

Published online 6 December 2013

Nucleic Acids Research, 2014, Vol. 42, No. 4 2637–2645
doi:10.1093/nar/gkt1218

Hyperactive mariner transposons are created by mutations that disrupt allosterism and increase the rate of transposon end synapsis

Danxu Liu and Ronald Chalmers*

School of Life Sciences, University of Nottingham, Queen's Medical Centre, Nottingham NG7 2UH, UK

Received October 1, 2013; Revised November 3, 2013; Accepted November 5, 2013



Emily Bruna Justino

Transposons

Sequências de DNA com a habilidade única de se mover como uma unidade discreta de uma posição a outra do genoma – **SEQUÊNCIAS SALTADORAS**

Esta habilidade em se realocar é chamada de **transposição**, e os elementos são chamados de **elementos de transposição** ou **elementos transponíveis**.

Influência na evolução e composição de genomas de plantas e animais. A possibilidade de se inserirem dentro de genes do próprio organismo pode causar diversas doenças, bem como ser fonte de nova informação genética



Descoberta dos Transposons

Década de 40: Barbara McClintock



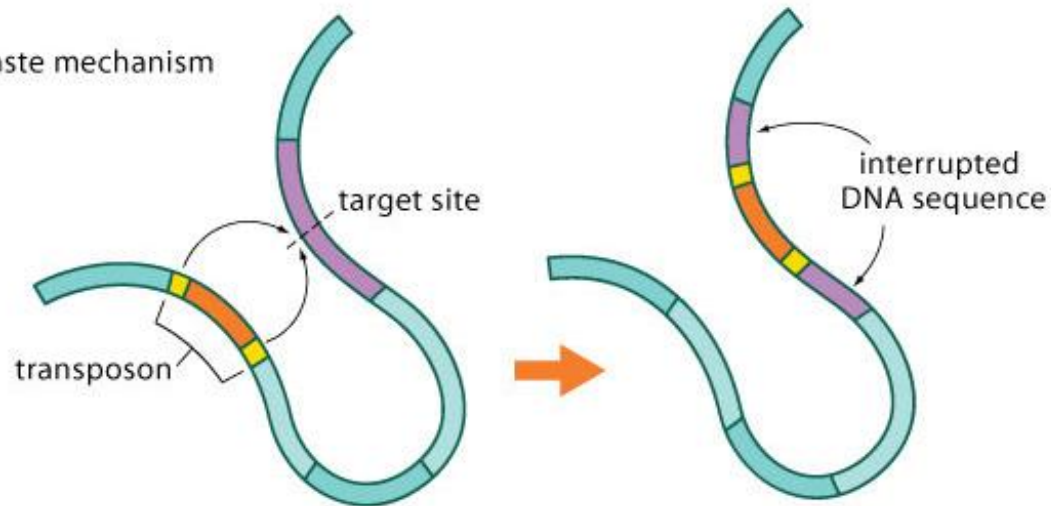
*Descoberta dos Elementos
Genéticos Móveis em Milho
“Elementos Controladores”*



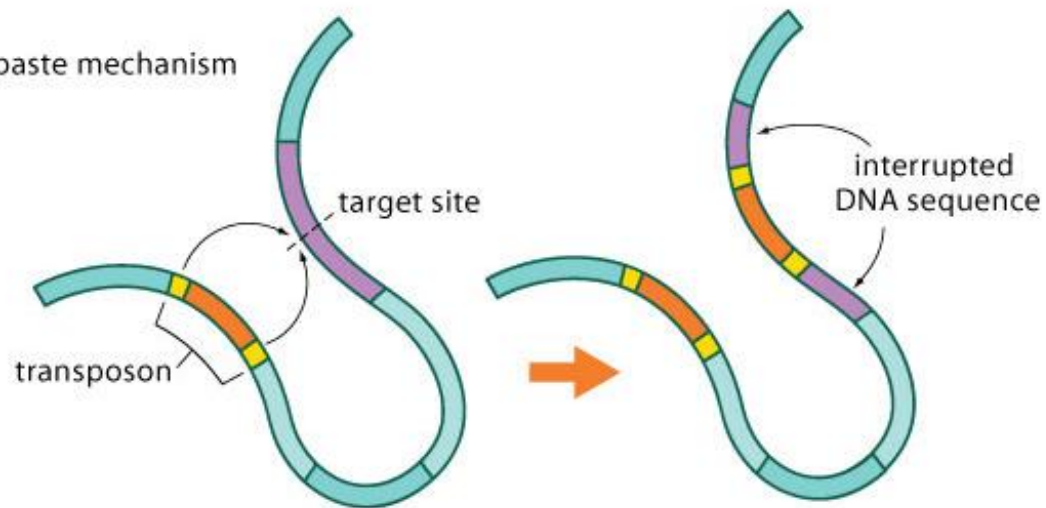
1983: Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina

