

Výskyt a vlastnosti inzerčných sekvencií v baktériach

MARIÁN MAČOR - PETER SIEKEL - JOZEF GRONES

SÚHRN. Základným cieľom predloženej práce je podať ucelený pohľad na výskyt, vlastnosti a funkciu základných inzerčných sekvencií izolovaných z bakteriálnych buniek a poukázať na vzájomný vzťah medzi inzerčnou pohyblivou sekvenciou a možnosťou vzniku spontánnych mutácií baktérií.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: inzerčné sekvencie; transpozóny; mutácia

Za posledných desať rokov sa dosiahol výrazný pokrok v poznatkoch o inzerčných elementoch a transpozíčných systémoch. Transpozícia sa v súčasnosti chápe nielen ako proces včlenenia cudzorodej molekuly DNA do cieľového miesta, ale aj ako molekulárno-biologický proces na molekulárnej úrovni v in vivo podmienkach u prokaryotických, ako aj eukaryotických organizmov [1-4]. Sekvenčná analýza dala výrazný podnet k podrobnému štúdiu a charakterizácii rôznych transpozíčných sekvencií. Do roku 1989 bolo známych a analyzovaných asi 50 inzerčných sekvencií (IS) izolovaných prevažne z bakteriálnych buniek [5], čo je asi iba desatina dnes známych inzerčných sekvencií (teraz je ich známych viac ako 500). Rovnako sa študujú aj v eukaryotických bunkách „inzerčné sekvencie“, ako napr. *mariner*, ktoré boli izolované z 240 druhov hmyzu, z húb, buniek cicavcov, rýb a rastlinných buniek [6], ako aj im príbuzné sekvencie typu *TcI* [7,8].

Veľké množstvo, ako aj premenlivosť inzerčných sekvencií, je dosť prekvapujúce. Počet inzerčných sekvencií je teraz taký veľký, že vznikli problémy s ich systematickou klasifikáciou. Zatriedňujú sa do určitých čeladi a skupín na základe podobností a rozdielov v štruktúre a organizácii, v stavbe nukleových kyselín a kódovaných proteínov, ako aj na základe ich vzájomných

RNDr. Marián MAČOR, CSc., Doc. RNDr. Jozef GRONES, CSc., Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4. E-mail: grones@fns.uniba.sk
RNDr. Peter SIEKEL, CSc. Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.

vzťahov. Pri obrovskom množstve informácií potrebných k systematizácii sa pridávajú aj ďalšie vlastnosti, ako je porovnanie vzťahu štruktúry a funkcie, presná charakterizácia enzýmov zabezpečujúcich transpozičné reakcie, ako sú rekombinázy a transpozázy.

Na základe takýchto kritérií sú definované inzerčné sekvencie ako malé (väčšie ako 2,5 kb) kryptické úseky DNA s jednoduchou genetickou organizáciou a schopnosťou inzercie do rôznych cieľových miest v molekule DNA. Z tohoto dôvodu sa medzi inzerčné sekvencie zaraďuje niekoľko typov pohyblivých genetických elementov, ako sú elementy obsahujúce molekulu RNA - retrovírusy, retrotranspozóny a retropozóny [9,10], molekulu DNA - konjugatívne transpozóny [11], ktoré využívajú mechanizmus včleňovania podobne ako bakteriofág lambda, a tiež také elementy, ako je bakteriofág Mu [3], bakteriofág Tn7 [1] a transpozóny typu Tn554 [12], ktoré sú veľké a relatívne zložité.

Do skupiny inzerčných sekvencií sa nezaraďuje veľká časť sekvencií transpozónov typu II čelade Tn3 [13], hoci niektoré z nich sú malé a môžu spĺňať kritériá kladené na inzerčné sekvencie (napr. transpozón Tn1000 ($\gamma\delta$), IS101 [14] a IS1071 [15,16]. Mnohé z nich majú zložitú štruktúru a nesú gény pre niekoľko rezistencií voči antibiotikám, ktoré sú na inom type pohyblivých elementov nazývanom integrón [17]. Hoci tieto pohyblivé elementy nie sú detailne popísané, mnohé z nich majú funkčnú podobnosť s inzerčnými sekvenciami a prinášajú nové poznatky dôležité pre pochopenie mechanizmu transpozície. Poznatky o nich prispievajú k pochopeniu správania sa inzerčných sekvencií.

Názvoslovie inzerčných sekvencií

Pre zaradenie inzerčných sekvencií do skupín sa v minulosti používalo niekoľko kritérií. Prvý spôsob označovania, ktorý navrhol v roku 1978 Lederberg [18], bol založený na jednoduchom princípe číslovania inzerčných elementov v poradí ich objavenia, napr. IS1. Toto názvoslovie postačovalo v čase, keď bolo známych iba niekoľko inzerčných sekvencií. Tento systém sa však stával menej prehľadným s pribúdajúcim počtom charakterizovaných pohyblivých elementov.

