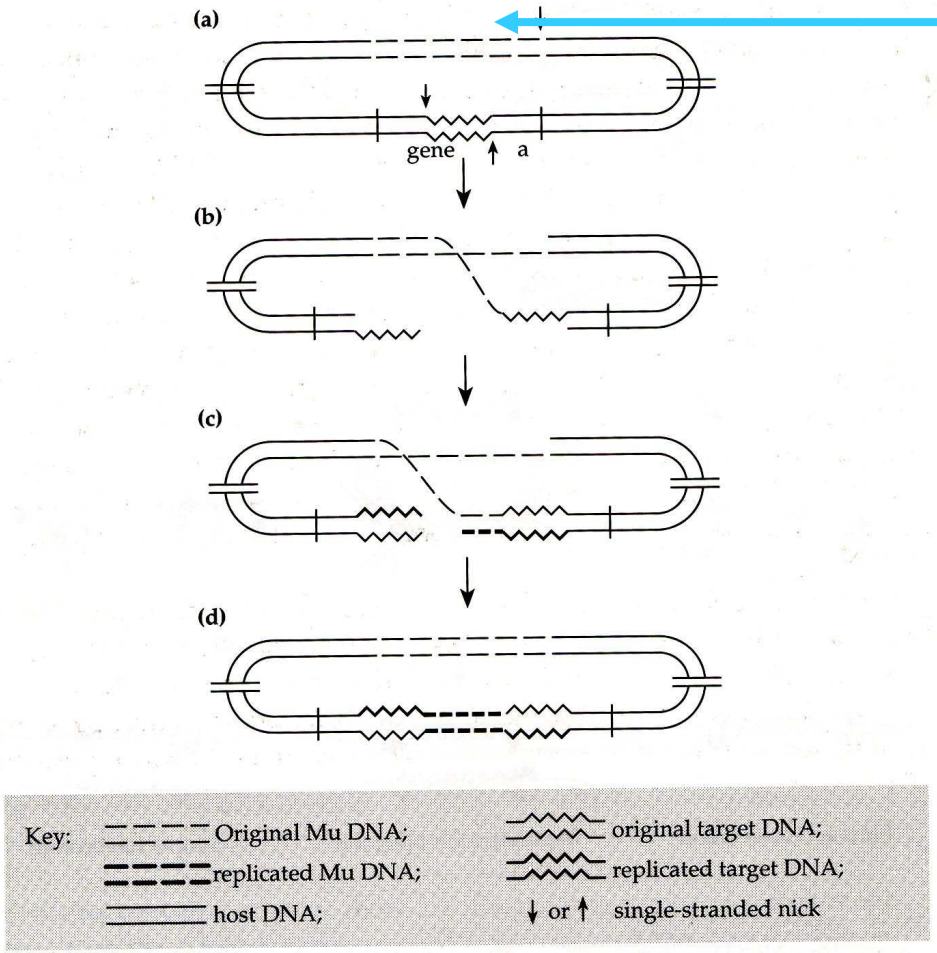
Reprodukční cyklus fága Mu



Po infekci bakteriální buňky se DNA fága MU začleňuje náhodně do chromozomu konzervativní transpozicí

Pomnožování fágových genomů probíhá replikativní transpozicí, čímž dochází k inaktivaci genů hostitelské buňky, která následně umírá

Replikace fága Mu a jeho mutagenní působení



a) vznik ss zlomů na koncích profága Mu a v cílovém místě
b) volný konec profága Mu se spojí s řetězcem cílového místa
c) doplnění jednořetězců replikací
d) spojení jednořetězcových zlomů vede k duplikaci Mu

Po infekci buněk se fág začlení do genomu zřejmě konzervativní transpozicí,

během lytického cyklu se množí replikativní transpozicí.