Métodos de transposição

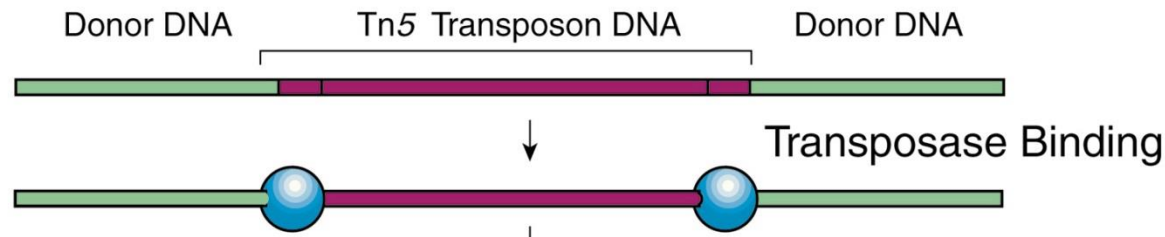
1. Cut-and-paste mechanism



2. Copy-and-paste mechanism

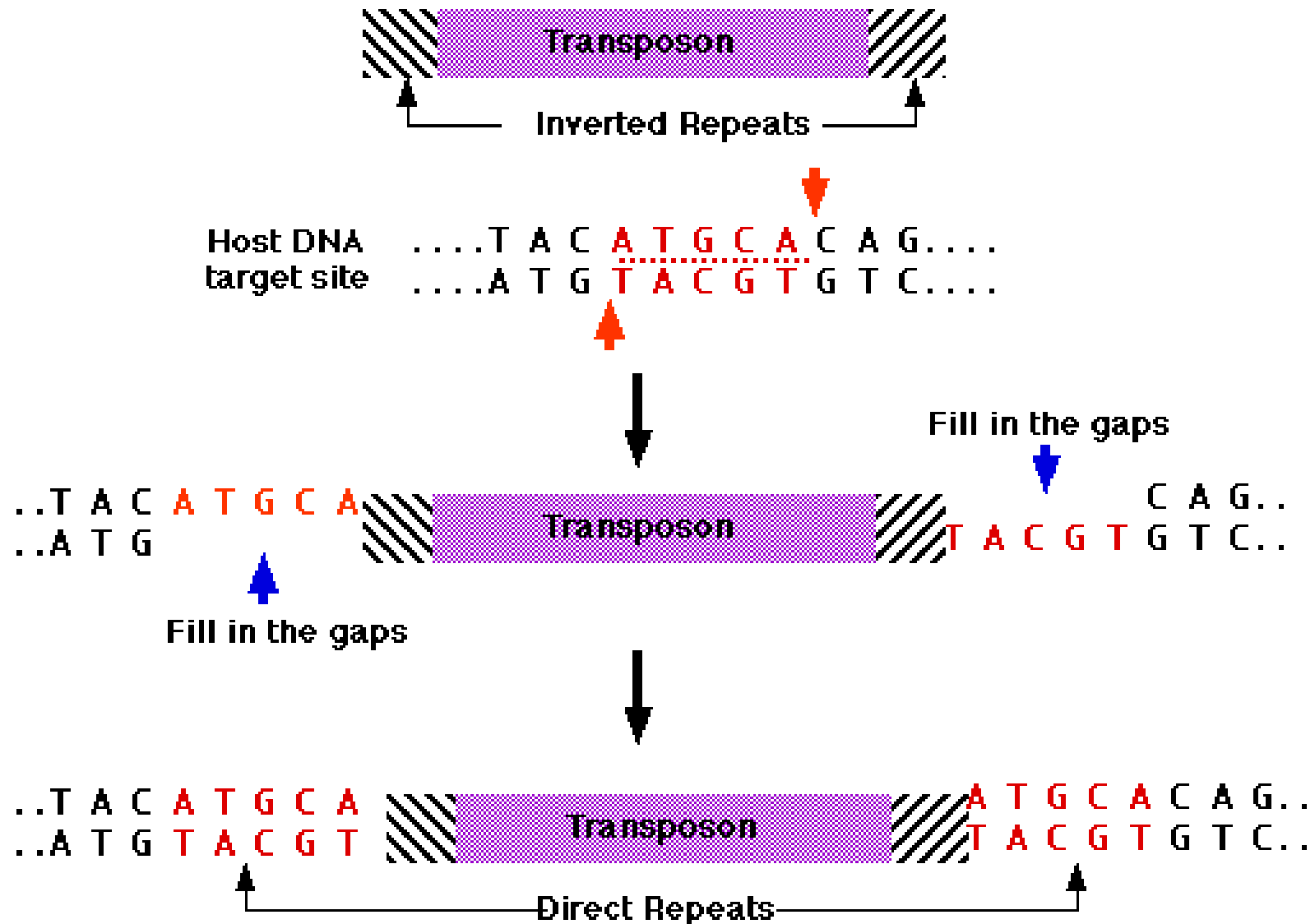


Transposase

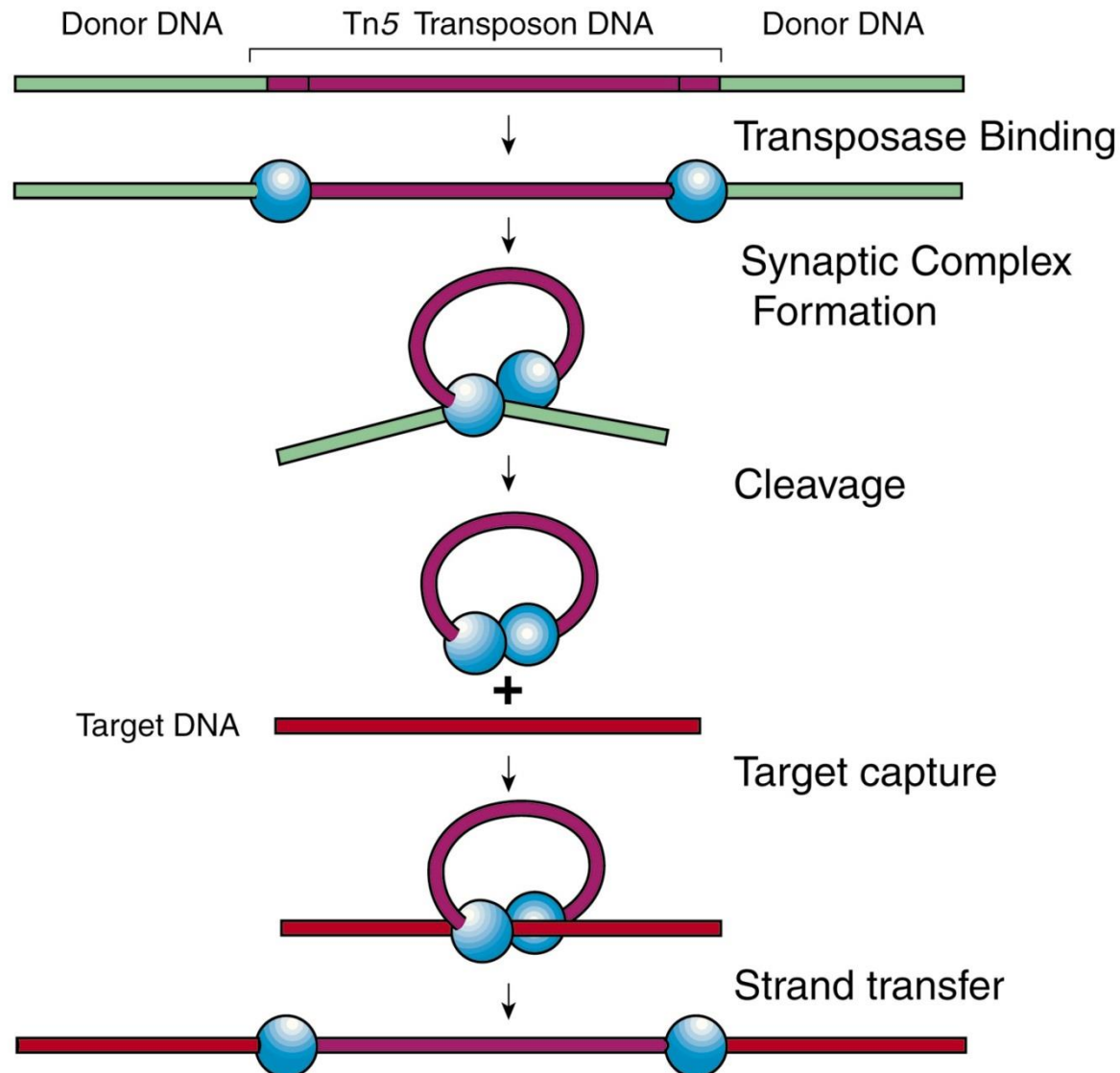


Transposases: enzimas que se ligam à extremidade dos transposons e catalisam o movimento de transposição para outra região do genoma.

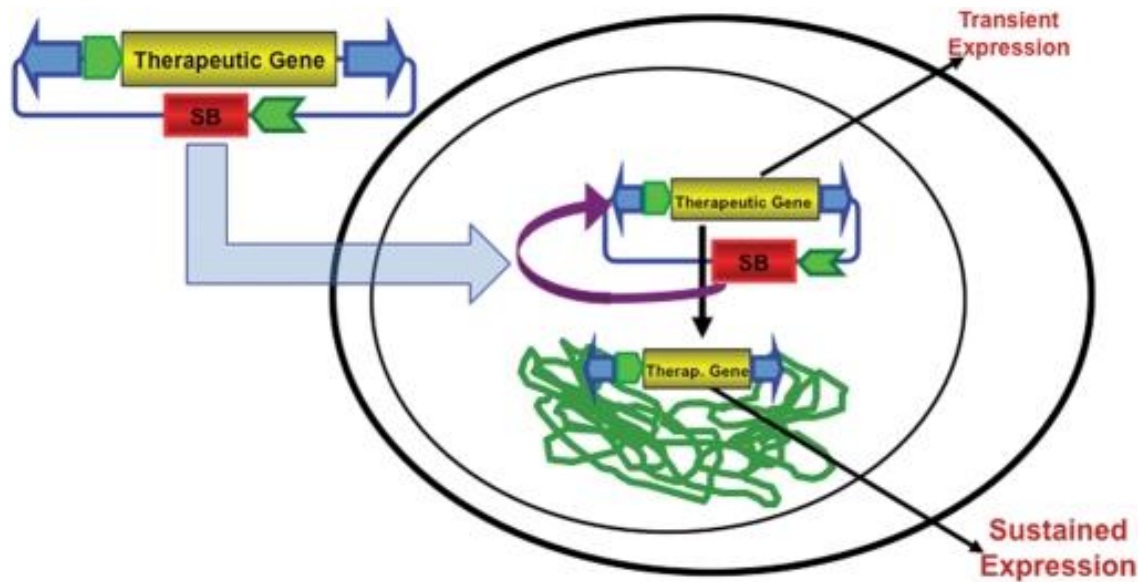
Mecanismo de Transposição



Mecanismo de Transposição

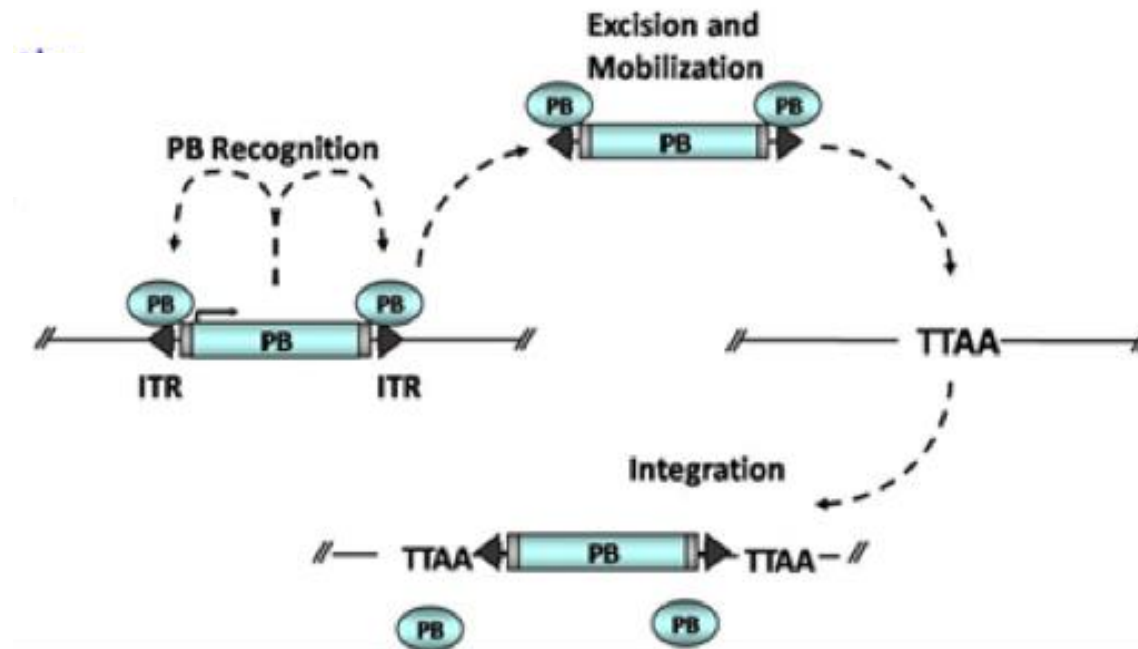


Aplicação biotecnológica



Sleeping Beauty System - é um transposon DNA sintético – introduz sequências de DNA nos cromossomos dos animais vertebrados para efeitos da introdução de novas características e descobrir novos genes e suas funções.

Aplicação biotecnológica



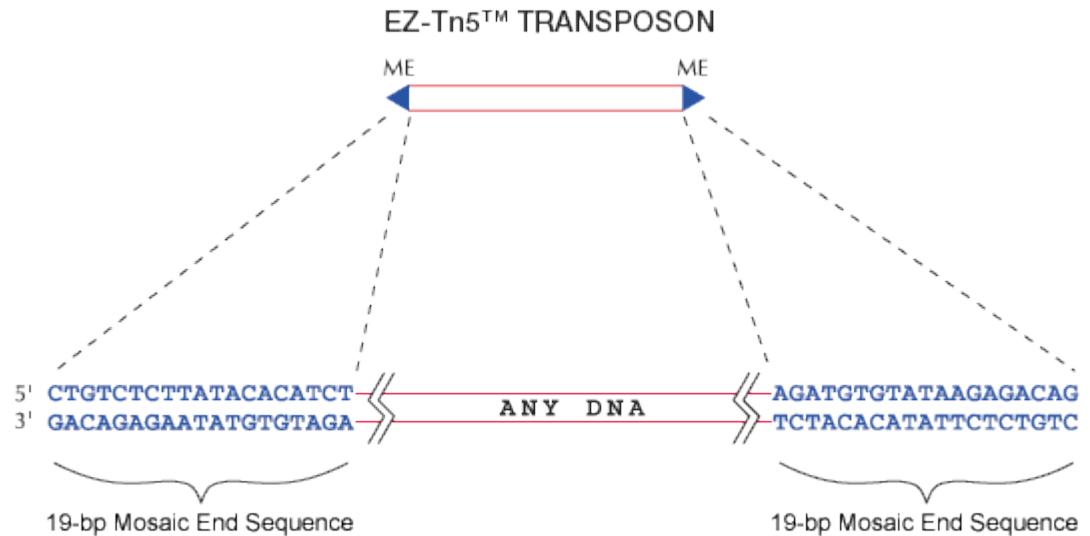
PiggyBac - é um elemento genético móvel que transpõe de forma eficiente entre os vetores e cromossomos por meio de um mecanismo de "cortar e colar". Têm sido desenvolvidos para a descoberta do gene do câncer e aplicações transgênicas em vertebrados .

Ao combinar várias mutações pontuais, as taxas de transposição do **piggyBac** e **Sleeping Beauty** foram aumentados em 17 e 100 vezes, respectivamente

Tranposons

Atualmente, a ferramenta transposon mais utilizado é o **Tn5** hiperativo. É um eficaz mutagêneo *in vivo* e tem numerosas aplicações pós-genômicas

(delivery of sequence bar codes and deep-sequencing Primers)



Hiperatividade depende de três mutações pontuais, que desativam os mecanismos auto-reguladores naturais do transposon.

Transposon *mariner*



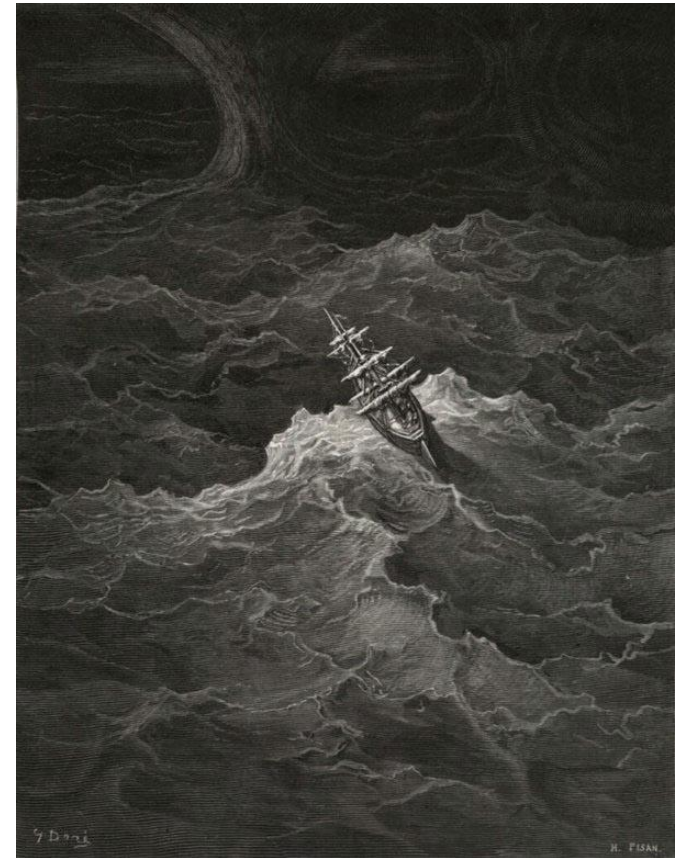
1986 - **J.W Jacobson**, isolou o *Mariner*, retirado de um mutante de *Drosophila mauritiana* de olhos brancos.

