

JAKUB KWINTKIEWICZ

RUCHOME ELEMENTY GENETYCZNE

Z Katedry Biologii i Ochrony Środowiska
Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Katedry: prof. dr hab. K. Wiktorowicz

Streszczenie

SŁOWA KLUCZOWE: ruchome elementy genetyczne, transpozony
Przekazywanie informacji genetycznej między organizmami może zachodzić w różny sposób. Jednym z nich jest transpozycja genów między osobnikami tego samego gatunku lub różnych gatunków. Za przeniesienie tego typu odpowiedzialny jest transpozon czyli fragment DNA, który ulega przeniesieniu. Fragment ten koduje strukturę kilku enzymów, które również są zaangażowane w proces transpozycji. Transpozony mogą przenosić takie cechy, jak oporność na antybiotyki między różnymi szczepami bakterii. Mogą również powodować mutacje, prowadząc do chorób lub do zmian w funkcjonowaniu organizmów.

MOBILIZABLE GENETIC ELEMENTS

Summary

KEY WORDS: transposable elements, transposons

Transfer of genetic information between different organisms can occur in several ways. One of these is transposition which may be found in both the same and in different species. The fragment of DNA which is transferred, the so called transposon, is responsible for this process. This fragment encodes several enzymes which are involved in the process of transposition. Transposons are able to carry features, such as antibiotic resistance, between two different bacterial species. They can also cause mutations leading to diseases and functional changes in the organism.

Kompletne sekwencjonowanie genomu rozmaitych bakterii, grzybów, robaków czy owadów wywarło olbrzymi wpływ na całą biologię. Poszukiwanie ewolucyjnych początków istnienia życia (różnych jego form), w dobie sekwencjonowania genomów, dostarcza wielu zmian w dotychczasowym sposobie widzenia świata. Ruchome elementy genetyczne i ich wpływ na zmiany struktury genetycznej organizmów ma ogromne znaczenie dla zrozumienia procesu ewolucji.

Genom to zbiór genów zlokalizowanych w DNA organizmu. Zorganizowany jest w zależności od fazy cyklu komórkowego w postaci luźnej (chromatyna) lub zwartej (chromosomy) znajdującej się w jądrze komórkowym. U organizmów prokariotycznych, czyli bezjądrzastych, zbiór taki nosi nazwę genoforu. Genomy różnych organizmów wykazują znaczny stopień stałości, co umożliwia ustalenie map genetycznych obrazują-

nych pozycje genów w chromosomach. Nawet odrębne gatunki, takie jak na przykład *Escherihia coli* i *Drosophila melanogaster*, mają bardzo zbliżone układy liniowe genów utrzymujące się od czasu ich niezależnej ewolucji od wspólnego przodka. Istotne ewolucyjnie zmiany w strukturze genomów zachodzą w bardzo długim okresie czasu.

Transpozony

U wielu różnych organizmów wykryto występowanie elementów genetycznych, nazywanych transpozonomi, zdolnych do zmiany miejsca położenia w genomie. Transpozony są odcinkami DNA złożonymi z sepek lub tysięcy par nukleotydów, które mogą ulegać spontanicznemu przemieszczeniu czyli transpozycji. Mogą one wywoływać duże zmiany w strukturze genomu, jak np. inwersje, delecje czy duplikacje dużych fragmentów DNA. Proces transpozycji związany z wycinaniem i integracją transpozonu jest wynikiem rekombinacji między niehomologicznymi sekwencjami występującymi w transpozonomach i miejscami ich integracji w DNA. Rekombinacja ta jest sterowana przez specyficzne enzymy – transpozazy. W genomie *E.coli* wykryto dziesiątki różnych transpozonów, różniących się strukturą genetyczną. W komórkach bakteryjnych, transpozony jednego typu mogą występować w różnej liczbie kopii – od kilku do kilkunastu. Między homologicznymi sekwencjami tych samych transpozonów znajdujących się w genomie w różnych położeniach, mogą zachodzić rekombinacje homologiczne typu crossing-over, prowadzące do znacznych zmian w strukturze genomu gospodarza. Transpozony mogły odgrywać istotną rolę w różnicowaniu struktury genomów, jako jeden z czynników ewolucji nowych gatunków.