V obou případech jsou místa začleňování profága zcela náhodná

Konjugativní transpozony

Konjugativní transpozony (CTn) = **integrované elementy (18-500 kbp), které se samy vyčleňují z chromozomu donora, samy se přenášejí konjugací do recipienta a tam se začleňují do chromozomu**

Mobilizovatelné transpozony (MTn) = **menší integrované transpozony (do 15 kbp), které se vyčleňují a přenášejí za účasti konjugativních transpozonů**

Současná terminologie

Ctn : Conjugative transposon

MTn: pro mobilizovatelné transpozony, dříve Nbu (non-replicating Bacteroides units)

ICE – integrative and conjugal elements – pro integrující se elementy

SXT – site-specific integrating elements

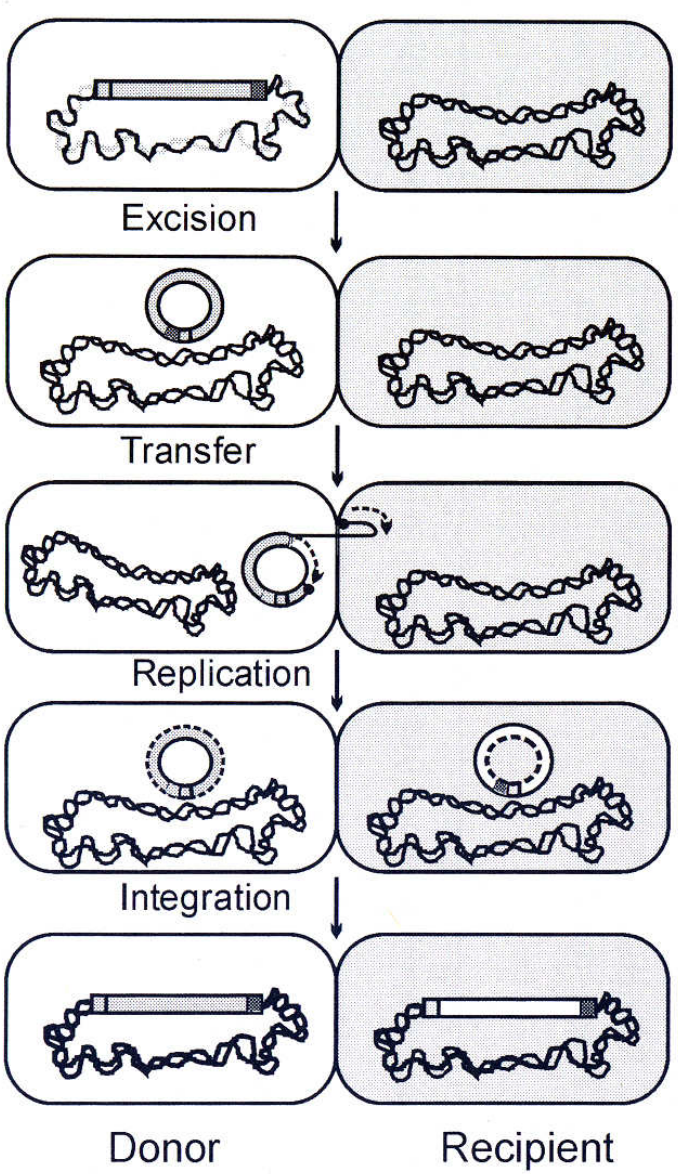
CTn – nesou geny kódující:

1. **integrázu a excisionázu (protein pro excizi),**
2. **proteiny vytvářející přenosový aparát jímž se pohybuje DNA z buňky do buňky**
3. **mobilizační proteiny, které vytvářejí jednořetězcové zlomy v oriT (geny tra jsou podobné genům plazmidu RP4 nebo F)**
4. **další produkty, zodpovídající za jiné znaky (např. rezistence k antibiotikům)**

TABLE 1 Examples of conjugative and mobilizable transposon families[a]

