



UPPSALA  
UNIVERSITET

Med hopp om framtiden

Transposoner, reglering och påverkan på genom

Jessica Bergman

---

Independent Project in Biology

Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2008

Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

## Sammandrag

Transposoner är en typ av mobila genetiska element, DNA som kan flytta sig själv. Det finns olika typer av transposoner som är uppbyggda på lite olika sätt, men gemensamt för alla är att de kodar för enzymet transposas. Transposas klipper ut transposonen från donator-DNA och klistrar in den i mål-DNA genom sekvensspecifik rekombination. De allra enklaste transposonerna kallas infogningssekvenser (IS-element) och innehåller bara information nödvändig för transponering.

Transposonen Tn3 är ett exempel på ett mer komplext IS-element och bär på fler gener. Två närliggande IS-element kan ta med sig den genetiska informationen mellan sig vid transponering och resultatet kallas då en sammansatt transposon. Den mest studerade sammansatta transposonen kallas Tn10, och används ofta på lab för att ge bakterier tetracyklinresistens. Transposoner i bakterier kan hoppa på två sätt, antingen replikativt (kopiera – klistra in) eller icke-replikativt (klipp ut – klistra in).

Icke-replikativ transponering hos Tn10 startar med att Tn10 och flankerande värd-DNA ordnas i ett komplex med transposas som klipper ut Tn10 och värdproteinet IHF (insertion host factor, värdprotein för infogning). Komplexet kallas transpososom och måste veckas upp korrekt med hjälp av H-NS (histoniskt nukleoidstrukturerande protein), ytterligare ett värdprotein, för att transposaset ska kunna rekombinera in Tn10 i en ny del av värdgenomet.

Tn3 transponerar replikativt, vilket innebär att replikonet (en plasmid eller kromosom) med Tn3 fuserar med ett annat replikon samtidigt som Tn3 replikeras. Detta mellansteg kallas ko-integrat och delas upp i de två replikonen (nu med varsin Tn3) med hjälp av det transposonkodade enzymet resolvas. En plasmid som bär på en kopia av Tn3 är väldigt obenägen att ta upp ytterligare en kopia. Detta fenomen kallas transponeringsimmunitet.

Mobila genetiska element, t.ex. transposoner, bygger upp den horisontella genpoolen. Detta innebär bl.a. att gener för sjukdomsalstring kan spridas mellan bakterier av olika stammar och arter. I eukaryota system finns exempel på hur transposoner påskyndat evolutionära processer. Hos ryggradsdjur finns ett adaptivt immunförsvar där antikroppar med stor diversitet är viktiga. Mycket av denna diversitet uppnås genom en process som kallas V(D)J-rekombinering och sköts av enzymet RAG1 (rekombinationsaktiverande gen 1). Det har visat sig att den katalytiska delen av RAG1 är väldigt lik transposas från transposonfamiljen *Transib* i en del evertebrater. Om en gen är mobil eller inte beror på vilka element som ligger i närheten. Nya sammansatta transposoner kan bildas med gener som förut varit stabila i genomet. Eftersom evolutionen verkar på varje gen, de som medför positiva egenskaper selekteras för, kan alla gener betraktas som "själviska".

## Inledning

Transposoner upptäcktes av Barbara McClintock i början av 1950-talet när hon gjorde genetiska försök på majs (*Zea mays*). På den tiden var strukturen på DNA inte känd, och möjligheterna för molekylärbiologisk forskning skiljde sig mycket från idag. McClintock insåg att hennes majsplantor kunde mutera utan att de faktiska generna ändrade sekvens och förstod att det var genernas regleringsregioner som förändrats. Hon beskrev fenomenet som en kontroll påverkad av icke-geniska aktörer som bärs på kromosomerna: "...effected by nongenic agents carried in the chromosomes". (McClintock 1953) Dessa icke-geniska aktörer kom sedan att kallas transposoner.

En transposon är en bit DNA som kan flytta sig själv, ett så kallat mobilt genetiskt element. Alla transposoner innehåller genetisk information för enzymet transposas, som behövs för förflyttning av transposonen. Många transposoner innehåller dessutom andra gener, t.ex. för antibiotikaresistens.

Ett sätt att se på förhållandet mellan bakteriens stabila genom och transposonen är som förhållandet mellan två mutualistiska symbionter. Det finns en möjlighet för båda parter att tjäna på samexistensen; bakterien kan få gener för antibiotikaresistens och transposonen får en värd att föröka sig och leva i. Transposonen tjänar alltså på att inte hoppa för mycket eftersom det ökar risken för att döda värden, bakterien. Detta samspel är noggrant reglerat och regleringsmekanismerna skiljer sig något från varandra mellan transposonfamiljerna.

I uppsatsen kommer jag att fokusera på transposoner i bakterier. Förståelse för transposoner har fått stor praktisk betydelse för bakteriell genetik eftersom de ger en möjlighet att märka bakterier med antibiotikaresistens, och slå ut gener (om transposonen integreras i en gen). Transposoner är även intressanta eftersom de kan betraktas som "själviskt DNA", liknande virus.

## Uppbyggnad och transponering

### Infogningssekvenser och transposas

Den enklaste typen av transposon kallas infogningssekvenser (IS-element). Ett IS-element består av en gen för enzymet *transposas*, som på båda sidor är omgivet av rekombinations-säten. Dessa rekombinationssäten är likadana men omvända i förhållande till varandra, så kallade omvänt upprepade sekvenser (IR-sekvenser). IR-sekvensernas längd kan variera från ca tjugofem till ett par hundra baspar. Mer komplexa IS-element kan även bära andra gener än den för transposas. (Snyder och Champness 2007)

### Sammansatta transposoner

En infogningssekvens har alltså genen för transposas och IR-sekvenser. Om två infogningssekvenser ligger nära varandra i en bakteriekromosom kan transposaset från den ena interagera med de båda yttersta IR-sekvenserna. Effekten blir att hela biten DNA mellan de båda yttersta IR-sekvenserna rekombineras ut. De gener som sitter mellan infognings-sekvenserna flyttas alltså också. Biten DNA som hoppar kallas sammansatt transposon och innehåller alltså två IS-element med varsin transposasgen samt ett antal andra gener. (Snyder och Champness 2007)

Under evolutionens gång har flera sammansatta transposoner bildats. De extra generna är ofta gener för resistens mot antibiotika, vilket ger både transposonen och värdbakterien högre fitness eftersom medicinsk behandling med antibiotika ger ett hårt selektionstryck. Det är dock inte speciellt vanligt att sammansatta transposoner bildas, utan de som finns är väldefinierade och delas ofta in i olika familjer beroende på sekvenslikhet.

Transponering kan ske på två olika sätt, replikativt och icke-replikativt. Den replikativa mekanismen är vanligast och kan beskrivas som kopiera – klistra in och den icke-replikativa som klipp ut – klistra in.