Transpozony zostały wykryte po raz pierwszy metodami genetycznymi w kukurydzy, jednak dopiero wykrycie tych elementów u bakterii kilkanaście lat później doprowadziło do poznania ich struktury molekularnej i przebiegu procesu transpozycji. Ruchome elementy DNA klasyfikowane są w grupy według tego, czy transpozycja zachodzi poprzez DNA czy RNA [2]. Transpozony zwane retroelementami, których transkrypcja zachodzi poprzez RNA, dzielą się na rodzinę elementów wirusowych i niewirusowych. Rodzina wirusowa obejmuje retrowirusy i transpozony charakteryzujące się długimi końcowymi powtórzeniami (LTR) (ang. *Long Terminal Repeats* – długie końcowe powtórzenia), które flankują domeny kodujące odwrotną transkryptazę. Natomiast elementy z rodziny niewirusowej obejmujące elementy SINE (ang. *Short Interspersed Elements* – krótkie elementy urozmaicone) i LINE (ang. *Long Interspersed Elements* – długie elementy urozmaicone) nie posiadają

LTR. Ruchome elementy, które ulegają transpozycji poprzez intermediały DNA, są generalnie flankowane przez krótkie odwrócone powtórzenia tzw. TIR (ang. *Terminal Inverted Repeats* – końcowe odwrócone powtórzenia), które u form autonomicznych flankują domeny kodujące transpozazę. Klasa ruchomych elementów o krótkich TIR obejmuje elementy Tn3 bakterii, elementy P i Hobo u *Drosophila melanogaster* [9], elementy Ac w kukurydzy [5], rodzinę Tc1 i elementy Tc2 u *Caenorhabditis elegans* [8, 9].

Niektóre transpozony bakteryjne u organizmów eukariotycznych

Symbol elementu	Liczba par zasad	Liczba par zasad w sekwencjach terminalnych	Gatunek w którym występuje transpozon	Liczba par zasad w sekwencji docelowej	Uwagi
IS1	768	23	<i>E.coli</i>	9	Koduje transpozazę
IS2	1327	41	<i>E.coli</i>	5	Koduje transpozazę
Tn3	4957	38	<i>E.coli</i>	5	Zawiera gen oporności na ampicylinę
Tn5	5700	1531	<i>E.coli</i> Plazmid R	9	Zawiera gen oporności na kanamycynę
Tn9	2500	IS1	<i>E.coli</i> Plazmid R	9	Zawiera gen oporności na chloramfenikol
AC	4563	11	<i>Zae mays</i> Kukurydza	8	Powoduje pęknięcie chromosomów
Tc1	1610	54	<i>Caenorhabditis elegans</i> Nicień	2(TA)	
P	2900	31	<i>Drosophila melanogaster</i> „muszka owocowa”	8	Wywołuje zaburzenia linii komórek płciowych

Typy mechanizmów transpozycji

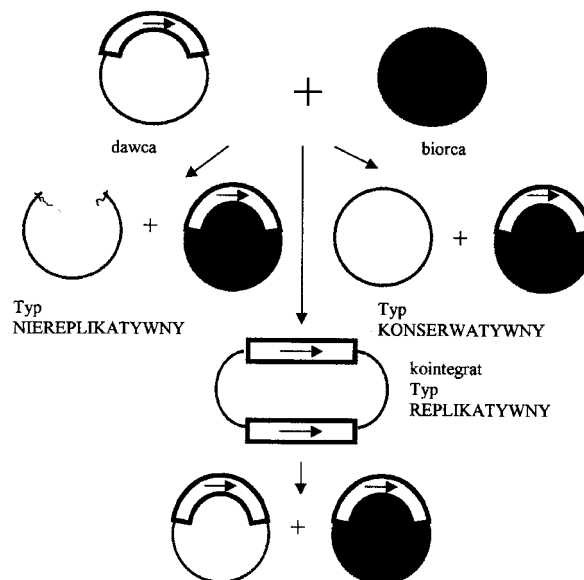
Transpozycja niereplikatywna polega na wycięciu transpozonu z jednej pozycji DNA (po czym pozostaje luka w DNA) i integracji w nowym położeniu, w którym transpozaza rozpoznaje specyficzną 5-nukleotydową sekwencję docelową. Replikowane jest jedynie kilka nukleotydów w nowym miejscu integracji.