Element	Size (kb)	First identified in	Marker genes	Integration (*tyr/ser-int*) -excision (xis)[b]	Target site(s) (coupling seqs)[c]	Reference(s)
			Conjugative transposons (CTns)			
CTnDOT	65.0	*Bacteroides thetaiotaomicron*	*tetQ*, *ermF*	*tyr-int*; *xis* and additional CTn gene products; tetracycline induced excision and transfer	GTAnnTTTGC (5 bp)	Cheng et al., 2001; Whittle et al., 2002
Tn*916*	18.3	*Enterococcus faecalis*	*tetM*	*tyr-int* family; *xis*; tetracycline induced promoters for transfer genes	AT-rich sites (6 bp)	Clewell et al., 1995
Tn*5252*	47	*Streptococcus pneumoniae*	*cat*, SOS operon	*tyr-int*; *xis*	72-bp sequence in element end and in primary target site; secondary sites in some hosts missing primary sequence	Alarcon-Chaidez et al., 1997; Kilic et al., 1994
CTn*5397*	20.658	*Clostridium difficile*	*tetM*	*ser-tndX*, for integration and excission; Tra products ~Tn*916*.	-GA-target (2 bp -GA-)	Roberts et al., 2001; Wang et al., 2000a
CTn*5276*	70	*Lactococcus lactis*	*nisA* (nisin), *sacA* (sucrose-6-phosphate hydrolase)	*tyr-int*; *xis*	TTTTTG between ends and in primary target site	Rauch and de Vos, 1994
			Site-specific CTns			
CTn-ICE*St1*	34.734	*Streptococcus thermophilus* not shown to transfer yet	Type II restriction system ΦST84 resistance	*tyr-int*; *xis*	27-bp 3′ end of *fda* (fructose-1, 6-diphosphate aldolase)	Burrus et al., 2002b
SXT	99.483	*Vibrio cholerae*	*sul II*, *dhf18*, *strAB*	*tyr-int*; *xis*	17-bp 5′ end of *prfC*	Hochhut et al., 1997
CTnR391 (IncJ)	88.532	*Providencia rettgeri*	*mer* operon (Hg), *aph* (Km), *rumAB* (UV sensitivity)			Beaber et al., 2002