Druhý spôsob označovania inzerčných sekvencií obsahuje informácie o ich pôvode, teda o bakteriálnom druhu, z ktorého boli izolované, napr. IS*Rm1* pochádza z *Rhizobium meliloti*. V súčasnosti sa v literatúre objavujú obidva typy označenia. Príbuzné inzerčné sekvencie, líšiace sa iba niektorými rozdielmi v sekvencii nukleových kyselín, v počte obrátených opakovaní, sa označujú ako izoformy rodičovských inzerčných sekvencií a pokladajú sa za špecifickú vetvu. Niektoré inzerčné sekvencie sa neoznačujú podľa vyššie

opísaných pravidiel, ako napr. R α 9. Tam, kde je to však aspoň trochu možné, sa tieto komplikované označenia zjednodušujú použitím názvoslovia, ktoré zahŕňa iniciály druhu bakteriálneho hostiteľa.

Zdroje bakteriálnych inzerčných sekvencií

Bakteriálne inzerčné sekvencie boli objavené pri štúdiu modelových genetických systémov pri translokácii génov a tvorbe mutácií a mutantov. Zvýšený záujem o gény rezistencie na antibiotiká a rôzne ťažké kovy sa stal dôvodom štúdia mnohých inzerčných sekvencií nielen v chromozóme, ale aj v plazmidoch širokej palety prokaryotických a eukaryotických buniek. Väčšina inzerčných sekvencií je vložená do mimoplazmidového genómu, pričom poskytuje promótor pre vlastnú integráciu a excíziu do plazmidu [19].

Experimenty ukázali, že inzerčné sekvencie majú výrazný vplyv aj na patogenitu a virulenciu baktérií. Štúdium mechanizmov bakteriálnej patogenity v posledných rokoch potvrdilo vzťah medzi inzerčnou sekvenciou a mnohými patogénnymi a virulentnými funkciami, čo je často spôsobené zvýšenou frekvenciou transpozície. Takýmto spôsobom sa objavilo mnoho inzerčných sekvencií živočíšnych patogénov (*Bacillus* [20], *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridium* [21,22], *Escherichia* [1,23-25], *Haemophilus* [26], *Neisseria* [27], *Vibrio* [28], *Yersinia* [29-32], a tiež rastlinných patogénov (*Agrobacter* [33], *Erwinia*, *Pseudomonas*) a symbiontov (*Rhizobium* [34]).

Nemenej významnú funkciu majú inzerčné sekvencie baktérií, ktoré sa využívajú pri biodegradáciách a bioremediáciách v prostredí. Ak sa inzerčná sekvencia správne začlení do genómu baktérie, umožní správnu funkciu degradačných a katabolických dráh [35], a pritom môže zabezpečiť zvýšený stupeň biodegradácie ponúkaného substrátu. Na to, aby bolo možné správne charakterizovať pozitívny alebo negatívny vplyv inzerčnej sekvencie na bunku, je potrebné poznať mechanizmus transpozície v bakteriálnej bunke.

Mnohé inzerčné sekvencie integrované v chromozómovej [36-38] alebo plazmidovej [39] molekule DNA sú schopné vytvárať markery pre restriktčné endonukleázy, polymorfizmus a epidemiologické ciele (napr. IS6100 v *Mycobacterium tuberculosis* [20], IS1296 v *Mycoplasma mycoides* [40], IS200 v *Salmonella* [40] a IS1004 vo *Vibrio cholerae* [41]). Sú však aj také bakteriálne druhy, ako je laboratórny kmeň *Bacillus subtilis* [42], ktorý inzerčné sekvencie neobsahuje.

Vlastnosti bakteriálnych inzerčných sekvencií

Bakteriálne inzerčné sekvencie, ako sme už spomenuli, boli pôvodne identifikované pri štúdiu generovania mutantov ako výsledok ich translokácie. Včleňovanie inzerčnej sekvencie a následné vnesenie rezistencií voči

antibiotikám na samoprenosné plazmidy má veľký význam pre modernú biológiu. Bolo popísaných niekoľko plazmidov, kde na malom úseku je generovaných niekoľko génov rezistencie na rôzne antibiotiká [1] s promótorom, ktorý umožňuje ich integráciu a excíziu. Na plazmide boli objavené dve kópie určitej inzerčnej sekvencie, ktoré zabezpečujú jeho pohyblivosť. Táto štruktúra sa označuje ako základná zložka transpozónu [43]. Štúdie mechanizmu bakteriálnej patogenity v posledných rokoch objavili priamy vzťah medzi prítomnosťou inzerčnej sekvencie v bunke a patogenitou baktérie. Inou oblasťou, v ktorej sa dosiahli výrazné výsledky v posledných rokoch, sú bioremediácie. Aj v tejto oblasti inzerčné sekvencie sú asociované s génmi tvoriacimi degradatívne alebo katabolické biodegradačné dráhy [35].

Charakterizácia základných vlastností inzerčných sekvencií

Organizácia inzerčných sekvencií

Inzerčné sekvencie sú krátke úseky molekuly DNA s definovanou genetickou funkciou (obr. 1). Kódujú základnú vlastnosť, ktorou je mobilita (pohyblivosť) sekvencie. Na molekule inzerčnej sekvencie sa rozpoznávajú základné charakteristické znaky, ako sú definované konce molekuly, gén pre enzým transpozázu a niektoré regulačné sekvencie. Transpozáza je kódovaná z jedného alebo niekedy z dvoch otvorených čítacích rámcov, čo je čiastočne závislé od dĺžky inzerčnej sekvencie. Jednotlivé zložky budeme zbežne charakterizovať v nasledujúcej časti práce.