Recebeu esse nome pelo poema "*The Rime of the Ancient Mariner*" (Samuel Taylor Coleridge), que fala sobre um velho marinheiro que se perde em suas navegações e que passa por eventos sobrenaturais.

Transposon *mariner*

Esse elemento transponível é o mais difundido entre os seres vivos, sendo encontrado na maioria dos insetos, crustáceos, aracnídeos e até mesmo no genoma humano, relação com doenças humanas como a Charcot-Marie-Tooth.

Esses elementos também foram encontrados em planárias, nas hydras e em morcegos, o que torna o *Mariner* um dos melhores navegadores do “oceano genético” que circunda a todos nós.



Tranposons *mariner*



Realizam transposição por um mecanismo de **corte e colagem**;

Tamanho: 1.300 a 2.400 pb de extensão, e contém o gene da transposase;

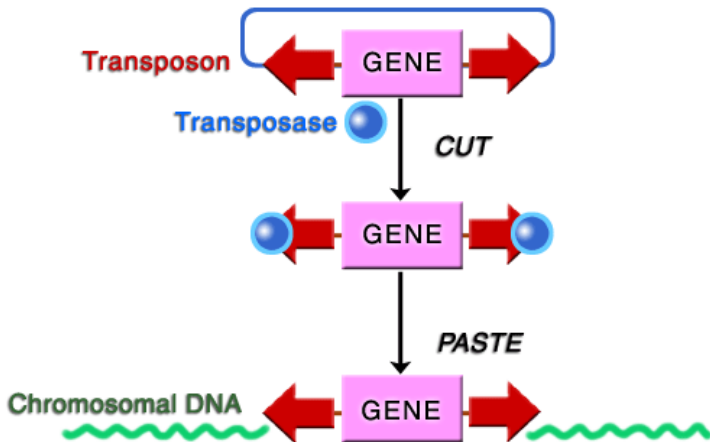
Quando **ativos**, podem se deslocar pelas genomas celulares de quase qualquer espécie, porém **poucos deles são ativos** (capazes de transposição), devido a mutações nos genes da transposase.



Saltam em sítios de DNA aleatoriamente – alto potencial de inativação de genes essenciais do hospedeiro, por meio de **disrupção**.

A engenharia genética vem sendo usada para reativar transposons dessa família, os quais são usados em pesquisas genéticas.

Transposição



- Atuação da **seleção estabilizadora**, que vai **equilibrar** a sua própria amplificação contra os efeitos prejudiciais
- Sugere-se que transposons exigem uma **regulação ativa** para a sobrevivência do organismo.

Transposons

Nº de cópias



taxa de
transposição



Desejável para proteger o elemento de deriva genética

Nº de cópias

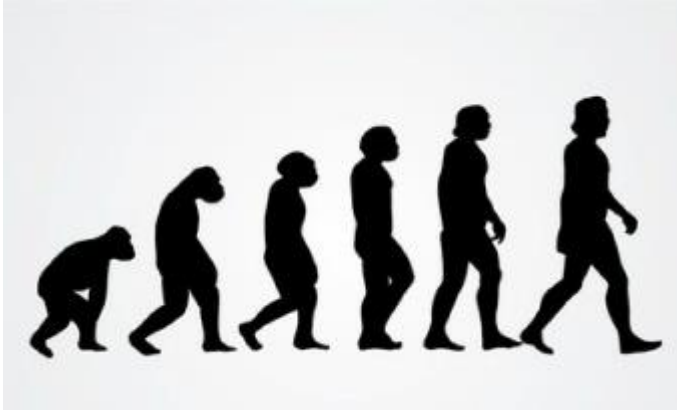


taxa de
transposição



Desejável para proteger o organismo

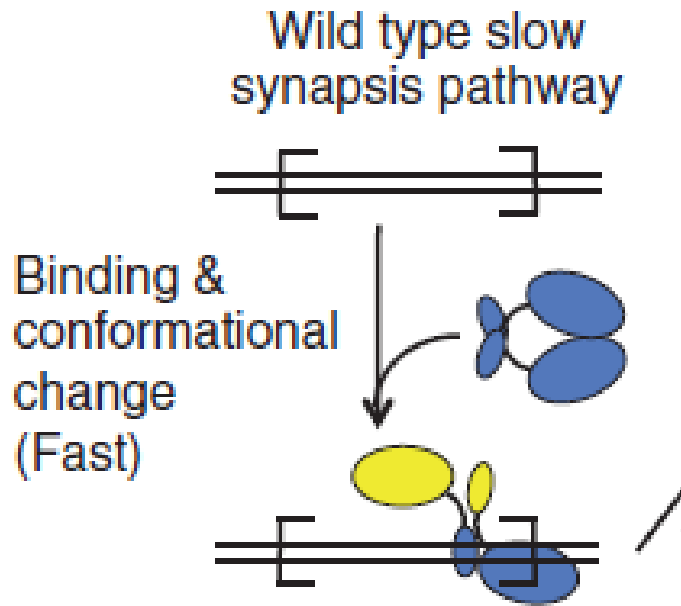
Transposon mariner *Hsmar1*



Subfamília de transposons *mariner* em **seres humanos**, é um elemento antigo que entrou na linhagem do genoma de primatas - 50 milhões de anos atrás.

Os elementos Hsmar1 são inativos devido a danos causados por mutação, uma cópia particular do gene de transposase

Transposon mariner *Hsmar1*



Em *Hsmar1*, a auto-regulação ocorre por interações alostéricas entre as subunidades transposase: os domínios de ligação de DNA apresentam a mesma afinidade para as extremidades do transposon.

- No entanto, a ligação da primeira extremidade do transposon reduz a afinidade do local não ocupado. **Alosterismo** - estado de uma molécula dita as propriedades da outra.

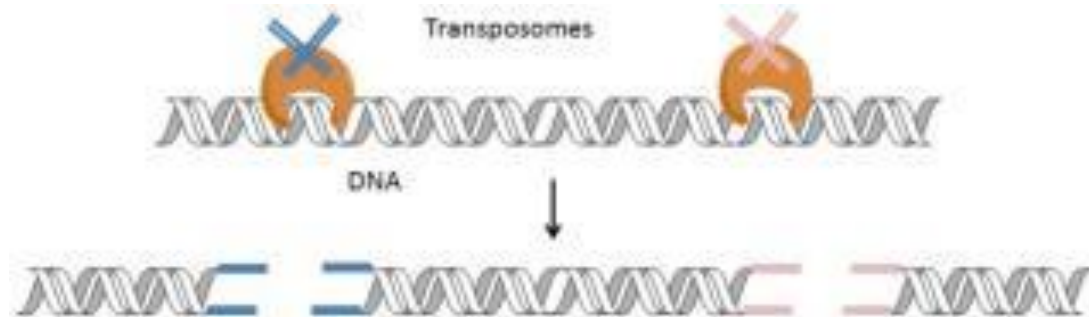
Transposon mariner *Hsmar1*

↓ afinidade para a segunda extremidade do transposon

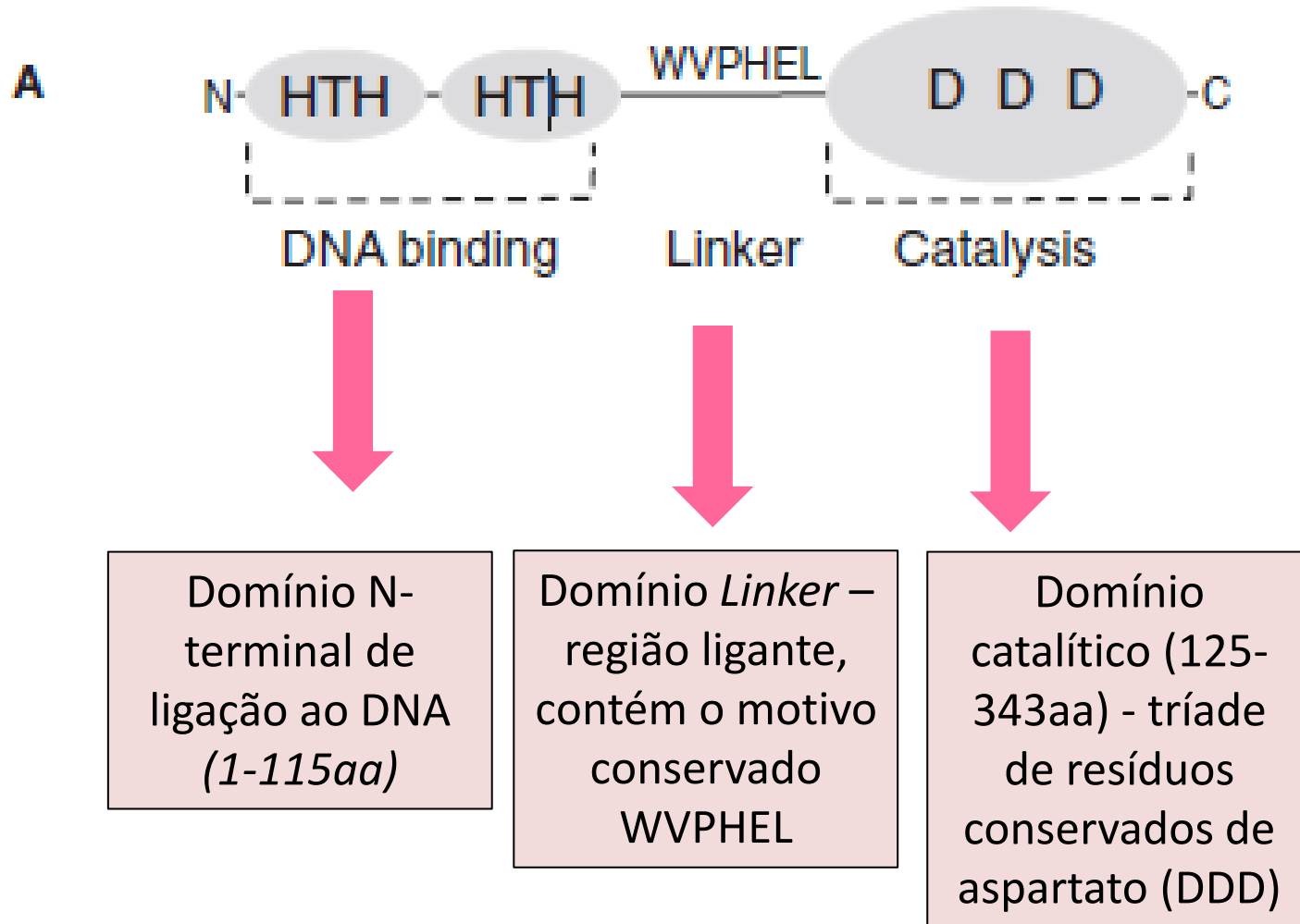
↓ a taxa de sinapse

↑ aumenta a competição por locais de ligação

Impõe a auto-regulação a uma
concentração de transposase baixa.



