

# DNA transpozoni u genomu čovjeka

---

Jelić Matošević, Zoe

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:424492>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

DNA TRANSPOZONI U GENOMU ČOVJEKA  
DNA TRANSPOSONS IN THE HUMAN GENOME

SEMINARSKI RAD

Zoe Jelić Matošević

Prediplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof.dr.sc. Miroslav Plohl

Suvoditelj: doc.dr.sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2016.

# SADRŽAJ

1. Uvod.....	3
2. Transpozicija .....	5
2.1 hAT .....	6
2.2 Tc1/mariner .....	7
2.3 PiggyBac.....	8
2.4 Helitroni i Polintoni .....	9
3. Životni ciklus transpozona .....	10
4. Raspodjela u genomu .....	11
5. Domestikacija.....	14
5.1 Rag1/Rag2 .....	14
5.2 SETMAR.....	15
6. Transpozoni kao alat u genomskom inženjerstvu .....	16
7. Zaključak.....	18
8. Literatura .....	19
9. Sažetak .....	22
10. Summary .....	23

# 1. Uvod

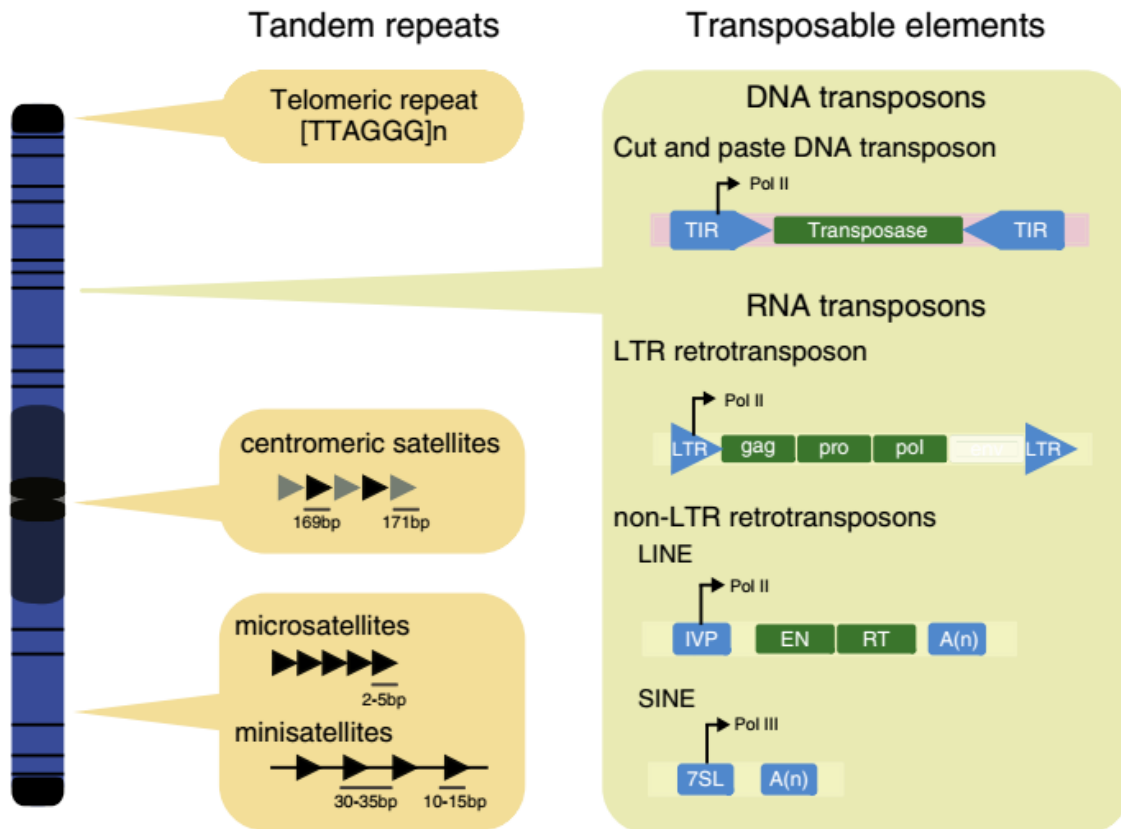
Transponirajući ili pokretni genetički elementi (TE) su segmenti DNA koji imaju sposobnost premještanja po genomu. Sastavni su dio kako prokariotskih tako i eukariotskih genoma te imaju važnu funkciju u njihovoj izgradnji, evoluciji, ali i funkciji. Prema mehanizmu replikacije dijele se u dvije skupine, elemente grupe I, koje uobičajeno nazivamo retrotranspozoni, i grupe II, ili transpozone (Habibi i sur. 2015). Retrotranspozoni se repliciraju "copy-and-paste" mehanizmom, koji uključuje RNA intermedijer i enzim reverznu transkriptazu ( $DNA \rightarrow RNA \rightarrow DNA$ ). Obično ih se još dodatno dijeli prema postojanju dugih ponavljajuće sekvenci na krajevima elementa (LTR, *long terminal repeats*). Retrotranspozicija nužno uključuje kopiranje elementa koji se premješta u genomu te povećanje broja kopija istog.

Za razliku od retrotranspozona, transpozoni su elementi koji se premještaju bez RNA intermedijera, koristeći "cut-and-paste" mehanizam izrezivanja i ponovne ugradnje izrezanog segmenta u genomsku DNA ( $DNA \rightarrow DNA$ ), za što im je dostatan enzim transpozaza. Obilježje transpozona je da na krajevima imaju invertno ponavljajuće sekvence DNA, u daljnjem tekstu TIR (*terminal inverted repeats*), koje mogu tvoriti strukture slične ukosnicama koje prepoznaju transpozaze. Mehanizmom izrezivanja i ugradnje transpozona mijenja se samo položaj elementa u genomu, a ne povećava se broj kopija. Međutim, broj kopija ovih elemenata može se ipak povećati drugim molekularnim mehanizmima, npr. popravkom na mjestu izrezivanja putem kopije na homolognom kromosomu. Uz "cut-and-paste" transpozone, elementi grupe II uključuju transpozone koji se amplificiraju replikacijom kotrljajućeg kruga (helitrone) te polintone (Kapitonov i Jurka, 2007).

Sljedeća podjela TE je na autonomne i neautonomne. Autonomni elementi kodiraju sve enzime koji su neophodni za premještanje po genomu, dok neautonomni „posuđuju“ enzime koji im nedostaju od autonomnih elemenata. Neautonomni elementi su često delecijске inačice autonomnih, ali i bilo koji segment molekule DNA koji sadrži obilježja koja prepoznaju enzimi potrebni za transpoziciju ili retrotranspoziciju mogu se uspješno premještati po genomu pomoću funkcionalnih enzima koje kodiraju autonomni TE (Padeken i sur., 2015). Tako retroelementi mogu biti i produkti staničnih gena. Među transpozonima, poznati neautonomni elementi su *miniature inverted-repeat transposable elements*, MITEs (Muñoz-López i García-Pérez, 2010).