Koncové obrátené opakovania

Okrem niekoľkých výnimiek (rodiny IS91, IS10 a IS200/605 pozri tab. 1), prevažná väčšina inzerčných sekvencií má na koncoch krátke koncové opakované sekvencie (IR) s dĺžkou od 10 do 40 bp. Koncové opakovania majú dve funkčné domény (obr. 1). Prvá doména (označená II) je orientovaná do vnútra IR a zabezpečuje väzbu na transpozázu, zatiaľ čo druhá doména (označená I) obsahuje 2 alebo 3 bp dlhé konce, ktoré zabezpečujú štiepenie hostiteľského vlákna, do ktorého sa včleňuje transpozón [19,26,44-48]. Takúto štruktúru a organizáciu prenosu má transpozón Tn3 [49]. Jednoduché väzbové miesta pre asymetrické väzbové proteíny využíva bakteriofág Mu, transpozón Tn7 [50] a pravdepodobne aj Tn552 [51]. Iné transpozóny majú zložené proteín-väzbové miesta, ktoré môžeme charakterizovať napr. komplexom En/Spm a Ac sekvencie, napr. v kukurici [52,53]. Nahromadenie rôznych väzbových vzorov na každom konci vo vhodnej vzdialenosti zabezpečuje aktivitu synaptických komplexov. Promótory vo vnútri inzerčnej



OBR. 1. Organizácia typickej inzerčnej sekvencie (IS).

IS predstavuje otvorený obdĺžnik, na ktorom sú koncové obrátené opakovania (IR) označené čiernym obdĺžnikom ako IRL (ľavé obrátené opakovanie) a IRR (pravé obrátené opakovanie). Jednoduchý otvorený čítací rámec kódujúci transpozázu je znázornený ako šrafovaná oblasť pozdĺž celého IS a siahajúca až do IRR. Promótor pre transpozázu (p), umiestnený v IRL, je znázornený šípkou. Typická doménová štruktúra IR je znázornená dole (čierna oblasť). Doména I predstavuje koncové báзовé páry, ktoré umožňujú rozpoznávanie pri štiepení substrátu transpozázou. Doména II predstavuje sekvencie potrebné pre väzbu transpozázy na substrát.

FIG. 1. Organisation of a typical insertion sequence (IS).

The IS is represented by an open box in which the terminal IRs are shown as black boxes labelled IRL (left inverted repeat) and IRR (right inverted repeat). The single open reading frame encoding the transposase is demonstrated as a hatched box stretching along the entire length of the IS and extending within the IRR sequence. The promoter of the transposase (p), located in IRL, is represented by an arrow. The typical domain structure of the IRs is indicated beneath (the black area). The domain I represents terminal base pairs which enable recognition at transposase-mediated cleavage. The domain II represents sequences necessary for transposase binding to the substrate.

sekvencie sú často umiestnené mimo IR sekvencie pred transpozázovým génom a na základe konvencie ich označujeme ako ľavé koncové opakovanie (IRL). Toto usporiadanie môže naznačovať mechanizmus autoregulácie syntézy transpozázy. Väzbové miesta pre špecifické hostiteľské proteíny sa tiež často objavujú za alebo tesne pred koncom inzerčnej sekvencie a tieto proteíny môžu hrať úlohu pri stanovovaní transpozičnej aktivity alebo exprese transpozázy.

Doménová štruktúra transpozázy

Špecifické poradie nukleotidov zodpovedné za väzbu proteínu na molekulu DNA je vo všeobecnosti orientované na N-koniec molekuly, naproti tomu katalytická doména prevažne na C-koniec proteínu (IS1 [54,55], IS30 [56], Mu [57], Tn3 [58], IS50 [59] a IS911 [60]). Jednou z interpretácií príčin takéhoto usporiadania v prokaryotických bunkách je ľahšia interakcia proteínov s inzerčnou sekvenciou, čím sa zvyšuje stupeň exprese a aktivity pro-

TAB. 1. Charakteristické vlastnosti niektorých inzerčných sekvencií izolovaných z gramnegatívnych, ako aj z grampozitívnych buniek.

TAB. 1. Characteristics of some insertion sequences isolated from gramnegative and grampositive bacteria.