Estrutura de uma transposase *mariner*



Estrutura da Hsmar1 transposase

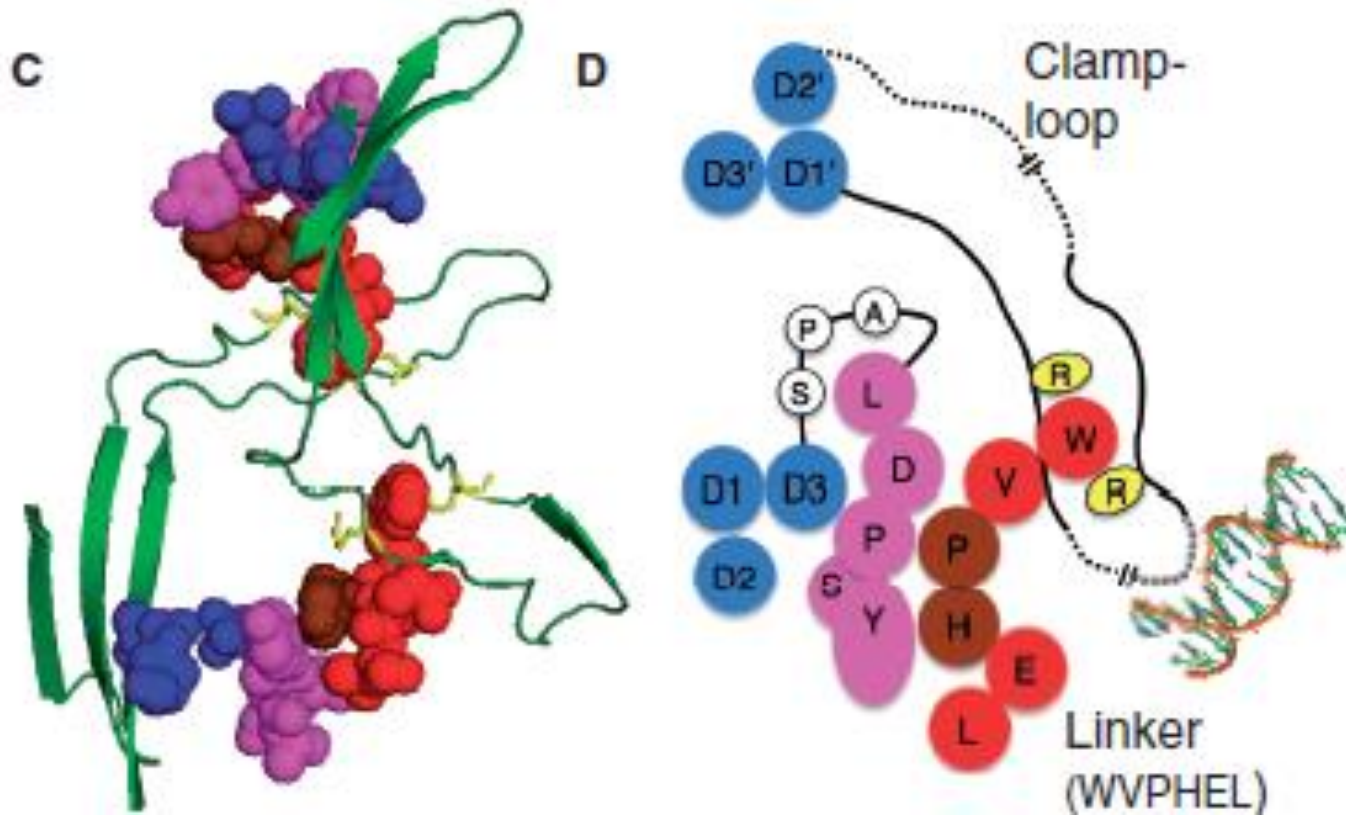
B

			*		*		*				
Mos1	...	WVPHEL	...	DEKW	...	HDNA	...	YSPDL	...	DY	...
Famar1	...	WVPHEL	...	DEKW	...	HDNA	...	YSPDL	...	DY	...
Mboumar9	...	WVPHEL	...	DEKW	...	HDNA	...	YSPDL	...	DY	...
Hsmar1	...	WVPHEL	...	DEKW	...	HDNA	...	YSPDL	...	DY	...
				D1		D2				D3	

Alinhado com as
seqüências de três
elementos mariner
naturalmente ativas

Além da tríade catalítica, há dois
motivos de seqüências altamente
conservadas: WVPHEL e YSPDL.

Estrutura da Mos1 transposase



O clamp-loop estende-se desde o núcleo catalítico de um monômero e interage com o motivo WVPHEL da outra.

Hiperatividade do Transposon

- Mutações em um motivo conservado sugere que a sua função é ativa, por consequência da alosteria.
- **Mutações no motivo WVPHEL de Hsmar1 produziu transposases hiperativas em quatro das seis posições.**

W - triptofano

V - valina

P - prolina

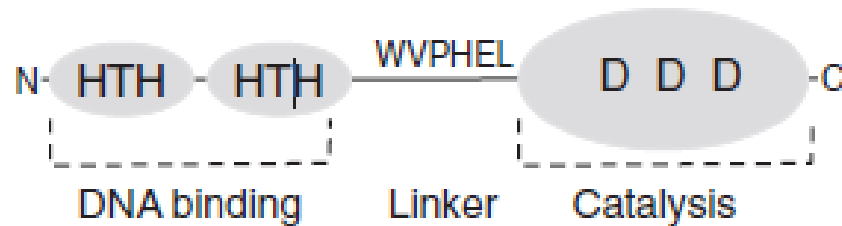
H - histidina

E - glutamato

L - leucina

Objetivo

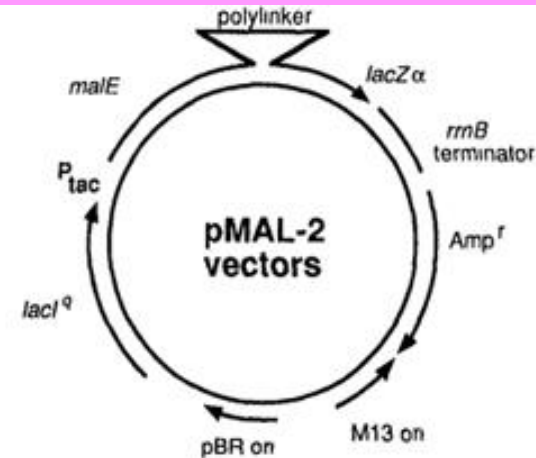
Mutações simples no motivo WVPHEL resultaria em transposases hiperativas?



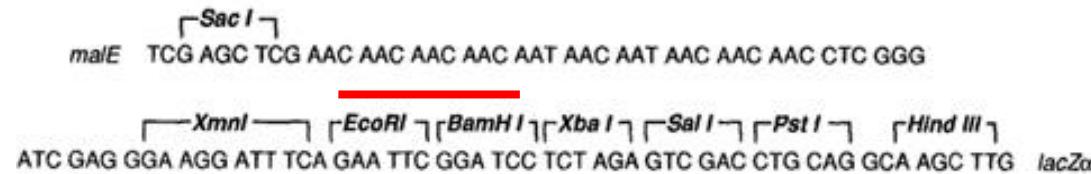
Materiais e Métodos

Hsmar1 transposase

- Plasmídeos de expressão de transposase para purificação e ensaio de papillation foram criados por clonagem dos respectivos genes de transposase:



pMAL-c2, -p2 polylinker:



Plasmídeo

Transposase

pRC880

WT

pRC1230–1235

W118V, W118R, V119T, E122R, L123S, L123N

pRC1248-1249

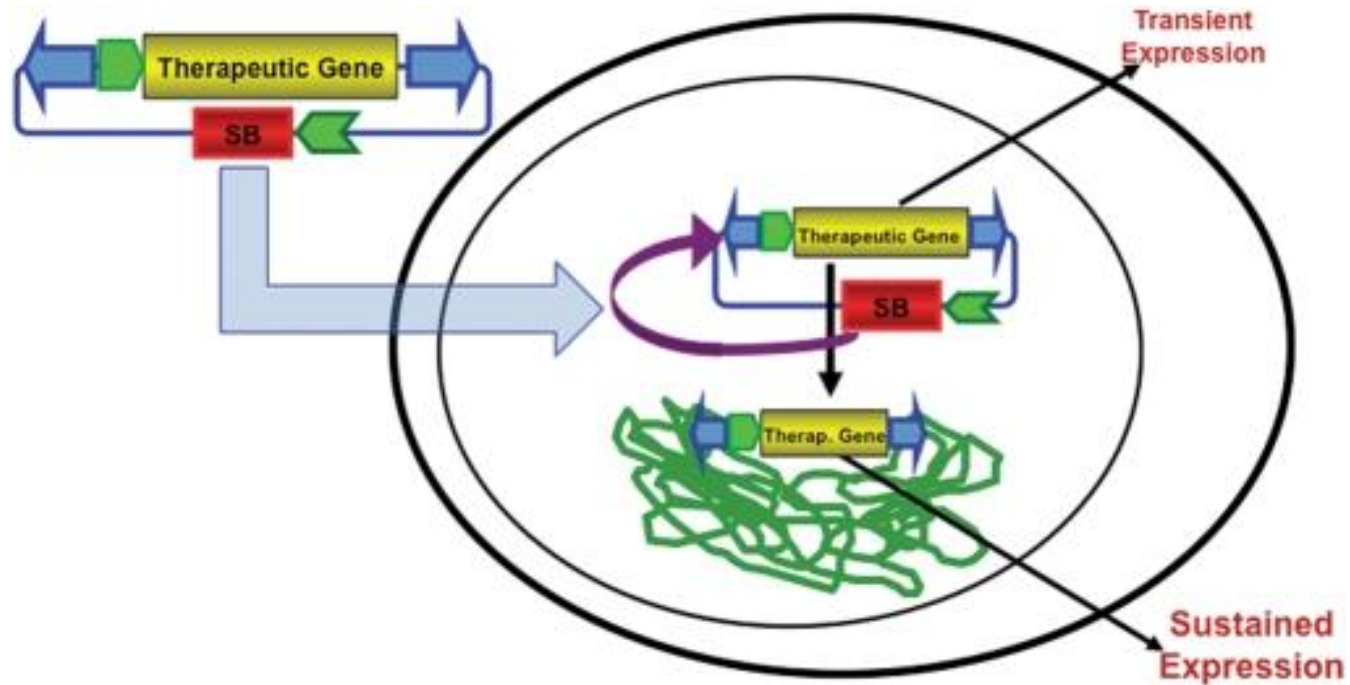
W118R+E122R, W118R+L123N

pRC1251-1259

R166A, K182A, R166A/K182A, W118D/R166A, W118D/K182A, W118D/R166A/K182A, Y275A, P267A, L278A

Materiais e Métodos

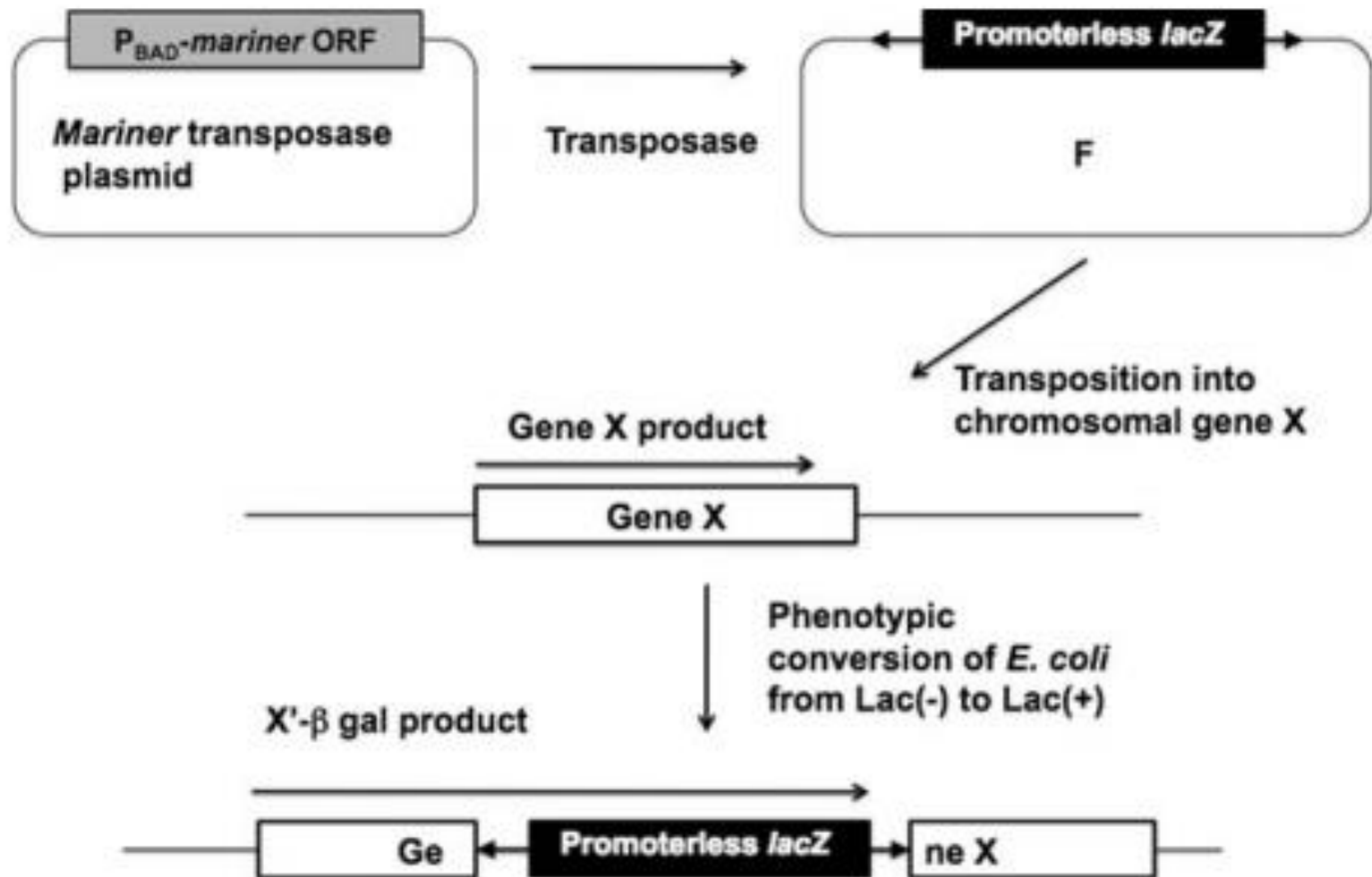
Células de Hella



Sleeping Beauty System - sequências transposase Hsmar1

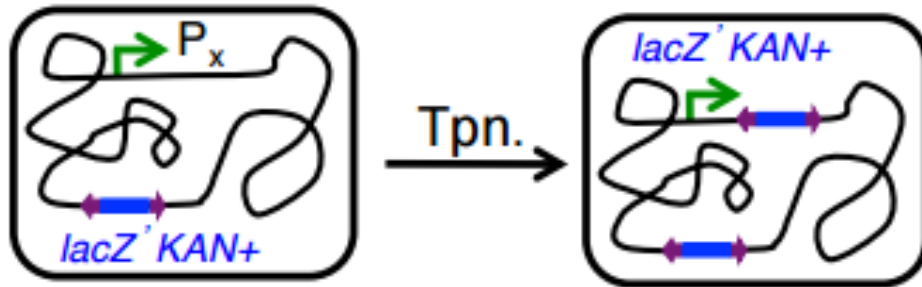
Plasmídeo	Transposase
pRC1241-1249	WT, W118V, W118R, V119T, E122R, L123S, L123N, W118R / E122R e W118R / L123N

Papillation Assay

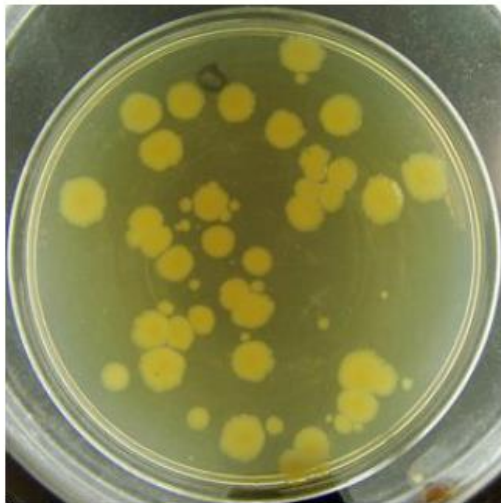


Papillation Assay

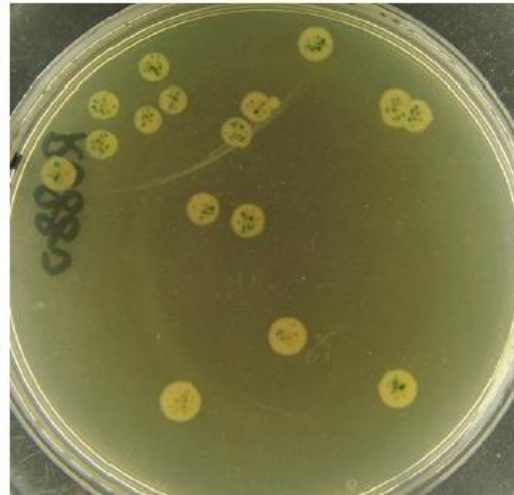
E. coli RC5096



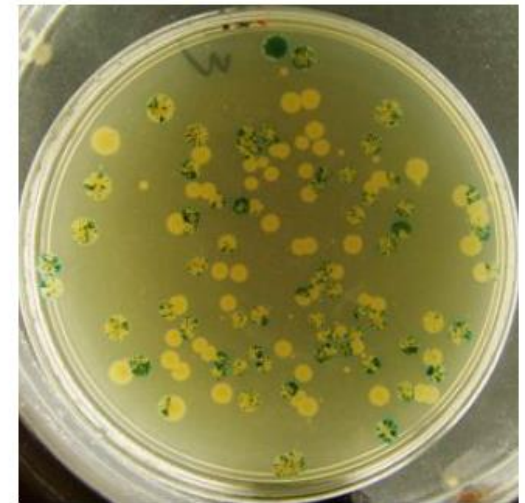
Ele codifica um transposon
com um $lacZ$ sem promotor
+ um gene de resistência à
canamicina



No T'ase



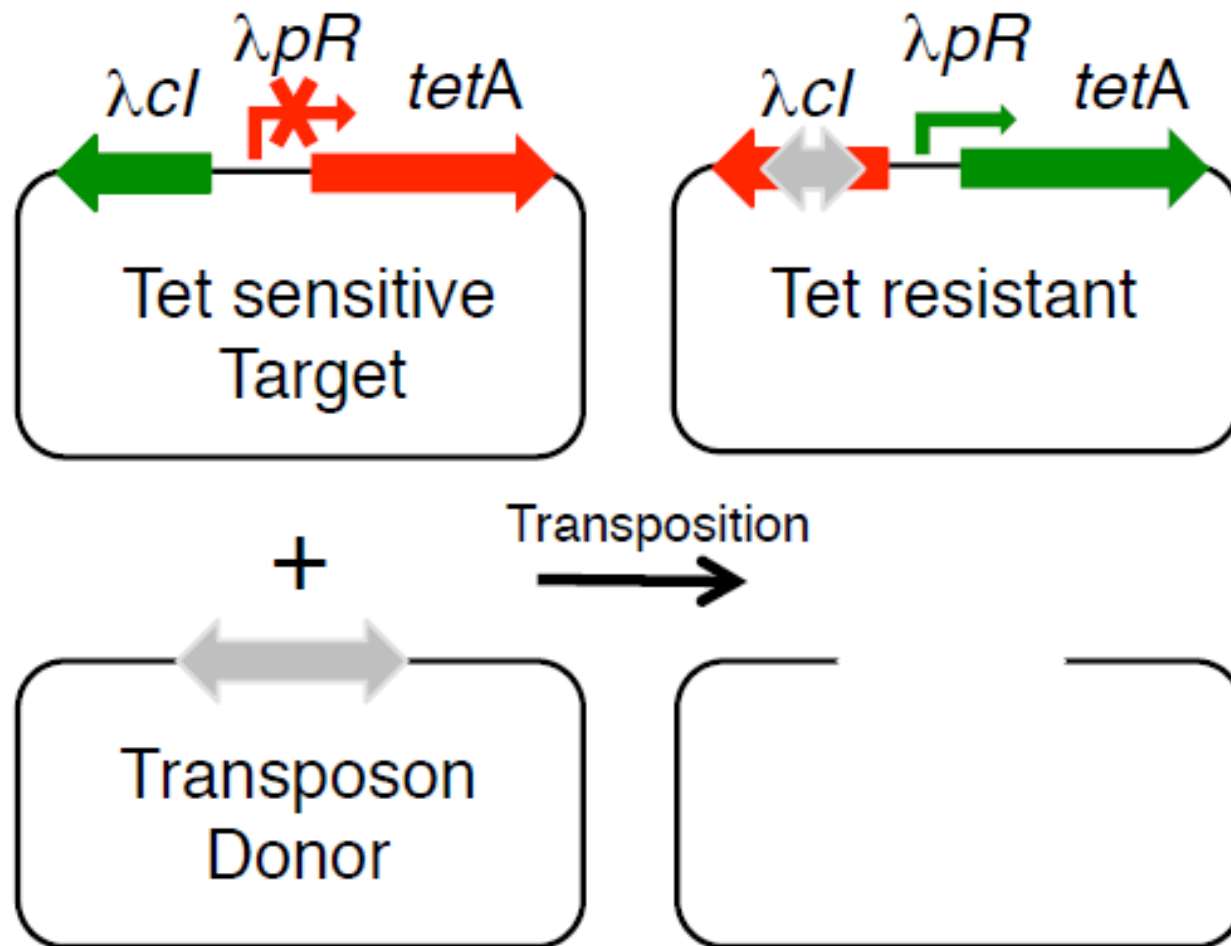
WT T'ase



W118

Foi usado para fornecer uma avaliação visual da taxa de transposição de Hsmar1

Mating out assay



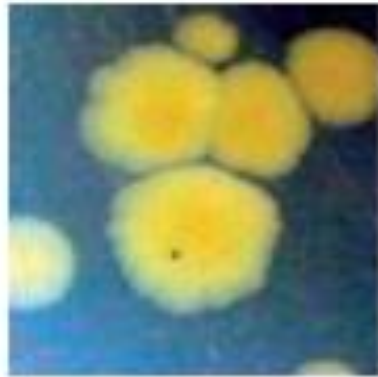
É usado para quantificar o nível de transposição das transposases mariner