Podczas transpozycji replikatywnej, sekwencja transpozonu ulega duplikacji drogą replikacji semi-konserwatywnej, która jest nieodłączną częścią procesu transpozycji.

Powstający produkt przejściowy (kointegrat), zawierający związane cząstki DNA dawcy i biorcy oraz dwie kopie transpozonu, zostaje rozdzielony w wyniku rekombinacji na dwa elementy: jeden identyczny jak cząstka donorowa, drugi to cząstka akceptorowa z włączonym transpozonom (niektóre transpozony kodują specyficzny enzym – resolwazę, odpowiedzialny za ten proces).

Transpozycja konserwatywna polega na dokładnym wycięciu i ligacji w nowym położeniu z zachowaniem wszystkich nukleotydów. Różni się od replikatywnej tym, iż u dawcy w trakcie transpozycji fragment przenoszony nie ulega duplikacji. Zamiast tego oba wolne końce DNA łączą się.

Typy mechanizmów transpozycji obrazuje rycina 1.



Ryc. 1. Typy mechanizmów transpozycji.

Zarówno transpozycja konserwatywna, jak i replikatywna mogą być inicjowane w podobny sposób. Pierwszym etapem jest utworzenie przez transpozazę czterech jednoniciowych nacięć: w DNA dawcy transpozonu oraz w DNA biorcy (sekwencji docelowej transpozycji), które są prze-

sunięte o 5 do 9 nukleotydów. Po krzyżowym połączeniu powstałych wolnych końców DNA integracja jest zawsze związana z odbudowaniem 5-9-nukleotydowych odcinków między przesuniętymi miejscami nacięć w sekwencji docelowej (w przypadku prostego wycięcia transpozonu) lub też replikacja obejmuje cały transpozon (w przypadku transpozycji replikatywnej).

W organizmach eukariotycznych wykryto transpozony, których struktura i sposób przemieszczania się jest podobny do transpozonów bakteryjnych. Ponadto, u eukariontów opisane zostały transpozony odrębnego typu zwane retrotranspozonami, które podobnie jak retrowirusy przechodzą w cyklu transpozycji przez RNA, który następnie w wyniku działania odwrotnej transkryptazy jest przepisywany na DNA. Mają one w większości cechy strukturalne, przypuszczalnie niezbędne do ich transpozycji, m.in.: na obu końcach mają powtórzone długie sekwencje terminalne (LTR), które umożliwiają ich integrację w różnych miejscach oraz miejsce podobne do tRNA niezbędne do rozpoczęcia odwrotnej transkrypcji. Mimo, że retrotranspozony mają niektóre geny zbliżone do genów retrowirusowych, to jednak nigdy nie występują poza komórką jako infekcyjne cząstki wirusowe.

Wykorzystanie transpozonów w biologii molekularnej

Transpozony mogą być traktowane jak inne wektory genetyczne. Można wycinać znajdujące się w nich geny i wprowadzać w zamian inne. Jeżeli TIR zostaną zachowane, to będą one rozpoznane przez transpozazy, które będą je integrować w różne miejsca genomu komórki. Transpozony pozbawione genów kodujących transpozazę tracą zdolność do integracji. Jednak obecność w komórce innych, nie zmodyfikowanych kopii transpozonów i produkowanych przez nie enzymów, może uaktywniać nieczynne jednostki.

Transpozony wykorzystuje się do otrzymywania organizmów transgenicznych. Na przykład, do uzyskania transgenicznych osobników *Drosophila melanogaster* używa się jako wektora transpozonu P.

Różne rodzaje transpozonów są także wykorzystywane obecnie do wykrywania i lokalizacji genów w chromosomach.

Transpozony w organizmie człowieka

Niezbitym faktem jest, iż ruchome elementy genetyczne występują wśród organizmów prokariotycznych, choćby takich, jak *E. coli*, jak również w organizmach eukariotycznych na przykład w kukurydzy, u nicienia czy muszki owocowej. Olbrzymim jednak dokonaniem było odkrycie

tych elementów również u człowieka. Fakt ten być może okaże się fundamentalnym w badaniu molekularnej ewolucji gatunków, biorąc pod uwagę „możliwości” tych struktur genetycznych.