PRŮBĚH PŘENOSU KONJUGATIVNÍCH TRANSPOZONŮ

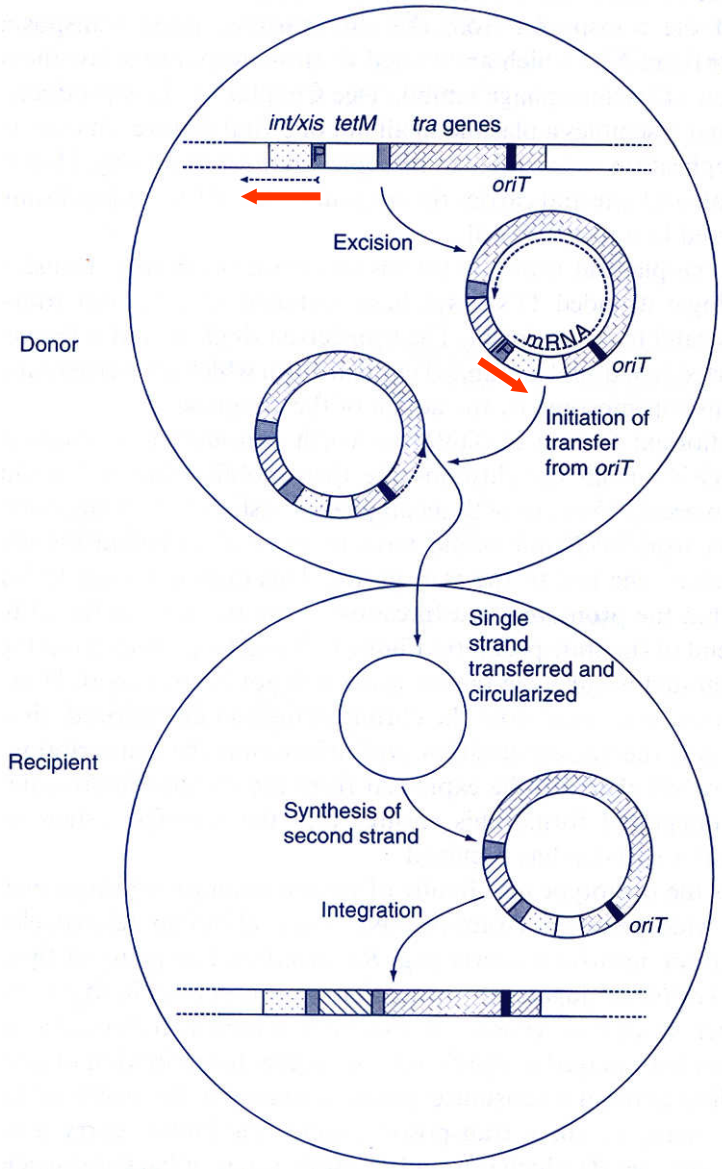


Transpozon začleněný do chromozomu se vyčlení a vytvoří kružnicový intermediát.

Do recipientní buňky se přenáší kopie jednoho z řetězců prostřednictvím multiproteinového párovacího aparátu spojujícího obě buňky.

Přenesená jednořetězcová kopie se změní na dvouřetězcovou formu, která se začlení do chromozomu recipientní buňky

Mechanismus přenosu konjugativního plazmidu Tn916



Transpozon je excidován z chromozomu pomocí enzymů Int a Xis a je cirkularizován.

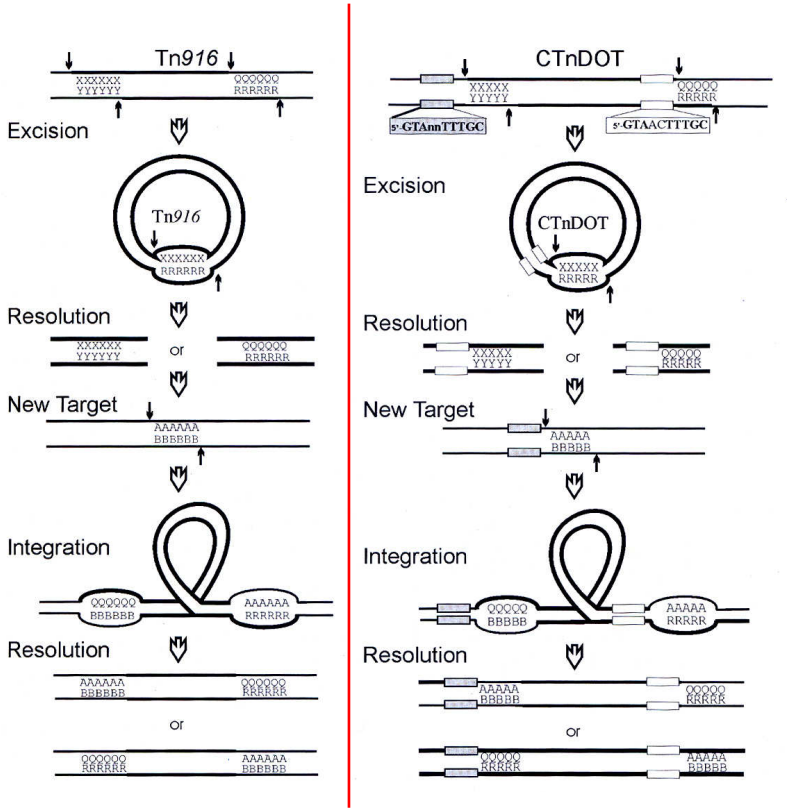
Cirkularizace umožní expresi genů tra z promotoru P ←

Z místa oriT je zahájen přenos DNA ve formě jednořetězce.

V recipientu se přenesená DNA cirkularizuje, doplní se druhý řetězec a transpozon se integruje do chromozomu.