#### *Överföring mellan bakterier*

En transposon kan alltså flytta sig mellan olika delar av genomet i en bakterie och replikeras tillsammans med bakteriens kromosom eller plasmider. På så vis överförs transposonen vertikalt. Transposoner kan också överföras horisontellt genom att följa med konjugativa plasmider. (Frost m.fl. 2005) Det finns också transposoner som kan överföra sig själva mellan två bakterier, så kallade konjugativa transposoner. (Saylers m.fl. 1995)

#### **Kan slå ut genuttryck – viktigt att reglera**

Om en transposon hoppar in i en gen kommer den genen inte att fungera normalt. Uttrycket kan tystas helt eller delvis. Detta är i många fall direkt dödligt för bakterien. Olika reglerings-system för transponering har dock utvecklats i bakterier. (Snyder och Champness 2007)

#### **Användning av transposoner på lab**

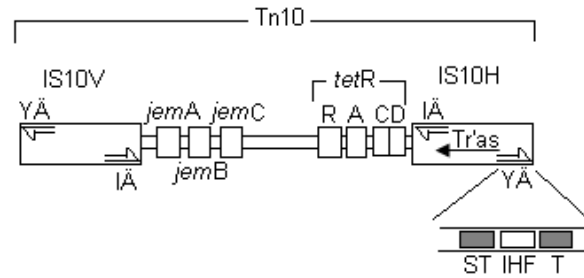
I laborativ mikrobiologi och genetik vill man ofta kunna märka bakterier, så att en viss mutation är kopplad till en antibiotikaresistent fenotyp. Ibland vill man också kunna slå ut hela gener. Med transposoner kan man göra båda dessa saker. Genom att se en ändrad fenotyp (förlust av genfunktion) och sedan kartlägga var transposonen hoppat in, kan man koppla fenotyp till genposition. (Snyder och Champness 2007) I och med ökade problem för hälso- och sjukvården med antibiotikaresistenta bakterier behöver dessa tekniker förnyas. Andra sätt för märkning, t.ex. substratanvändning, kan användas i stället och enkla system behöver utvecklas.

## **Bakterietransposon Tn10**

En sammansatt transposon som ofta används som modell är Tn10. Tn10 har totalt 9300 baspar och består av ett antal gener, bl.a. för tetracyklinresistens, flankerade av två IS10-element (figur 1). Ett IS10-element består av 1400 baspar. De båda IS10-elementen benämns som ”höger” (IS10H) och ”vänster” (IS10V). De är nästan helt identiska, men man har visat att IS10V kodar för ett inaktivt transposas, och alltså inte kan hoppa själv utan att IS10H är aktivt och hoppar samtidigt. (Foster m.fl. 1981) Transposoner kan som sagt ses som själviska genetiska element. En sammansatt transposon med gener för antibiotikaresistens ger högre fitness än ett IS-element. För att transposonen skulle kunna behålla genen för tetracyklinresistens antog Foster m.fl. (1981) att IS10V evolverat så att det inte kan hoppa själv utan är tvunget att hoppa tillsammans med IS10H. Då tar alltså transposonen med sig tetracyklinresistensen samtidigt.

De båda IS10-elementen har IR-sekvenser i sina yttre och inre ändar (YÄ och IÄ). En Tn10-transposon innehåller alltså totalt fyra IR-sekvenser, se figur 1. Varje IR-sekvens har tre regioner som är viktiga för transponeringen. Den mittersta binder värdproteinet IHF (insertion

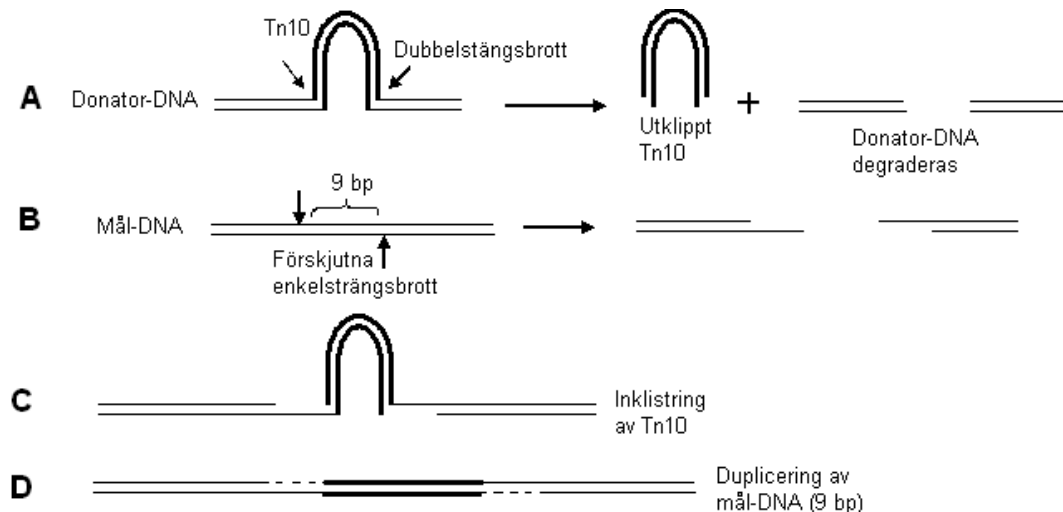
host factor, värdprotein för infogning) och de båda andra, den terminala och den subterminala, är viktiga för bildandet av en komplex DNA-proteinstruktur. Ward m.fl. (2007)



Figur 1. Strukturen hos den icke-replikativa sammansatta transposonen Tn10. Gener för tetracyklinresistens (*tetR*) och gener med okänd funktion (*jemaA*, *jemaB*, *jemaC*) omges av två IS10-element. IS10H har en gen för ett funktionellt transposas. I IS10-elementens yttre ändrar finns tre bindningsställen. T och ST (terminal och subterminal) kan bindas av transposas. IHF är bindningsstället för värdproteinet ”insertion host factor”. De inre och yttre ändarna av IS10 (IÄ och YÖ) är omvänt uppretrade sekvenser. (Efter Ward m.fl. 2007)

### Transponeringsmekanism

I transposonfamiljen Tn10 sker transponering icke-replikativt (Bender och Kleckner 1986) och har grovt sett fyra faser. Först bildas en ordnad komplex struktur av DNA (transposonen och flankerande värd-DNA) och protein, bl.a. transposas. Komplexet kallas *transpososom*. Därefter katalyserar transposaset dubbelsträngsbrott på båda sidor av transposonen så att bara transposon-DNA blir kvar i transpososomen. I nästa steg binder transposonens yttre ändrar till mål-DNA och rekombineras in. Detta sker genom enstegstransesterifiering som reparerar brotten på ena DNA-strängen, på båda sidor om transposonen. Slutligen fylls brotten på de andra strängarna igen av DNA-syntas och ligas. (Haniford 2006) Tn10 känner igen en sekvens som den oftast transponerar till, NGCTNAGCN. Det är alltså en symmetrisk sekvens med sex bestämda baser och tre, de flankerande och det mittersta, obestämda. Hela denna sekvens (nio baser) dupliceras vid transponering. (Halling och Kleckner 1982)



Figur 2. Transponering av Tn10. (Efter Halling och Kleckner 1982 och Snyder och Champness 2007.)

