

BAKTERIÁLNÍ TRANSPOZONY

(transponovatelné 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

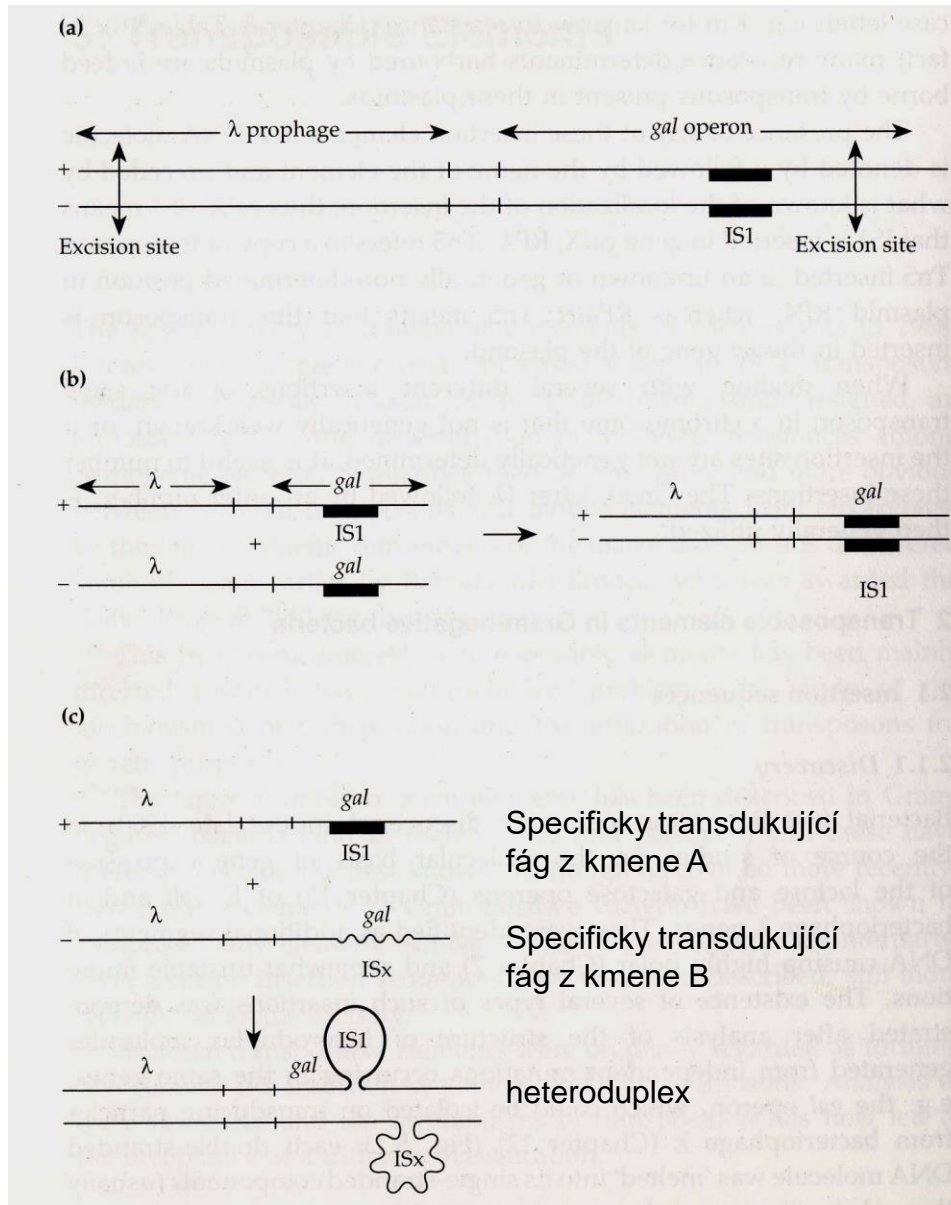
- **IS = inzerční sekvence (IS-elementy)**
- **Tn = transpozony (složené transpozony)**
- **Bakteriofág MU**
- ***Konjugativní transpozony***

- **Poprvé byly bakteriální transpozony 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 inzertovaného elementu.
- Tyto mutace nebylo možné revertovat analogy bází nebo mutageny navozujícími posunové mutace, takže podstatou mutací nemohly být substituce, 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 $F' lac^-$.
- Fyzikální studium plazmidů ukázalo, že plazmid s mutací je delší díky vloženému 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 inserce se zdvojují ve stejném směru sekvence DNA - transpozon je na obou koncích ohraničen přímými repetitivy, což je důsledek mechanismu transpozice
- po inserci transpozonu do cílového místa dochází obvykle k inaktivaci genů, po excizi transpozonu se funkce genu obnovuje.

DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI IS-SEKVENCÍ U *E. coli*

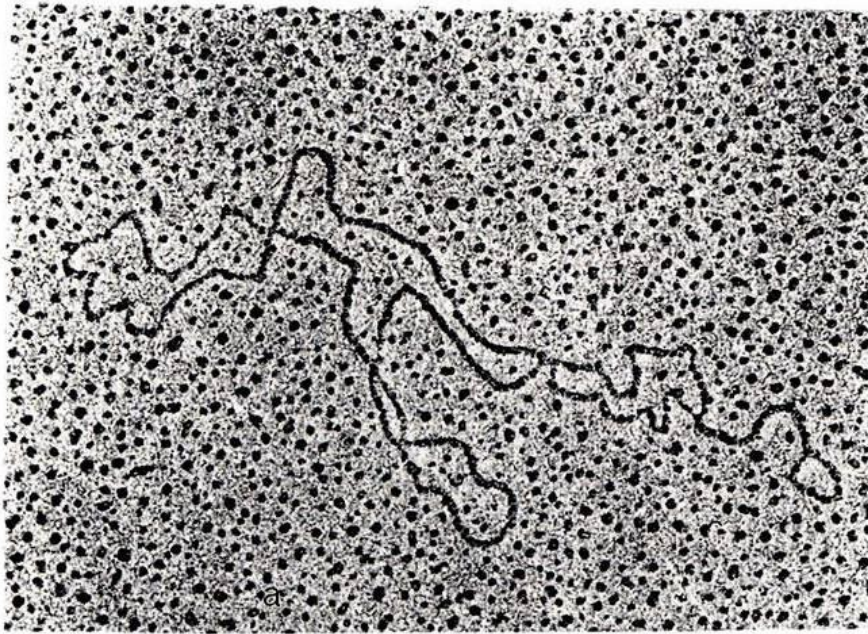


Vznik specificky transdukujících fágů

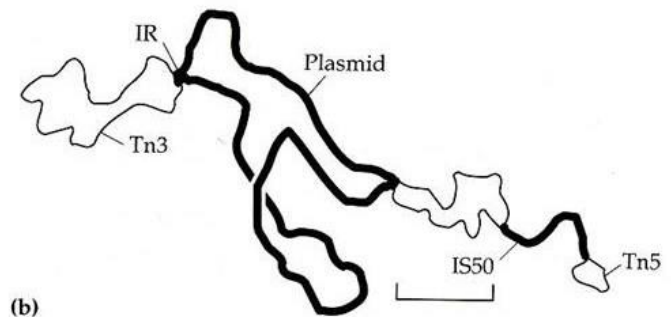
Vznik heteroduplexů

Mapování neznámých IS v gal operonu heteroduplexní analýzou

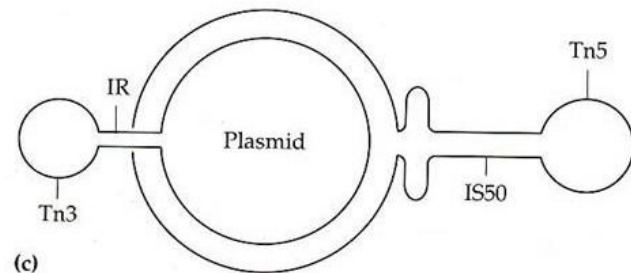
ZNÁZORNĚNÍ PŘÍTOMNOSTI TRANSPOZONŮ V ELEKTRONOVÉM MIKROSKOPU - HETERODUPLEXNÍ ANALÝZA



(a)

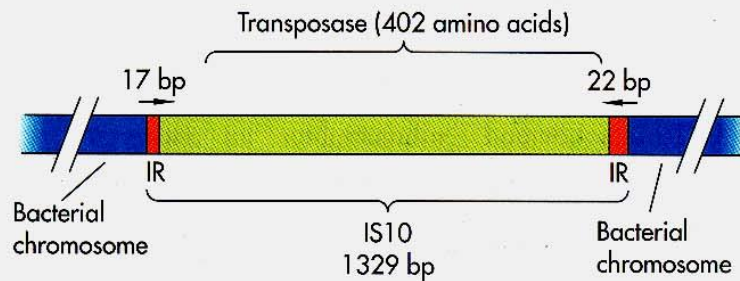


(b)

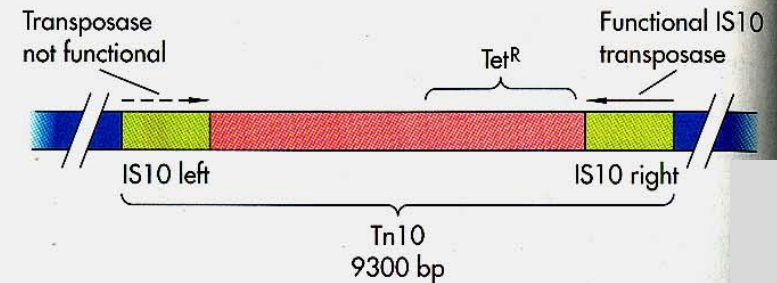


(c)

STRUKTURA IS SEKVENCÍ A SLOŽENÝCH TRANSPOZONŮ



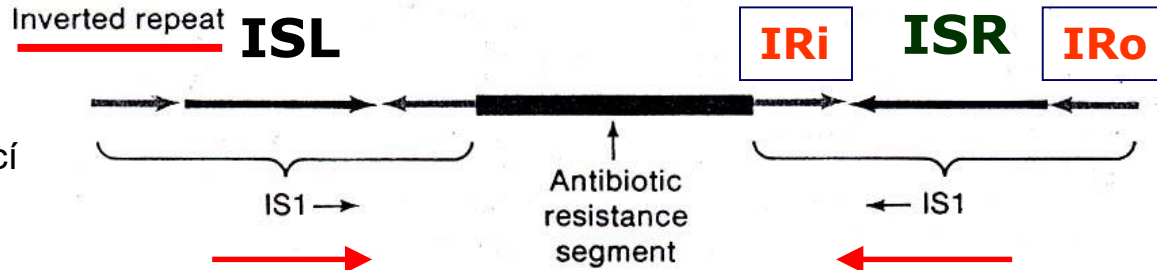
Struktura inzerční sekvence IS10



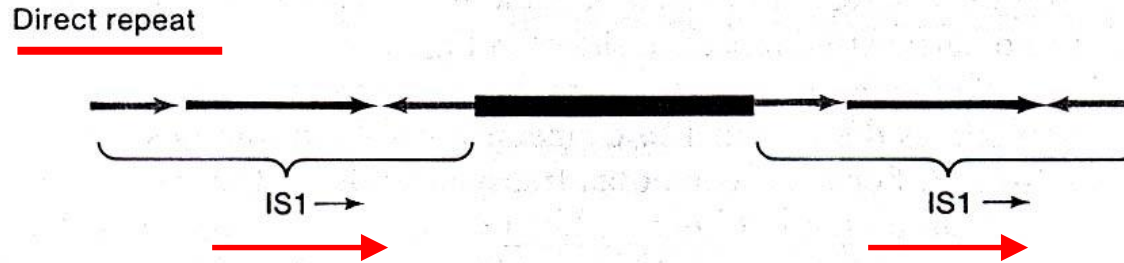
Složený transpozon Tn10

Struktura složených transpozonů

IS mají charakter
obrácených repeticí



IS mají charakter
přímých repeticí



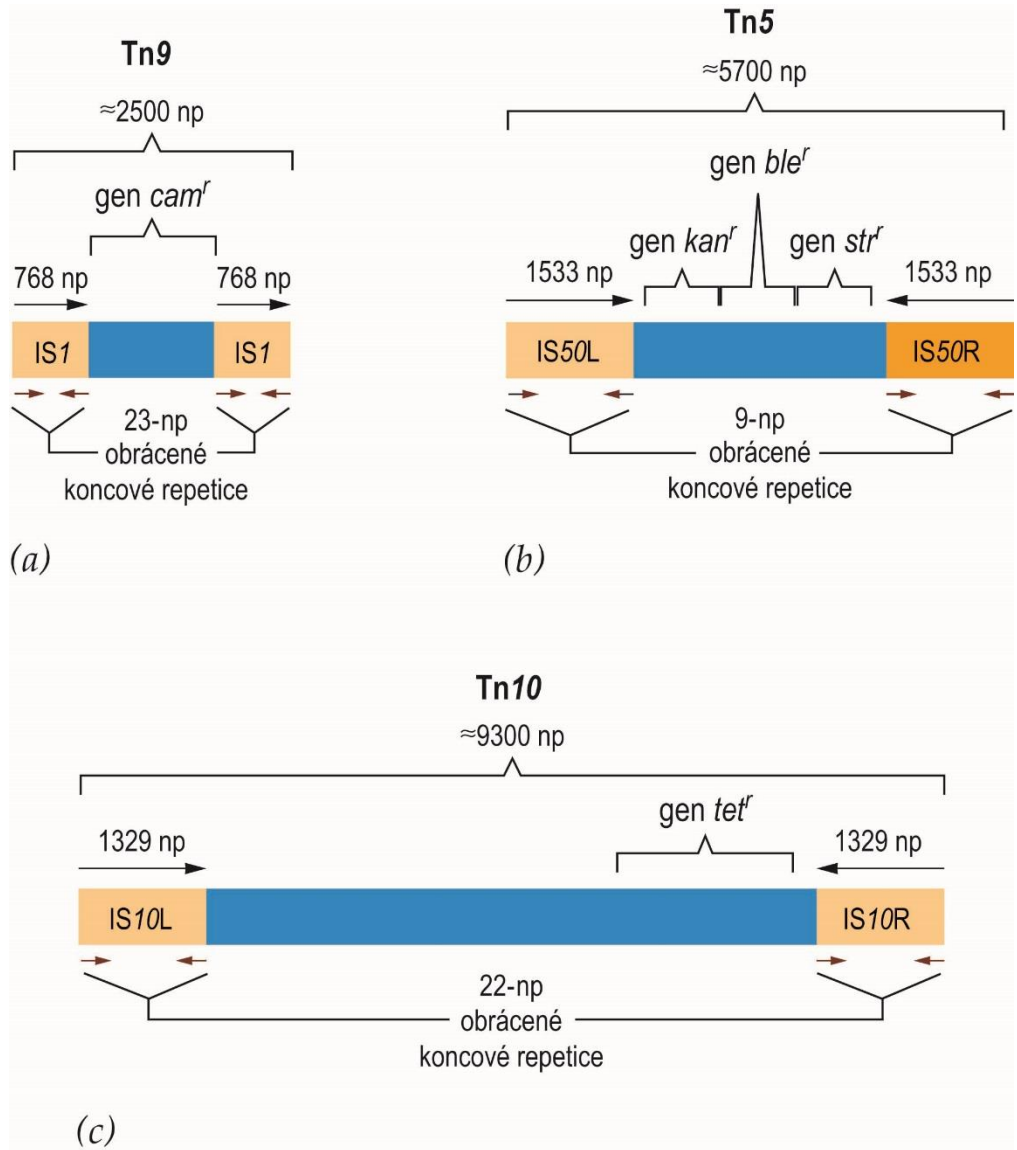
Vlastnosti složených transpozonů u *E. coli*

Element	Genes carried*	Size in base pairs	Terminal IS element and size in base pairs	Relative directions of terminal IS Elements
Tn5	<i>kan</i>	5818	IS50 (1533)	Inverted
Tn9	<i>cam</i>	2638	IS1 (768)	Direct
Tn10	<i>tet</i>	9300	IS10 (1329)	Inverted
Tn204	<i>cam, fus</i>	2457	IS1 (768)	Direct
Tn903	<i>kan</i>	3094	IS903 (1057)	Inverted
Tn1681	<i>ent</i>	2088	IS1 (768)	Inverted