Organizmus ¹	Rodina ²	Skupina ³	Dĺžka ⁴ [bp]	IR [bp]	DR [nk]
<i>Escherichia coli</i> W3110	IS1		768	18/23	9
<i>Escherichia coli</i> K12	IS3	IS2	1 331	16/18	5
<i>Escherichia coli</i> K12	IS3	IS3	1 258	29/40	3, 4
<i>Escherichia vulneris</i> ATCC 29943	IS1		786	18/23	ND
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	IS1		694	ND	ND
<i>Escherichia hermannii</i> ATCC 33652	IS1		768	20/23	ND
<i>Shigella sonnei</i>	IS1		798	18/23	ND
<i>Shigella dysenteriae</i>	IS1		766	20/23	ND
<i>Shigella flexneri</i>	IS1		768	20/23	ND
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	IS4		1 303	15/19	ND
<i>Salmonella typhimurium</i> (TN10)	IS4		1 329	17/22	9
<i>Salmonella typhimurium</i> (pBP11)	IS6		820	14	ND
<i>Salmonella panama</i> LA46	IS6		1 648	14	8
<i>Enterococcus faecalis</i> BM4281	IS256		1 466	28/42	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO (pFP110)	ISCNY		7 300	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO (pR68,45)	IS21		2 131	30/42	4, (5)
<i>Pseudomonas oleovorans</i> TF4-1L	IS21		> 316	ND	ND
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4060 (pLA108)	ISNCY		1 200	ND	ND
<i>Yersinia pestis</i> 106 Otten	IS21		1 953	20/28	5
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (pKYP1)	IS21		1 954	20/28	ND
<i>Streptomyces albus</i> G J1147	IS5	ISL2	883	16/20	2
<i>Streptococcus mutans</i> V403	IS3	IS150	1 220	31/43	3
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>finitimus</i> 73-E-10-2	IS4		1 649	20	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> (pSH6)	IS6		791	21/26	ND
<i>Caulobacter crescentus</i> SC298	ISNCY		800	12/16	4
<i>Bulkholderia cepacia</i> ATCC17616 (pTGL6)	IS3	IS427	1 316	23/26	3
<i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11638	IS605		1 904	0	ND
<i>Anabaema</i> sp. strain M-131	IS605		1 352	0	0
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LM0230	IS3	IS3	1 250	25/36	3, 4
<i>Vibrio cholerae</i> O1	IS605	IS200	628	ND	ND
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> WP1	IS5	IS903	1 046	15/18	ND
<i>Vibrio minicus</i> 6	IS5	IS903	964	18	ND
<i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 23769	IS5	IS1031	930	22/24	3
<i>Ralstonia eutrophia</i> AE104	IS30		1 104	22/28	3
<i>Bacillus thuringiensis</i>	IS4		1 656	20	10-12
<i>Bacillus thuringiensis</i>	IS4		1 643	7/20	ND
<i>Bacillus thuringiensis</i>	IS4		1 656	19/20	11
<i>Bacillus thuringiensis</i> 73-E-10-2	IS4		1 694	20	ND
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	IS66		2 716	24/27	8
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AB3	IS3	IS51	1 321	25/26	ND
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (pTiAB3)	IS5	IS427	849	14/16	2

Organizmus ¹	Rodina ²	Skupina ³	Dĺžka ⁴ [bp]	IR [bp]	DR [nk]
<i>Anabaema</i> sp. M131	IS1		1 352	0	0
<i>Anabaema</i> sp. PCC7120	ISNCY		1 675	21/24	8
<i>Anabaema</i> PCC7120	ISNCY		1 200	ND	ND
<i>Coxiella burnetii</i> NineMile7	IS110		1 450	7	ND
<i>Coxiella burnetii</i> NineMile7	IS110		1 458	7	ND
<i>Ralstonia eutropha</i> AE104	IS30		1 106	22/28	3
<i>Bulkhordia cepacia</i> 2a (pIJB1)	IS630		1 113	18/25	2
<i>Bulkhordia cepacia</i> ATCC17616 (pTGL1)	IS21		> 2 530	40/48	8

IR - invertované opakovanie, DR - priame opakovanie, ND - neanalyzované.

IR - inverted repeat, DR - direct repeat, ND - not analysed.

1 - organism, 2 - family, 3 - group, 4 - length.

teínu [61,62]. Toto usporiadanie uprednostňuje aktivitu proteínu v *cis*-konformácii, ktorú majú aj transpozázy (pozri aktivity *cis*). Takéto väzobné miesto transpozázy bolo identifikované v IS1 a IS911.

Ďalšou charakteristikou, ktorá však neplatí pre všetky transpozázy, je schopnosť vytvárať multimérne formy, ktoré podporujú zvýšenie aktivity [63]. Takéto multimérne formy tvoria transpozázy mobilných elementov prokaryotických buniek, napr. bakteriofág Mu [64], IS50 [62] a IS911 (ale nie IS10 [65]), tak aj eukaryotické elementy, ako sú retrovírusy [66] a elementy typu Mos1 [67].

Zvyšovaním počtu študovaných štruktúr rôznych typov enzýmov bude výrazne vzrastať možnosť porovnávania ich vlastností a funkcií. Ukazuje sa, že niektoré známe štruktúry, ako sú polynukleotidyltransferázy typu Holiday-resolváza RuvC a RNázaH [68,69], majú podobnú katalytickú funkciu ako transpozázy v retrovírusoch a v bakteriofágu Mu.

Priame cieľové opakovania

Ďalšou všeobecnou vlastnosťou inzerčných sekvencií je ich včleňovanie do cieľovej molekuly DNA prostredníctvom krátkych opakovaných (repetitívnych) sekvencií (directly repeated sequences - DRs), nachádzajúcich sa na konci molekuly. V cieľovom mieste atakuje buď jeden alebo obidva konce transpozónu obidve vlákna cieľovej molekuly DNA. Dĺžka opakovaní je od 2 bp do 14 bp, čo sa líši v jednotlivých inzerčných sekvenciách (tab. 1), pričom inzerciou sa bude generovať zdvojnásobenie ich dĺžky v cieľovom mieste. Niektoré inzerčné sekvencie s nízkou frekvenciou generujú opakované sekvencie atypickej dĺžky, čo spôsobuje geometrické zmeny pri trans-

pozičnej reakcii. Na druhej strane sa stáva, že inzerčné sekvencie nemajú opakované sekvencie. Neprítomnosť priamych opakovaní môže komplikovať vysvetlenie homologickej intermolekulárnej a intramolekulárnej rekombinácie medzi dvoma inzerčnými sekvenciami. Pri ich vyčlenení z molekuly DNA hostiteľa dochádza k nevratným deléciám v genóme.