RESULTADOS

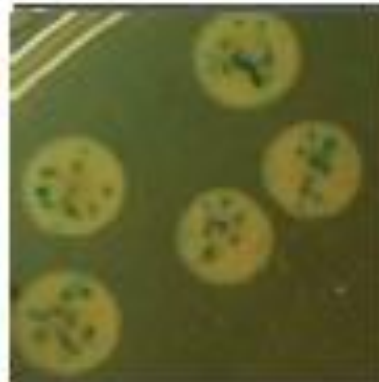


Mutações WVLEL produziram transposases hiperativas

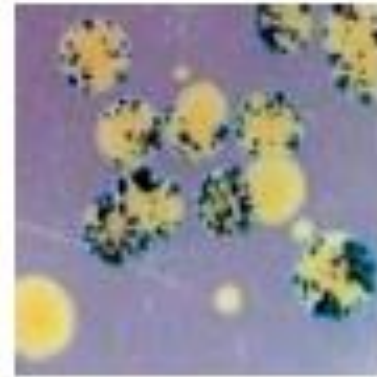
A



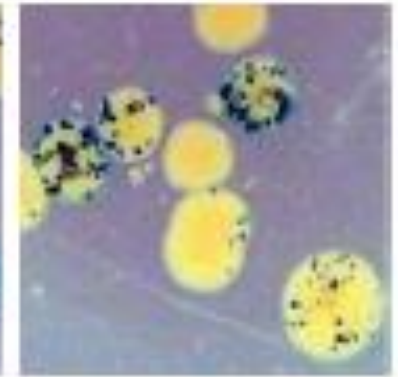
No T'ase



WT T'ase



W118→X



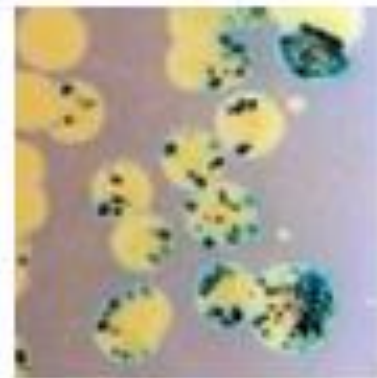
V119→X



P120→X



H121→X



E122→X

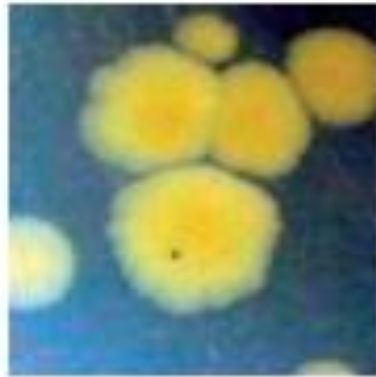


L123→X

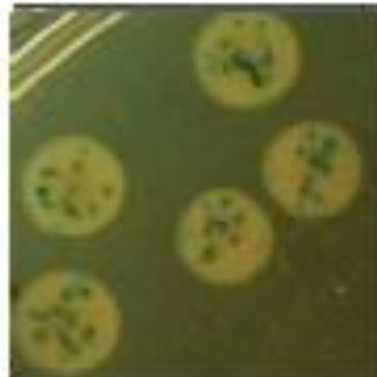
Quase todas as possíveis substituições de W, V, E e L produziram um aumento na taxa de transposição.

Mutações PH produzem transposases hipoativas

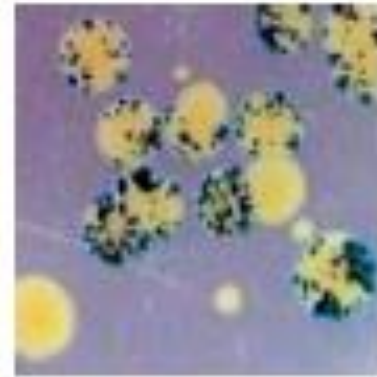
A



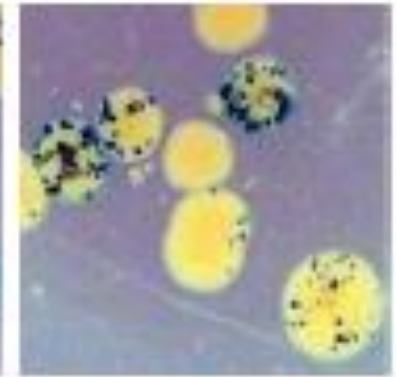
No T'ase



WT T'ase



W118→X



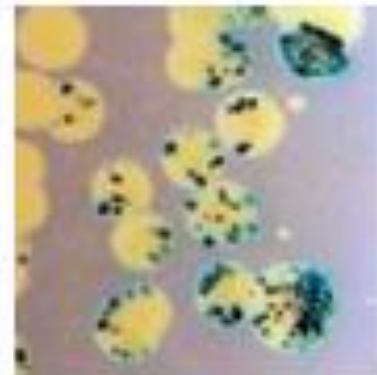
V119→X



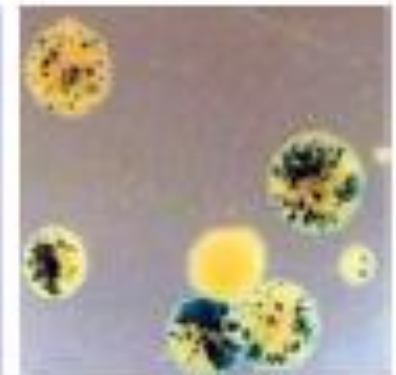
P120→X



H121→X



E122→X

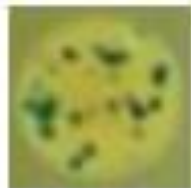


L123→X

P e H – clones hipoativos

Resultados

B



WT



R166A



K182A



R166A/
K182A



R166A/
W118D



K182A/
W118D



R166A/
K182A/
W118D

C



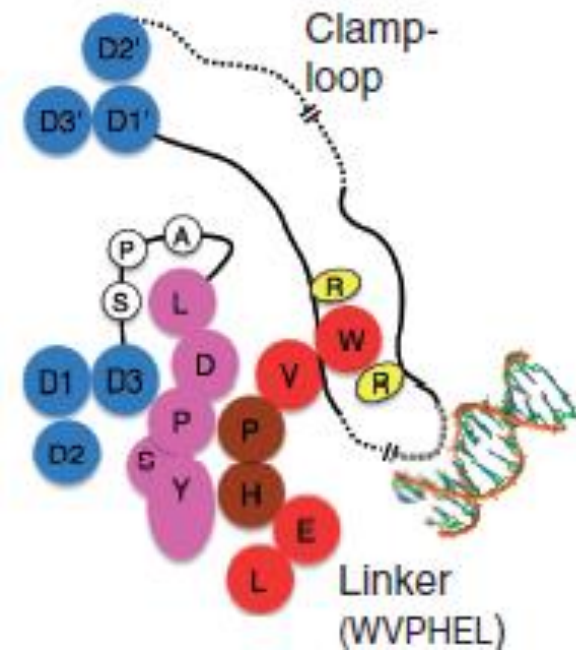
Y274A



P276A



L278A



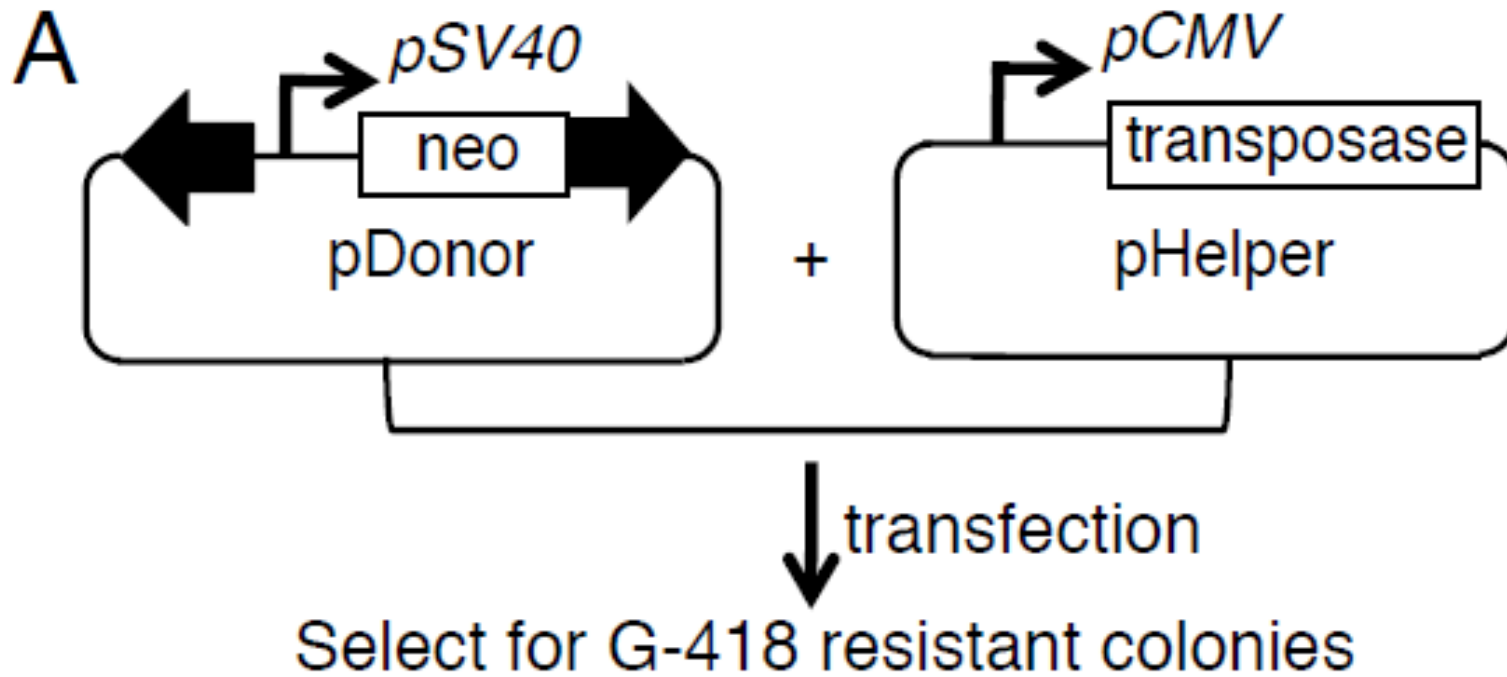
Resultados

Table 1. Transposition frequencies of individual mutants

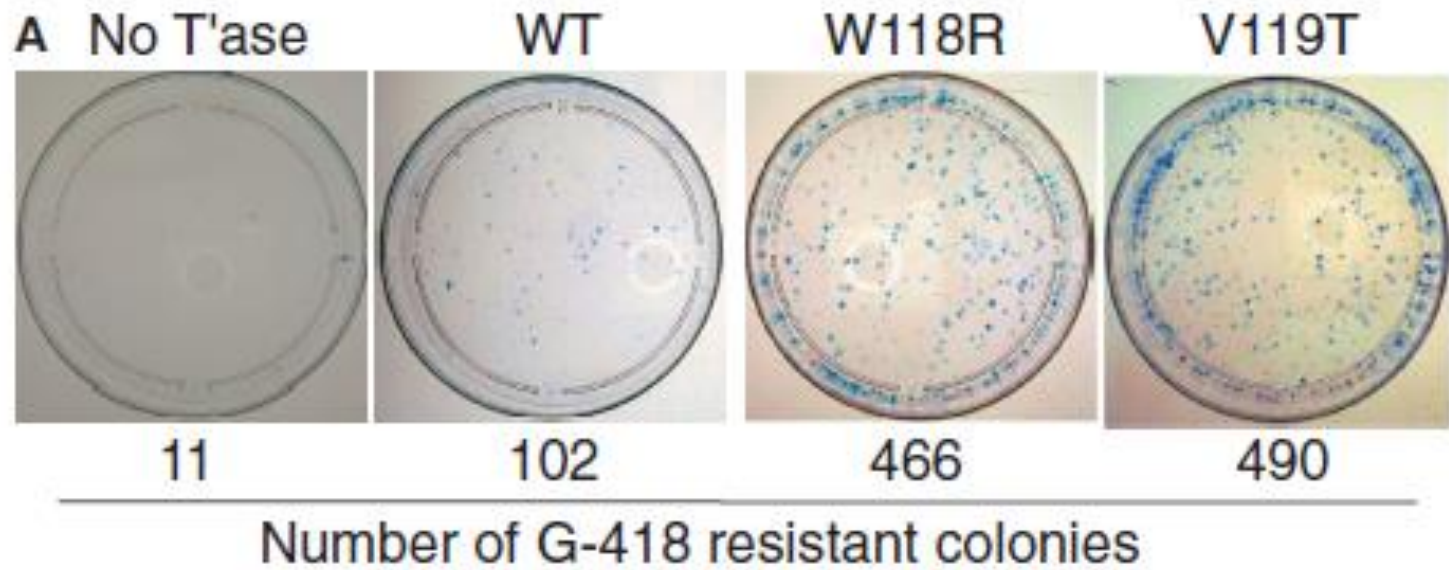
Mutation		W Mutant/W.T.	V Mutant/W.T.	P Mutant/W.T.	H Mutant/W.T.	E Mutant/W.T.	L Mutant/W.T.
Small	G	1	0.03	nd	0.08	0.4	20
	A	8	3	0.5	nd	3	5
Nucleophilic	S	20	7	nd	0.09	6	50
	T	8	7	nd	0.3	8	20
	C	8	2	0.4	nd	1	0.7
Hydrophobic	V	10	1	0.6	nd	10	6
	L	6	0.1	0.4	nd	4	1
	I	4	3	nd	nd	2	3
	M	10	nd	nd	nd	nd	0.8
	P	4	0.02	1	nd	0.2	0.06
Aromatic	F	8	0.2	nd	0.4	2	0.09
	Y	nd	0.06	nd	0.5	5	nd
	W	1	nd	nd	1	2	nd
Acidic	D	0.3	nd	nd	nd	0.08	20
	E	2	3	nd	nd	1	7
Amide	N	nd	0.8	nd	nd	0.6	60
	Q	8	2	0.01	nd	6	3
Basic	H	10	0.3	nd	1	2	0.1
	K	10	0.4	0.04	0.2	7	nd
	R	30	0.02	nd	nd	30	0.9