Dok su retrotranspozoni i danas povremeno aktivni u ljudskom genomu, za transpozone se smatra kako nisu bili aktivni zadnjih 37 milijuna godina (Pace i Feschotte, 2007). Unatoč tome,

mnogi geni u ljudskom genomu vuku podrijetlo od transpozona. U ovom radu ću prikazati svojstva transpozona te, pojašnjavajući njihovu raspodjelu unutar ljudskog genoma i njihovu domestikaciju, objasniti njihov utjecaj na evoluciju čovjeka.



Slika 1 Shematski prikaz tipova repetitivnih sekvenci (Izvor: Padeken i sur., 2015)

## 2. Transpozicija

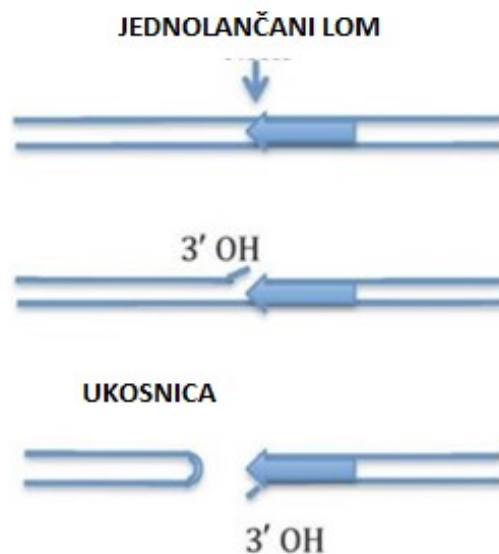
Osnovni model premještanja transpozona po genomu podrazumijeva izrezivanje iz donorske molekule, cijepanje ciljne molekule i integraciju transpozona na novo mjesto. Transpozaze su enzimi koje kodiraju sami transpozoni, a imaju dvojaku ulogu, kao endonukleaze pri izrezivanju elementa iz genomske DNA te kao integreze pri njegovoj ugradnji na novom položaju u genomu. Ova druga funkcija uključuje prepoznavanje kratkog niza od nekoliko nukleotida genomske DNA na mjestu ugradnje, koju se pocijepa tako da ostaju stršeci jednolančani krajevi od, često, 4-5 nukleotida (kao kod nekih restriksijskih endonukleaza). Popunjavanjem jednolančanih dijelova genomske DNA po ugradnji mobilnog elementa nastaje duplikacija kratkog odsječka DNA domaćina, koja predstavlja trag na mjestu ugradnje, a naziva se duplikacija ciljnog mjesta (*target site duplication*, TSD). Sve transpozaze u katalitičkom mjestu imaju DDD/DDE motiv<sup>1</sup> (Atkinson, 2014). Iako su navedena svojstva svima zajednička, u ovom poglavlju ću detaljnije prikazati mehanizme onih skupina koje se u većem broju pojavljuju u ljudskom genomu. Osim klasičnog cut-and-paste mehanizma, relativno nedavno su otkrivene dvije nove obitelji transpozona, helitroni i polintoni, koji su složene građe (slični virusu) i čija transpozicija je vezana uz sintezu vlastite DNA (Kapitonov i Jurka 2007). Iako zasad nisu pronađeni u ljudskom genomu, njihovo postojanje daje zanimljive uvide u mogućnosti propagacije genetičkih elemenata, pa ću i njih ovdje ukratko opisati.

---

<sup>1</sup> Asp-Asp-Asp/Asp-Asp-Glu

## 2.1 hAT

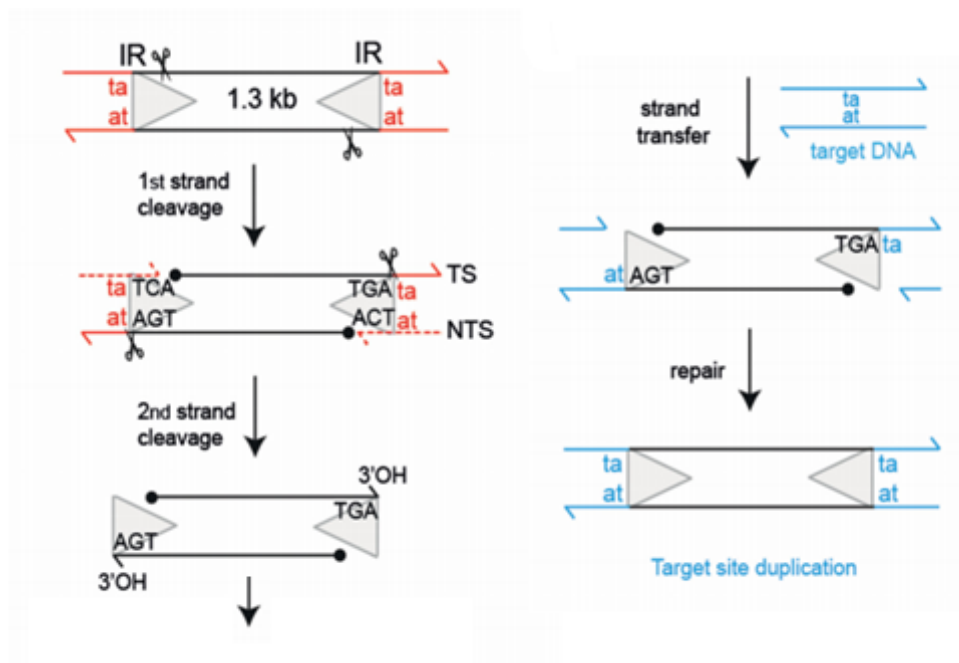
hAT je najbrojnija nadporodica transpozona u ljudskom genomu te sadrži i autonomne i neautonomne elemente (Atkinson, 2014). Na krajevima imaju TIR, sekvence DNA čija duljina može jako varirati, a pri ugradnji stvaraju karakteristične duplikacije genoma domaćina na mjestu ugradnje duge 8 pb. Sadrže i subterminalna ponavljanja, koja su bitna za vezivanje transpozaze. Izrezivanje im je često neprecizno, što je posljedica samog mehanizma hAT transpozaze. Izrezivanje započinje jednolančanim lomom 1 nukleotid od 5'-kraja transpozona, čime nastaje slobodna 3'-OH skupina pored transpozona koja napada komplementarni lanac DNA. U DNA domaćina na ovaj način nastaje ukosnica, a transpozon dobiva 3'-OH kraj koji može nukleofilno napasti ciljnu DNA (Atkinson, 2014). Ukosnica se potom cijepa enzimima domaćina i lom se popravlja nehomolognim sparivanjem krajeva (Zhou i sur, 2004), što je vjerojatno uzrok nepreciznog izrezivanja. Transpozaza potom radi jednolančane ureze u ciljnoj DNA udaljene 8 pb, transpozon se veže za nastale stršeće krajeve i sintezom DNA nastaju duplikacije duge 8 pb (Piegu i sur., 2015).