Kontrola expresie susedných génov

Mnohé inzerčné sekvencie po včlenení do cieľovej molekuly DNA dokážu aktivovať expresiu susedných génov. Do tejto skupiny patria dávnejšie známe inzerčné sekvencie IS1, IS2, ale aj mnohé nedávno popísané inzerčné sekvencie ako IS406 [70], IS1186 [71], IS481 [72], ISSg1 [73], IS1490 [74] a ISVa1 [75].

V známych inzerčných sekvenciách, ako sú IS1, IS2 a IS5, bol pred génom na konci IR v pozícii –35 potvrdený funkčný promótor (hexamér). Ak sa umiestni (transpozíciou) v správnej vzdialenosti do –10 hexaméru hostiteľskej molekuly DNA, vytvorí sa nový funkčný promótor schopný riadiť expresiu susedných génov. Do tejto skupiny inzerčných sekvencií s riadiacou funkciou hexaméru v polohe –35 patrí veľká skupina sekvencií IS21 [76], IS30 [77], IS257 [78], IS2 [79], IS911 [80], a IS982 z *Lactococcus lactis* [81].

Regulácia vnútorného –10 hexaméru v IRL oblasti inzerčnej sekvencie sa môže uskutočniť dvoma spôsobmi. Obidva konce inzerčnej sekvencie sa postavia vedľa seba tak, aby vytvorili dimérnu štruktúru typu „hlava k päte“, alebo vytvorili kruhovú kópiu inzerčnej sekvencie. Pri kombinácii –10 hexaméru s –35 hexamérom v susedstve pravého konca sa môže vytvoriť silný promótor (IS21 [80], IS30 [77] a IS911 [80]). Toto zoskupenie môže viesť k zvýšenej expresii transpozázy, čo súčasne zvýši transpozičnú aktivitu.

Kontrola susedných génov inzerčnou sekvenciou sa môže ilustrovať na operóne *bgl* v bunkách *E. coli*. Aktivácia operónu môže byť zvýšená inzerciou IS1 alebo IS5 pred alebo za promótor [82,83]. Jedným z vysvetlení tohto efektu je zmena štruktúry molekuly DNA (t. j. zmena zakrivenia alebo topológie molekuly DNA). Podobný aktivačný efekt majú aj mutácie v *cap*, *tolI* a *hns* génoch.

Kontrola transpozičnej aktivity

Transpozičná aktivita v bunkách má vo všeobecnosti nízku úroveň. Tento poznatok je však v protiklade s vysokou frekvenciou vzniku mutantov a zmien v genóme hostiteľských buniek [84]. Promótory pre transpozázu patria medzi veľmi slabé. Mnohokrát sú umiestnené na konci IR, čo spôsobuje neschopnosť autoregulácie väzby transpozázy.

Aktivita a expresia transpozázy

Zatiaľ čo mnohé klasické mechanizmy zabezpečujúce kontrolu expresie génov, napr. produkciou transkripčného represora (IS1 [55,85,86] a IS2 [87]) alebo transkripčného inhibítora (antisense RNA v IS10 [2]), sú dobre preštudované, väzba na operátory pre expresiu transpozázy doteraz ešte nie je presne preštudovaná. V ďalšej časti si ukážeme vplyv jednotlivých faktorov na aktivitu transpozázy a na účinok transpozíčnej reakcie.

(i) Translačno-iniciačné signály

Ochrana inzerčných sekvencií pred aktiváciou pri vysokej expresii génov predpokladá existenciu vlastných operátorov, od ktorých závisí úroveň iniciácie translácie. Regulačné miesta inzerčnej sekvencie sú umiestnené na ľavom konci molekuly, obsahujú miesto pre väzbu ribozómu (RBS), alebo translačný iniciačný kodón pre gén transpozázy. Pri transkripcii z vlastných promótorov sa tvoria krátke opakované transkripty. Ak by sa tvorili transkripty zo susedných molekúl DNA (po prerušení promótorov v IS), opakovania by mohli generovať takú sekundárnu štruktúru na mRNA, ktorá by mohla porušiť translačné iniciačné signály [88,89]. Štúdiom mutantov v IS10 a IS50 sa potvrdili vznik sekundárnej štruktúry, ktorá znižuje aktivitu transpozázy [90].