- Tn10 är veckat i transpososomen och transposas klyver ut Tn10 med dubbelsträngsbrott. Donator-DNA:t bryts ned.
- Transposas katalyserar även enkelsträngsbrott i mål-DNA. Enkelsträngade överhäng (om nio baser) bildas.
- Tn10 klistras in i mål-DNA:t, en sträng per sida.
- De hål som bildats fylls igen genom att överhängen kopieras. Resultatet blir att nio bp på varje sida Tn10 dupliceras.

### **Transpososomen och reglering**

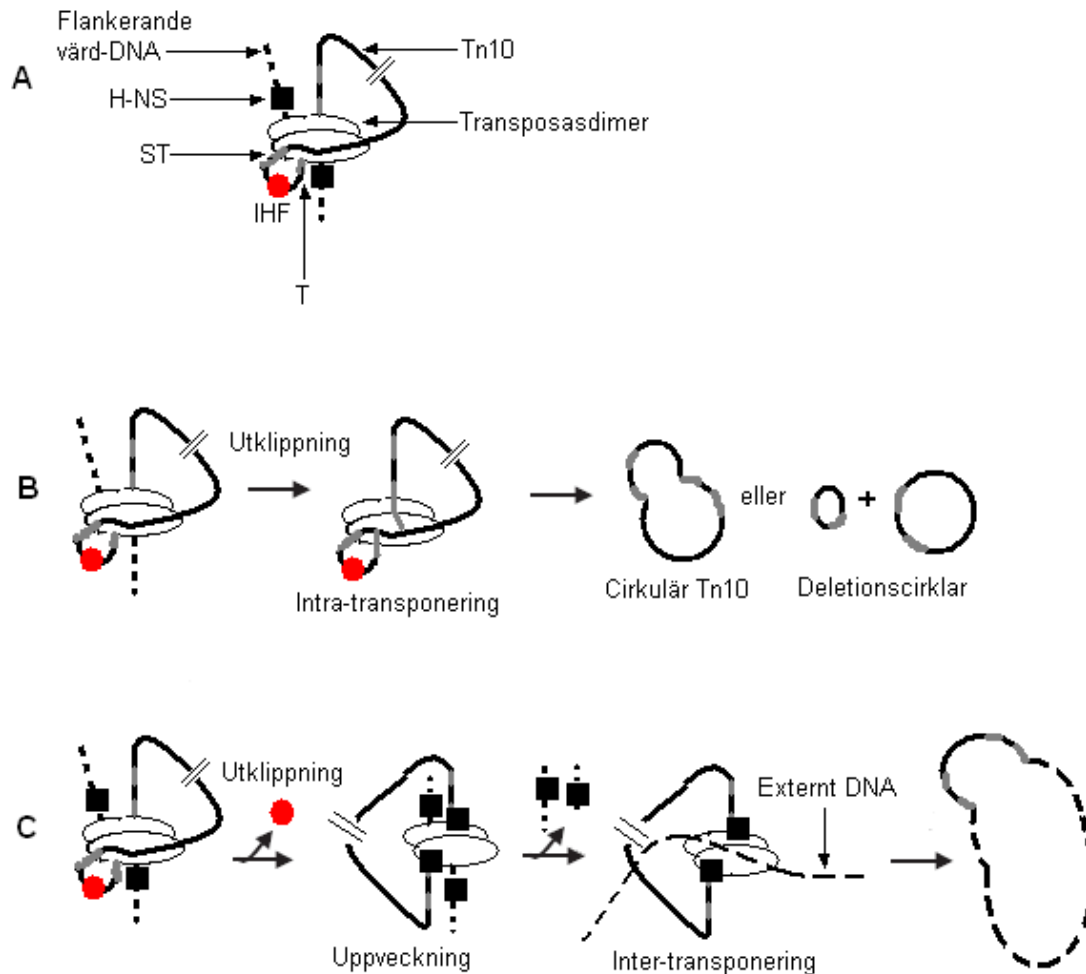
Som en förberedelse för transponering blir Tn10 involverat i en ordnad veckning av transposon-DNA och proteiner. Denna struktur kallas alltså transpososom (jämför splitsosom, som också är ett komplex av proteiner och DNA). En veckad transpososom består av proteinerna transposas (kodat från transposonen) och IHF (kodad från värdgenomet) med Tn10 och flankerande värd-DNA vikt runt proteinerna, se figur 3. Den veckade transpososomen, med bunden IHF, är inaktiv, d.v.s. transposonen kan inte hoppa. (Wardle 2005)

I gramnegativa bakterier finns en global regulator som kallas histonlikt nukleoid-strukturerande protein (H-NS). H-NS kodas från bakteriens genom och kan binda DNA. Genom att binda till olika geners promotorer fungerar H-NS som en transkriptionsregulator. Många gener kan tystas av H-NS, men transposonen Tn10 blir mer aktiv under påverkan av H-NS. (Ward m.fl. 2007)

Sakai m.fl. (1995) har visat att IHF binder specifikt till de yttre ändarna av IS10, vilket är nödvändigt för att dessa ska inordna sig korrekt i transpososomkomplexet. Om H-NS binder till det flankerande DNA:t induceras uppveckning av transpososomen och komplexet släpper IHF (fig. 2). (Ward m.fl. 2007) För korrekt transponering behövs alltså först ett ordnat veckande av transpososomen (med IHF) och sedan ett ordnat uppveckande (med H-NS).

När transpososomen veckas upp får Tn10 möjlighet att komma i kontakt med och interagera med DNA som inte ingår i transpososomen. Detta, tillsammans med närvaro av transposas, möjliggör intermolekylär transponering. Man har visat att frånvaro av H-NS ger senare och svagare uttryck av överförda gener, något som tolkats som sämre möjligheter till transponering. Själva klipningen påverkas dock inte av H-NS, då den katalyseras av transposas. (Wardle m.fl. 2005)

Intermolekylär transponering innebär en faktisk förflyttning av Tn10 till en annan del av genomet, antingen i kromosomen eller till en plasmid. Motsatsen till detta är intramolekylär transponering, vilket innebär att en transposon infogas på samma plats som den klipptes ut ifrån, eller i sig själv. Resultatet blir då antingen en cirkel av hela Tn10, eller två så kallade deletionscirkel med varsin bit av Tn10 på. (Singh m.fl. 2008) Intramolekylär transponering är genetikens motsvarighet till ”mycket väsen för ingenting”, d.v.s. det kostar energi men inga nya fördelar uppnås vare sig för transposonen eller för värden. Det är rimligt att anta att det är för att förhindra en sådan ofruktbar och energikrävande process som värdprotein H-NS är nödvändigt för uppveckning av transpososomen. Det är också intressant att IHF, också ett värdprotein, främjar intramolekylär transponering, genom att hålla ihop transpososomen. De båda värdproteinerna H-NS och IHF har alltså motsatta roller och genom att kontrollera de relativa koncentrationerna av dem kan bakterien till viss del styra transponeringsfrekvensen. Det är möjligt att IHF dominerar i bakterier som växer och mår bra, där transponering skulle innebära för stora risker, och H-NS i stressade bakterier där transponeringens risker är värda att jämföras med möjligheter till nya fördelar.