Slika 2 Izrezivanje hAT transpozona (Izvor:Atkinson, 2014)

## 2.2 Tc1/mariner

Tc1/mariner transpozoni se preferencijalno ugrađuju u TA mjesta, stvarajući TA duplikacije u ciljnoj DNA. Pokazano je da su ove duplikacije nužne i za pravilno izrezivanje (Dornan i sur., 2015). TIR-ovi ovih transpozona sadrže mjesto cijepanja koje je evolucijski dobro očuvano i mjesto vezanja transpozaze koje osigurava njezinu specifičnost (Brillet i sur., 2007). U ovom slučaju, 5'-urez se formira izvan transpozona, nekoliko nukleotida od početka TIR-a, dok na 3' kraju urez nastaje točno na kraju transpozona, pri čemu se formira stršeci 3'-OH kraj. Potom se u ciljnoj DNA urezi rade oko TA mjesta, transpozon se veže na stršeci krajeve i sintezom DNA nastaju TA duplikacije (Dornan i sur., 2015). Stršeci nukleotidi transpozona se sparuju i na taj način nakon ligacije ostaje „ožiljak“ od transpozona (Ivics i Izsvak, 2015).

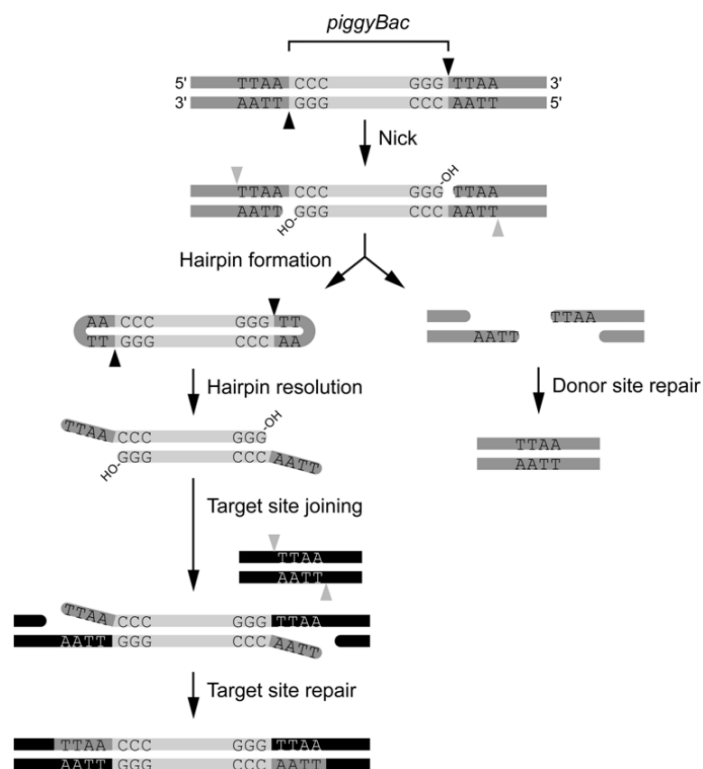


Slika 3 Izrezivanje transpozona iz Tc1/mariner superobitelji (Izvor: Dornan i sur., 2015)



### 2.3 PiggyBac

Ova skupina transpozona zanimljiva je zbog toga jer ugradnjom u DNA domaćina ne ostavlja „ožiljak“, što ju čini pogodnim za genetsko inženjerstvo (Zhao i sur., 2016). PiggyBac transpozoni su specifični po tome što se ugrađuju u TTAA mjesta. Pri izrezivanju, transpozaza reže jedan lanac stvarajući 3'-OH skupinu, koja potom nukleofilno napada 5'-kraj TTAA sekvence susjedne transpozonu. Na ovaj način na samom transpozonu nastaju ukosnice, a u donorskoj DNA ostaju komplementarni stršeci krajevi. Lom nastao u donorskoj DNA popravlja se sparivanjem stršecih krajeva i ligacijom. Transpozaza razrješava ukosnice na transpozonu i urezuje ciljnu DNA u TTAA mjestu. 5'-TTAA stršeci kraj na transpozonu komplementaran je nastalim stršecim krajevima u ciljnoj DNA, te dolazi do sparivanja i ligacije. Zanimljivo svojstvo ovog mehanizma transpozicije jest da ne zahtijeva sintezu DNA pri popunjavanju stršecih krajeva i popravku loma (Yusa, 2014).

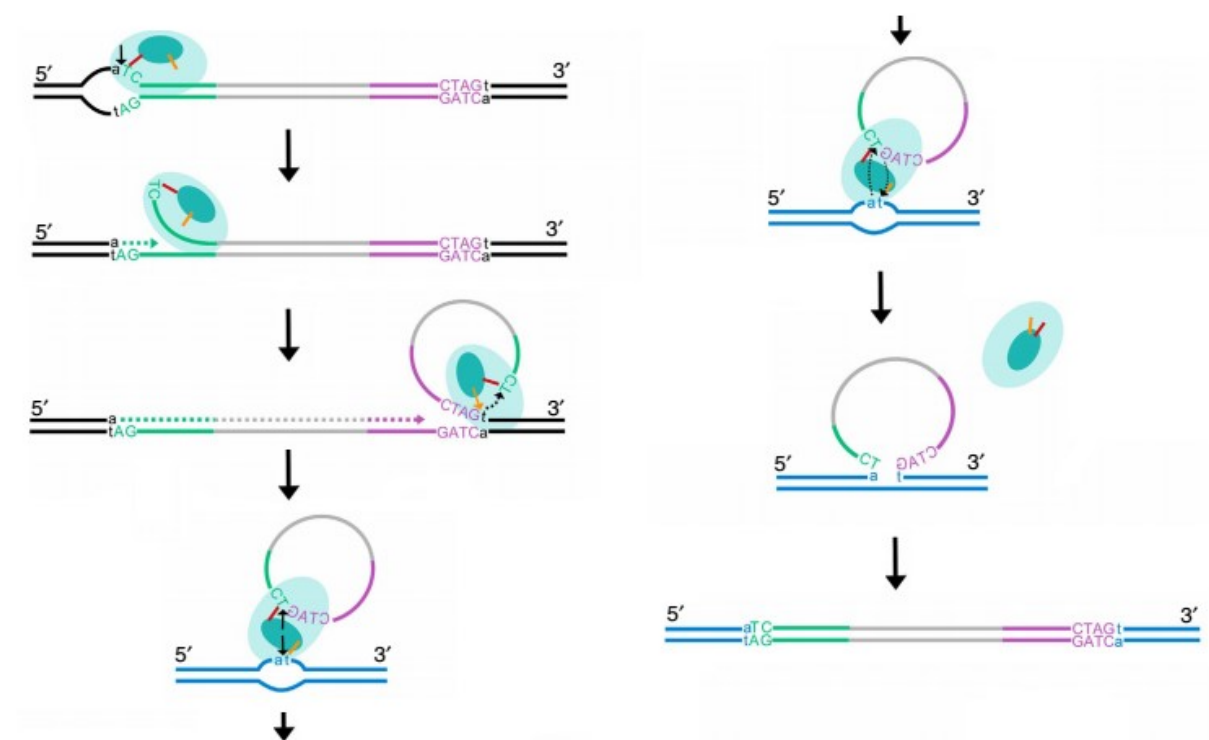


Slika 4 Izrezivanje PiggyBac transpozona (Izvor:Yusa, 2015)