(ii) Programovanie translačných čítacích rámcov

Na úrovni elongácie translácie dochádza k programovaniu translácie medzi dvomi konsekutívnymi otvorenými čítacími rámcami. Prvý začína v pozícii -1, čo je jeden nukleotid pred RBS. Táto pozícia sa nazýva „slippery“ (kľzavý) kodón s heptanukleotidovou sekvenciou typu Y YYX XXX vo fáze 0 pri čítaní YYY XXX Z v pozícii -1. V reálnej inzerčnej sekvencii je poradie heptanukleotidov A AAA AAG. Posun ribozómu po takejto štruktúre stimuluje vznik sekundárnej štruktúry na molekule mRNA, ktorá zvyšuje väzbu ribozómu na RBS pred sekundárnou štruktúrou. Kontrola transpozície na úrovni translácie bola pozorovaná u IS1 a IS3 [85,91,92]. Je pravdepodobné, že takýto mechanizmus sa uplatňuje aj pri iných inzerčných sekvenciách. Mechanizmus predpokladá, že pred čítacím rámcem v molekule DNA sa rozpoznávajú domény, ktoré kódujú katalytické miesto. Produkt pred čítacím rámcem funguje ako modulátor aktivity, pričom sa viaže na inzerčné sekvencie. Obidve domény obsadí iba jeden proteín, transpozáza, ktorá riadi a zabezpečuje mobilitu inzerčnej sekvencie. Obsadenie obidvoch miest je dôležité pre transpozíčnú aktivitu. Tento mechanizmus je závislý od fyziologického stavu hostiteľa, od ktorého závisí aj intenzita transpozíčnej reakcie.

(iii) Translačné terminátory

Ukončenie translácie je závislé od translačných terminačných kodónov pre gén transpozázy, ktoré sú umiestnené mimo IR. Experimenty ukázali, že väzba transpozázy na promótorové oblasti ešte nezabezpečuje riadny priebeh transpozičnej reakcie. Gény pre transpozázy v mnohých inzerčných sekvenciách neobsahujú vlastné terminačné kodóny. Výnimkou sú rodiny IS240C a IS6 [93]; dvaja členovia z rodín IS5, IS427 [94] a ISMkI [95]; a niekoľko členov rodiny IS630, IS870 a ISRfI [96]. Preto sa mnohé z inzerčných elementov včleňujú do relatívne špecifickej cieľovej sekvencie, ktorá vytvára, alebo poskytuje terminačný kodón pre transpozázu.

(iv) Dopad na transkripciu

Skoršie štúdie inzerčných sekvencií ukázali, že na priebeh transkripcie má vplyv aj transpozičná aktivita. Tieto výsledky boli čiastočne potvrdené aj pre IS10 a IS50, ale mechanizmus nie je doteraz jasný. Pri transkripcii ľavého konca molekuly bakteriofága Mu sa podstatne znižuje jeho transpozičná aktivita [97]. Je pravdepodobné, že pre transpozíciu je potrebná väzba transpozázy na obidva konce molekuly, čo pri transkripcii na ľavej strane molekuly nie je zabezpečené.

(v) Stabilita transpozázy

Ako príklad môžeme uviesť IS903, kde transpozáza v bunkách *E. coli* je senzitívna voči Lon proteáze [98]. Táto senzitivita blokuje aktivitu obidvoch transpozáz. Aktivita transpozázy je najvyššia v prípade, keď je enzým v *cis*-konfigurácii. Naproti tomu mutant v transpozáze IS903 si zachováva aktivitu práve v konfigurácii *trans*. Enzým je viac degradovaný Lon proteázou, keď je v prirodzenom stave, teda v *cis*-konfigurácii. Táto proteáza má vplyv aj na Tn5 (IS50) transpozón. Okrem toho je transpozáza IS1 citlivá na zvýšenú teplotu (pri teplote 42 °C ireverzibilne stráca aktivitu) v *in vivo* ako aj v *in vitro* podmienkach.

(vi) Aktivita v polohe *cis*

Základné štúdie mnohých transpozičných elementov indikujú, že transpozičná aktivita sa prejaví za predpokladu, ak transpozáza a gén pre transpozázu sú umiestnené v tej istej molekule DNA. Uprednostňuje aktivitu v *cis* redukovanej polohe, kde expresia a aktivita transpozázy prebiehajú na tej istej molekule DNA. Takýto mechanizmus bol opísaný pre viac inzerčných sekvencií, ako sú IS1 [99,100], IS10 [101], IS50 [102], IS903 [103,104]. Táto vlastnosť predpokladá väzbu transpozázy na koniec transpozónu, čím zabráni ďalšej syntéze.

Pre IS903 sa zvyšuje aktivita [26] a expresia [105] transpozázy v polohe *trans*. Pre IS10 mutanty, u ktorých je zvýšená expresia transpozázy, dochádza k väzbe enzýmu v polohe *cis*. Preferovanie polohy *cis* je spôsobené tým, že väzbová doména je umiestnená na N-konci proteínu, čo umožňuje lepšiu väzbu práve na susedné väzbové pozície.

Vplyv hostiteľských faktorov na transpozíciu

Transpozíčná aktivita je často pozitívne alebo negatívne ovplyvňovaná hostiteľskými faktormi. Tieto účinky sú špecifické pre každú inzerčnú sekvenciu. Medzi ne sa zaraďujú DNA šaperóny (alebo histónom podobné proteíny), ďalej integračné hostiteľské faktory (IHF) HU, HNS, FIS, iniciačný replikačný faktor DnaA; proteínové šaperóny I proteázy CLpX, CLpP, ClpA; ďalej sú to proteíny, ktoré hrajú úlohu pri SOS (záchrannom) mechanizme, ako je LexA proteín, a nakoniec metylácia molekúl DNA - Dam metylácia. Transpozíciu môže ovplyvniť aj súbor proteínov podieľajúcich sa na superšpiralizácii molekuly DNA v bunke (topoizomerázy, gyrázy).