Figur 3. Reglering av intra- eller intermolekylär transponering i transpososomen.

A) Komponenter i den helt veckade transpososomen visas.

B) I utgångsläget är Tn10 (heldragna linjer) och kringliggande värd-DNA (streckade linjer) veckade runt en transposasdimmer (ofyllda ovaler). IHF (fylld cirkel) har bundit till ett av IS10-elementen och både T och ST kan interagera med transposas. Om utklippning sker i detta läge kommer transposonens båda ytterändar att infogas vid en målsekvens i transposonen. Resultatet blir intramolekylär transponering vilket leder till en cirkulär Tn10 eller två så kallade deletionscirklar.

C) Transpososomen är veckad på samma sätt som i A. H-NS (svarta kvadrater) kan binda det omkringliggande DNA:t. Detta initierar uppveckning av transpososomen och IHF lämnar komplexet. I den uppvecklade transpososomen binder ytterligare två molekyler H-NS till T-sätena och utklippning från omkringliggande DNA sker. Transposonens yttre ändar kan nu få kontakt med externt DNA (streckat), vilket resulterar i intermolekylär transponering. (Efter Ward m.fl. 2007 och Singh m.fl. 2008.)

### Tn10 kan bara hoppa om DNA är hemimetylerat

I *Escherichia coli* metylerar enzymet Dam adenin när det förekommer i sekvensen GATC. Eftersom metylering inte sker omedelbart efter DNA-replikation är nyreplikerat DNA hemimetylerat en kort tid. Detta utnyttjas av bakterien bl.a. för att skilja det gamla och den nya strängen åt vid korrekturläsning efter replikation. Metyleringen av GATC-adenin används också som en metod för *E. coli* att minska aktiviteten hos IS10. I *dam*-mutanter som inte kan metylera sina adeningrupper har man sett en kraftigt ökad transponeringsfrekvens för IS10. Roberts m.fl. (1985) gjorde försök med *dam*-mutanter som man överförde en metylerad DNA-sträng till. I bakterierna blev dessa hopparade med ometylerade strängar och resultatet

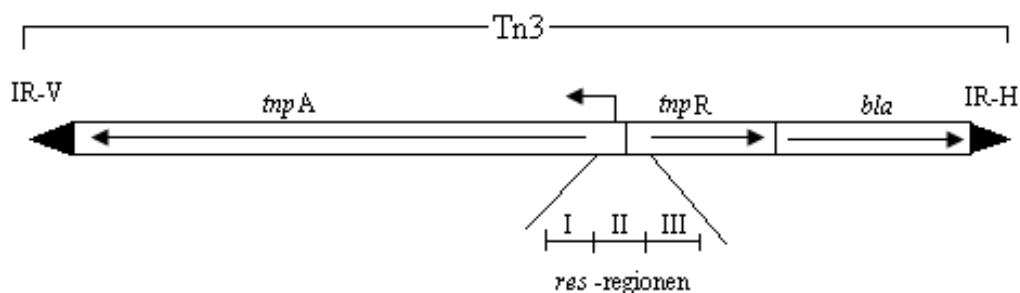
blev en hemimetylerad dubbelhelix. De såg då att frekvensen för transponering var ännu högre än i bakterier med enbart ometylerat DNA. (Roberts m.fl. 1985)

I IS-10 finns två GATC-sekvenser. Den ena ligger i promotorregionen för transposasgenen och den andra ligger nära den inre änden av IS10, där transposas binder för att initiera transponering. För att transponering ska kunna ske måste transposas både bildas och kunna binda till änden på IS10. Detta kräver att både promotorn och bindningsstället är aktiva, alltså hemimetylerade, samtidigt. Just efter att replikationsgaffeln har passerat är detta fallet för båda sekvenserna. Detta anser man vara ett exempel på hur Tn10 kan kontrollera sin transponering genom att samordna och koncentrera den. (Roberts m.fl. 1985)

Detta kan också ses som sätt för bakterien att kontrollera transponeringsfrekvensen. Att transposaspromotorn är mindre aktiv i fullt metylerat tillstånd skulle eventuellt kunna bero på att värdkontrollerade transkriptionsfaktorer binder sämre. Metylgruppen kan möjligen vara ett steriskt eller elektrostarkt hinder för effektiv bindning.

### Bakterietransposon Tn3

Transposonen Tn3 kan beskrivas som ett långt IS-element, se figur 4. Mellan IR-sekvenserna finns tre gener: två för transponering och en för ett  $\beta$ -laktamas som ger ampicillinresistens. I Tn3 finns även sekvenser (i IR-sekvenserna och *res*-regionen) där protein som reglerar transponeringen kan binda (Heffron m.fl. 1979).



Figur 4. Schematisk struktur av den replikativa transposonen Tn3. *mpA* och *mpR* kodar för transposas respektive resolvas. I en region med 120 bp som överlappar genernas start finns tre rekombinationsställen, I-III. Det första (I) ligger inom promotorregionen för *mpA*. *bla* kodar för ett  $\beta$ -laktamas. De tre generna flankeras av två omvänt upprepade sekvenser, IR-V och IR-H. (Efter Heffron m.fl. 1979 och Kitts m.fl. 1983.)

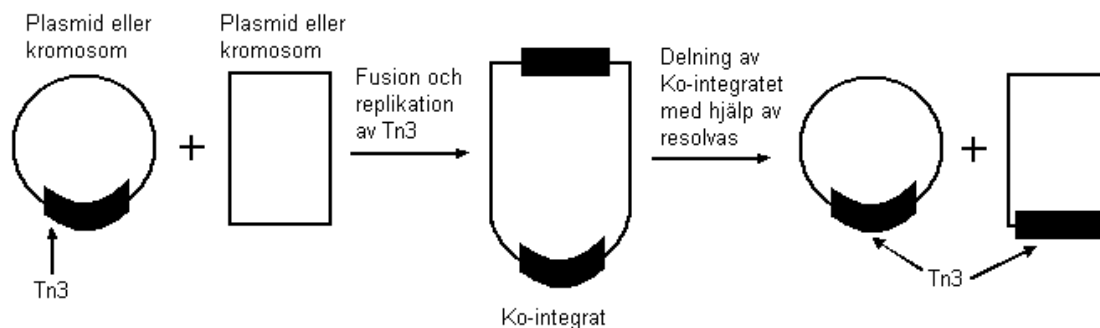
### Transponeringsmekanism

Transposoner i Tn3-familjen m.fl. transponerar replikativt. Som tidigare nämnts har Tn3 två gener för transponeringsprotein. *mpA* kodar för transposas som står för själva utklippningen, och *mpR* för resolvas som behövs för att avsluta transponeringsprocessen. Vid transponering bildar transposonen en hårnålsstruktur och det sker enkelsträngsbrott så att fria 3'-ändar bildas. Ändarna överkorsas och replikeras av DNA-polymeras (3'  $\rightarrow$  5'). (Lett 1988, Snyder och Champness 2007)

Själva transponeringen sker i två steg. Först binder transposas till IR-sekvenserna. Utan korrekta IR-sekvenser kan transponering inte ske (Heffron m.fl. 1977). Transposaset får IR-sekvenserna att interagera med sekvensspecifikt DNA på ett annat replikon (t.ex. en



plasmid) och ett intermediärt ko-integrat bildas, se figur 5. Steg två är delning av ko-integratet. Genen *tnpR* kodar alltså för resolvas, ett sekvensspecifikt rekombinationsenzym. Resolvas binder till DNA vid *res*-regionen mellan *tnpA* och *tnpR* på de båda transposonerna och katalyserar rekombination mellan de båda *res*-regionerna. Detta leder till att ko-integratet delas till de två replikonen igen, nu med varsin kopia av Tn3. (Kitts m.fl. 1983)



Figur 5. Replikativ transponering av Tn3 via ett ko-integrat. (Efter Arthur m.fl. 1984.)