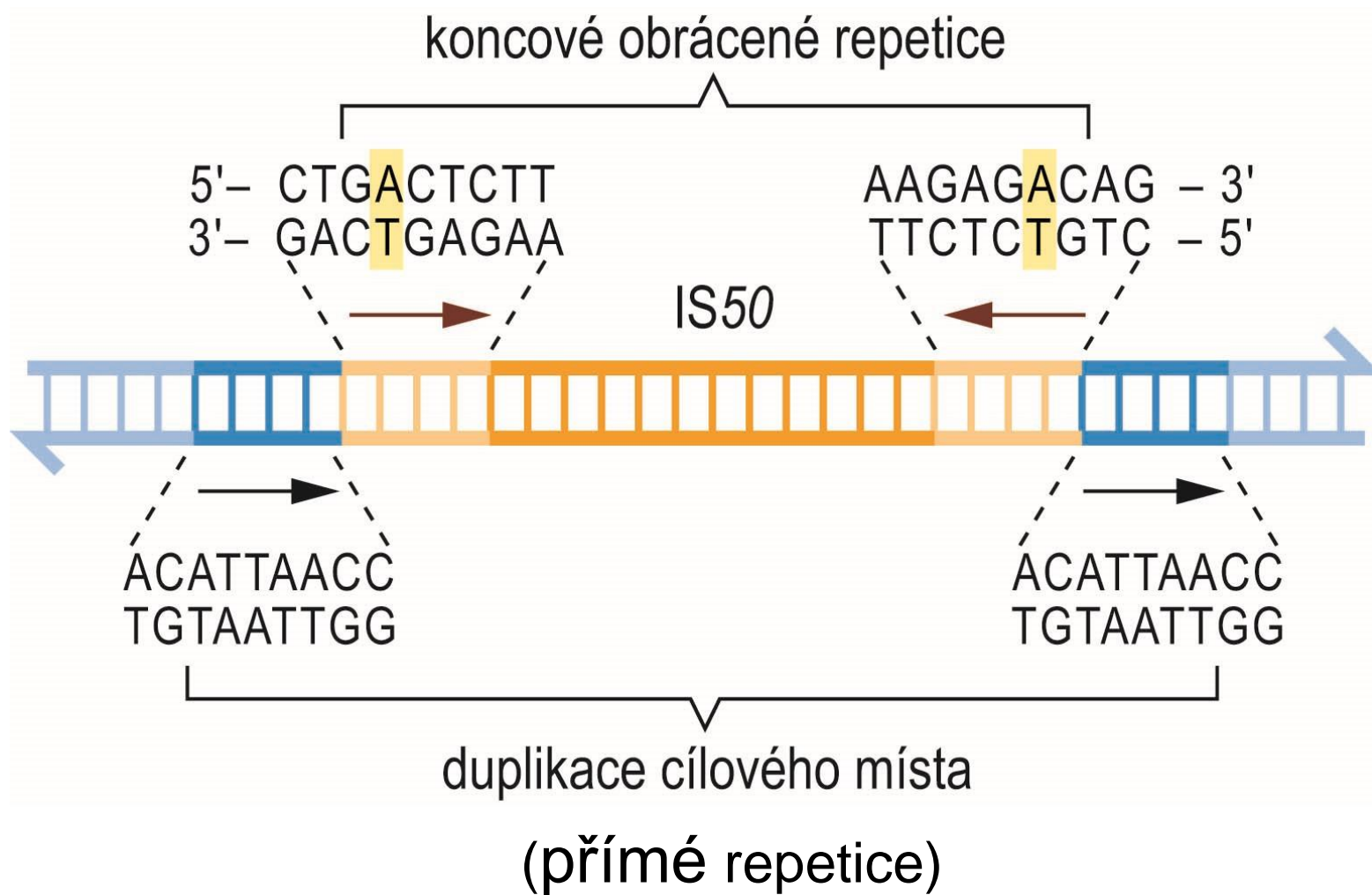
**cam*, chloramphenicol; *ent*, enterotoxin; *fus*, fusidic acid; *kan*, kanamycin; *tet*, tetracycline.

+ metabolické geny,
RM-systémy aj.

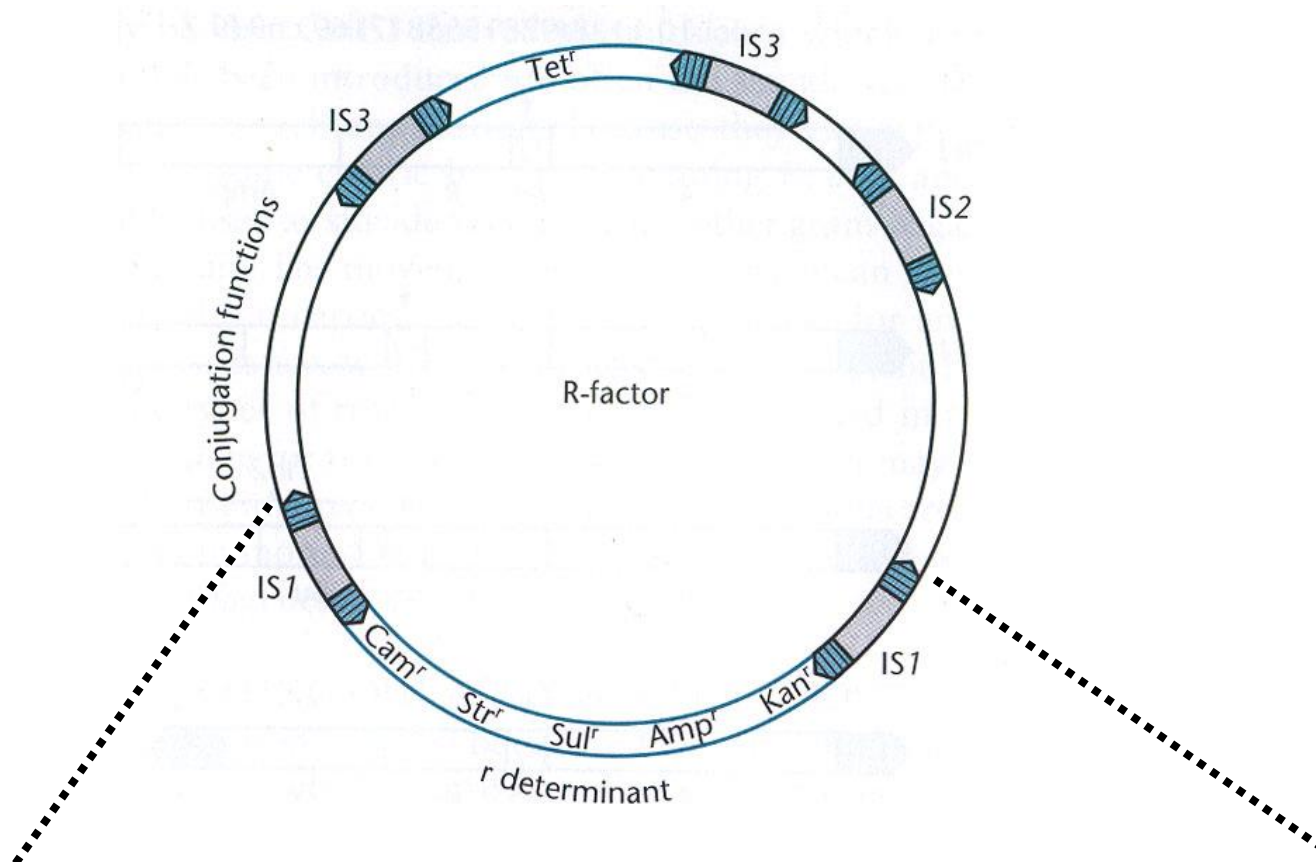
Příklady genetické organizace složených transpozonů



Struktura IS50

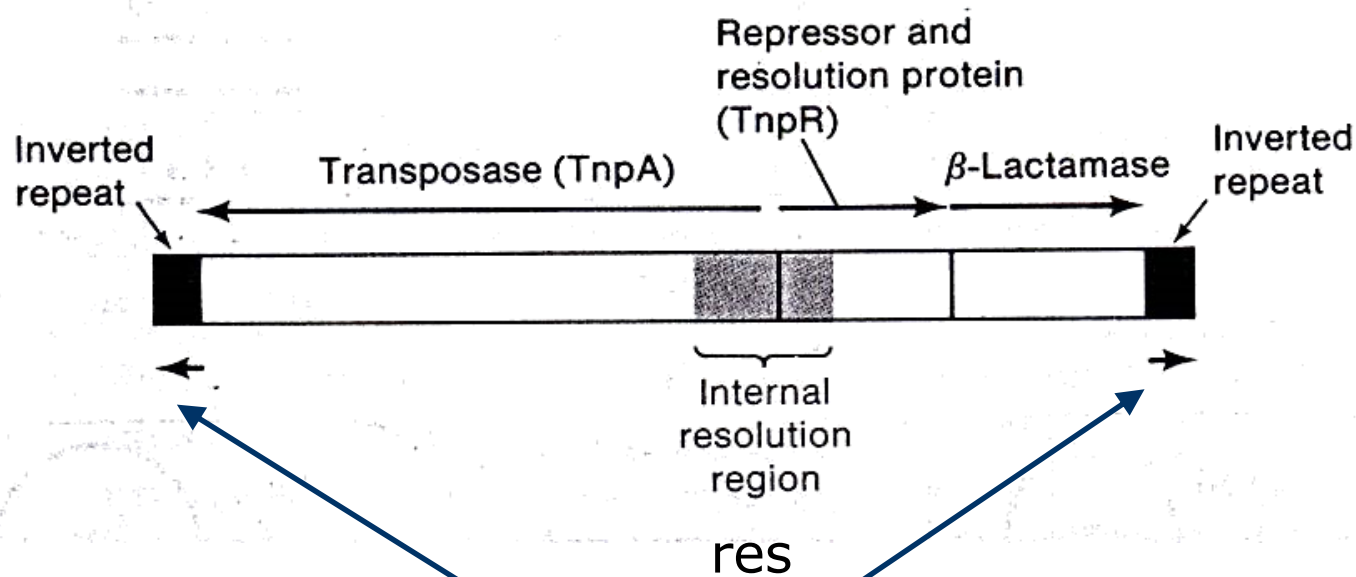


Obsah transpozonů v R plazmidu

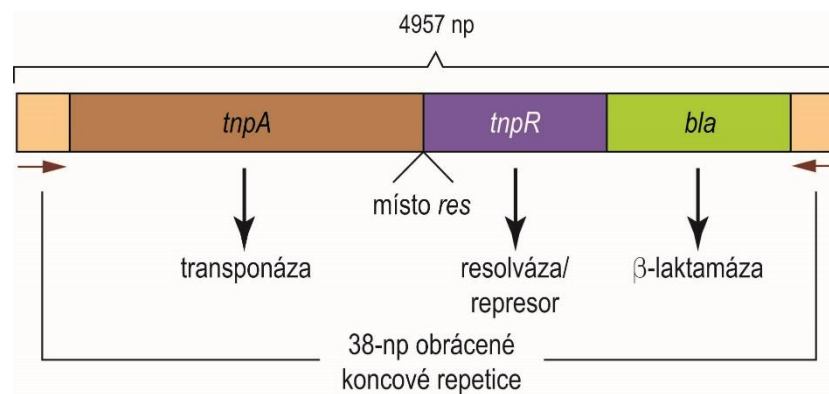


Vznik složených transpozonů tvořených dvěma IS, mezi nimiž se nachází gen nebo geny pro ANT^R

STRUKTURA TRANSPOZONU Tn3




38 bp obrácená opakování



Základní charakteristiky IS U GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ

Table 5.1 Some IS elements present in Gram-negative bacteria.

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	<i>E. coli</i> chromosomes, plasmids (F)	1327	32/41	5	2	Inverted repeats of Tn951
IS3	<i>E. coli</i> chromosomes (4–5 copies) Plasmid F (2 copies)	1258	39/39	3	3	Behaves as a mobile promoter
IS4	Chromosomes of <i>E. coli</i> K12 (1 copy at a single location)	1426	16/18	11, 12 or 14	2	1 specific insertion site
IS5	<i>E. coli</i> <i>Shigella</i> Phages λ, Mu	1195	15/16	4	3	The most abundant IS in <i>E. coli</i> ; has a promoter activity by creation of a promoter
IS10	Tn10	1329	17/22	9	1	Tn10 inverted repeats
IS15	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> 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 <i>E. coli</i>	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	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	1209	9/10	4			
IS66	<i>Agrobacterium</i> plasmid pTiA66	2548					
IS102	Plasmid pSC102	1057	18	9	3		
IS136 (IS426)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (pTC137)	1313	32/30	9	3		
IS200	<i>Salmonella typhimurium</i> (6–10 copies)						Only found in <i>Salmonella</i> species
IS222	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> chromosome and phage D3	1350	40				
IS476	<i>Xanthomonas campestris</i>	1225	13	4			
IS4400	<i>Bacteroides fragilis</i>	1150					
ISRm2	<i>Rhizobium meliloti</i>	2700	24/25	8			

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

HLAVNÍ TŘÍDY SLOŽENÝCH 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	<i>tnpA</i> transposase <i>tnpR</i> 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^8) 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	<i>Bacillus thuringiensis</i>	None	1.65	20	11	
ISS1	<i>Streptococcus lactis</i>	None	0.82	18	8	I (IS15)
IS110	<i>Streptomyces coelicolor</i>	None	1.55	10/15	ND	
IS257	<i>Streptococcus lactis</i>	None				I (IS15)
IS861	<i>Streptococcus</i>					I (IS50, IS3)
Tn4001	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gm, Tm, Km	4.7	IS256	ND	I
Tn551	<i>Staphylococcus aureus</i>	Em	5.3	40	5	II
Tn917	<i>Streptococcus faecalis</i>	Em	5.27	38	5	II
Tn4430	<i>Bacillus thuringiensis</i>	None	4.194	38	5	II
Tn4451	<i>Clostridium perfringens</i>	Cm	6.2	12	ND	II
Tn4556	<i>Streptomyces fradiae</i>		6.62			II
Tn916	<i>Streptococcus faecalis</i>	Tc conjugative	16.4	Imperfect	0	V
Tn918	<i>Streptococcus faecalis</i>	conjugative	16	ND	ND	V
Tn919	<i>Streptococcus sanguis</i>	conjugative	16	ND	ND	V
Tn1545	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Tc, Em, Km conjugative	25.3	Imperfect	0	V
Minicircle	<i>Streptomyces coelicolor</i>	None	2.6	Imperfect	0	V
Tn554	<i>Staphylococcus aureus</i>	Em, Sp	6.69	0	0	V

Nová třída V
- nemají IR
- netvoří TD

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.