DNA šaperóny môžu hrať úlohu v zabezpečovaní trojrozsomernej stavby rôznych nukleoproteínových komplexov nevyhnutných pre účinnú transpozíciu. Môžu byť zahrnuté aj v regulácii exprese transpozázy. Niektoré zložky môžu mať špecifické väzbové miesta pre integračné hostiteľské faktory. Tieto môžu byť vnútri, alebo pri transpozázovom promótoze, napr. u inzerčných sekvencií IS1 [106], IS903 [103], IS10 [19]. Integračné hostiteľské faktory HU, HNS a FIS v bakteriofágu Mu zabezpečujú expresiu niektorých Mu génov, alebo priamo riadia samotné transpozíčné procesy. IHF v IS10 ovplyvňuje produkt transpozície naviazaním sa na 43. bázu od konca inzerčnej sekvencie [107]. Hoci IS1 bola prvým elementom, u ktorého IHF miesta boli identifikované, doteraz neboli objasnené podmienky, za ktorých má IHF jednoznačný účinok na transpozíciu alebo na expresiu génov. Podobne aj proteín FIS a replikačný proteín DnaA majú vplyv na transpozíciu IS50 [108]. Hoci mechanizmus účinku je doteraz nejasný, študuje sa účinok aj ďalších hostiteľských proteínov na transpozíčnú reakciu. Acylovaný proteín stimuluje štiepenie 3'-konca transpozónu Tn3 [58]. Ten istý proteín spolu s ribozómovým proteínom L29 stimuluje naviazanie TnsD (proteín zahrnutý v cieľovej sekvencii Tn7) na inzerčné miesto *att* transpozónu Tn7 na chromozóme [67]. ACP aj L29 stimulujú Tn7 transpozíciu v in vitro podmienkach a samotný proteín L29 aj v in vivo podmienkach [67]. Medzi ďalšie faktory, ktoré sa podieľajú pri transpozíčných reakciách sú CLpX, CLpP a Lon. CLpX je esenciálny pre fágovú replikáciu [109,110] ako aj replikáciu bakteriofágu Mu [111]. Faktory CLpP a CLpX a 10 koncových aminokyselín pA proteínu [112] hrajú úlohu pri proteolýze Mu

represora [113,114]. Ako sme už spomenuli, Lon proteáza má účinok pri proteolýze transpozázy v IS903 [99,115].

Tretou skupinou hostiteľských faktorov sú faktory limitujúce poškodenie molekuly DNA a zachovanie integrity chromozómov. Vysoká hladina transpozázy v transpozónoch IS101 [116] a IS1 [115] v prítomnosti vhodných koncových IR vedie k indukcii hostiteľského SOS systému. Reznikoff a spolupracovníci zistili, že transpozícia Tn5 je inhibovaná indukciou SOS systému a nevyžaduje proteolytickú aktivitu RecA proteínu [116]. Na druhej strane Tessman a spol. [115,117,118] dokázali, že konštitutívne SOS podmienky aktuálne zvyšujú Tn5 transpozíciu. Ahmed [119] poukázal na skutočnosť, že transpozícia Tn5 je stimulovaná v prítomnosti RecA proteínu.

Vnútro bunková transpozícia transpozónu Tn9 (odvodený od IS1) prebieha podobným spôsobom ako u Tn5 s rovnakým účinkom *recA* génu [119]. Na druhej strane frekvencia delécií spôsobených IS1 bola v neprítomnosti RecA proteínu zvýšená. Toto podporuje domnienku, že delečné produkty sa hromadia u *recA* hostiteľov, ale nie u divého typu, kde takáto akumulácia závisí od *recBC* proteínu. Podobne aj u transpozónu Tn5 a Tn10 [120] tento proces nezávisí od transpozície. Tento vzťah sa významne prejavuje u zložitých transpozónov IS10 a IS50, ktoré sú prítomné v priamych opakovaniach a stimulujú transpozón umiestnený na konjugatívnom plazmide. Zdá sa, že excízie sa vyskytujú pri tvorbe replikačnej vidlice.

Počiatkové štúdie transpozície Tn5 poukazujú na priamy vzťah DNA-polymerázy a DNA-gyrázy v tejto reakcii [121,122]. Zatiaľ čo gyráza ovplyvňuje superšpiralizáciu, DNA-polymeráza hrá úlohu v syntéze DNA a pri reparácii medzier po naštiepení, čo môže mať za následok vznik priamych cieľových repetícií. Pozitívna úloha DNA-gyrázy bola pozorovaná aj pri transpozícii bakteriofága Mu [123].

Dam DNA-metyláza hrá úlohu pri aktivite transpozázy, ako aj pri jej expresii. IS10, IS50 a IS903 majú metylačné miesta (GATC) v promótorovej oblasti transpozázy. Aktivita promótora sa zvyšuje u hostiteľov s *dam* mutáciou [124]. Metylácia miesta GATC vo vnútri terminálnych IR znižuje terminačnú aktivitu týchto koncov [124]. Väčšina členov skupín IS3, IS4 a IS5 má GATC miesta v prvých 50 bp. Výrazná stimulácia transpozície bola pozorovaná u *dam* hostiteľov v IS3 [125]. V iných prípadoch je biologický význam týchto miest neznámy. Treba však poukázať na skutočnosť, že pravdepodobnosť, že každá 100 bp sekvencia bude obsahovať GATC miesto, je asi 40 %.