A frequência de transposição é obtida dividindo-se o número total de transconjugantes contendo o transposão pelo número total de transconjugantes.

Células *HeLa* - eucarióticas



Substituições WVPHEL são hiperativos em células *HeLa*

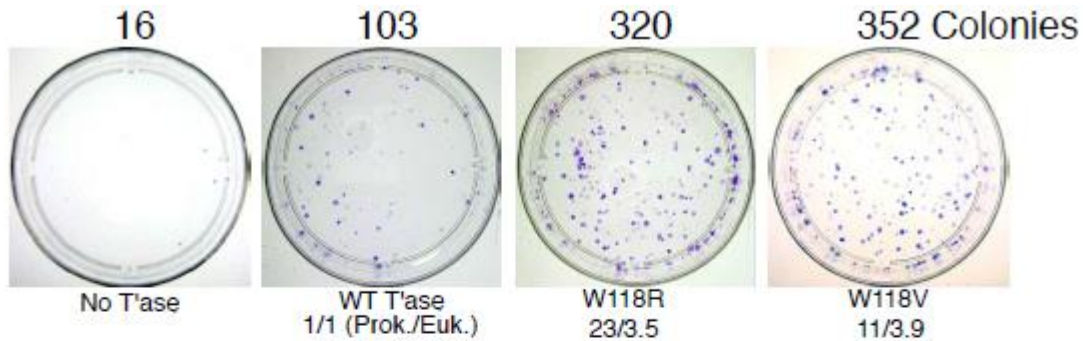


30 a 7 X
Mating-out bacterias

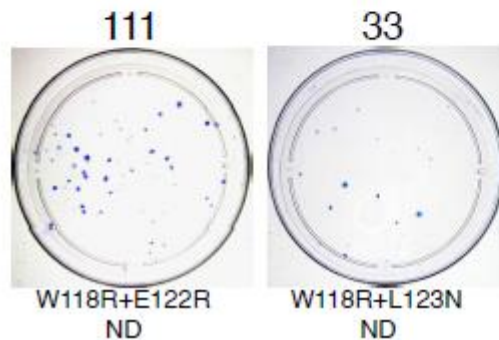
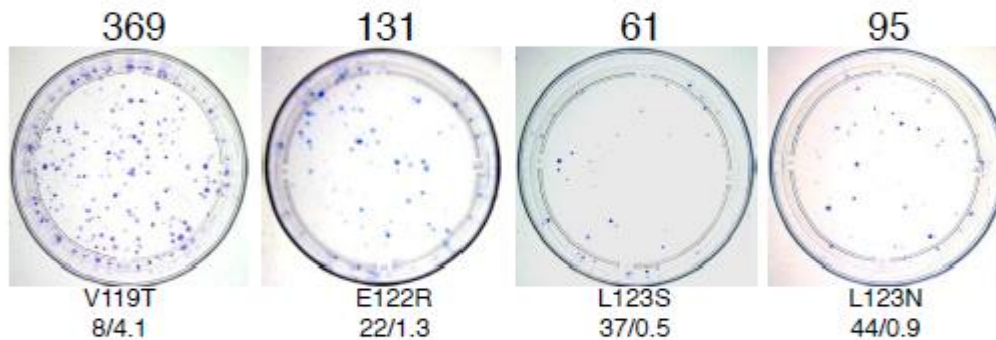


4 X
Células *HeLa*

Resultados



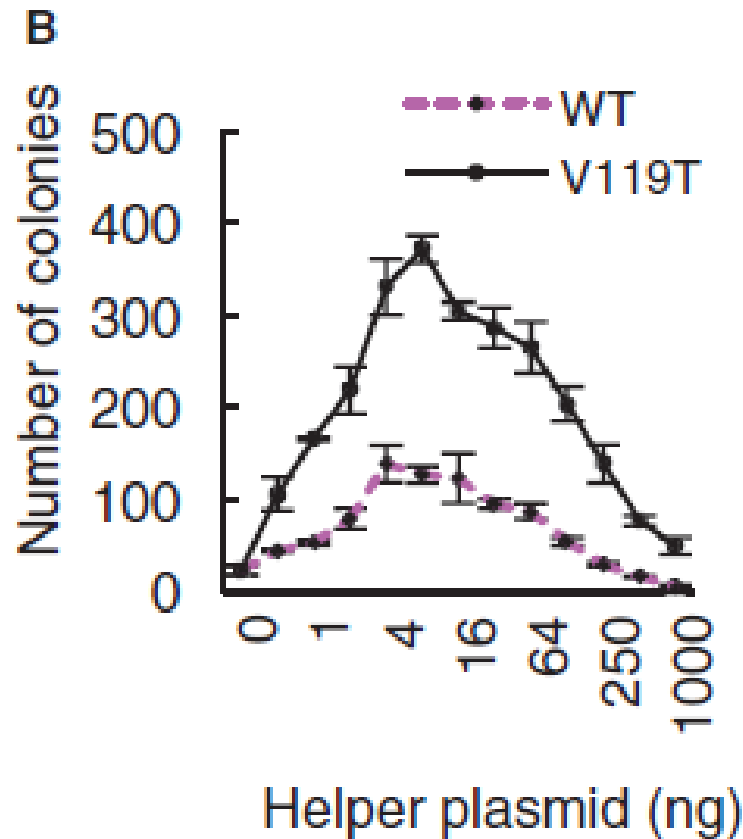
Substituições V, E e G =
hiperactividade em células
HeLa > ensaio bacteriano



mutantes duplos = menos
ativos que mutantes individuais
de onde foram derivados

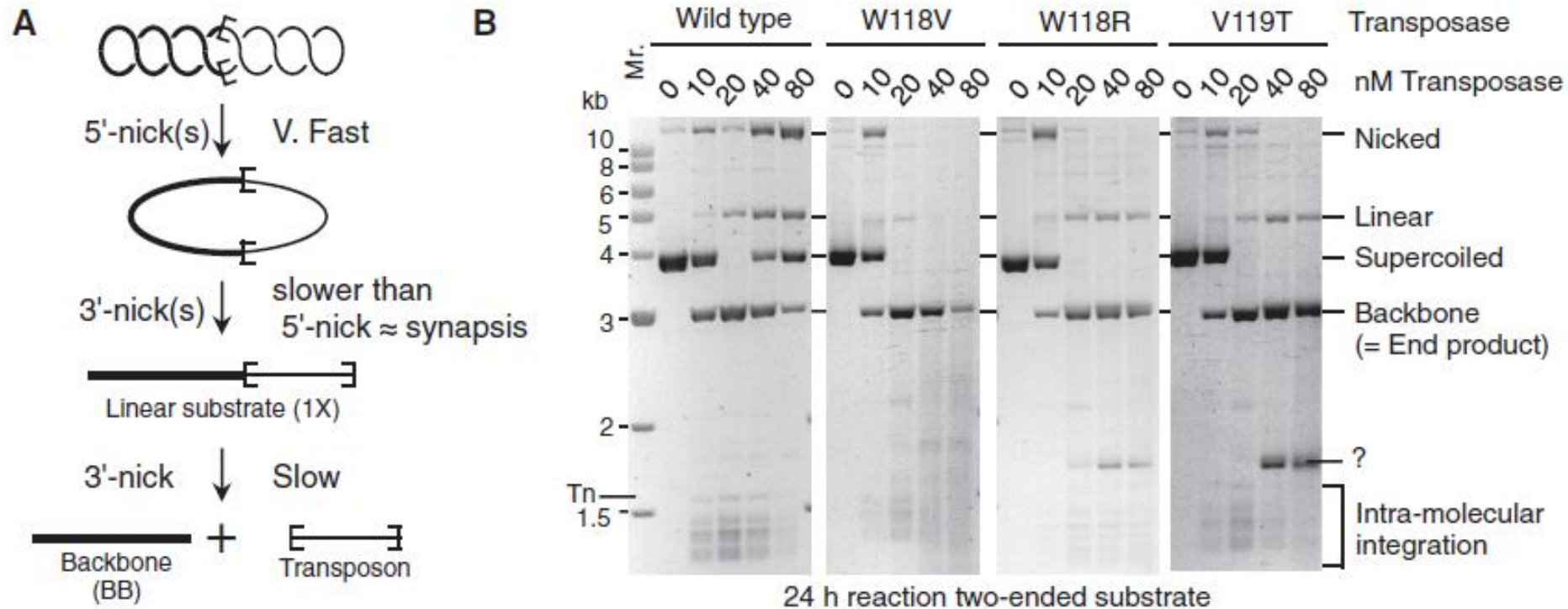
Resultados

OPI: inibição de superprodução



Feedback negativo =
quando há muita
transposase, o nível de
transposição diminui.