Konjugativní transpozony

IS U ARCHEÍ

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

Byly vytvořeny umělé složené transpozony (např. z ISH2) použitelné pro mutagenezu u archeí

Vlastnosti některých inzerčních elementů u *E. coli* a jejich lokalizace v genomu

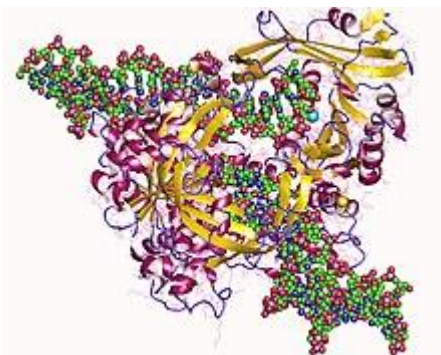
Element	Number of copies and location*	Number of base pairs
IS1	5–8 in chromosome	768
IS2	5 in chromosome; 1 in F	1327
IS3	5 in chromosome, 2 in F	1258
IS4	1 or 2 in chromosome	1426
IS5	Unknown	1195
Tn 1000 ($\gamma\delta$)	1 or more in chromosome; 1 in F	5980

Více kopií \longrightarrow přestavby genomu, interakce replikonů

Transponázy – obecná charakteristika

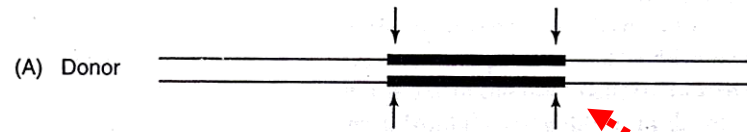
Transponázy jsou enzymy, které se vážou na konce transpozonů k IR sekvencím a katalyzují jejich přesun (transpozici) do jiných míst genomu. Obecně mají slabou aktivitu, neboť transpozice navozují mutace a nízká aktivita transponáz je nezbytná pro snížení rizika vzniku fatálních mutací. Např. u Tn5 je jedním z důvodů slabé reaktivity fakt, že jeho N- a C-konec jsou umístěny relativně blízko (v trojrozměrné struktuře) a mají tendenci se inhibovat. To bylo prokázáno mutacemi (záměnami aminokyselin) transponázy v různých místech, které vedly k hyperaktivním formám transponáz. Tyto záměny vedou ke změně konformace enzymu, v níž jsou oba konce oddáleny.

Enzymové aktivity transponáz: endonukleáza, rekombináza, polynukleotidyltransferáza, resolváza, integráza

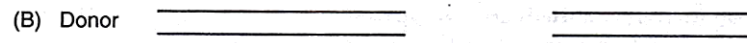


Vysoce konzervovaný DDE motiv tvoří karbonylová rezidua Asp139, Asp75, Glu51 a Asp10, nezbytná pro stabilizaci Mg iontů v aktivním místě.

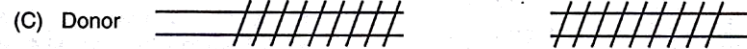
MODEL NEREPLIKATIVNÍ TRANSPOZICE (KONZERVATIVNÍ TRANSPOZICE, „cut and paste“)



Vytvoření
dvouřetězcových zlomů



Působení
transponázy



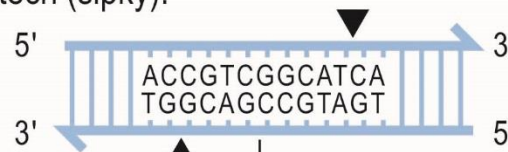
Degradace
donorové molekuly

VZNIK PŘÍMÝCH REPETICÍ V CÍLOVÉM MÍSTĚ PO ZAČLENĚNÍ TRANSPOZONU

KROK

1

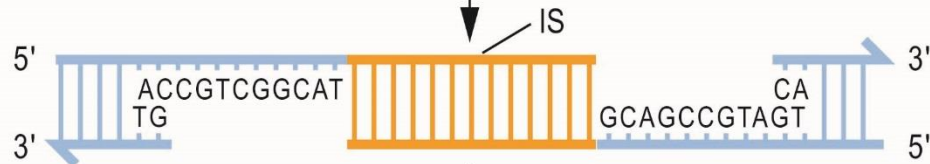
Oba řetězce cílové DNA jsou štěpeny v různých místech (šipky).



KROK

2

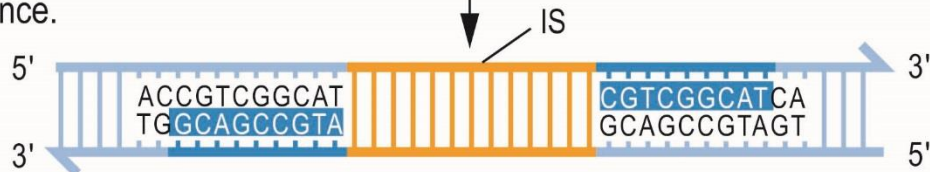
IS-element je začleněn do mezery vytvořené posunutými zlomy cílové DNA.



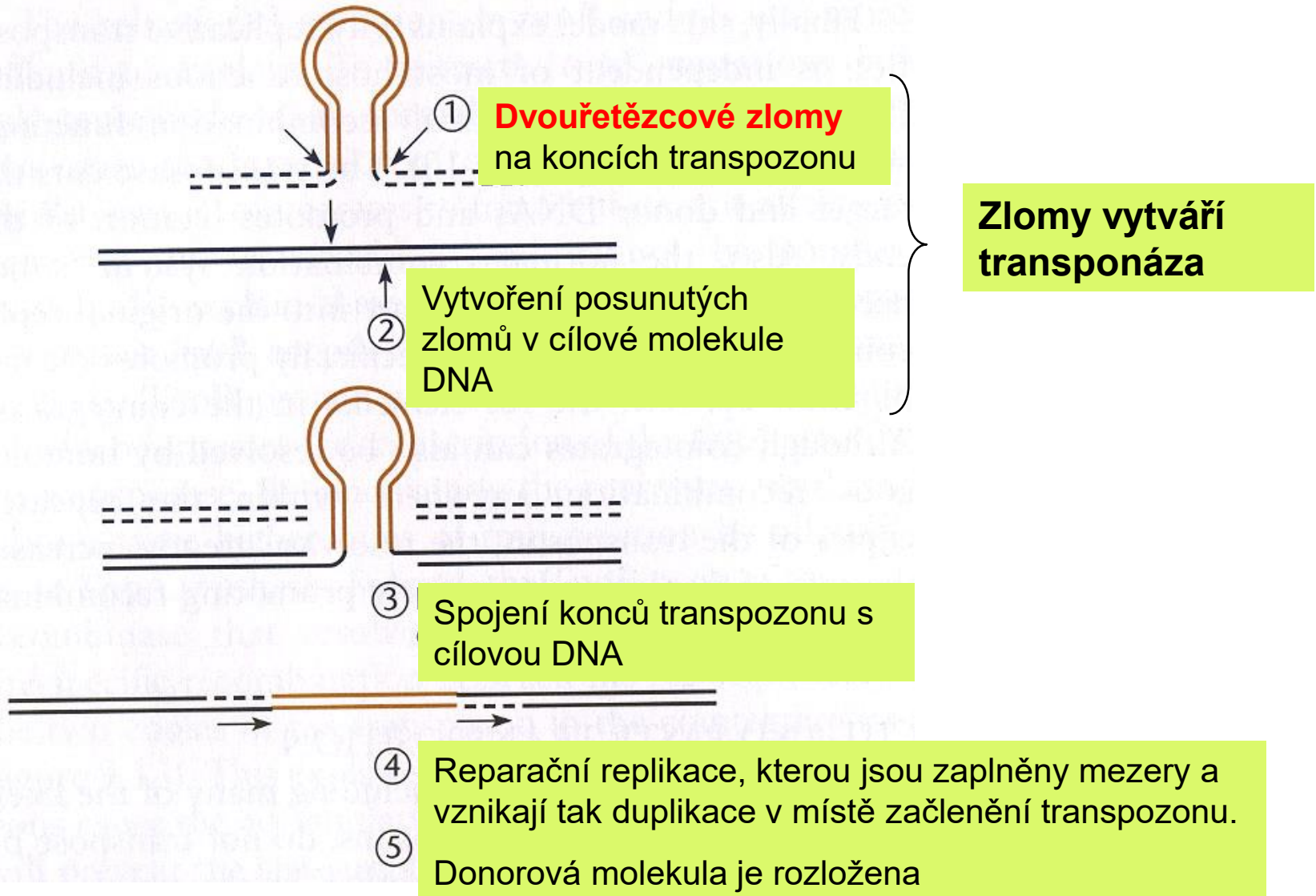
KROK

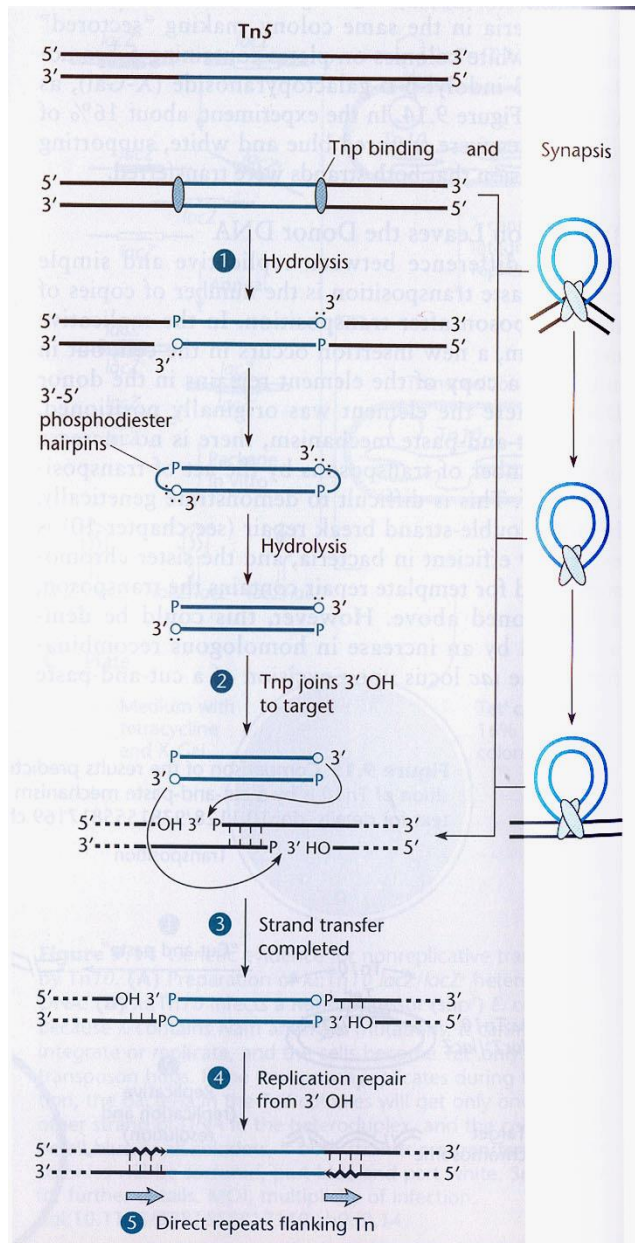
3

Mezery na obou stranách IS-elementu jsou zaplněny syntézou DNA, čímž se v cílovém místě vytvoří duplikované přímé sekvence.



Průběh konzervativní transpozice („CUT and PASTE“)

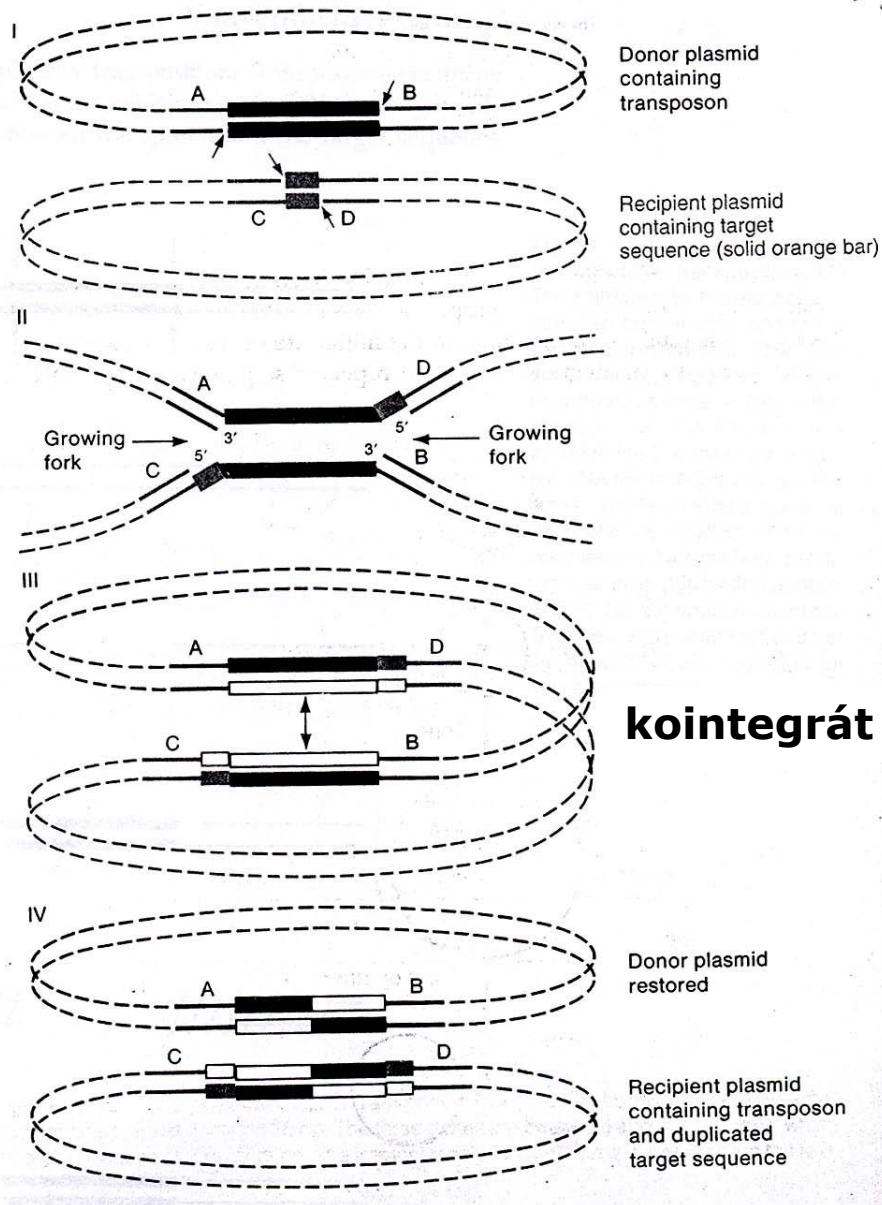




Mechanismus konzervativní transpozice Tn5 („cut and paste“)

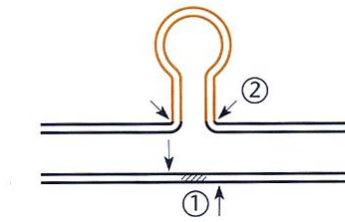
Molekuly transponázy se vážou na konce transpozonu, pak se tyto molekuly spojí za vzniku synapse. Vytvoří se zlomy a znovuspojení, čímž se transpozon vyčlení z donorové DNA a na jeho koncích se vytvoří vlásenky. Tyto vlásenky se pak štěpí a konce transpozonu se spojí s řetězcí v cílové DNA, v nichž transponáza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

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 kmenech recA+**
 - b) **místně specifickou rekombinací působením resolvázy (Tn3)**

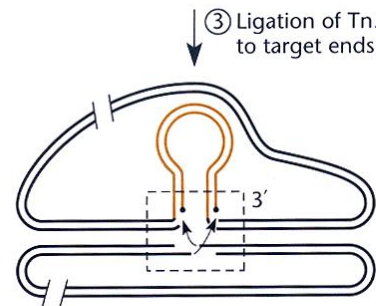
Replikativní transpozice Tn3



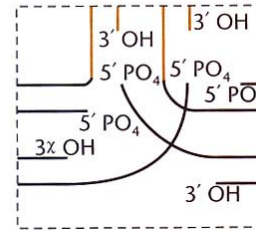
① Staggered cuts 5 bp apart in target DNA

② Single-strand cuts at outside ends of Tn3

Jednořetězcové zlomy

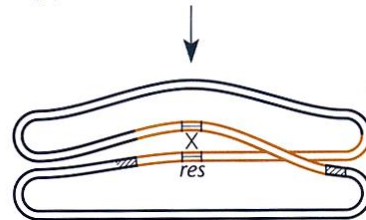
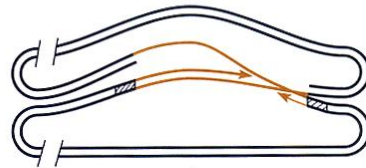