### Tn3 kan reglera sig själv

Eftersom replikativt transponerande transposoner, som de i Tn3-familjen, inte klipps ut på samma sätt som de icke replikativa ingår inte transpososomen som något mellansteg i Tn3-transponering. Därför kan inte IHF och H-NS reglera Tn3. Istället sker en stor del av regleringen genom kontroll av uttrycket av *transposas* och *resolvas*, som båda kodas för inom transposonen. Mellan dessa gener finns alltså *res*-regionen, som är 120 baspar lång. Man har funnit att en *res*-region består av tre rekombinationsställen, och att det till vart och ett av dem kan binda en resolvasmolekyl. I delningen av ko-integratet är det därmed sex resolvasmolekyler inblandade. (Kitts m.fl.1983)

Promotorn för *tnpA* ligger i *res*-sekvens I och när *resolvas* binder där under transponering tystas uttrycket av *transposas*. (Heffron m.fl. 1979) Detta är styrt av Tn3 själv och det är ju så att när *resolvas* binder *res*-regionen är transponeringsprocessen redan halvvägs och nytt *transposas* behöver inte längre bildas. Man kan diskutera varför en transposon, som är en bit självskt DNA, skulle "bry sig om" eventuella energiförluster för värdcellen, men då får man tänka på mutualismen mellan transposon och värdcell som nämndes tidigare. Om bakterien dör förlorar även transposonen.

### Tn3 och transponeringsimmunitet

Sedan 1970-talet har mycket forskning gjorts på olika transposoner för att förstå hur de fungerar, när de hoppar och hur transponering regleras. För Tn3 har man funnit att det endast är IR-sekvenserna som är nödvändiga för att Tn3 ska kunna transponera. Om *transposas* tillsätts utifrån (i *trans*) kan en modifierad Tn3 transponera i princip lika bra som en vildtyp, så länge som den modifierade har IR-sekvenser på båda sidor. (Arthur m.fl. 1984)

En annan forskargrupp hade sett att om en plasmid innehöll Tn3 var frekvensen för upptag av en annan kopia av Tn3 mycket lägre än för plasmider utan Tn3. Fenomenet kallas transponeringsimmunitet. Immuniteten gäller dock bara för varje enskild plasmid och kromosom; om en bakterie innehåller flera likadana plasmider kan alla ta upp varsin kopia av Tn3. (Robinson m.fl. 1977) När man insett att det är IR-sekvenserna som är kritiska för

transponering ville man testa om dessa även ingick i transponeringsimmuniteten och i så fall hur.

Wiater och Grindley (1990) undersökte transposonen  $\gamma\delta$  i Tn3-familjen. De fann att om transposas finns bundet till en sekvens på ett replikon (en plasmid eller kromosom) ger detta immunitet. Eftersom transposas och bindningssekvens är specifika för varje transposon betyder närvaro av transposas att replikonet redan innehåller den specifika transposonen. De la fram en hypotes om att transposas bundet till målreplikonet interagerar med transposas som är i komplex med den invaderande transposonen. Själva mekanismen var inte känd, de man antog att det var denna interaktion som ledde till att transponeringen avbröts.

En japansk forskargrupp (Maekawa m.fl. 1996) har visat att transposas binder den inre delarna av IR-sekvenserna, de så kallade B-domänerna. De bekräftade att transposas bundet till B-domänerna i Tn3 gav immunitet till replikonet och utvecklade också Wiaters och Grindleys teori om transposas – transposasinteraktion. Den Tn3-transposon som ska transponera har transposas bundet till IR-sekvenserna och kan bilda ett synaptiskt komplex med mål-DNA. När de båda transposonernas transposasmolekyler interagerar med varandra kommer det synaptiska komplexet istället att omvandlas till ett annat, inaktivt, komplex och transponeringsprocessen kan inte slutföras.

Så vitt man vet är det alltså bara transposonkodade proteiner som deltar i immuniteten, men processen är inte helt klarlagd ännu. Eftersom värd-DNA alltid är närvarande och viktigt för det synaptiska komplexet är det inte helt otroligt att transponeringsimmunitet delvis är reglerad av värden, som en metod att minimera risken för mutationer genom transponering. Med två likadana transposoner på samma replikon finns en risk att transposas verkar på IRV på ena transposonen och på IRH på den andra och klipper ut hela biten DNA emellan. Detta skulle leda till förlust av gener för bakterien och bildande av en sammansatt transposon.

## **Transposoner och påverkan på eukaryota system**

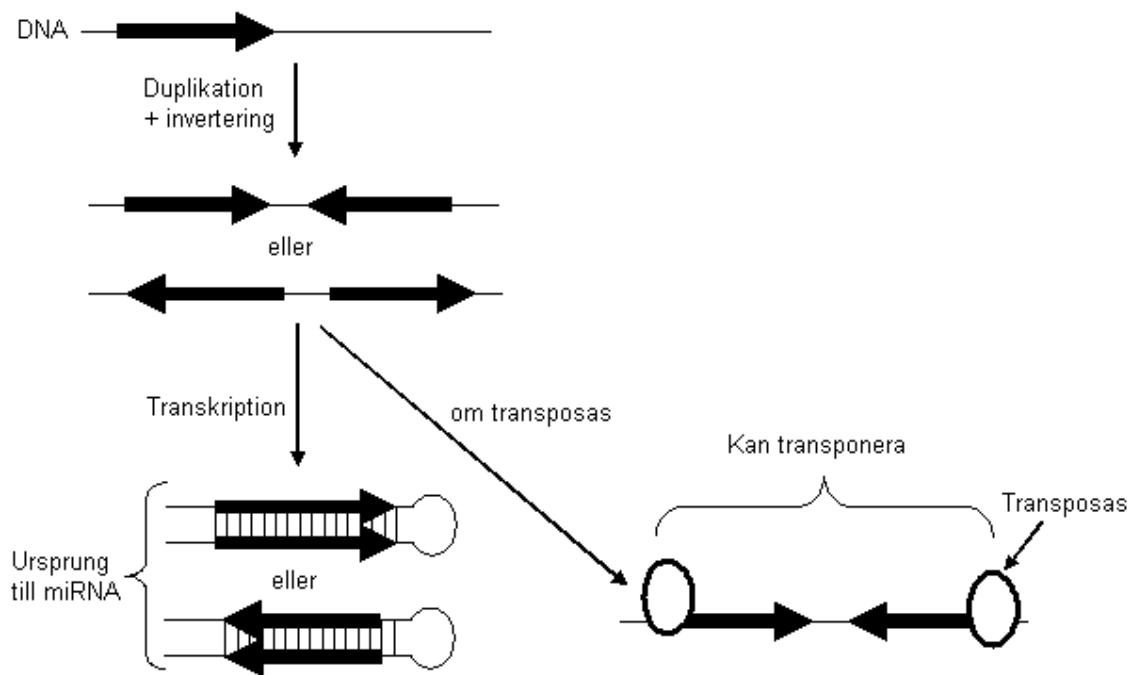
Hittills har jag fokuserat på transposoner i bakterier eftersom det är väl studerade system för reglering, och det är relativt enkelt att se kopplingen genotyp-fenotyp i ett bakteriellt system. Det har även gjorts mycket forskning på transposoner i eukaryoter. Några av de mer intressanta exemplen kommer från tillfällen där transposoner har inordnats så fullständigt i värden att de utvecklats till helt nya funktioner. MikroRNA och ett rekombinationsenzym involverat i mognad av antikroppar är exempel på detta. Ursprunget till sådana fenomen måste vara transposoner som förlorat förmågan att hoppa, t.ex. genom mutationer i transposaset. Att de nya, ofta ganska komplexa, funktionerna hos värden inte utvecklats från grunden är ett exempel på hur horisontell genöverföring kan öka evolutionshastigheten.