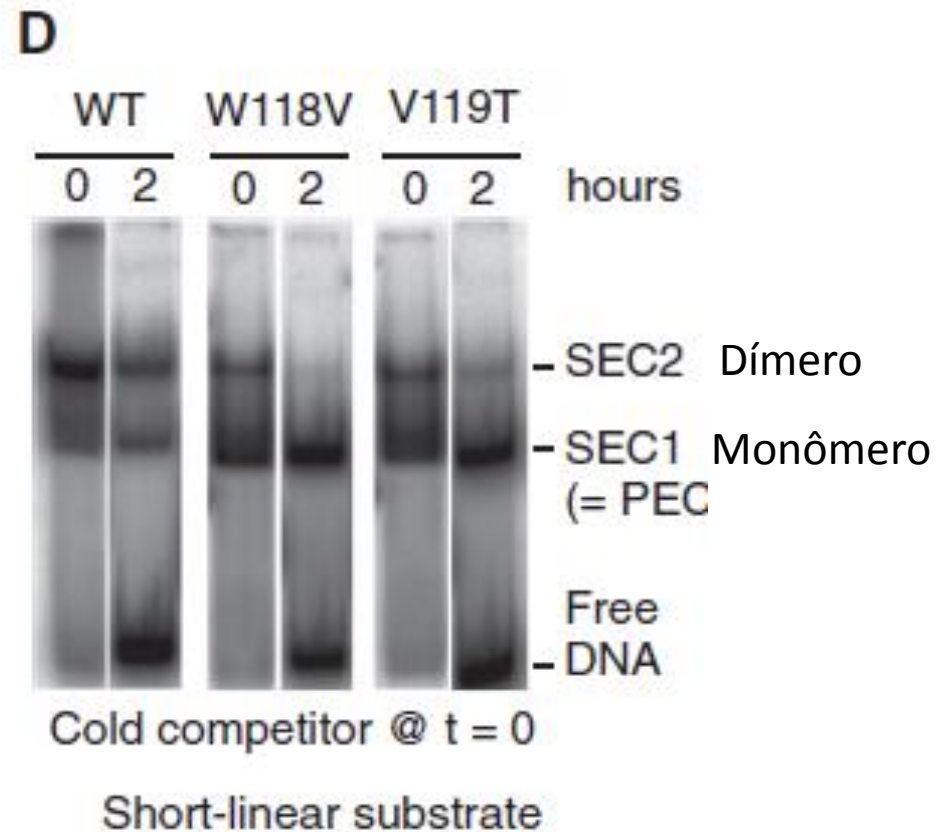
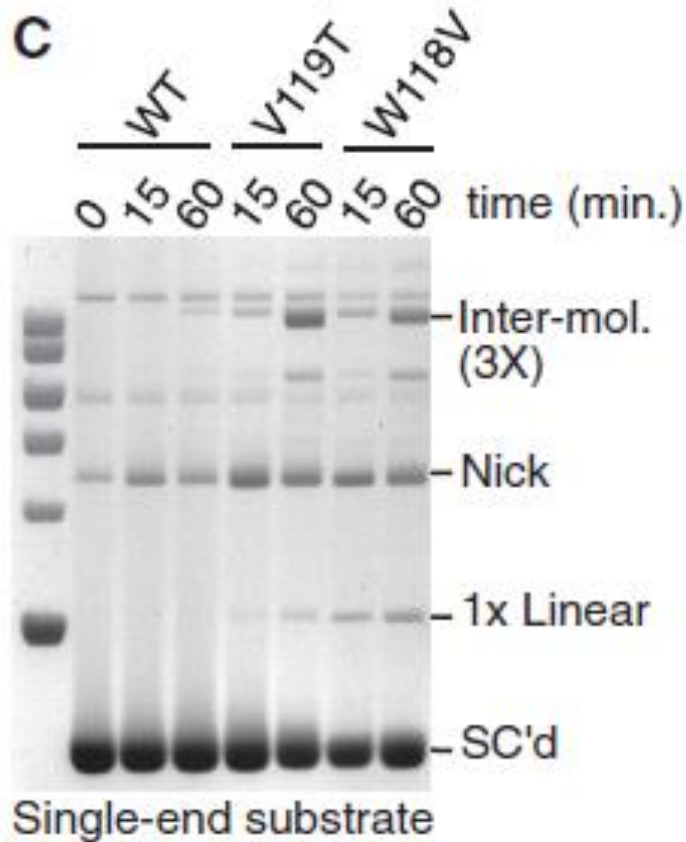
Sensibilidade dos mutantes ao excesso de transposase



O mutante V119T é resistente ao OPI

A resistência ao OPI pode ser devida à sinapse mais rápida com as proteínas mutantes

A sinapse é o passo mais lento da transposição

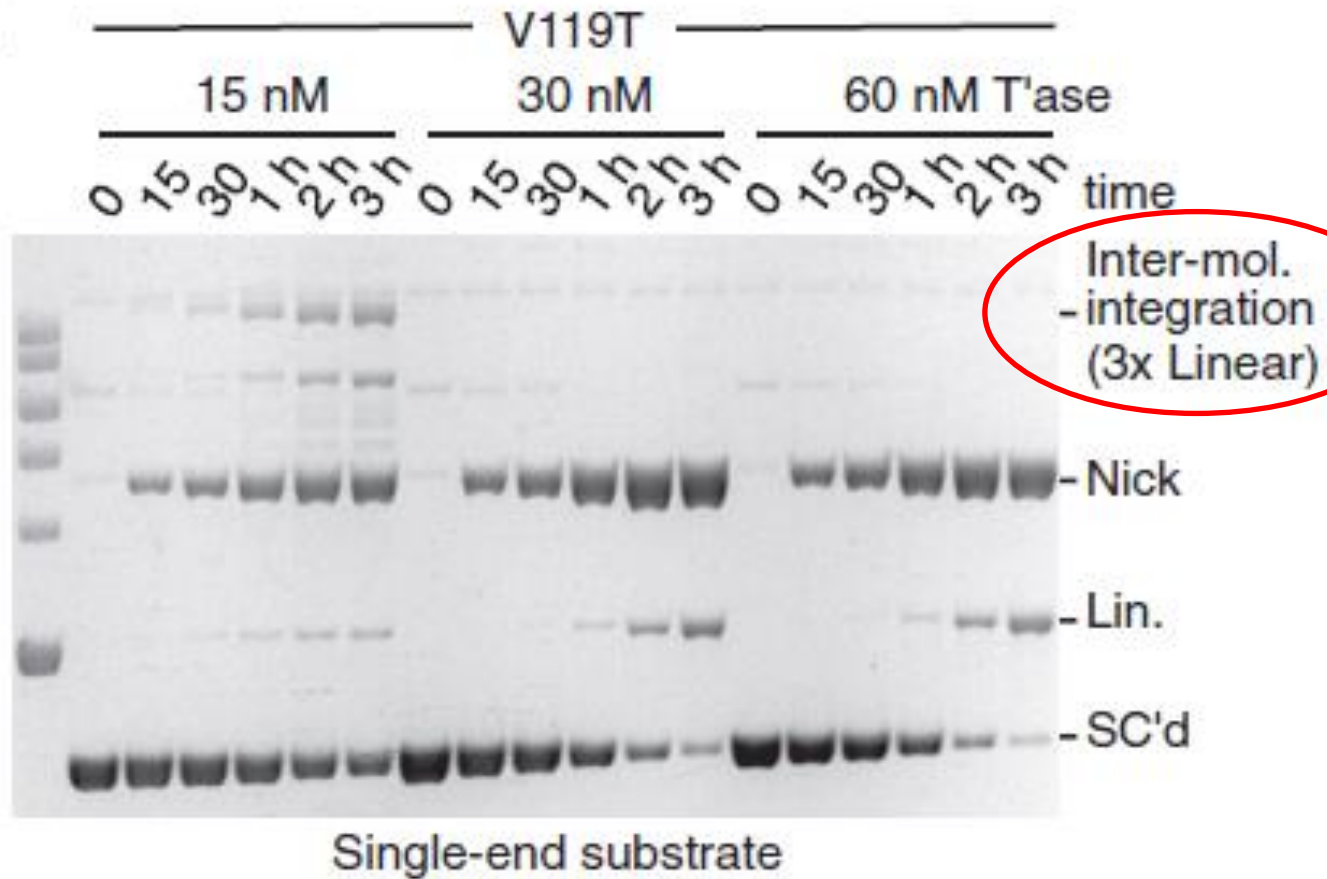


Os mutantes produzem o transposossomos mais rapidamente

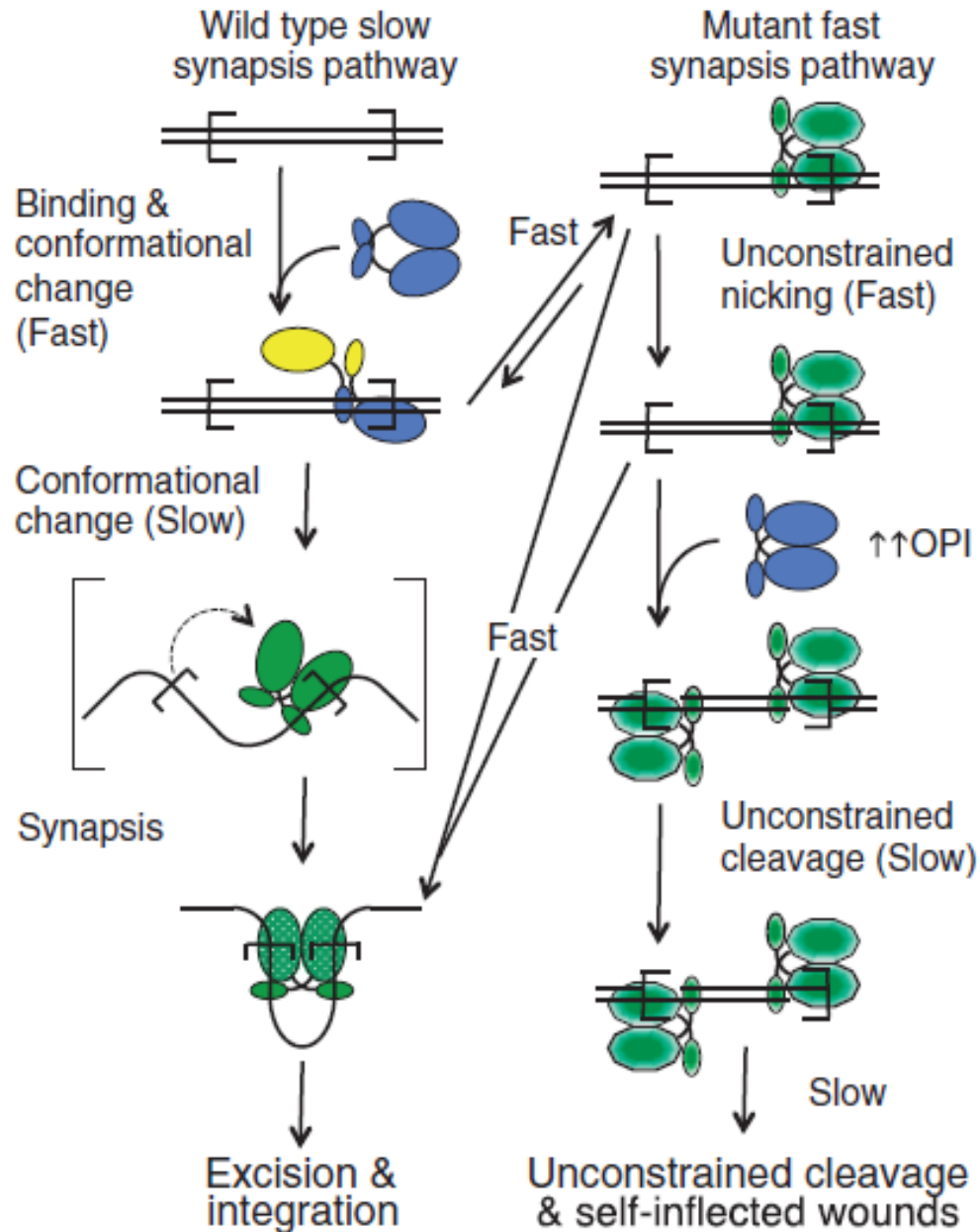
Inter-mol. é o produto de transposição
SC'd indica substrato supercoiled.

Mutantes V119T OPI + transposição inibida

E



Discussão



Conclusões

- **Mutações WVPHEL produziram transposases hiperativas em cepas bacterianas**
- **Mutações WVPHEL produziram transposases hiperativas em células *HeLa* > que em bacs**
- **As transposases selvagens são sensíveis ao excesso de transposase - OPI**
- **Mutantes hiperativas são menos sensíveis à OPI porque montar o transposossomo mais rapidamente**

OBRIGADA!