③ Ligation of Tn3 ends to target ends



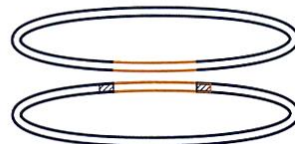
③ Detail of ends

④ 3' ends prime replication through Tn3



Cointegrate

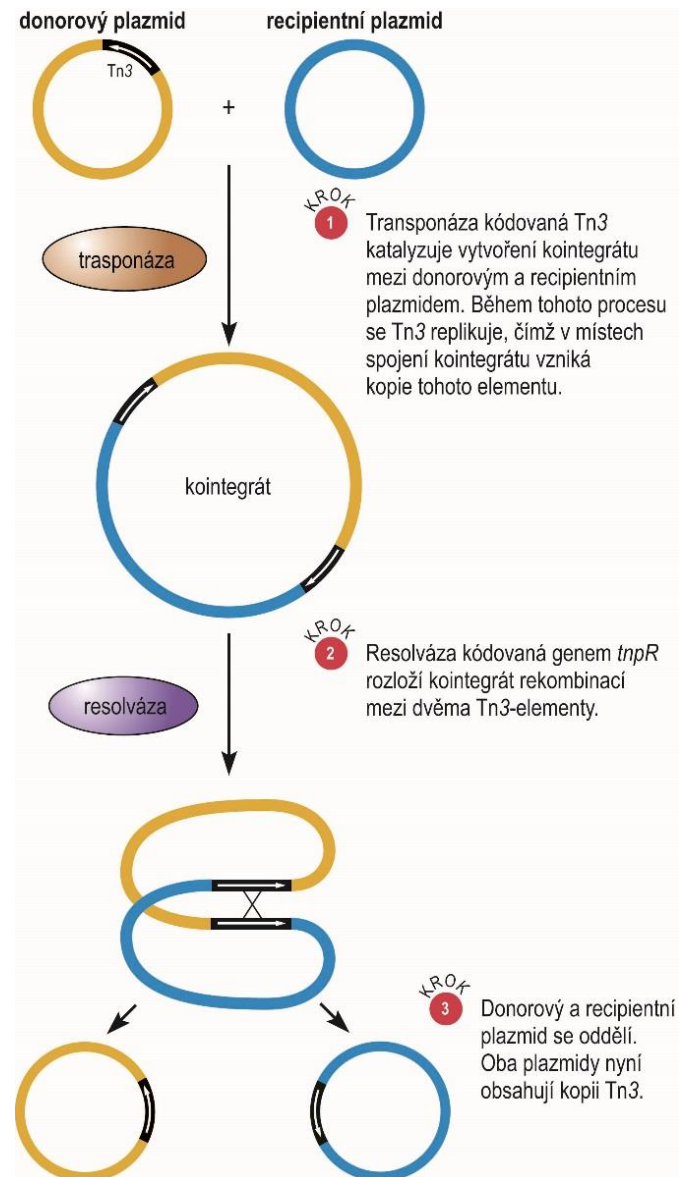
⑤ Recombination at *res* (≡) resolves cointegrate



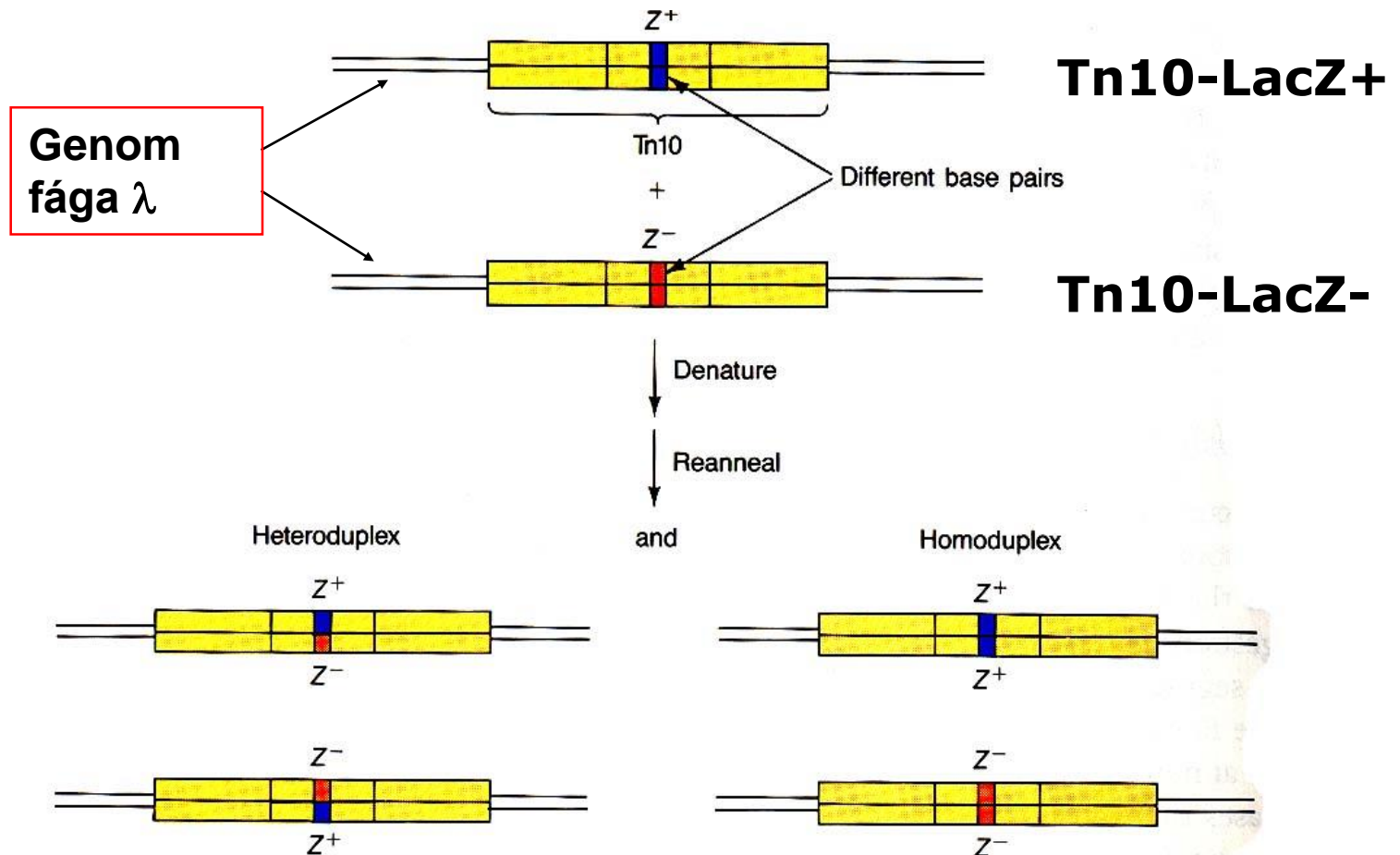
▨ 5-bp duplicated sequence flanking Tn3 insertion into target DNA

MODEL TRANSPOZICE PROSTŘEDNICTVÍM TVORBY KOINTEGRÁTU

(meziprodukt replikativní transpozice Tn3)



DŮKAZ KONZERVATIVNÍ TRANSPOZICE Tn10



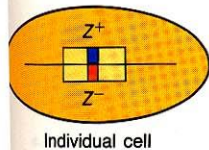
Vytváření směsi heteroduplexů a homoduplexů z transpozonů Tn10, které nesou odlišné alely genu lacZ lišící se toliko 3 bázemi. Tn10 je přítomen v transdukujících fágách lambda.

Donor (fág)

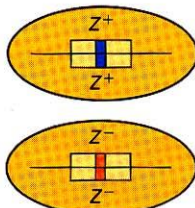
Cílová molekula

Infikovaná buňka, v níž došlo k transpozici

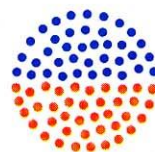
Konzervativní transpozice



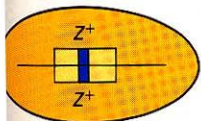
First division



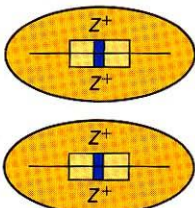
Growth of subsequent colony



Replikativní transpozice



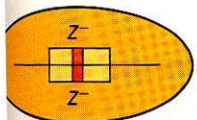
First division



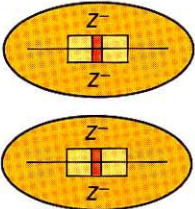
Colony



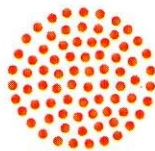
nebo



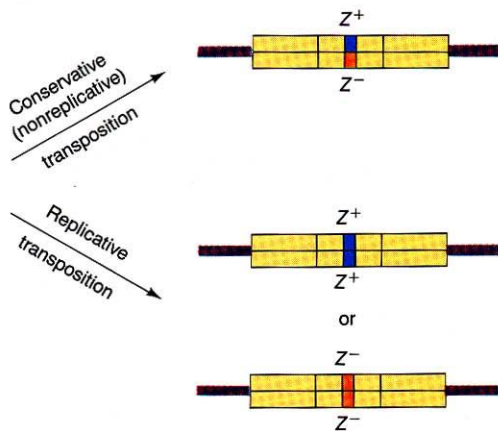
First division



Colony

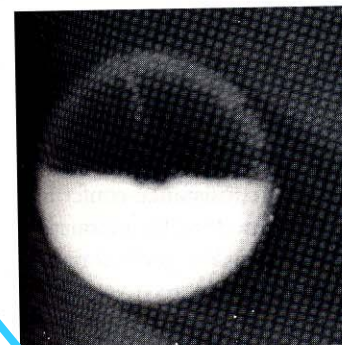


(a)



(b)

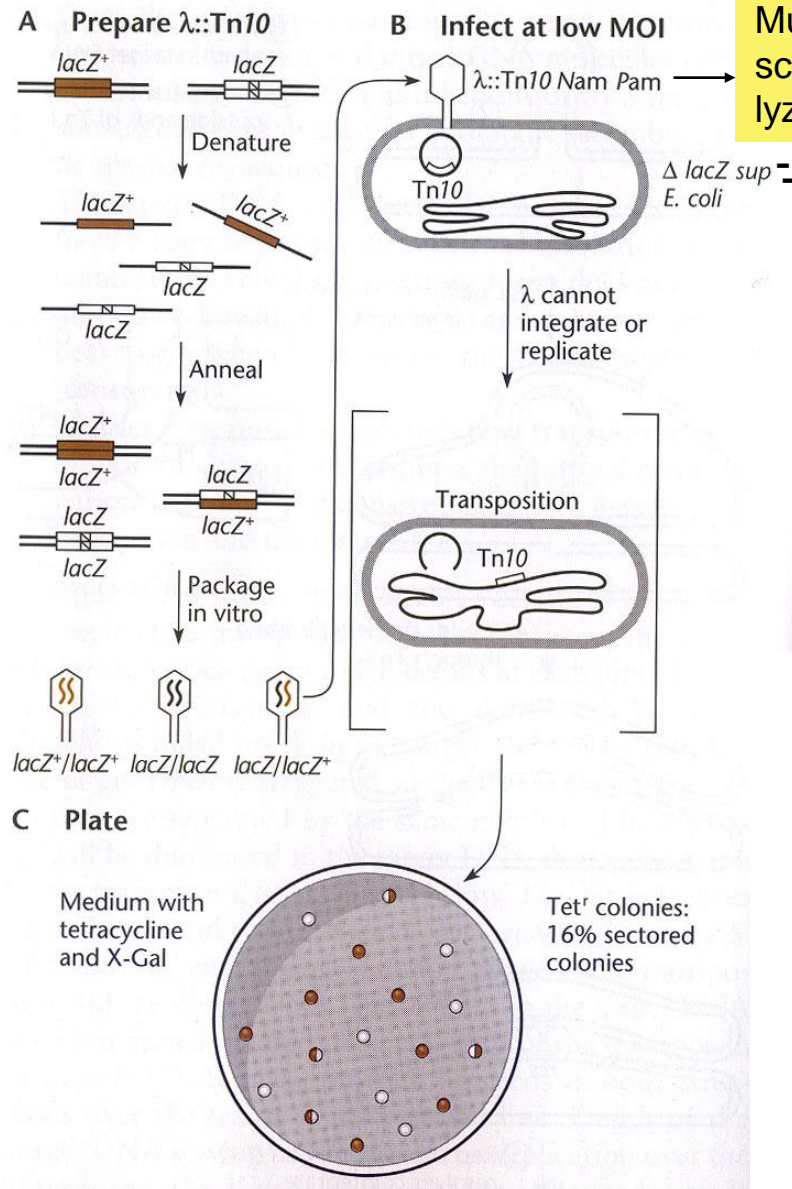
Figure 21-20 Consequences of conservative and replicative transposition. (a) The heteroduplex of homoduplex nature of DNA (see Figure 21-19) is transposed into a target gene. If the starting DNA is heteroduplex, then the resulting DNA will still be heteroduplex only in a conservative, or non-replicative, 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^- .