Transpozony reprezentowane przez elementy SINE (ang. *Short Interspersed Element*) należące do rodziny *Alu*, są bardzo charakterystyczne dla rzadko występujących powtórzeń DNA u ssaków. W ludzkim genomie początkowo wykryto 300.000 kopii tych sekwencji zbudowanych z 200 – 300 pz. Nazwę swoją zawdzięczają specyficznej sekwencji (wewnątrz swojej struktury), która jest rozpoznawana przez restrykcyjną endonukleazę zwaną *Alu I*.

Elementy te występują obecnie w DNA wszystkich naczelnych, jak i u gryzoni. Dodatkowo, u ssaków wewnątrz *Alu* istnieje bardzo konserwatywna sekwencja o długości 40 pz. Wiadomo również, że sekwencje *Alu* są silnie reprezentowane w jądrze komórkowym w formie transkryptów.

Istnieje kilka dowodów na to, aby określać je mianem ruchomych elementów genetycznych. Najważniejszym z dowodów jest fakt, iż są one oskrzydłone na obu swych końcach powtórzonymi i w tą samą stronę skierowanymi sekwencjami o długości 7 – 20 pz. Można się tu dopatrzeć paraleli u bakterii w przypadku sekwencji insercyjnych. Te oskrzydłujące regiony są kluczowe dla insercji genu w procesie transpozycji. Obserwacja, która dostarcza następnym dowód mówi o tym, iż regiony *Alu* różnią się od siebie w DNA osób chorych i zdrowych, a także w różnych tkankach tego samego organizmu. Dodatkowo, sekwencje te zostały znalezione poza chromosomami.

Potencjalna ruchliwość i mutagenność tych elementów ma daleko sięgające implikacje. Ostatnio opisany przypadek dotyczy sytuacji, w której transpozon „został przyłapany na gorącym uczynku”. Sprawa dotyczy chłopca chorego na hemofilię. Jedną z przyczyn tej choroby jest defekt VIII czynnika krzepliwości krwi, produktu genu sprzężonego z chromosomem płci X. Naukowcy znaleźli dwa przypadki, w których transpozony dużo dłuższe niż sekwencje *Alu* zostały zintegrowane wewnątrz genu czynnika krzepliwości. Występujące również w innych miejscach w genomie przykłady powtarzającego się DNA zdefiniowano jako LINE (ang. *Long Interspersed Element*).

Wielkie zainteresowanie powstało, gdy zadano sobie pytanie, czy jeden z matczynych chromosomów X również zawierał specyficzny LINE. Jeśli tak, to okazałoby się, że matka była heterozygotą i przeniosła na swojego syna chromosom zawierający LINE. Zaskakującym odkryciem był fakt, iż sekwencja LINE nie była obecna w żadnym z chromosomów X, natomiast została wykryta na chromosomie 22. u obu rodziców [3]. Sugeruje się, że ów ruchomy element mógł się przemieścić z jednego

chromosomu na drugi w komórkach generatywnych matki, zanim cecha została przekazana synowi.

Transpozony w rozwoju odpowiedzi immunologicznej

Immunolodzy rozważają obecnie dwa aspekty układu odpornościowego jako naprawdę unikalne w perspektywie ewolucji. Pierwszy z nich to nadzwyczajny polimorfizm ludzkich genów układu zgodności tkankowej MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*). Druga zaś to rearanżacja genów dla receptorów antygenowych limfocytów B i T. Poznany niedawno obraz genomu ludzkiego nie ujawnia nowych informacji, które mogłyby kwestionować unikalność tych dwóch zjawisk [4]. Analizy wskazują na to, iż geny dotyczące układu immunologicznego podlegały zdecydowanie silniejszej presji ewolucji niż inne geny [6].

Somatyczna rearanżacja genetyczna receptorów antygenowych jest ewolucyjnym fenomenem układu odpornościowego. Postulowano, iż gen aktywujący rekombinazę I i II, RAG1 i RAG2 (ang. *Recombinase-Activating Gene*), odpowiedzialny za te rearanżacje wywodzi się z ruchomych elementów genetycznych [1]. Najnowsza analiza genomu dostarcza coraz więcej wyjaśnień na temat wielu klas transpozonów i ich widocznej roli w ewolucji ludzkiego genomu. Uważa się, że w przybliżeniu połowa ludzkiego genomu, tzw. „junkDNA” pochodzi od transpozonów, a 47 genom przypisuje się tymczasowo pochodzenie transpozonowe [11]. RAG1 i RAG2 dały ewolucyjny przełom w przypadku somatycznych rearanżacji genowych.