## 2.4 Helitroni i Polintoni

Helitroni i Polintoni su otkriveni relativno nedavno i osim nedostatka RNA intermedijera nemaju drugih sličnosti s „klasičnim“ DNA traspozonima. Iako nemaju RNA intermedijer, helitroni su elementi koji se šire mehanizmom „*copy-and-paste*“. Umnažaju se replikacijom kotrljajućeg kruga, nalik nekim plazmidima. Prilikom transpozicije, samo jedan lanac se izrezuje a nastala praznina popunjava se pomoću komplementarnog lanca. Izrezani lanac se ugrađuje u novo mjesto u genomu. Na ovaj način helitroni transpozicijom povećavaju broj vlastitih kopija. (Grabundžija i sur., 2016)

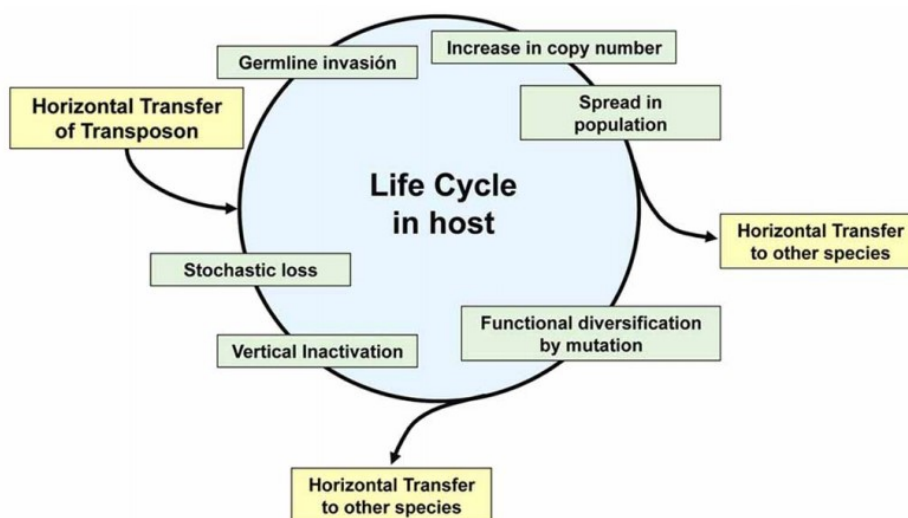
Polintoni su veliki transpozoni vrlo složene građe koji imaju mnoge sličnosti s eukariotskim DNA virusima. Za replikaciju ne koriste DNA ili RNA početnice, već OH-skupinu proteina pPolB polimeraze.



Slika 5 Mehanizam transpozicije helitrona (Izvor: Grabundžija i sur., 2016)

### 3. Životni ciklus transpozona

Smatra se da se autonomni transpozoni inicijalno uvode u genom horizontalnim prijenosom, vjerojatno pomoću virusa ili unutarstaničnih parazita (Miskey et al, 2005; Pace i Feschotte, 2007). Nakon toga slijedi faza širenja kroz genom, koja traje dok se elementi ne inaktiviraju mutacijama, ili dok ih ne inaktiviraju domaćinovi mehanizmi obrane na invazivnu DNA (primjerice heterokromatinizacija i metilacija DNA). Ukoliko promjene nastale ugradnjom ovih elemenata u genom nisu letalne, može doći do fiksacije elementa u populaciji djelovanjem genetičkog drifta ili čak i selekcije, ukoliko je nastala promjena povoljna za *fitness* organizma (Hellen i Brookfield, 2013). Tijekom ovog procesa dolazi do promjena u strukturi transpozona te od izvornog invazivnog elementa nastaju različite populacije pokretnih genetičkih elemenata, a koje se ponajviše razlikuju u rubnim regijama transpozona. Također nastaju i neautonomne varijante izvornog elementa. Ovakav proces stvaranja različitih populacija transpozona iz jednog izvornog elementa naziva se vertikalna diversifikacija (Pace i Feschotte, 2007). Nakupljanjem mutacija sve više transpozona postaje neaktivno, pri čemu neaktivne inačice transpozaze blokiraju vezna mjesta za aktivne, a neautonomni elementi kompetiraju s autonomnim za vezanje transpozaze (Pace i Feschotte, 2007). Ovaj model propagacije transpozona zove se model životnog ciklusa i iz njega proizlazi da je odumiranje određene populacije transpozona neizbježno. Iako postoje mnogi organizmi u kojima su transpozoni vrlo aktivni i nije sigurno da podliježu ovakvom životnom ciklusu, ovaj model dobro opisuje istražene populacije transpozona u većini sisavaca.



Slika 6 Životni ciklus Tc1/mariner transpozona (Izvor: Muñoz-López Bureau i García-Pérez Wessler, 2010)