Většina případů

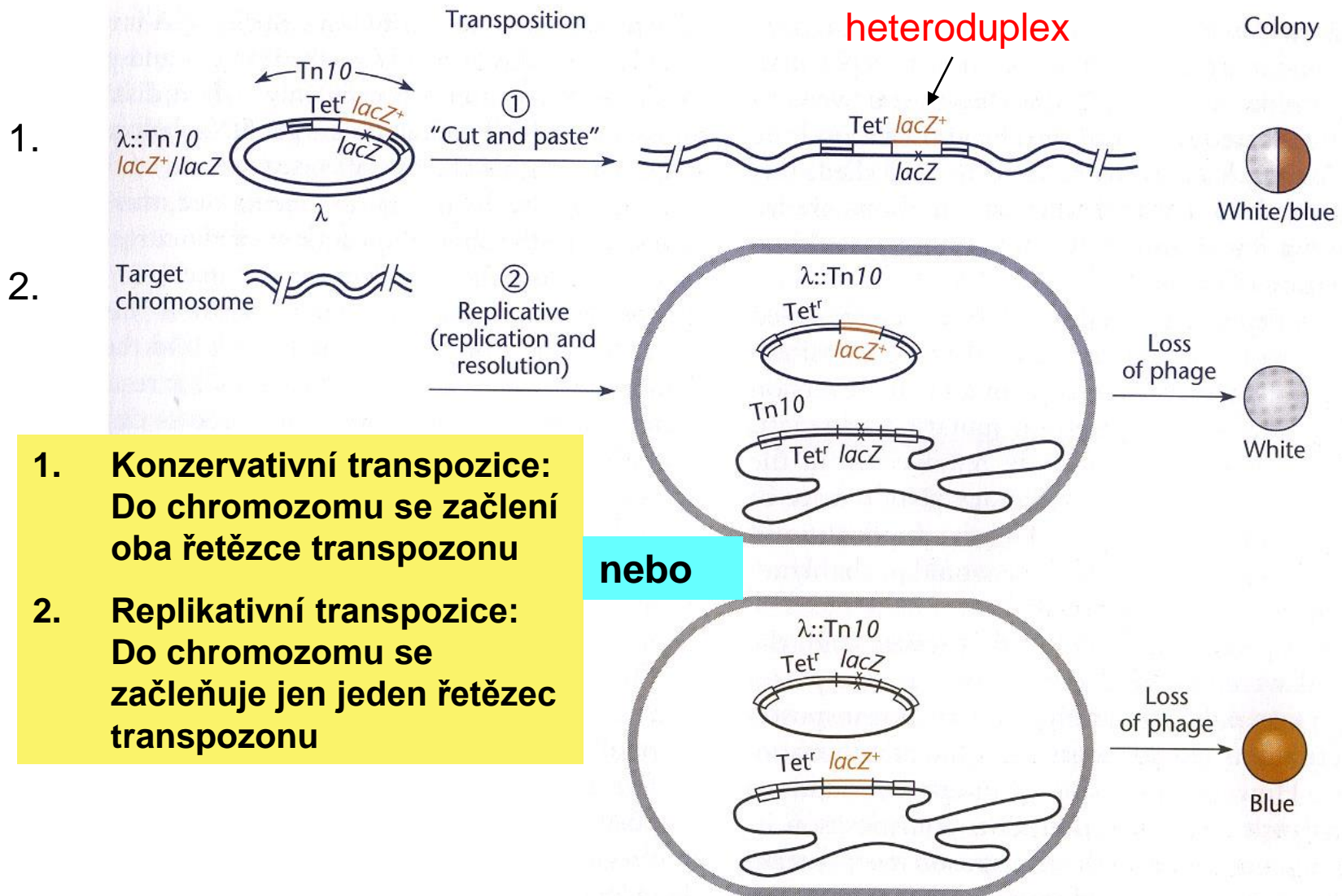
Důkaz konzervativní transpozice

Směs
homoduplexů a
heteroduplexů



Mutace Nam a Pam – fág není schopen se replikovat ani lyzogenizovat v kmeni sup-

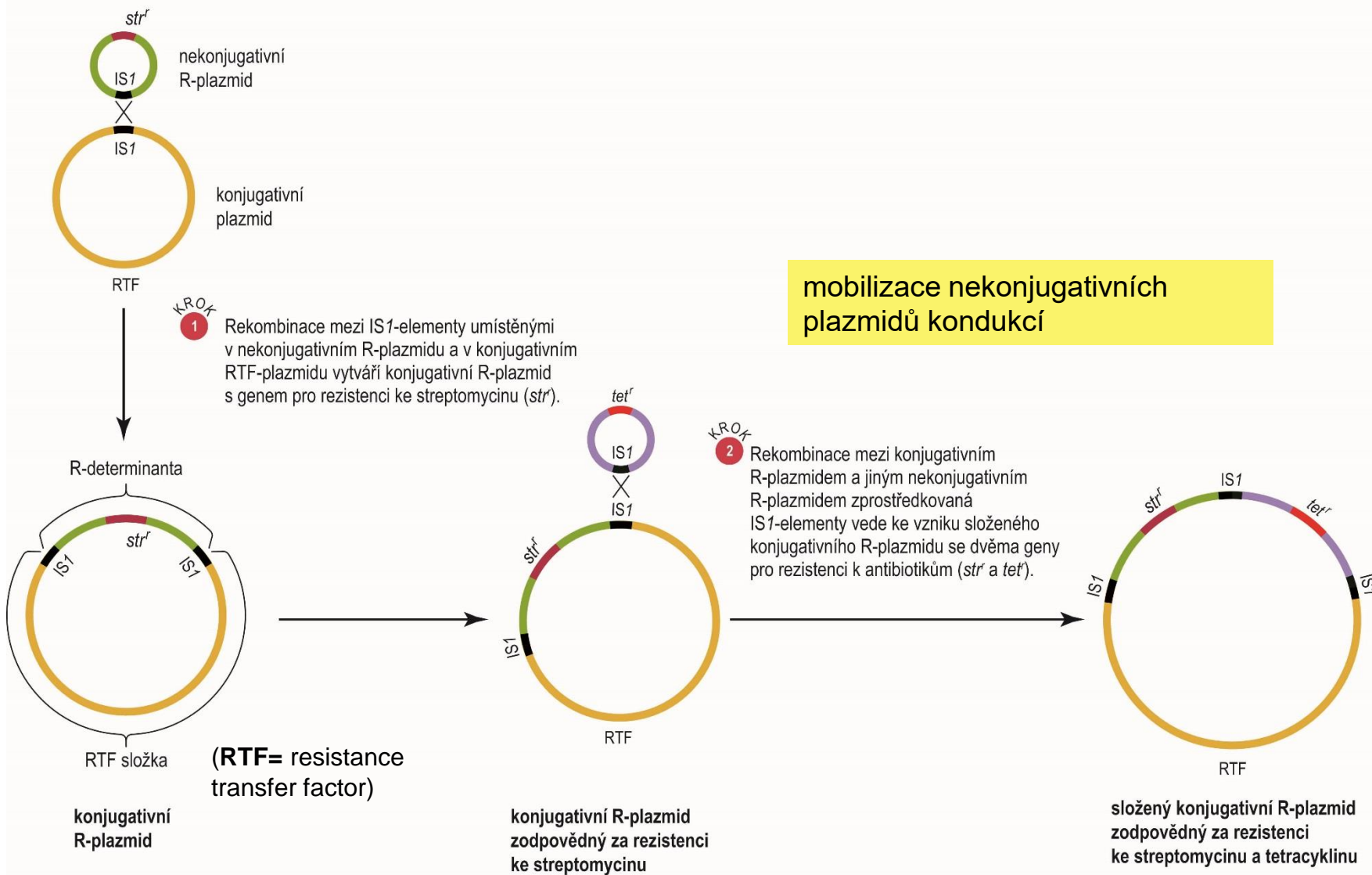
Výsledky konzervativní a replikativní transpozice transpozonu Tn10



nebo

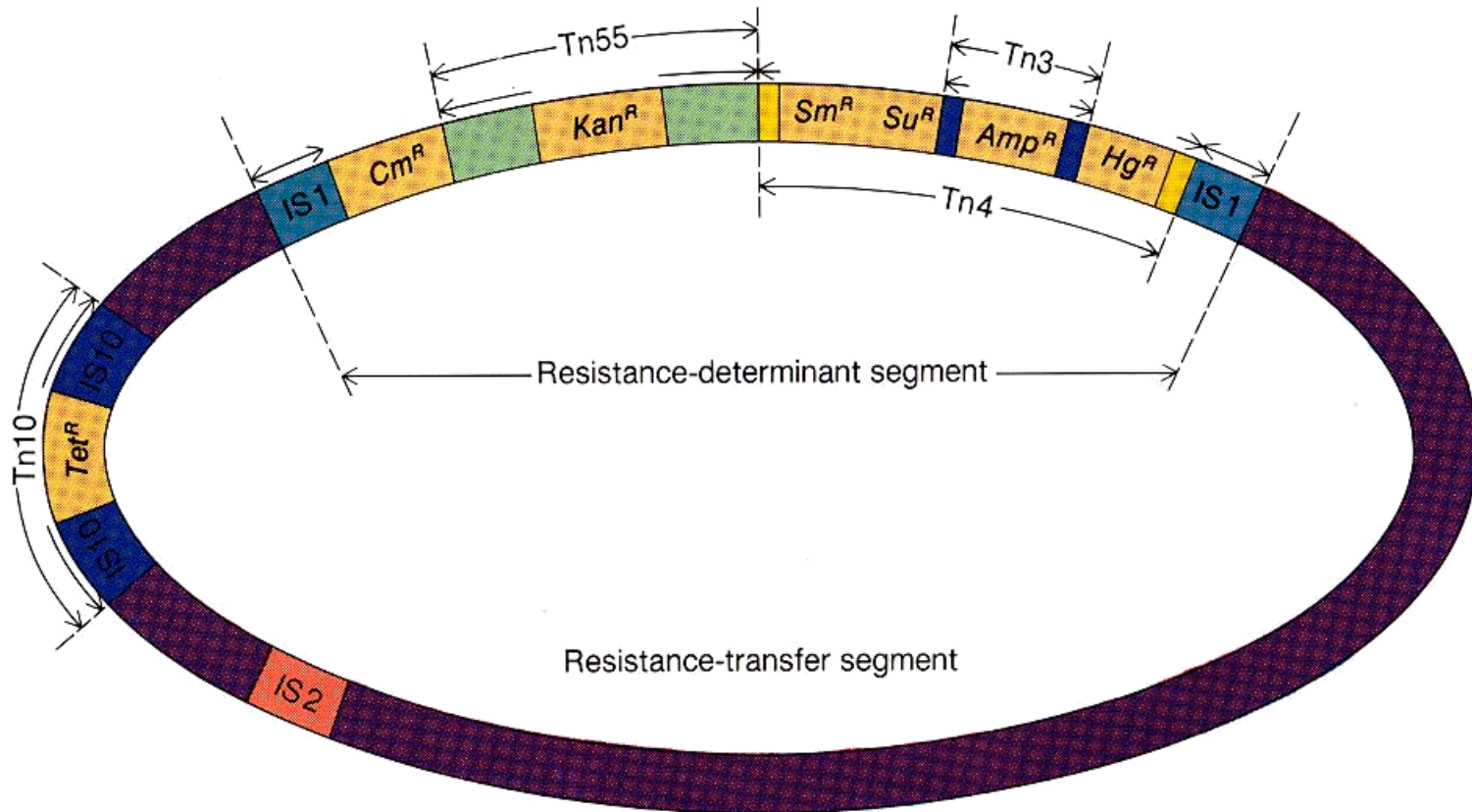
- Konzervativní transpozice:**
Do chromozomu se začlení oba řetězce transpozonu
- Replikativní transpozice:**
Do chromozomu se začleňuje jen jeden řetězec transpozonu

Evoluce konjugativních plazmidů obsahujících geny pro rezistenci k antibiotikům

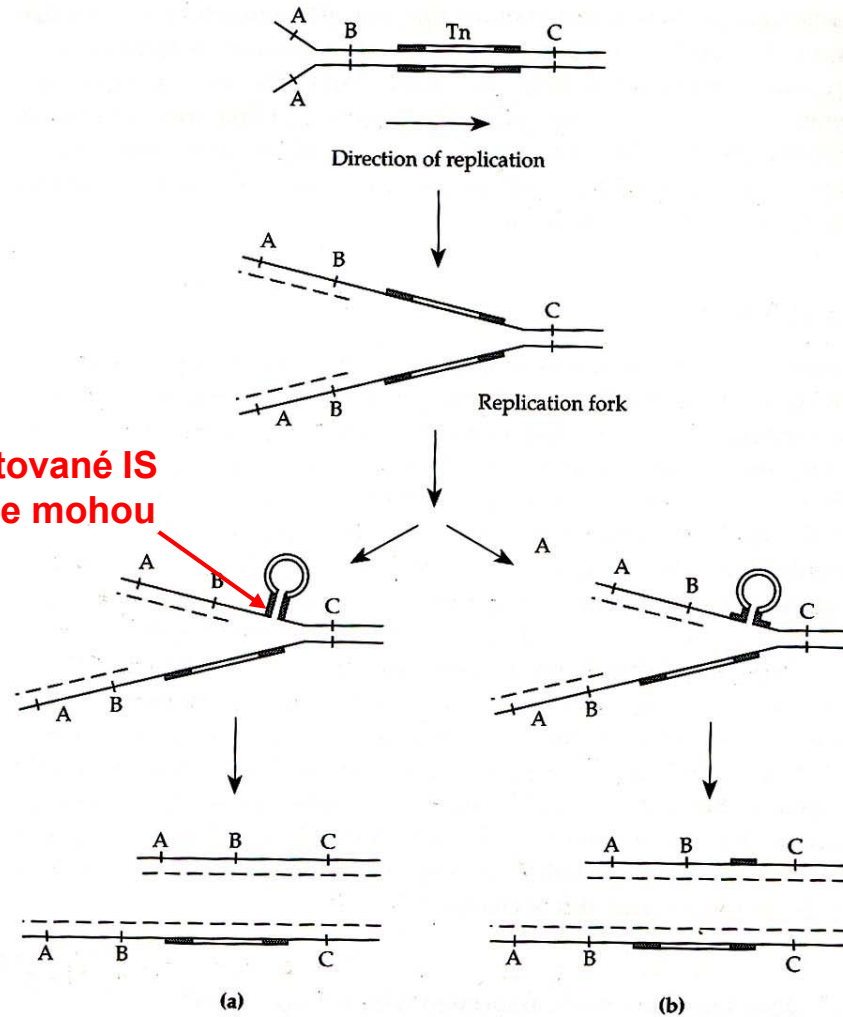


ÚLOHA TRANSPOZONŮ PŘI EVOLUCI R-PLAZMIDŮ

každý transpozon může být přenášen nezávisle



Důsledky přesné a nepřesné excize transpozonu

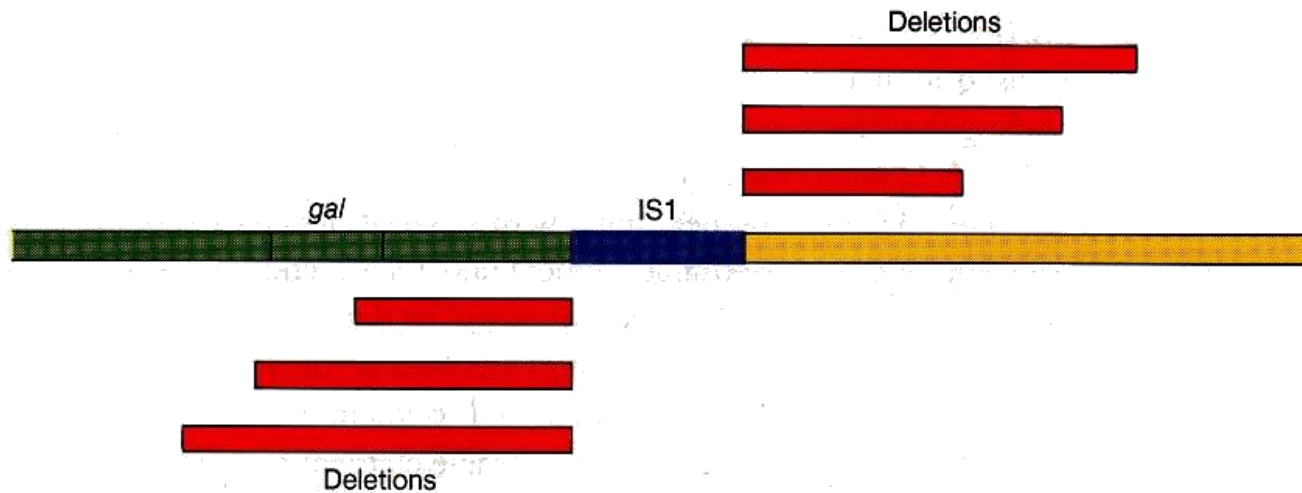


Obráceně orientované IS na koncích Tn se mohou párovat

přesná excize – úplná ztráta transpozonu

nepřesná excize – ztráta části transpozonu

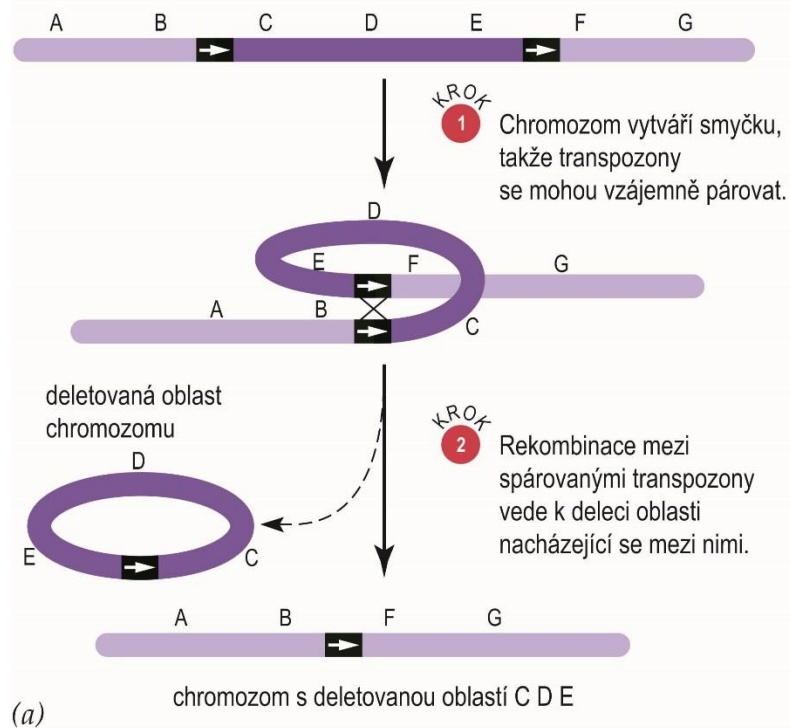
DELECE POZOROVANÉ V MÍSTĚ ZAČLENĚNÍ IS1 V LOKUSU GAL *E. coli*