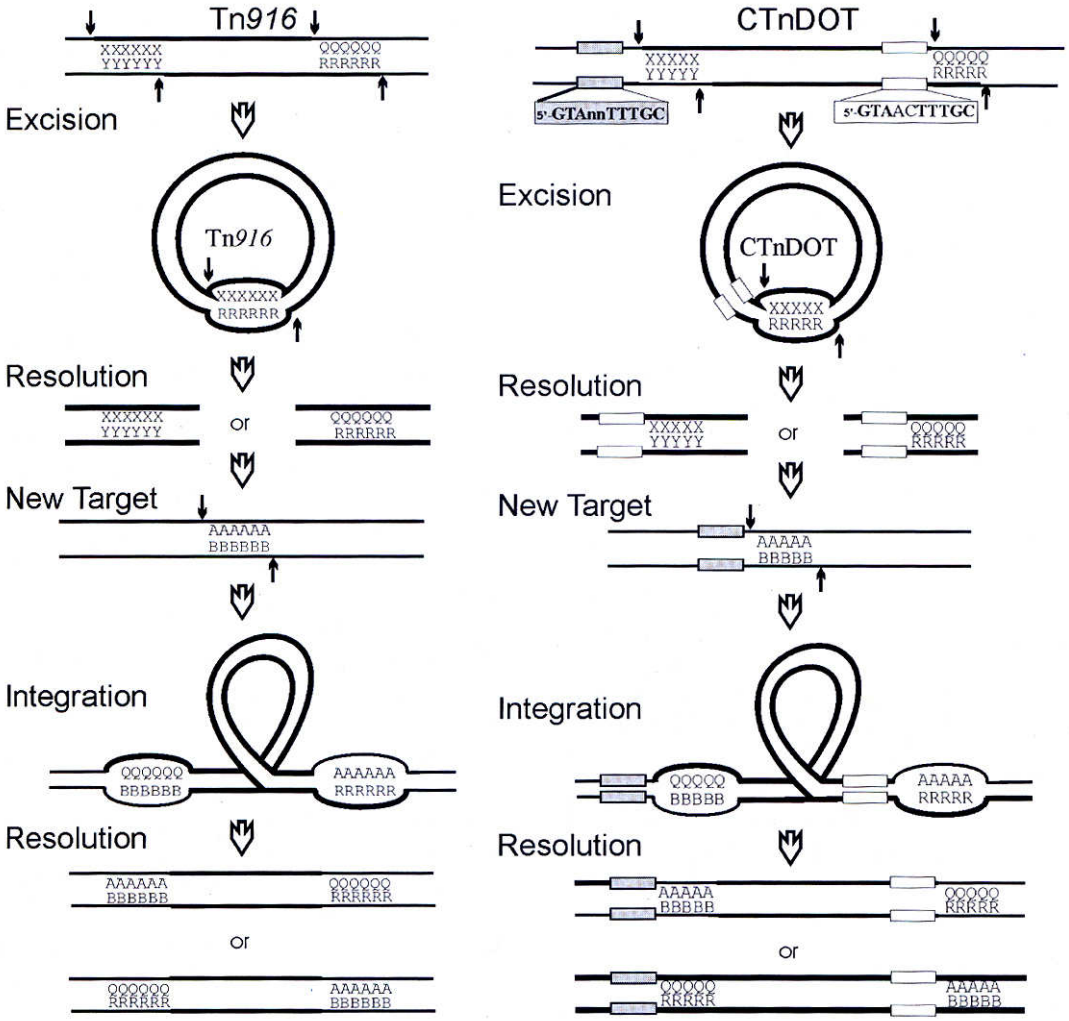
transpozony typu Tn916 mají široké rozmezí hostitelů – gen tetR je rozšířen u mnoha bakterií