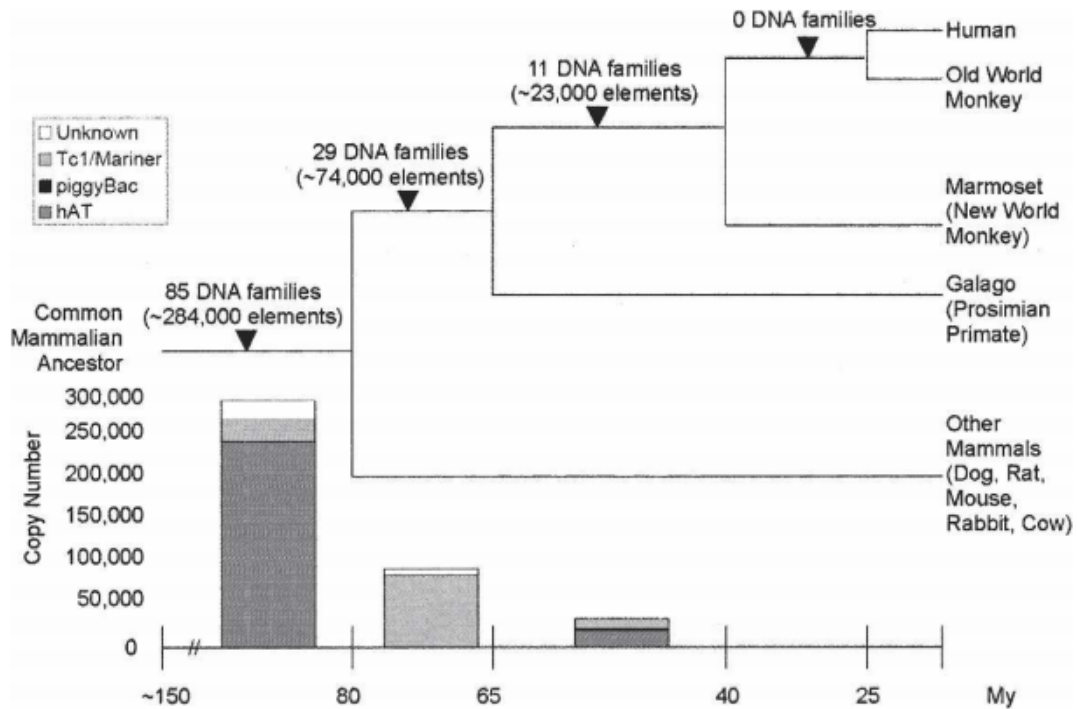
## 4. Raspodjela u genomu

Transpozoni sačinjavaju oko 3% ljudskog genoma, što je nešto više od udjela gena (Pace i Feschotte, 2007). Unatoč tome, vrlo malo se zna o njihovoj ulozi i evoluciji. Jedan od razloga je činjenica da u ljudskom genomu ovi elementi nisu bili aktivni 40-ak milijuna godina. Najbrojnije nadporodice koje nalazimo u ljudskom genomu su hAT i Tc1/mariner (Pace i Feschotte, 2007). U ove porodice spadaju kako autonomni (iako nefunkcionalni), tako i neautonomni elementi (koji ne kodiraju vlastitu transpozazu). Zanimljivo je da MITE-ovi, tip neautonomnih transpozona, čine čak 74% populacije transpozona u ljudskom genomu (Pace i Feschotte, 2007). Njihovo uspješno širenje kroz genom omogućava činjenica da su TIR-ovi često jedini uvjet za vezanje transpozaze.

Raspodjela transpozona u genomu ovisi o dva faktora – preferencijama ugradnje transpozona koji mogu ovisiti o sekvenci i strukturi kromatina te selektivnom pritisku, koji eliminira ugradnje koje su štetne za vijabilnost jedinke. Neki od faktora koji utječu na insercije su trinukleotidna ponavljanja koja sličje mikrosatelitima, koja mogu uzrokovati zastoj replikacijskih rašlji, što rezultira dvolančanim lomom koji olakšava integraciju transpozona u to mjesto. Određene sekvence utječu na konformaciju molekule DNA, pa tako dolazi do stvaranja G-kvadripleksa ili Z-DNA, koji se često nalaze u blizini aktivno transkribirajućih genomskih regija. Ovisno o svojstvima pojedine transpozaze, ovi faktori mogu poboljšati ili otežati njezino vezanje za te sekvence. Za G-kvadriplekse i Z-DNA je u istraživanju provedenom na transpozonima Charlie i Tigger u ljudskom genomu pokazano da umanjuju vjerojatnost integracije, što bi moglo biti zbog negativnog utjecaja selekcije na ugradnju blizu transkripcijski aktivnih regija (Campos-Sánchez i sur., 2014). Heksamerne telomerne sekvence, koje se osim na krajevima kromosoma nalaze smještene i intersticijalno, također su često mjesto ugradnje transpozona. Iako analize ljudskog genoma ukazuju na to da se transpozoni uglavnom ne ugrađuju u regije bogate genima, *in vitro* eksperiment ugradnje piggyBat i Sleeping Beauty transpozona u HeLa stanice pokazao je da se ovi transpozoni često ugrađuju u takve regije. Ovi rezultati sugeriraju da je nepostojanje transpozona u regijama ljudskog genoma bogatim genima barem djelomično posljedica selektivnog pritiska (Campos-Sánchez i sur., 2014).

Izrezivanjem „*cut-and-paste*“ transpozona na genomskoj DNA ostaju dvolančani lomovi. Ovo može aktivirati domaćinove sustave obrane, ali također omogućava povećanje broja ovakvih sekvenci u genomu. Naime, dvolančani lom se može popraviti homolognom rekombinacijom sa sestrinskom kromatidom tijekom replikacije DNA ili s homolognog kromosoma, ukoliko se

kopija transpozona nalazi i ondje (Pace i Feschotte, 2007). Ovakav način umnažanja ukazuje i na ograničenja propagacije „*cut-and-paste*“ transpozona u genomu.



*Slika 7* Aktivnost transpozona kroz evoluciju primata (Izvor: Pace i Feschotte, 2007)

Promatrajući evoluciju ljudskog genoma uočavamo postepeno opadanje aktivnosti transpozona. Oko 74 000 transpozona ugradilo se u genom tijekom 17 milijuna godina prije divergencije suhonosaca i još 23 000 prije podjele na majmune novog i starog svijeta (Pace i Feschotte, 2007). Ovako intenzivna aktivnost u relativno kratkom vremenskom razdoblju ukazuje na potencijalno važnu ulogu transpozona u izgradnji genoma primata, no postavlja se i pitanje što je bilo uzrokom njihova masovnog odumiranja nakon divergencije majmuna novog svijeta. Ranije opisani životni ciklus transpozona u genomu postavlja horizontalni prijenos gena kao nužan preduvjet kako za međuvrsnu propagaciju transpozona tako i za njegov opstanak unutar populacije. Prema tome uzrok inaktivacije transpozona (koji je prema predloženom modelu za određeni element neizbježan) možemo tražiti u izostanku horizontalnog prijenosa.