Chromozomová přeskupení navozená transpozony

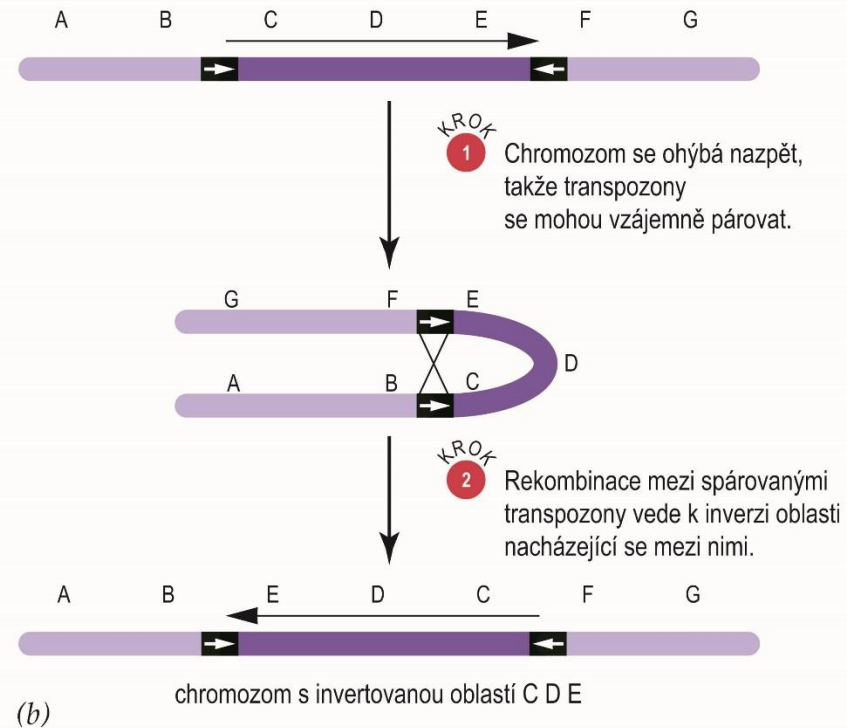
a. Vznik delecce intrachromozomovou rekombinací mezi dvěma stejně orientovanými transpozony

chromozom se dvěma stejně orientovanými transpozony

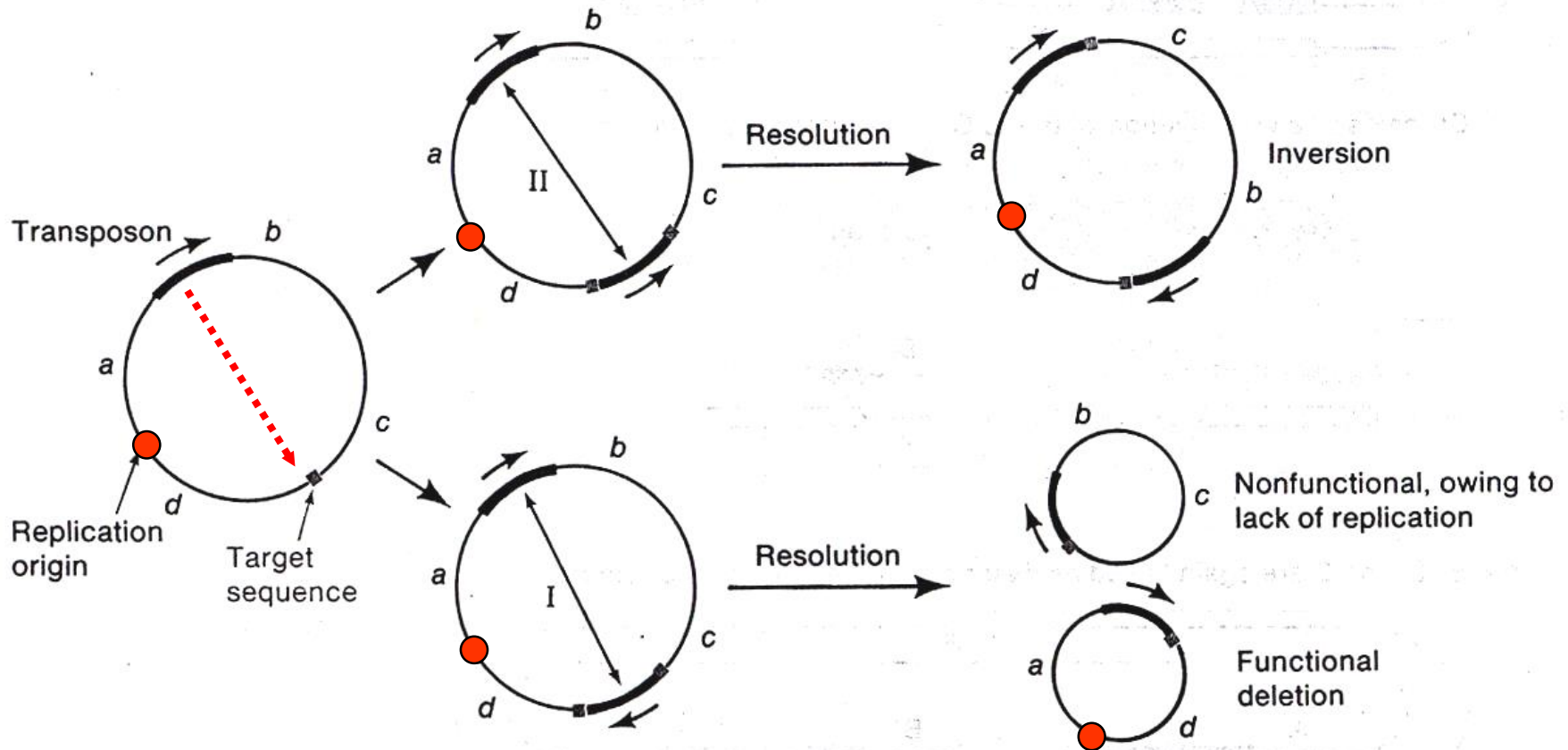


b. Vznik inverze intrachromozomovou rekombinací mezi dvěma opačně orientovanými transpozony

chromozom se dvěma opačně orientovanými transpozony

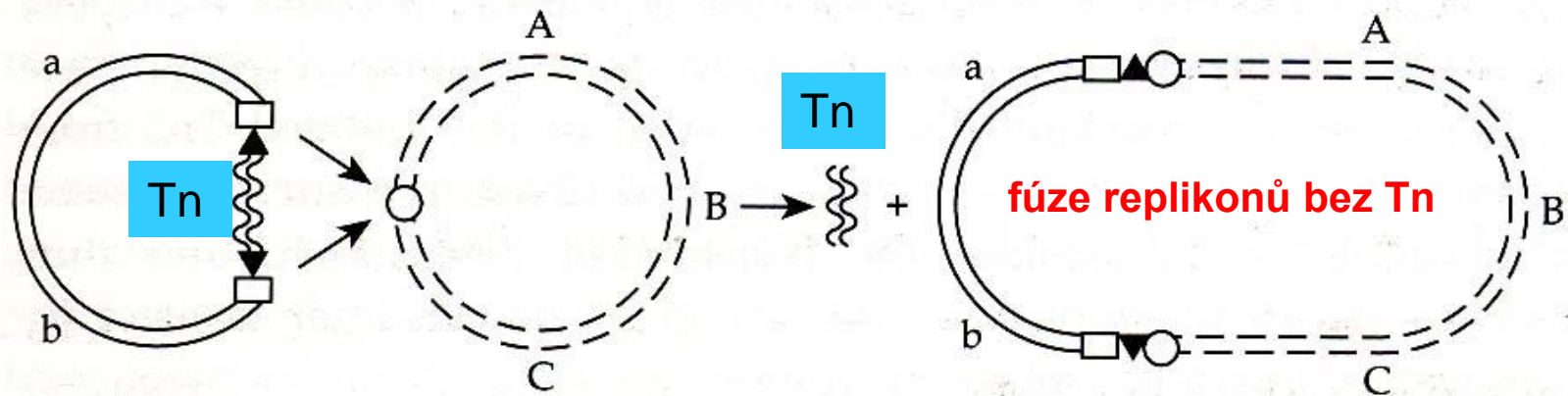


VZNIK DELECÍ A INVERZÍ PO TRANSPOZICI



Model vytváření delecí a inverzí. Do cílové sekvence může být transpozon začleněn v orientaci I (vznik delecce) nebo II (vznik inverze).

INVERZNÍ TRANSPOZICE

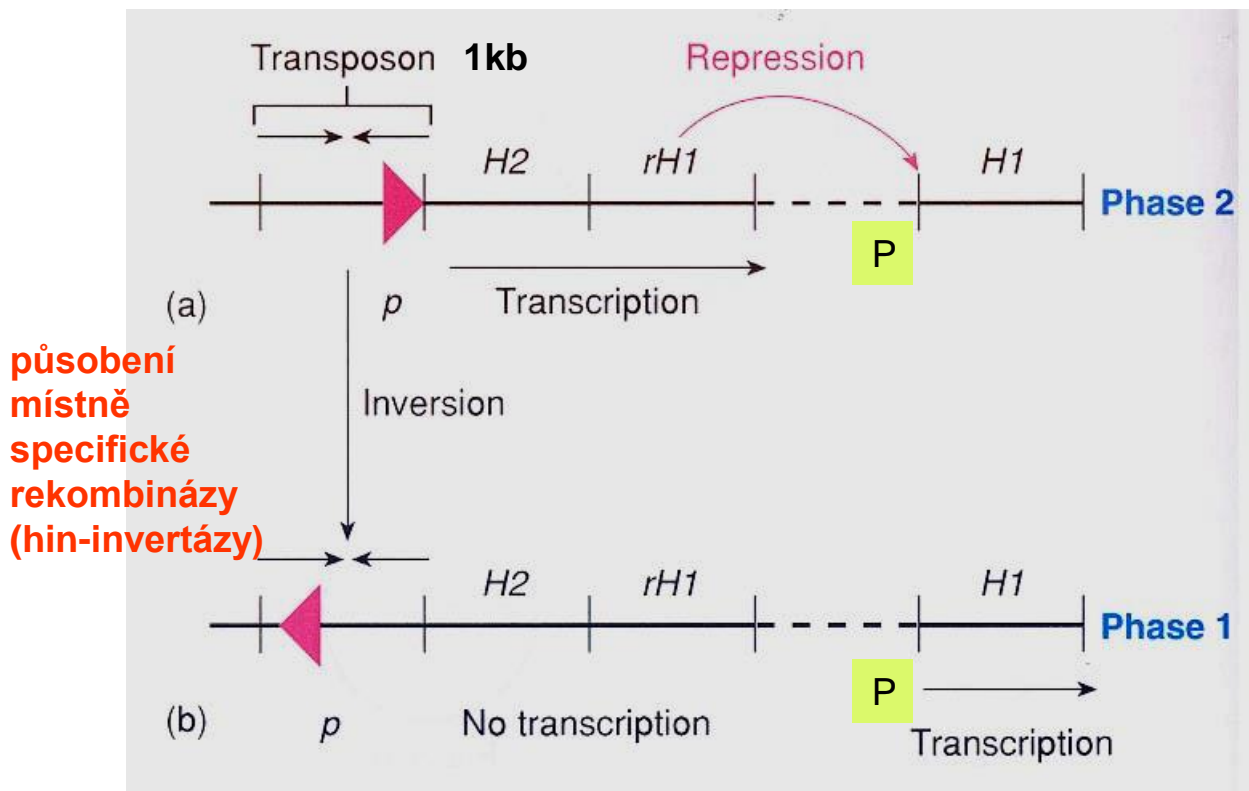


Key: □, ○ Target sites; ▲ IR

Inverzní transpozice: do cílového replikonu se vloží replikon nesoucí transpozon, nikoliv transpozon sám

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

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



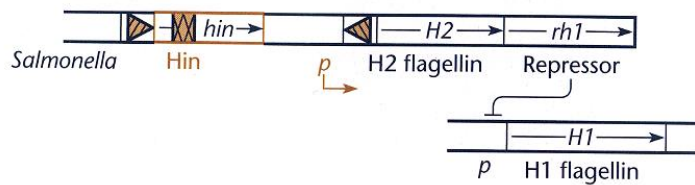
Z promotoru *p* je exprimován *H2* a *rH1*, je tvořen *H2*, exprese *H1* je potlačena

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

P – promotor genu H1

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

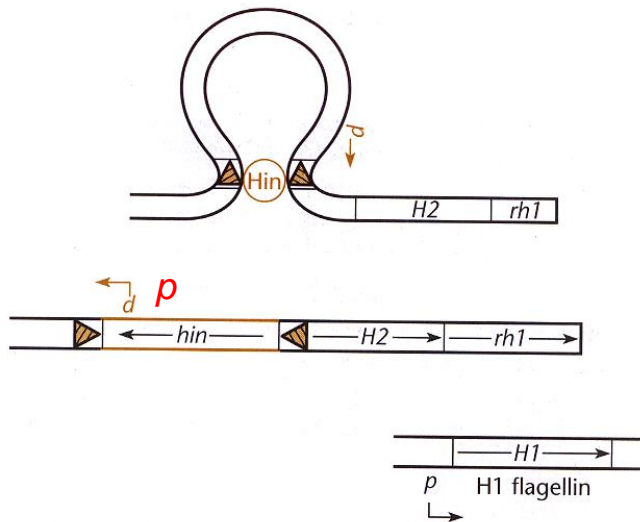
A



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

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 aj. je známa imunita k transpozici podmíněná přítomností sekvencí IR
 - v blízkosti transpozonu nedochází k začlenění jeho další kopie (100 000 bp, i celý replikon)

Příčiny nízké FREKVENCE TRANSPOZICE

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

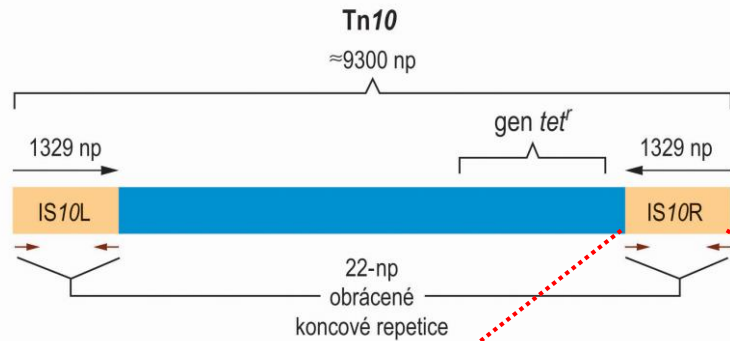
Transpoziční imunita

Některé transpozony se netransponují poblíž místa, kde už nějaký transpozon je. Jev je znám jen u některých transpozonů. Imunita zabraňuje, aby se transpozon začlenil sám do sebe nebo vedle sebe. Jev je znám jen u některých transpozonů (MU, Tn7 a Tn3), ne u většiny IS. Může působit i na vzdálenost 100 000 bp.