Być może okaże się, że 1,5 miliarda par zasad w „junk DNA” to wcale niewysoka cena jaką trzeba zapłacić za innowacje w postaci RAG1 i RAG2 [13].

Przenoszenie oporności na antybiotyki

Klasyczne dziedziczenie cech z pokolenia na pokolenie nazywamy pionowym przenoszeniem cech. W przypadku transpozycji genów mówimy o przenoszeniu poziomym. Ten drugi sposób jest znacznie efektywniejszy i szybszy. Za poziome przekazywanie genów odpowiedzialne są takie procesy, jak koniunkcja, transformacja czy transdukcja. Elementem genetycznym, który może poziomo przekazywać cechy, są także transpozony, zwłaszcza w przypadku przenoszenia genów odpowiedzialnych za oporność szczepu bakterii na rozmaite antybiotyki.

Ruchome elementy, oznaczone jako NBU2 (11-kpz), odkryto w szczepach bakterii występujących w szpitalach: *Bacteroides fragilis* ERL i *B. thetaiotaomicron* DOT. Początkowo uważano, że NBU2 jest bardzo

podobny do innego elementu: NBU1. Podobieństwo to wykazuje, w wewnętrznym regionie o długości 2,5-kpz. Okazało się jednak, iż poza tym małym fragmentem oba elementy są do siebie niepodobne w obrębie całej struktury. Transpozon NBU2 zawiera gen integrazy (intN2), zlokalizowany na jednym z końców tego elementu. Gen ten jest konieczny, a zarazem wystarczający dla integracji NBU2 w genomie gospodarza. Integracja NBU2 jest bardzo specyficzna u *B. thetaiotaomicron*. Miejsce integracji jest zlokalizowane na 3'-końcu genu serynylo-tRNA. Analiza genetyczna NBU2 uwidacznia dwa geny, odpowiedzialne za oporność na antybiotyki. Sekwencja aminokwasów domniemanych białek kodowanych przez te geny jest podobna do białek reprezentowanych przez bakterie Gram+. Tylko jeden z tych genów, homolog genu oporności na linkomycynę, ulega ekspresji u *B. thetaiotaomicron*.

Zjawisko tranpozycji NBU2 stwierdzono u 291 szczepów bakteryjnych [12]. Może to mieć ogromne znaczenie w przenoszeniu oporności na antybiotyki między różnymi szczepami bakterii.

Nasuwa się wiele pytań dotyczących tych czy innych transpozonów. Jakie jest ich pochodzenie? Czy były kiedyś jakimś rodzajem retrowirusów? Jak dokładnie ulegają przemieszczeniu i jaka była ich rola w ciągu trwania ewolucji? Te i inne pytania będą intrygować naukowców przez następne lata.

Piśmiennictwo

1. Agrawal A.: Nature, 1994, 394, 744-751. – 2. Berg D.E., Howe M.M.: Mobile DNA, 1989, 163-84, 227-68, 375, 619, 972. – 3. Cumings M. R., Klug W.S.: Concepts of genetics. 1997, 419-20. – 4. Dawkins R.: Immunol. Rev., 1999, 167, 275-304. – 5. Fedoroff N.V i wsp.: Cell., 1983, 235-42. – 6. Murphy P.M.: Cell., 1993, 72, 823-26. – 7. Oosumi T., Belknap W.: J. Mol. Evol., 1997, 137-144. – 8. Ruvolo V. i wsp.: DNA Cell. Biol., 1992, 111-22. – 9. Streck R. D. i wsp.: EMBO J., 1986, 3615-23. – 10. Stryer L.: Biochemia, 1997, 883-86.
11. The Genome National Sequencing Consortium.: Nature., 2001, 409, 860-921. – 12. Wang j. i wsp.: J. Bacteriol., 2000 182(12) 3559-71. – 13. Yin L., Shaw S.: Trends in immunology, 2001, 227.