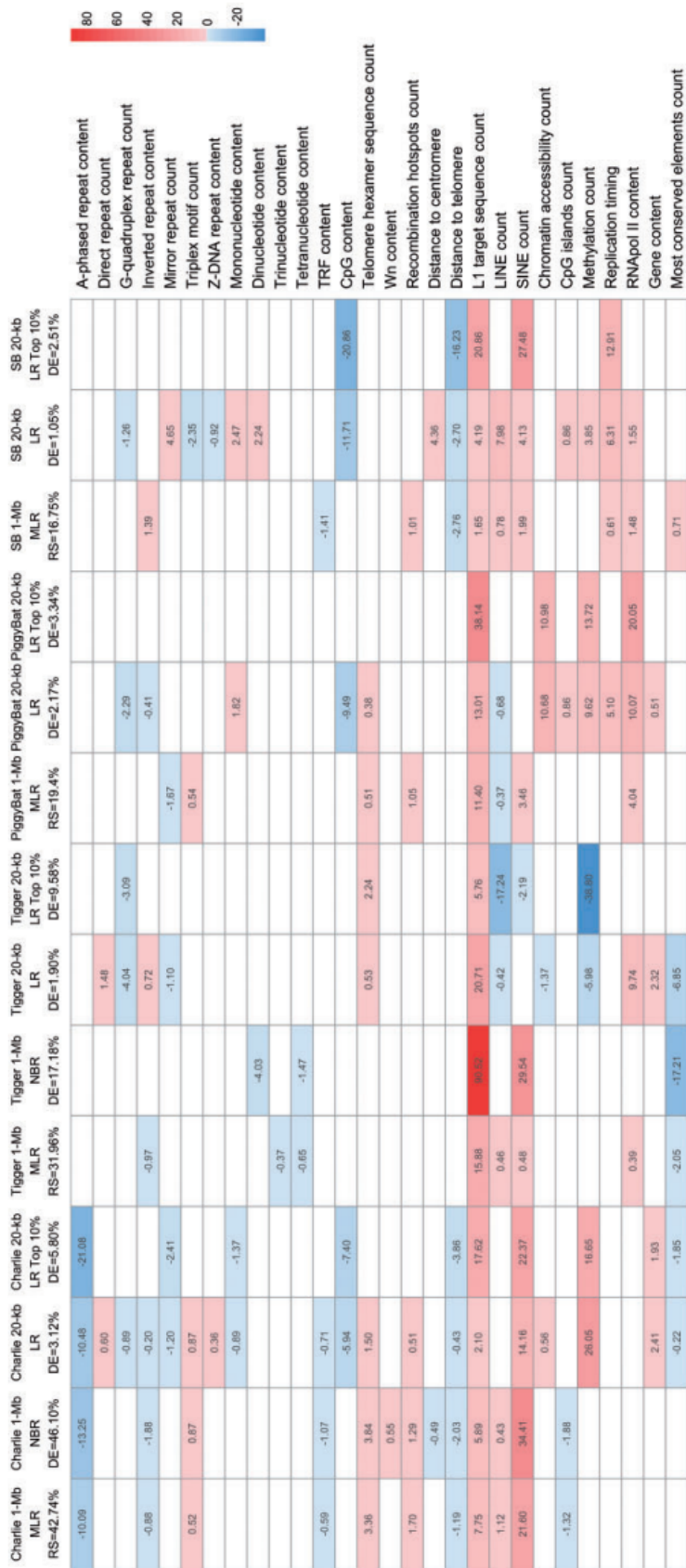


FIG. 1. Effects of genomic features in various human DNA transposon models. The intensity of the color is proportional to the RCVE of each predictor in each model, and the color encodes the sign of the effect - positive in red or negative in blue. White are not significant predictors. LR, logistic regression; RS, R-squared; DE, deviance explained.

Slika 8 Utjecaj svojstava sekvence na vjerojatnost ugradnje transpozona (Izvor: Campos-Sanchez i sur., 2014)

## 5. Domestikacija

Evolucija genoma je složen proces tijekom kojeg se različiti genetički elementi ugrađuju u genom, mijenjaju ga, ponekad prepisuju, te naposljetku izrezuju iz genoma. Uvođenje transpozona u genom može biti kobno, no genetska informacija koju donose može predstavljati i adaptivnu prednost. Neki od primjera domestikacije transpozona prikazani su u daljnjem tekstu.

### 5.1 *Rag1/Rag2*

Prilikom domestikacije transpozaza najčešće dolazi do inaktivacije transpozicijskih funkcija, a zadržava se aktivnost vezanja DNA (Yusa, 2014). Protuprimjer ovom pravilu je domestikacija Transib transpozona kojom su nastali geni *Rag1* i *Rag2*. Smatra se da su se ovi geni pojavili u zajedničkom pretku svih *Gnathostomata* (Kapitonov i Koonin, 2015). Produkti ovih gena tvore V(D)J rekombinazu, enzim koji je ključan za somatsko preslagivanje DNA čija je posljedica velika raznolikost receptora na limfocitima B i T (Kapitonov i Koonin, 2015). Genski lokusi na koje ova rekombinaza djeluje sastoje se od nekoliko V, D i J segmenata (Andreis, 2010) okruženih rekombinacijskim signalnim sekvencama (RSS). Nalik i vjerojatno izvedene iz TIR-ova, ove sekvence su mjesta prepoznavanja za V(D)J rekombinazu (Fugmann, 2010). Sam mehanizam V(D)J rekombinaze podsjeća na mehanizam hAT transpozaza po tome što nastaje ukosnica u DNA susjednoj izrezanom fragmentu. Neprecizan popravak ove ukosnice još je jedan od uzroka velike varijabilnosti receptora na T i B limfocitima. (Fugmann, 2010). Gen *Rag1* je nositelj transpozazne aktivnosti V(D)J rekombinaze i dijeli homologiju s Transib transpozazama. Podrijetlo *Rag2* donedavno nije bilo poznato, a smatra se kako ima ulogu u vezanju RSS-ova (Callebaut i Mornon, 1998). Nedavno su u bodljikašima pronađeni transpozoni TransibSU iz nadporodice Transib koji kodiraju 2 gena, nalik genima *Rag1* i *Rag2*. Kako je filogenetska analiza pokazala da su geni *Rag1* i *Rag2* vrlo srodni, moguće je da je upravo ovakav transpozon ulaskom i domestikacijom u genomu drevnog kralješnjaka omogućio pojavu gena *Rag1/Rag2* i adaptivne imunosti (Kapitonov i Koonin, 2015).

## 5.2 SETMAR

SETMAR je fuzijski gen nastao spajanjem SET histonske metilaze i i transpozaze transpozona Hsmar1. Nalazimo ga isključivo u podredu Haplorrhini (suhonosci) (Shaheen i sur., 2010). Ranije spomenuti DDD/DDE<sup>2</sup> motiv karakterističan za sve transpozaze u ovom fuzijskom genu zamijenjen je DDN<sup>3</sup> motivom, čime je transpozazna domena dobila nove funkcije. Tako SETMAR sudjeluje u popravku dvolančanih lomova nehomolognim sparivanjem krajeva, integraciji DNA u genom, dekatenciji kromosoma ovisnoj o TopoIIa i ponovnom uspostavljanju kolabriranih replikacijskih rašlji (Shaheen i sur., 2010; Kim i sur., 2014). Domena SET, koju nalazimo i u mnogim drugim proteinima, dvostruko metilira lizin 36 na histonu H3. Ova histonska modifikacija potiče popravak nehomolognim sparivanjem krajeva time što privlači protein Ku80 a potencijalno i druge proteine nužne za ovaj put popravka (Williamson i sur., 2011). Transpozazna domena je nositelj endonukleazne aktivnosti koja preferira stršeće krajeve jednolančane DNA koji preostaju nakon dvolančanog loma te doprinosi efikasnosti nehomolognog sparivanja krajeva (Beck i sur., 2011). SETMAR ulazi i u interakcije s mnogim proteinima uključenim u stanične procese u kojima sudjeluje, no sve njegove funkcije nisu detaljno istražene. Ono što možemo zaključiti jest da je fuzijom histonske metilaze i mutirane transpozaze u primatima nastao novi gen koji će povećati kapacitet popravka dvolančanih lomova nehomolognim sparivanjem. S obzirom na to da se u somatskim stanicama izbjegava popravak homolognom rekombinacijom, nehomologno sparivanje krajeva je izuzetno važan put popravka i njegova optimizacija je bitan događaj u evoluciji primata.