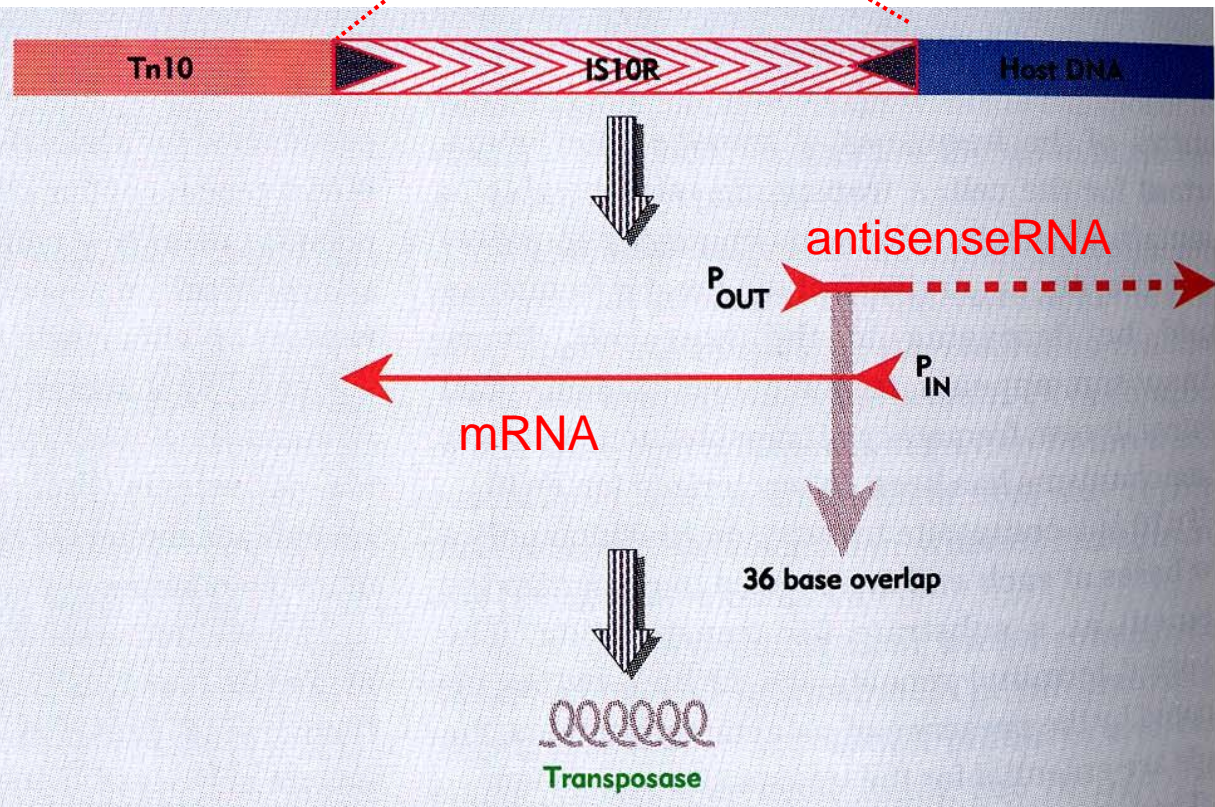
Příčina imunity není známa. U fága Mu, kde je nejvíc poznatků, přítomnost MuB vázaného na konce prvního Mu elementu, může preferenčně vázat MuA, a tento úbytek snižuje jeho potřebné množství pro začlenění do jiného sousedního místa.

.

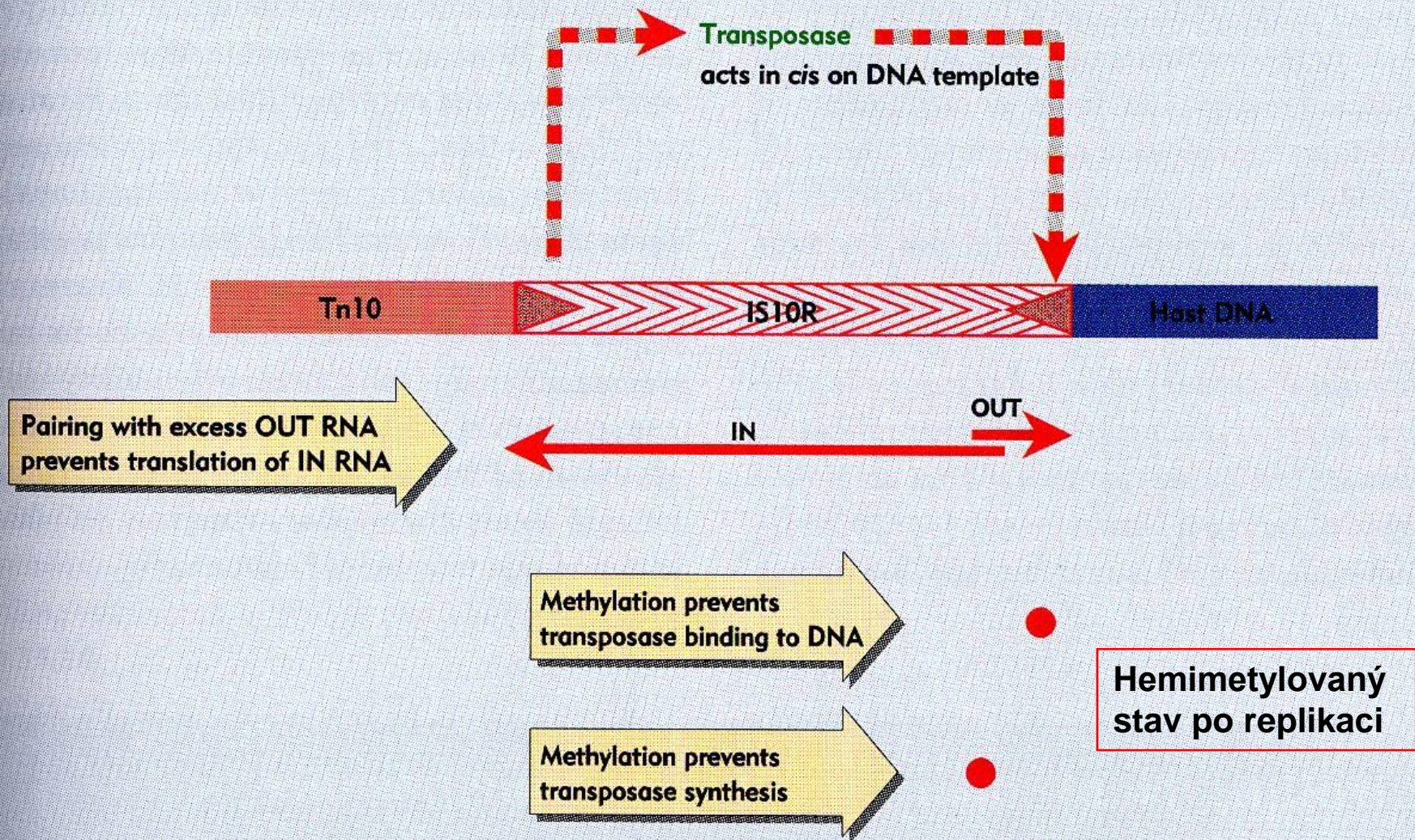
REGULACE TRANSPOZICE Tn10



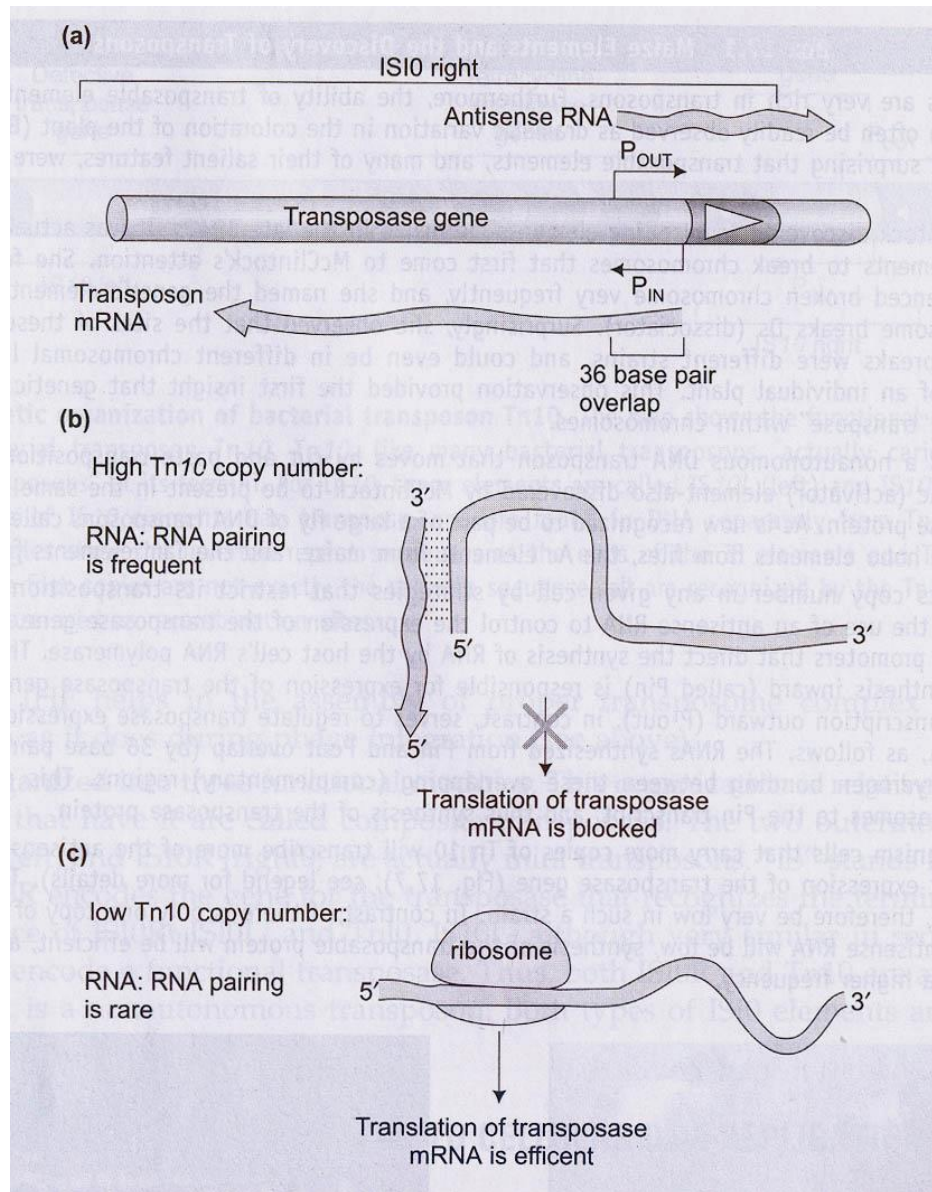
Na koncích IR10R se nacházejí dva promotory s opačnou orientací. Silnější promotor P_{OUT} zajišťuje transkripci pokračující do přiléhající hostitelské DNA. Slabší promotor P_{IN} zahajuje transkripci oblasti kódující transponázu. Transkripty (RNA) OUT a In mají přesah 40 bází, kterým se mohou párovat, takže transponáza se nemůže vytvářet.



Frekvence transpozice je řízena několika mechanismy, které ovlivňují buď syntézu nebo funkci transponázy. Transpozici brání metylace cílových sekvencí v IR, proto k ní dochází jen krátce po replikaci. Pokud je přítomno více kopií Tn10, uplatňuje se cis-preference pro výběr cílové sekvence. Syntézu transponázy inhibuje párování molekul OUT a IN RNA.



Regulace transpozice Tn10 prostřednictvím antisense RNA



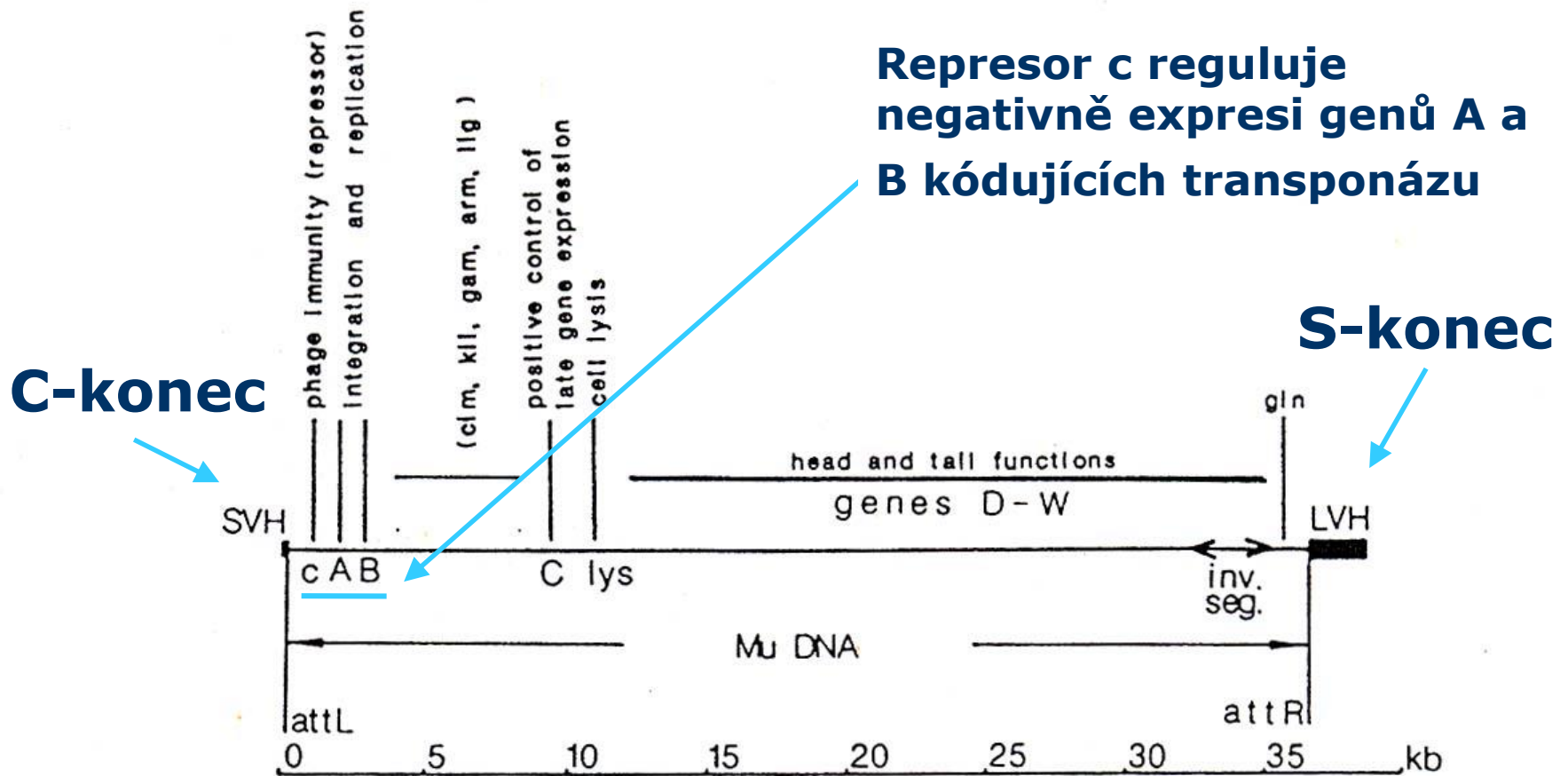
P_{IN} řídí transkripci transponázového genu,

P_{OUT} řídí transkripci antisense RNA, která je stabilnější než mRNA

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

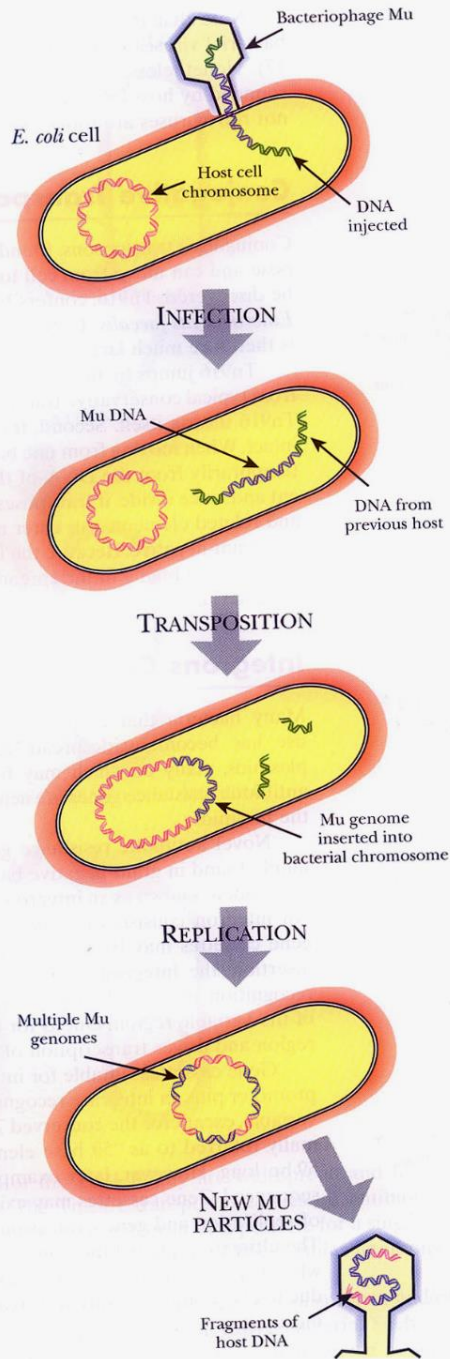
Při nízkém počtu kopií Tn10 dochází k párování antisenseRNA s mRNA jen vzácně a transpozice probíhá