### **RNA-interferens**

Man har funnit att de flesta organismer använder RNA för att reglera gener. Hos eukaryoter finns ett system som kallas RNA-interferens som går ut på att korta bitar RNA hämmar translation av gener. Detta sker via ett komplex som kallas RISC (RNA-inducerat tystningskomplex). RISC innehåller flera typer av enzymer, bl.a. Dicer och en grupp som kallas Argonaut-enzym. Argonaut 4 (Argo4) kan binda små RNA-molekyler och metyltera DNA, vilket är viktigt för att reglera transponering. (Qi m.fl. 2006)

Det har även diskuterats om mikroRNA (miRNA) som ingår i RNA-interferens kan ha utvecklats ifrån transposoner. På kromosom 19 hos människor ligger gener för flera miRNA blandade bland Alu-transposoner, en vanlig transposonfamilj som förlorat förmågan att hoppa. Tidigare har man trott att miRNA alltid syntetiseras av RNA-polymeras II, och Alu av RNA-polymeras III. År 2006 visade Borchert m.fl. att gener för miRNA kan transkriberas av polymeras III. Om Alu är ursprunget till miRNA är svårt att säga, men användandet av samma polymeras, tillsammans med det faktum att Alu-sekvenser kan fungera som promotorer för gener för miRNA, visar på en koppling mellan miRNA och transposoner. (Borchert m.fl. 2006)

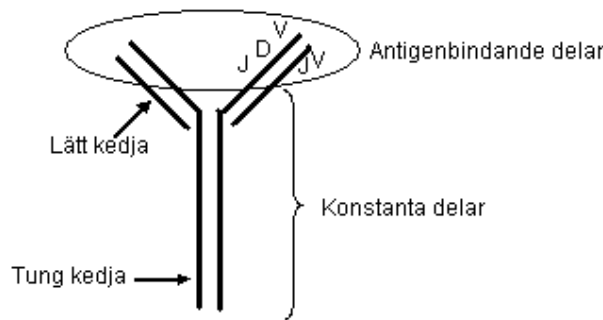
*Arabidopsis thaliana* är en vanlig modellväxt för genetiska system, bl.a. miRNA. Baserat på studier i *Arabidopsis* finns en hypotes om hur gener för miRNA kan bildas genom en mekanism som har kopplingar till transposoner. Som allt RNA är miRNA enkelsträngat, men miRNA är komplementärt med sig självt och bildar en stam-öglestruktur. Denna struktur bearbetas sedan av DCL1 (Dicer-like 1), ett protein som ingår i växternas motsvarighet till RISC. För att kunna bilda stam-öglestrukturen måste genen för miRNA bestå av omvänt upprepade sekvenser (se figur 6). Enligt en hypotes har sådana gener bildats genom dupliceringsprocesser, antingen direkt med replikation eller indirekt via omvänd transkription. (Allen m.fl. 2004) Det verkar rimligt att detta bildande av inverterade repetitioner även kan vara ett sätt för IS-element att bildas. Denna hypotes skulle ge transposoner och miRNA ett gemensamt, eller åtminstone likartat, ursprung.



Figur 6. Möjlig uppkomst av miRNA i *Arabidopsis*. Om en gen (illustrerat som pil) dupliceras och en av kopiorna inverteras kan det mRNA som bildas genom transkription vika tillbaka på sig själv och bilda en stam-öglestruktur. Eftersom stam-öglestrukturer är substrat för DCL1, som utvecklar miRNA, är detta en möjlig uppkomstväg för nya miRNA (efter Allen m.fl. 2004). Om genen som blev duplicerad kodade för ett transposasliknande protein (vita ovaler) skulle detta även kunna vara en mekanism för uppkomst av IS-element och transposoner.

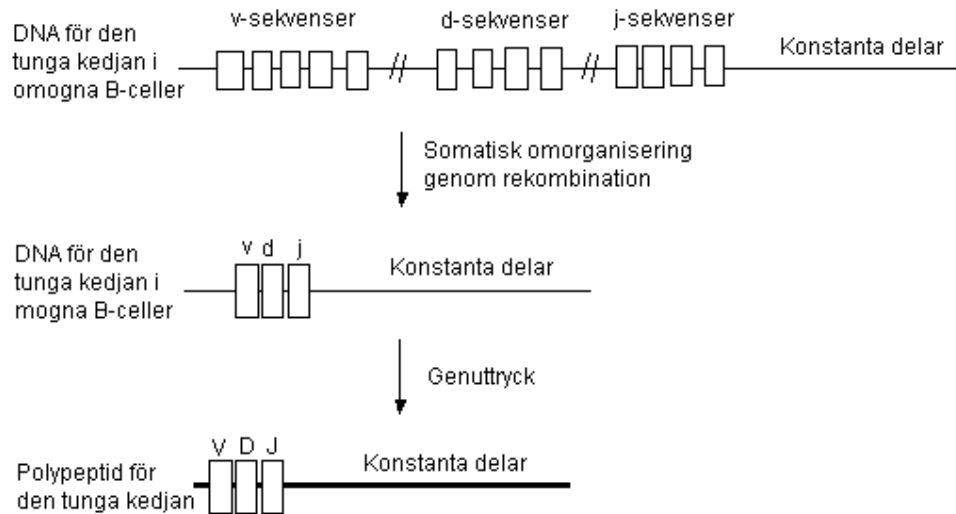
### Vertebraters immunsystem har delvis ursprung i transposoner