---

<sup>2</sup> Asp-Asp-Asp/Asp-Asp-Glu

<sup>3</sup> Asp-Asp-Asn



## 6. Transpozoni kao alat u genomskom inženjerstvu

Velik izazov u istraživanju eukariotskih gena i genoma oduvijek je bila mutageneza, jer alati uspješno korišteni u bakterijama uglavnom nisu primjenjivi na složenije eukariotske stanice. Kao alternativa plazmidima i virusnim vektorima koriste se transpozoni, izolirani iz različitih organizama i prilagođeni za upotrebu u genomskom inženjerstvu. Korištenje transpozona izoliranih iz jedne vrste u potpuno različitom organizmu moguće je zbog toga jer transpozoni uglavnom nisu specifični za određenog domaćina i ne zahtijevaju vrsno-specifične faktore za svoju integraciju (Skipper i sur., 2013).

Transpozone je moguće koristiti za istraživanje funkcije gena njihovom inaktivacijom pomoću insercijske mutageneze, ili pak za uvođenje transgena u kromosome. Pritom je moguće gen za transpozazu unijeti u stanicu odvojeno, a umjesto njega između TIR-ova ugraditi željeni gen (Zhao i sur., 2016).

Dva najčešće korištena transpozona su Sleeping Beauty (SB) i piggyBac. SB je umjetno kreirani transpозон dobiven izvođenjem konsenzus sekvence iz nekoliko inaktivnih ribljih transpozona (Ivics i Izsvak, 2015). PiggyBac je izoliran iz moljca *Trichoplusia ni*. Problemi koji se pojavljuju u radu s transpozonomima kao vektorima su ograničenje veličine sekvence koja se može prenijeti i razina aktivnosti u ljudskom genomu. Transpozoni imaju mehanizme kojima ograničavaju vlastitu transpoziciju. To je evolucijski poželjno, jer se time ograničava negativan utjecaj na domaćina, no u genomskom inženjerstvu postaje problematično (Skipper i sur., 2013). SB je pionir među transpozonomima u genomskom inženjerstvu, no piggyBac se pokazao kao puno korisniji vektor. U poglavlju Transpozicija – piggyBac opisan je mehanizam izrezivanja ovog tipa transpozona. Činjenica da za sobom ne ostavlja ožiljke, već komplementarne stršeće krajeve koji omogućavaju precizan popravak izdvaja ga od drugih vektora. Ovo svojstvo također omogućava reverziju insercije, kako bi se provjerilo je li fenotip uistinu uzrokovan promatranom insercijom (Zhao i sur., 2016). Također, piggyBac može nositi sekvence do 100 kb, dok se SB transpozoni s umetnutim sekvencama te duljine inaktiviraju time što se ugrade sami u sebe (Skipper i sur., 2013). Napravljena je i fuzija piggyBac-a s domenom cinkovog prsta (*Zn finger*), koja omogućava mjesno-specifičnu upotrebu ovog vektora.

Transpozoni su kao alati posebno korisni u istraživanju karcinogeneze i identifikaciji gena koji u njoj sudjeluju, a posebno se radi na njihovoj upotrebi u genetskoj terapiji. PiggyBac, čija je

aktivnost u humanim stanicama izrazito visoka, nudi se kao sigurnija alternativa virusnim vektorima.

## 7. Zaključak

Transpozoni su sastavni dio svih eukariotskih genoma. U genom ulaze horizontalnim prijenosom, nakon čega slijedi razdoblje aktivne transpozicije tijekom koje mogu uzrokovati niz promjena u genomu. Insercijom unutar gena mogu dovesti do njegove inaktivacije, a izrezivanjem iza sebe ostavljaju dvolančane lomove, koji mogu uzrokovati kromosomske translokacije, ali i manje promjene kao što su posljedice nepreciznog popravka dvolančanog loma. Prilikom širenja kroz genom dolazi i do vertikalne diverzifikacije, kojom od jednog izvornog elementa nastaje nekoliko različitih populacija transpozona. Analizirajući transpozone u ljudskom genomu možemo razaznati više ovakvih događaja, pa tako transpozone možemo dijeliti ovisno o tome u kojem su se razdoblju evolucije čovjeka integrirali u genom.

Općenito, repetitivne sekvence snažno utječu na stabilnost genoma. Raspršeno ponavljajuće sekvence DNA mogu uzrokovati nelegitimne rekombinacijske događaje koji rezultiraju inverzijama ili delecijama, ali i kromosomskim translokacijama. S druge strane, upravo repetitivne sekvence osiguravaju stabilnost linearnih kromosoma definirajući centromerne i telomerne regije. Različite repetitivne sekvence surađuju u održanju integriteta genoma. Primjerice, ljudske centromere gradi  $\alpha$ -satelitna DNA, na koju se vezuje CENP-B protein, koji je porijeklom domesticirana pogo transpozaza.

Ljudski genom je prepun domesticiranih sekvenci transpozona i da bismo razumijeli njegovu evoluciju bitno je poznavati evolucijsku dinamiku elemenata koji ga sačinjavaju. U usporedbi sa retrotranspozonima, 3% ljudskog genoma koliko sačinjavaju transpozoni ne čini se značajno, no treba istaknuti da otprilike podjednak udio čine i kodirajuće sekvence. Iako su aktivni transpozoni u ljudskom genomu izmurlali prije 37 milijuna godina, neupitno je da su važan dio evolucije čovjeka.

## 8. Literatura

1. Habibi, L., Pedram, M., AmirPhirozy, A., & Bonyadi, K. (2015). Mobile DNA Elements: The Seeds of Organic Complexity on Earth. *DNA and cell biology*, 34(10), 597-609.
2. Kapitonov VV, Jurka J: Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:8714–8719.
3. Padeken, J., Zeller, P., & Gasser, S. M. (2015). Repeat DNA in genome organization and stability. *Current opinion in genetics & development*, 31, 12-19.
4. Martín Muñoz-López and José L. García-Pérez. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, 2010, 11, 115-128
5. Pace, J. K., & Feschotte, C. (2007). The evolutionary history of human DNA transposons: evidence for intense activity in the primate lineage. *Genome research*, 17(4), 422-432.
6. Atkinson PW. 2014. hAT transposable elements. *Microbiol Spectrum* 3(4):MDNA3-0054-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0054-2014
7. Vladimir V. Kapitonov and Jerzy Jurka 2007. Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. *Trends in Genetics* 2007:23, 521
8. Zhou, L., Mitra, R., Atkinson, P. W., Hickman, A. B., Dyda, F., & Craig, N. L. (2004). Transposition of hAT elements links transposable elements and V (D) J recombination. *Nature*, 432(7020), 995-1001.
9. Piégu, B., Bire, S., Arensburger, P., & Bigot, Y. (2015). A survey of transposable element classification systems—a call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. *Molecular phylogenetics and evolution*, 86, 90-109.
10. Dornan, J., Grey, H., & Richardson, J. M. (2015). Structural role of the flanking DNA in mariner transposon excision. *Nucleic acids research*, 43(4), 2424-2432.
11. Benjamin, B., Yves, B., & Corinne, A. G. (2007). Assembly of the Tc1 and mariner transposition initiation complexes depends on the origins of their transposase DNA binding domains. *Genetica*, 130(2), 105-120.
12. Abrusán, G., Yant, S. R., Szilágyi, A., Marsh, J. A., Mátés, L., Izsvák, Z., ... & Ivics, Z. (2016). Structural determinants of sleeping beauty transposase activity. *Molecular Therapy*.