GENOM BAKTERIOFÁGA Mu (dsDNA, 37 kb)



Protein A 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

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 : Conjugal transposon

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

ICE – integrative and conjugal elements –integrující se elementy

SXT – site-specific integrating elements

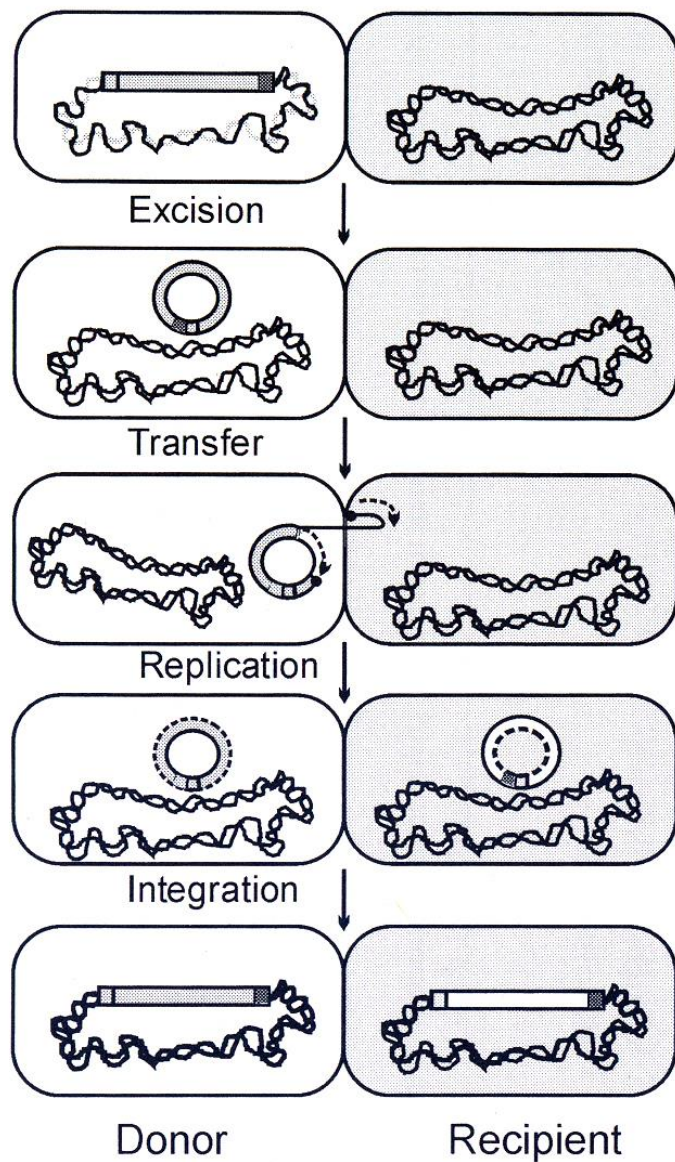
CTn – nesou geny kódující:

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 (<i>tyr/ser-int</i>) -excision (<i>xis</i>) ^b	Target site(s) (coupling seqs) ^c	Reference(s)
Conjugative transposons (CTns)						
CTnDOT	65.0	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>tetQ</i> , <i>ermF</i>	<i>tyr-int</i> ; <i>xis</i> and additional CTn gene products; tetracycline induced excision and transfer	GTAnnTTTGC (5 bp)	Cheng et al., 2001; Whittle et al., 2002
Tn916	18.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>tetM</i>	<i>tyr-int</i> family; <i>xis</i> ; tetracycline induced promoters for transfer genes	AT-rich sites (6 bp)	Clewell et al., 1995
Tn5252	47	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>cat</i> , SOS operon	<i>tyr-int</i> ; <i>xis</i>	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
CTn5397	20.658	<i>Clostridium difficile</i>	<i>tetM</i>	<i>ser-tndX</i> , for integration and excision; Tra products ~Tn916.	-GA-target (2 bp -GA-)	Roberts et al., 2001; Wang et al., 2000a
CTn5276	70	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>nisA</i> (nisin), <i>sacA</i> (sucrose-6-phosphate hydrolase)	<i>tyr-int</i> ; <i>xis</i>	TTTTTG between ends and in primary target site	Rauch and de Vos, 1994
Site-specific CTns						
CTn-ICESt1	34.734	<i>Streptococcus thermophilus</i> not shown to transfer yet	Type II restriction system Φ ST84 resistance	<i>tyr-int</i> ; <i>xis</i>	27-bp 3' end of <i>fda</i> (fructose-1, 6-diphosphate aldolase)	Burrus et al., 2002b
SXT	99.483	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>sul II</i> , <i>dhf18</i> , <i>strAB</i>	<i>tyr-int</i> ; <i>xis</i>	17-bp 5' end of <i>pfC</i>	Hochhut et al., 1997
CTnR391 (IncJ)	88.532	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>mer</i> operon (Hg), <i>aph</i> (Km), <i>rumAB</i> (UV sensitivity)			Beaber et al., 2002

PRŮBĚH PŘENOSU KONJUGATIVNÍCH TRANSPOZONŮ

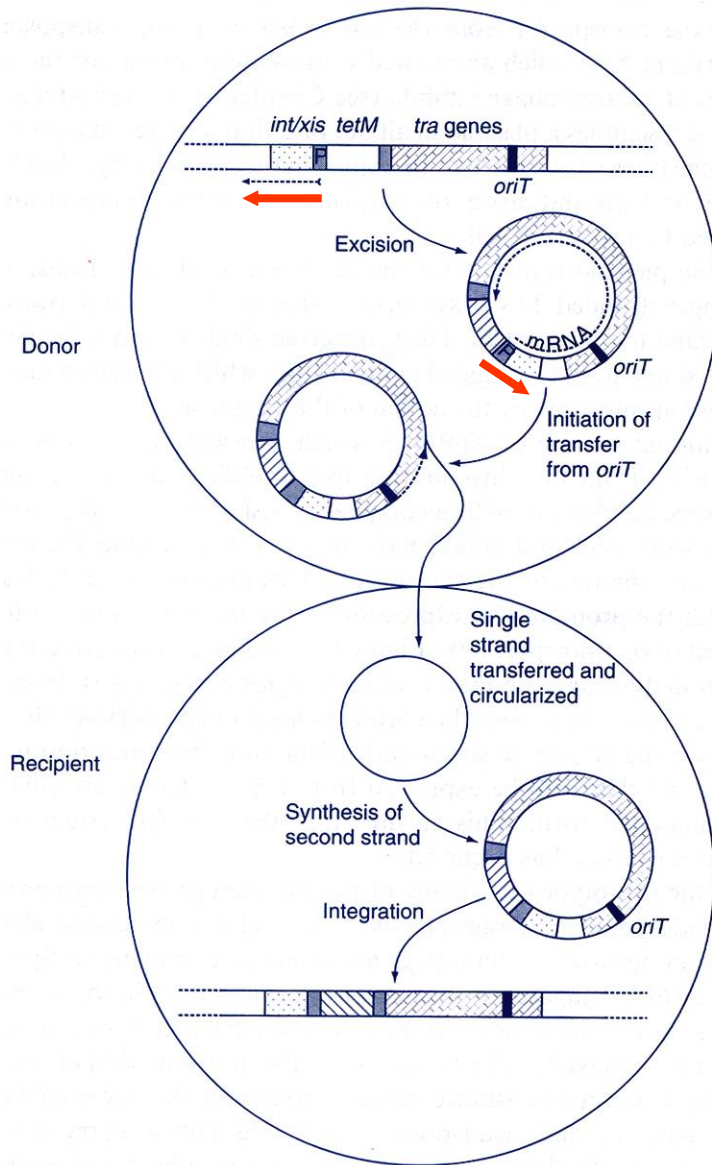


Transpozon začleněný do chromozomu se vyčlení a vytvoří kružnicový intermediát.

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



Transpozón je vyčleněn z chromozomu pomocí enzymů Int a Xis a je cirkularizován.

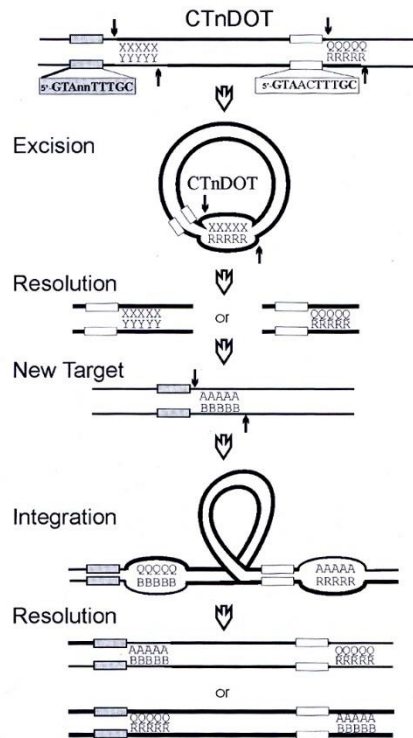
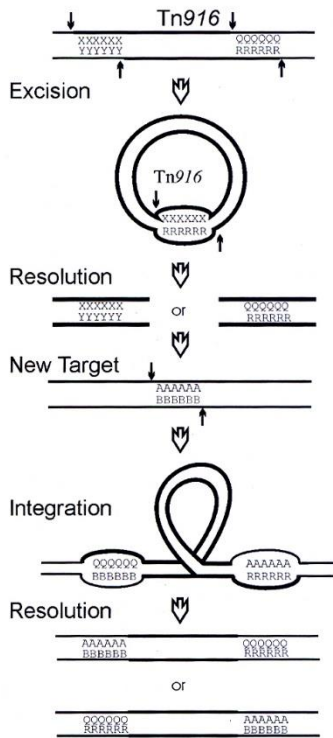
Cirkularizace umožní expresi genů *tra* z promotoru P ←

Z místa *oriT* je zahájen přenos DNA ve formě jednořetězce.

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

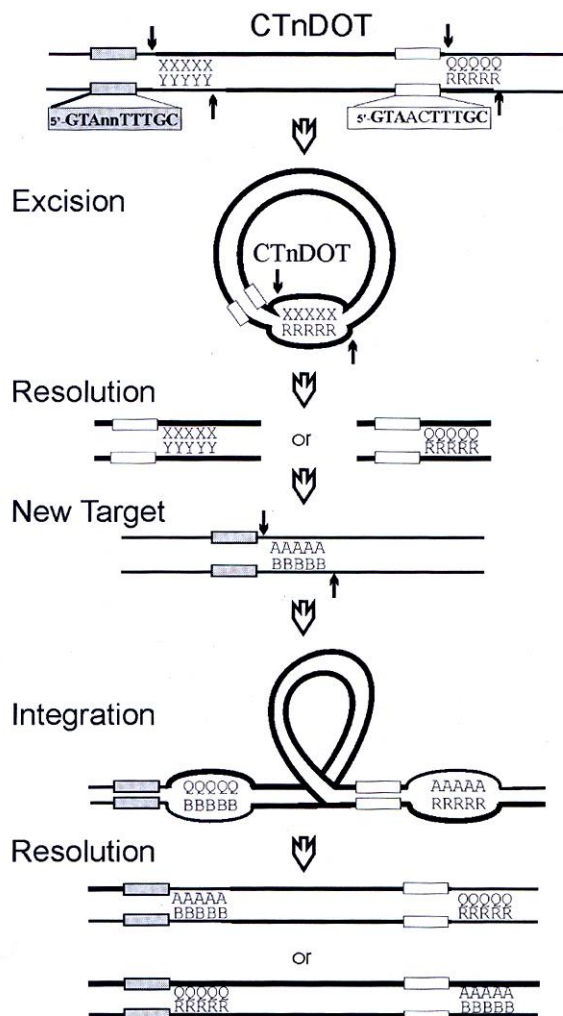
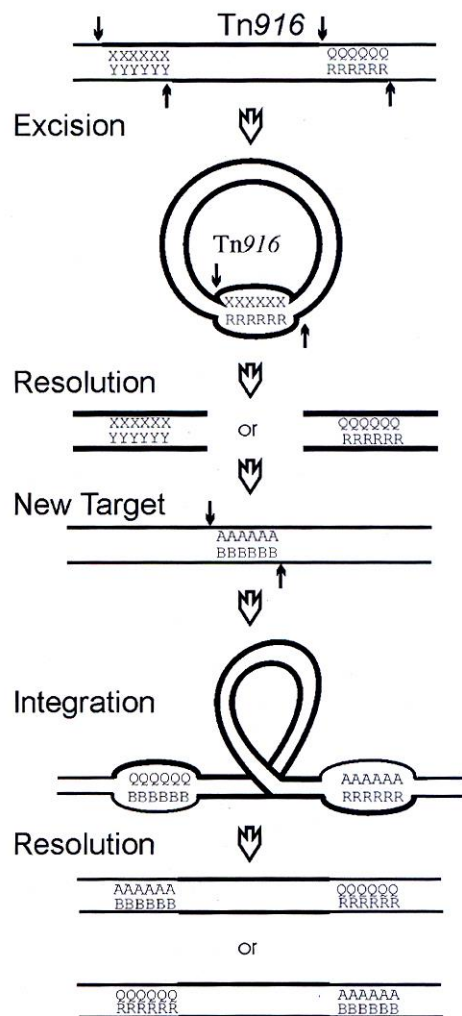
transpozony typu Tn916 mají široké rozmezí hostitelů – gen *tetR* je rozšířen u mnoha bakterií

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 spojovací 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

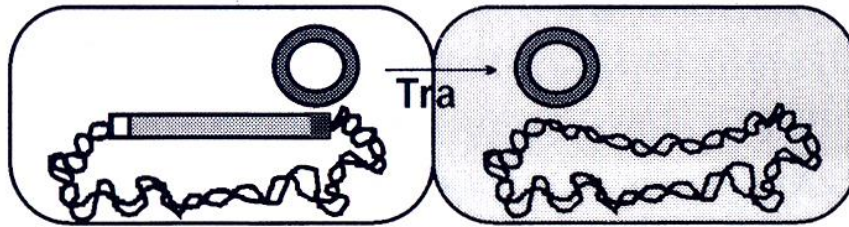


Spojovací chromozomové sekvence (XXX/YYY nebo QQQ/RRR jsou původně vzájemně komplementární).

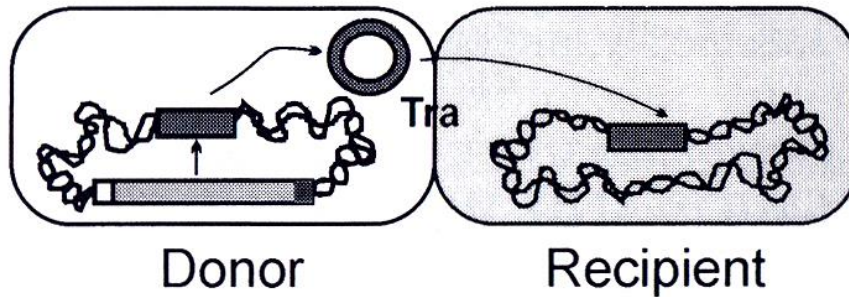
Šipky naznačují místa vzniku posunutých zlomů před excizí nebo před integrací

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

Mobilization of co-resident plasmids *in trans*



Excision and mobilization of MTns



Mobilizovatelný rezidentní plasmid 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*.