Proces přenosu konjugativních transpozonů Tn916 a CTnDOT



- Transpozon se exciduje z DNA v donorové buňce. Podobně jako fág lambda, Tn916 potřebuje dva proteiny: Int a Xis.
- Excize vyžaduje dva zlomy poblíž začleněného transpozonu
- Nejdříve integráza vytvoří posunuté zlomy poblíž konců transpozonu – sekvence jsou náhodné a liší se podle místa začlenění transpozonu v donorové DNA – a nejsou tudíž komplementární
- Tyto sekvence se přesto párují za tvorby kružnicového transpozonového intermediátu – v místě spojení je heteroduplexní spojující sekvence.
- V donorovém místě po vyčlenění transpozonu vzniká krátká delece
- Kružnicový intermediát se nemůže replikovat, ale je přenesen do jiné buňky procesem podobným konjugaci plazmidů.
- Transpozon má své vlastní oriT místo a tra geny (jsou podobné plazmidu RP4 a F).
- Iniciace transferu začíná vytvořením zlomu v oriT a do recipientní buňky je přenesen jeden řetězec.
- V recipientní buňce se konce transpozonu spojí a je dosyntetizován komplementární řetězec.
- Int protein kódovaný transpozonem pak integruje transpozon do DNA recipientní buňky vytvořením tupých konců v její DNA – proto nevznikají duplikace cílové DNA.

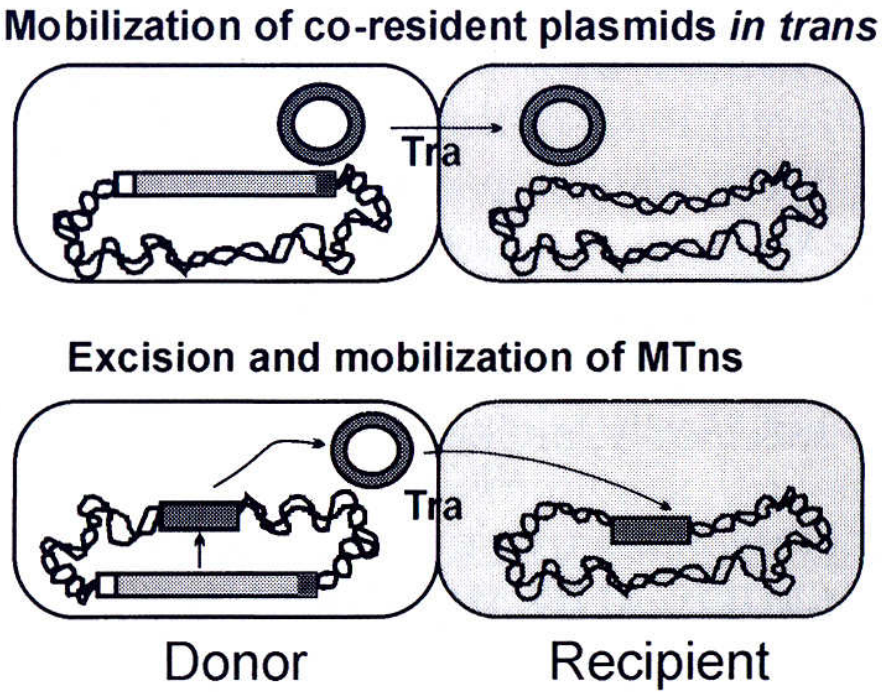
MODEL EXCIZE A INTEGRACE KONJUGATIVNÍCH TRANSPOZONŮ Tn916 A CTnDOT



Spojovací chromozomové sekvence (XXX/YYY nebo QQQ/RRR jsou původně vzájemně komplementární).

Šipky naznačují místa vzniku posunutých zlomů před excizí nebo před integrací

MOBILIZACE GENETICKÝCH ELEMENTŮ KONJUGATIVNÍMI TRANSPOZONY (PŮSOBENÍ *IN TRANS*)



Mobilizovatelný rezidentní plazmid nese geny kódující proteiny vytvářející zlom v jeho DNA, CTn zajišťuje vytvoření multiproteinového párovacího aparátu

CTn navozuje excizi rezidentního mobilizovatelného transpozonu (MTn) - CTn poskytuje proteiny pro excizi a cirkularizaci a pro přenos ss-formy MTn do recipienta, kde se MTn již samostatně integruje do chromozomu

Přenos Tn918 do *S. aureus* prostřednictvím konjugativního plazmidu (příklad „hitch-hiking“)

Transpozon se inzertuje do konjugativního plazmidu *Str. feacalis* a tento komplex je přenesen do *S. aureus*, kde se plazmid nereplikuje, Tn se vyčlení a začlení do chromozomu *S. aureus*.