13. Zhao, S., Jiang, E., Chen, S., Gu, Y., Shanguan, A. J., Lv, T., ... & Yu, Z. (2016). PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene encoding. *Translational lung cancer research*, 5(1), 120.
14. Yusa K. 2014. piggyBac transposon. *Microbiol Spectrum* 3(2):MDNA3-0028-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0028-2014.
15. Grabundzija, I., Messing, S. A., Thomas, J., Cosby, R. L., Bilic, I., Miskey, C., ... & Jurka, J. (2016). A Helitron transposon reconstructed from bats reveals a novel mechanism of genome shuffling in eukaryotes. *Nature communications*, 7.
16. Campos-Sánchez, R., Kapusta, A., Feschotte, C., Chiaromonte, F., & Makova, K. D. (2014). Genomic landscape of human, bat and ex vivo DNA transposon integrations. *Molecular biology and evolution*, msu138.
17. Miskey, C., Izsvák, Z., Kawakami, K., & Ivics, Z. (2005). DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cellular and molecular life sciences*, 62(6), 629-641.
18. Hellen, E. H., & Brookfield, J. F. (2013). The diversity of class II transposable elements in mammalian genomes has arisen from ancestral phylogenetic splits during ancient waves of proliferation through the genome. *Molecular biology and evolution*, 30(1), 100-108.
19. Skipper, K. A., Andersen, P. R., Sharma, N., & Mikkelsen, J. G. (2013). DNA transposon-based gene vehicles-scenes from an evolutionary drive. *Journal of biomedical science*, 20(1), 1.
20. Kapitonov, V. V., & Koonin, E. V. (2015). Evolution of the RAG1-RAG2 locus: both proteins came from the same transposon. *Biology direct*, 10(1), 1.
21. Andreis Igor, Batinić Drago, Čulo Filip, Grčević Danka, Lukinović-Škudar Vesna, Marušić Marko, Taradi Milan, Višnić Dora. *Imunologija. Medicinska naklada d.o.o.*, 2009.
22. Fugmann, S. D. (2010, February). The origins of the Rag genes—from transposition to V (D) J recombination. In *Seminars in immunology* (Vol. 22, No. 1, pp. 10-16). Academic Press.
23. Callebaut, I., & Mornon, J. P. (1998). The V (D) J recombination activating protein RAG2 consists of a six-bladed propeller and a PHD fingerlike domain, as revealed by sequence analysis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(8), 880-891.

24. Fnu, S., Williamson, E. A., De Haro, L. P., Brenneman, M., Wray, J., Shaheen, M., ... & Hromas, R. (2011). Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2), 540-545.
25. Shaheen, M., Williamson, E., Nickoloff, J., Lee, S. H., & Hromas, R. (2010). Metnase/SETMAR: a domesticated primate transposase that enhances DNA repair, replication, and decatenation. *Genetica*, 138(5), 559-566
26. Kim, H. S., Chen, Q., Kim, S. K., Nickoloff, J. A., Hromas, R., Georgiadis, M. M., & Lee, S. H. (2014). The DDN catalytic motif is required for Metnase functions in non-homologous end joining (NHEJ) repair and replication restart. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), 10930-10938.
27. Beck, B. D., Lee, S. S., Williamson, E., Hromas, R. A., & Lee, S. H. (2011). Biochemical characterization of metnase's endonuclease activity and its role in NHEJ repair. *Biochemistry*, 50(20), 4360-4370.

## 9. Sažetak

Transpozoni sačinjavaju oko 3% ljudskog genoma, no nisu bili aktivni zadnjih 37 milijuna godina. Kroz evoluciju primata njihova je aktivnost postepeno opadala, no u razdoblju prije divergencije suhonosaca i potom prije divergencije majmuna novog svijeta bili su vrlo aktivni. Unatoč ovome, mnogi geni derivirani iz njihovih sekvenci domesticirani su u ljudskom genomu, među kojima su možda najpoznatiji geni Rag1 i Rag2 nužni za adaptivnu imunost.

Transpozaza prepoznaje transpozon pomoću njegovih ITR-ova, a sami mehanizmi izrezivanja razlikuju se među skupinama. Primjerice, precizno izrezivanje PiggyBac transpozona čini ga izuzetno pogodnim alatom za mutagenezu i vektorom za genomsko inženjerstvo i genetičku terapiju.

Povećanje broja transpozona ovisno je o fazi staničnog ciklusa i zapravo se zasniva na popravku mjesta izrezivanja transpozona pomoću homologne sekvence u kojoj se taj isti transpozon još uvijek nalazi. Širenje transpozona kroz genom je ograničeno i domaćinovima mehanizmima obrane, kao i nakupljanjem mutacija u samom transpzonu. Inaktivacija određenog transpozona je naposljetku neizbježna, tako da proliferacija ovih genetičkih elemenata ovisi o kontinuiranoj infiltraciji genoma.

## 10. Summary

Transposons make up 3% of the human genome, but they have not been active for the past 37 million years. Their activity has declined steadily throughout the primate evolution, but a surge in their activity can be observed right before the divergence of prosimians, and later, before the divergence of New world monkeys. Although the transposons themselves are not active in the human genome any more, many genes made out of their domesticated sequences are functional. The best known example are the Rag1/Rag2 genes, essential for adaptive immunity.

Transposase recognizes the transposon's TIRs, and the mechanisms of excision vary between different groups. The precise excision of the piggyBac transposon make it a useful tool for mutagenesis and an important vector for genomic engineering and gene therapy.

Transposon multiplication is cell cycle-dependent. It is based on the repair of the donor sequence with a homologous template sequence that still contains the transposon. The spread of transposons through the genome is also limited by the host's defense mechanisms as well as the accumulation of mutations within the transposon. According to the life-cycle model, the inactivation of a class II transposable element is therefore inevitable, and so the proliferation of these elements depends upon the horizontal transfer.