Hos ryggradsdjur är antikroppar en viktig del av det adaptiva immunförsvaret. Antikroppar har till uppgift att binda antigener med de variabla delarna och sedan signalera detta genom Fc-delen (se figur 7). En antikropp är ett stort glykoprotein som består av fyra polypeptidkedjor, två tunga och två lätta. I de antigenbindande delarna av antikroppen består de tunga kedjorna av tre segment; V, D och J (variabla, diversa och fogande). Motsvarande delar av de lätta kedjorna består av två segment, V och J. I de somatiska B-cellerna som producerar antikroppar innehåller genen för den tunga kedjan en *v*-, en *d*- och en *j*-sekvens, men i omogna B-celler innehåller genen ca femton *v*-, tjugotre *d*- och sex *j*-sekvenser. Under en B-cells mognadsprocess sker somatiska omorganiseringar i generna för de tunga och lätta kedjorna och alla *v*-, *d*- och *j*-sekvenser utom en av varje klipps ut ur genomet, se figur 8. Sådana faktiska utklippningar i DNA skulle vara dödligt i alla andra celltyper, men i B-celler bidrar de till att antikroppar kan vara så olika. Detta är en nödvändighet för ett effektivt immunförsvaret, eftersom de sjukdomsalstrare som antikroppar försvarar mot är väldigt olika. (Abbas och Lichtman 2005)



Figur 7. Schematisk bild av antikropp. Antikroppen består av två lätta och två tunga polypeptidkedjor och har två antigenbindande delar som varierar beroende på vilket antigen den är specialiserad på. Variationen beror till stor del på de V(D)J-segment som utgör de antigenbindande delarna. (Efter Abbas och Lichtman 2005.)

De enzym som är ansvariga för utklippningarna och de somatiska omorganiseringarna heter RAG1 och RAG2 (rekombineringsaktiverande gen). RAG-enzymen uttrycks bara i omogna B- (och T-) celler och bara under  $G_0$  och  $G_1$  i cellcykeln, när cellerna inte delar sig. RAG känner igen och binder till speciella sekvenser som omger varje *v*-, *d*- och *j*-sekvens. En sekvens av varje typ väljs, helt slumpmässigt, ut och sätts ihop av RAG, som också klipper bort mellanliggande sekvenser, se figur 8. Denna V(D)J-rekombination är mycket specifik. (Abbas och Lichtman 2005) Det har länge funnits en hypotes om att RAG-enzymerna evolverat från transposoner för ca 500 miljoner år sedan. Ingen sekvenslikhet har setts RAG och transposas, men funktionen att klippa DNA väldigt specifikt är likadan för båda enzymerna. När Kapitanov och Jurka undersökte detta (2005) fann de att RAG1 har en kärnregion på 600 aminosyror som är signifikant lik en aminosyresekvens i transposas från *Transib*-familjen i evertebrater. De såg också att de tre viktigaste aminosyrorna i den aktiva ytan, Asp-Asp-Glu, var samma i RAG1 och *transib*-transposas. De slöt sig till att den katalytiska delen av RAG1 evolverat från transposas och att det alltså inte var fråga om konvergent evolution. Den N-terminala delen av RAG1 verkar däremot inte ha sitt ursprung i transposas, utan i ett annat protein med okänd funktion i de evertebrater de undersökte, bl.a. sjögurkor och hydror. (Kapitanov och Jurka 2005)



Figur 8. Rekombination i somatiskt DNA i omogna B-celler. Enzymet RAG1 binder specifikt och klipper bort allt utom en *v*-, en *d*- och en *j*-sekvens. Efter genuttryck blir resultatet en polypeptidkedja med ett V-, ett D- och ett J-segment. (Efter Abbas och Lichtman 2005.)

## Uppkomst och horisontell överföring

Det är fortfarande okänt hur och när transposoner uppkommit. De förekommer i alla de tre domänerna, och det är möjligt att de första transposonerna uppkom innan domänerna separerades. Möjligheten finns också att transposoner nybildats kontinuerligt och i varje domän för sig eller uppstått i en domän och sedan horisontellt spridit sig till de övriga. (Snyder och Champness 2007) En av anledningarna till att detta är svårt att avgöra är att det ju ligger i transposoners natur att flytta sig och man måste utgå ifrån att hoppning skett under hela den evolutionära historien för transposoner. Man kan jämföra sekvenslikheter och likheter i transposasets uppbyggnad och se olika transposonfamiljer i de olika domänerna. Eftersom transposoner är del i den horisontella genpoolen, tillsammans med plasmider och virus, kan de också antas förändra varandra horisontellt.

### Patogenitetsöar och genöverföring

Hos patogena bakterier finns ofta virulensgener (gener för kolonisering och spridning, ofta genom sjukdom hos värden) samlade i så kallade patogenitetsöar. Det vanligaste sättet att bestämma om bakterier från ett prov är patogena eller inte är att göra en serotypning, som grundar sig på determinanter utanpå bakteriens cellvägg. Detta brukar fungera ganska bra. Men eftersom horisontell överföring av virulensgener har upptäckts, mellan kommensala (normalt förekommande) och enterotoxiska (utsöndrar gifter som ger diarré) *E. coli*, kan serotypning bli missvisande. Man kan då karaktärisera patogena bakterier och dela in dem i olika stammar beroende på vilka virulensgener de bär på. Detta skulle vara ett bättre sätt eftersom det ju faktiskt är förekomst av virulensgener man vill bestämma. (Wu m.fl. 2007) En följd av detta synsätt kan bli att bakterier som nu anses vara nära släkt, men bär olika virulensgener, skulle räknas till olika stammar. De släkträd man kan rita på så vis är släkträd för just virulensgenerna. Flyttning av virulensgener ett konkret exempel på hur viktig den horisontella genpoolen är.

## Diskussion

Jag har flera gånger nämnt att transposoner kan betraktas som själviskt DNA. Med detta menar jag att transposoner påminner om virus, de är inte ”levande”, utan element som utnyttjar celler för att föröka och sprida sig. Å andra sidan fungerar en transposon som vilken gen som helst genom att hela tiden bli selekterad för eller emot beroende på vilka egenskaper och vilken fitness den ger. För detta är en transposon naturligtvis beroende av värdcellen och av att värdcellens replikationsapparat fungerar. Detta resonemang leder fram till synsättet om förhållandet transposon-värdcell som ett symbiotiskt förhållande. I vissa fall är transposonen mest en parasit och i andra kan förhållandet beskrivas som mutualistiskt. I fallet med RAG1 och V(D)J-rekombinering kan den ursprungliga transposonen ses som en endosymbiont, vars funktioner nu helt gagnar värden. Möjligen är detta även fallet med miRNA, men det är inte lika klarlagt.

Exemplet med virulensgener som överförs mellan olika serotyper belyser vikten av att förstå den horisontella genöverföringens mekanismer och konsekvenser. Transponering är en sådan mekanism. Foster m.fl. (1981) har visat att transposas kan verka på både den yttre och den inre änden av ett IS-element. Med Tn10 insatt på en plasmid med en gen för ampicillin-resistens kunde man se att två typer av transposoner hoppade ut från plasmiden. Den ena var en normal Tn10, och den andra var en transposon med ampicillinresistens och replikationsorigo flankerat av två IS10-element.

Transposoner gör bakteriers genom dynamiska, men är också dynamiska i sig själva. De anpassar sig ständigt efter selektionstrycket. Många transposoner bär, som tidigare nämnts, på gener för antibiotikaresistens vilket ger transposonen fördelar i selektionen. Det icke-funktionella transposaset i IS10V (Tn10) är ett exempel på hur transposoner med antibiotikaresistens selekteras. Visserligen kan bakterier, t.ex. från släktet *Streptomyces*, tillverka vissa antibiotika som de själva är resistent mot och genom horisontell genöverföring kan även andra arter bli det. De stora mängderna antibiotika står dock vi människor för. Vi har alltså skapat ett selektionstryck för transposoner. Hur transposoner såg ut innan vi började behandla sjukdomar med antibiotika är en intressant fråga, men svår att svara på.

Orsaken till att gener flyttar sig varierar. Gener i transposoner flyttas med hjälp av transposas och sekvensspecifik rekombinering, gener på plasmider sprids när plasmiden replikeras och konjugerar till andra bakterier och virus kan sprida värd-DNA genom transduktion. Samma gen kan finnas på en transposon, i en plasmid, i ett virus eller som en del av det stabila genomet. Det är helt enkelt de element som finns runt en gen som avgör om genen anses vara stabil eller ingå i den horisontella genpoolen. Fosters försök från 1981 är ett konstruerat, men ändå tydligt exempel på att en gens ”beteende” styrs av vad som ligger i närheten. Slutsatsen av ett sådant resonemang blir att genen är evolutionens minsta enhet och att alla gener i någon grad kan uppfattas som ”själviska”.

## Tack

Stort tack till min seminariegrupp som läst och givit återkoppling på uppsatsens alla versioner. Tack också till Karin Carlson för hjälp under skrivprocessen och för vetenskapligt stöd och till Ann Blücker på Språkverkstaden för språklig granskning. Jag vill även speciellt tacka Lisa Öberg som läst uppsatsen och kommit med värdefulla råd och Anders Holgersson som läst den populärvetenskapliga sammanfattningen och givit synpunkter!

## Referenser

- Abbas, A.K. och Lichtman, A.H. 2005. Cellular and Molecular Immunology, reviderad upplaga. Elsevier Inc., Philadelphia.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., Sung, G-H., Spatafora, J.W. och Carrington, J.C. 2004. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 36: 1282 – 1290.
- Arthur, A., Nimmo, E., Hettle, S. och Sheratt, D. 1984. Transposition and transposition immunity of transposon Tn3 derivatives having different ends. *The EMBO Journal* 3: 1723 – 1729.
- Bender, J. och Kleckner, N. 1986. Genetic Evidence that Tn10 Transposes by a Nonreplicative Mechanism. *Cell* 45: 801 – 815.
- Borchert, G., Lanier, W. och Davidson, B.L. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology* 13: 1097 – 1101.
- Foster, T.J., Davis, M.A., Roberts, D.E., Takeshita, K. och Kleckner, N. 1981. Genetic Organization of Transposon Tn10. *Cell* 23: 201 – 213.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O. och Toussaint, A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3: 722 – 732.
- Halling, S.M. och Kleckner, N. 1982. A symmetrical six-basepair target site sequence determines Tn10 insertion specificity. *Cell* 28: 155 – 163.
- Haniford D.B. 2006. Transpososome Dynamics and Regulation in Tn10 Transposition. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 41: 407 – 424.
- Heffron, F., Bedinger, P., Champoux, J.J. och Falkow, S. 1977. Deletions affecting the transposition of an antibiotic resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 702 – 706.
- Heffron, F., McCarthy, B., Ohtsubo, H. och Ohtsubo, E. 1979. DNA Sequence Analysis of the Transposon Tn3: Three Genes and Three Sites Involved in Transposition of Tn3. *Cell* 18: 1153 – 1163.
- Kapitanov, V.V. och Jurka, J. 2005. RAG1 Core and V(D)J Recombination Signal Sequences Were Derived from *Transib* Transposons. *PLoS Biology* 3: 998 – 1011.
- Kitts, P.A., Symington, L.S., Dyson, P och Sheratt, D.J. 1983. Transposon-encoded site-specific recombination: nature of the Tn3 DNA sequences which constitute the recombination site in *res*. *The EMBO Journal* 2: 1055 – 1060.
- Lett, M.-C. 1988. Tn3-like elements: molecular structure, evolution. *Biochimie* 70: 167 – 176.

- Maekawa, T., Yanagihara, K. och Ohtsubo, E. 1996. A cell-free system of Tn3 transposition and transposition immunity. *Genes to cells* 1: 1007 – 1016.
- McClintock. 1953. Induction of instability in selected loci in maize. *Genetics* 38: 579 – 599.
- Roberts, D., Hoopes, B.C., McClure, W.R. och Kleckner, N. 1985. IS10 Transposition Is Regulated by DNA Adenine Methylation. *Cell* 43: 117 – 130.
- Robinson, M.K., Bennett, P.M. och Richmond, M.H. 1977. Inhibition of TnA Translocation by TnA. *Journal of Bacteriology* 129: 407 – 414.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J. och Hannon, G.J. 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE 4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443: 1008 – 1012.
- Sakai, J., Chalmers, R.M. och Kleckner, N. 1995. Identification and characterization of a pre-cleavage synaptic complex that is an early intermediate in Tn 10 transposition. *The EMBO Journal* 14: 4374 – 4383.
- Saylers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M. och Li, L.-Y. 1995. Conjugative transposons: an Unusual and Diverse Set of Integrated Gene Transfer Elements. *Microbiological Reviews* 59: 579 – 590.
- Singh, R.K., Liburd, J., Wardle, S.J. och Haniford, D.B. 2008. The Nucleoid Binding Protein H-NS Acts as an Anti-Channeling Factor to Favor Intermolecular Tn10 Transposition and Dissemination. *Journal of Molecular Biology* 376: 950 – 962.
- Snyder, L. och Champness, W. 2007. Molecular genetics of bacteria. 3:e upplagan. ASM Press, Washington DC.
- Ward, C.M., Wardle, S.J., Singh, R.K. och Haniford, D.B. 2007. The global regulator H-NS binds two distinct classes of sites within the Tn10 transpososome to promote transposition. *Molecular Microbiology* 64: 1000 – 1013.
- Wardle, S.J., O'Carroll, M., Derbyshire, K.M. och Haniford, D.B. 2005. The global regulator H-NS acts directly on the transpososome to promote Tn 10 transposition. *Genes and Development* 19: 2224 – 2235.
- Wiater, L.A. och Grindley, N.D. 1990. Uncoupling of Transpositional Immunity from  $\gamma\delta$  Transposition by a Mutation at the End of  $\gamma\delta$ . *Journal of Bacteriology* 172: 4959 – 4963.
- Wu, X.-Y., Chapman, T., Trott, D.J., Bettelheim, K., Do, T.N., Driesen, S., Walker, M.J. och Chin, J. 2007. Comparative Analysis of Virulence Genes, Genetic Diversity, and Phylogeny of Commensal and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Weaned Pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 83 – 91.