Reakčný mechanizmus

Základné mechanizmy pôsobenia jednotlivých inzerčných sekvencií sa od seba odlišujú a v tejto časti sa pokúsime ukázať na niektoré základné roz-

diely. Proces transpozície môžeme rozdeliť na niekoľko krokov: naviazanie rekombinázy na koniec molekuly s následnou úpravou synaptického komplexu s rekombinázou, možnosť pripojenia proteínu na obidva konce - tento krok znamená úplné alebo čiastočné oddelenie od cieľovej DNA; prerušenie vlákna a jeho prenos z konca transpozónu na cieľové miesto; a úprava preneseného vlákna na finálny produkt (obr. 2).

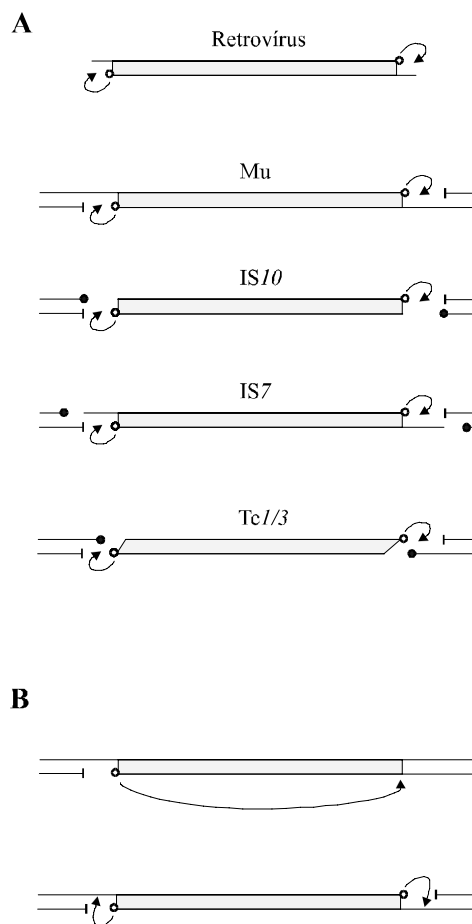
Rýchlosť nájdenia cieľového miesta a následné naviazanie, chemické štiepenie a prenos vlákna sú v prevažnej väčšine inzerčných sekvencií veľmi podobné, pričom však aj tu sa nájde niekoľko výnimiek, ako je transpozícia u retrovírusov, eukaryotických Tc a *mariner* častíc, ako aj u bakteriofágov Mu, IS10, Tn7 a IS911. Základným mechanizmom je katalytické štiepenie nukleofilným atakom na 3'-konci vlákna DNA transpozázou (obr. 3 vľavo). Voľná skupina 3'-OH realizuje nukleofilný atak 5'-fosfátovej skupiny cieľovej molekuly DNA v jednostupňovej transesterifikačnej reakcii (obr. 3 vpravo). Podobný prenos sa uskutoční na obidvoch koncoch transpozónu. Za týchto podmienok je enzým schopný „dezintegrovat“ koniec transpozónu pri katalytickom ataku skupiny 3'-OH na novom mieste pre transpozón (obr. 3 vpravo) [126,127]. Reakcie nevyžadujú externú energiu na vytvorenie kovalentnej väzby medzi enzýmom a substrátom v rekombinačnej reakcii.

Rozdiely v umiestnení cieľovej fosfodiesterovej väzby v reakcii môžu viesť k zmenám v celkovej transpozíčnej dráhe. Pre IS3 rodiny, medzi ktoré patria IS911 a IS2, je častým produktom molekula, v ktorej je len jeden transpozón v cirkularizovanom vlákne DNA (obr. 2B hore). Výsledkom je reakcia voľnej OH-skupiny na jednom vlákne transpozónu s transpozázou s opačným koncom cieľovej molekuly.

Ďalšou možnosťou je, keď skupina 3'-OH sama štiepi komplementárne vlákno DNA pri vzniku dvojitého štiepenia. Vytvorí sa vlásenková štruktúra (obr. 2B dole) a výsledkom je vyčlenenie segmentu z molekuly donora. Delécia je dokončená po zavedení jednovláknového prerušenia na každej hranici medzi kódujúcou a nekódujúcou oblasťou molekuly DNA za vytvorenia voľného 3'-OH konca v kódujúcej časti. Výsledkom sú dve vlásenkové štruktúry, ktoré sa môžu navzájom spojiť do novej kódujúcej oblasti. Tento typ vlásenkovej štruktúry bol zistený v IS10 [47].

DDE motív

Za posledných niekoľko rokov bolo objavených viacero enzýmov, ktoré sa zúčastňujú na transpozíčných reakciách. Tieto enzýmy patria do skupiny príbuzných fosfotransferáz, medzi ktoré sa zaraďuje napr. RNáza H, RuvC Holiday resolváza. Kyslé aminokyseliny prítomné vo všetkých enzýmoch sa priamo zúčastňujú na katalýze a ich úlohou je zrejme koordinácia dvoj-



OBR. 2. Rôzne typy štiepenia vlákna transpozázou na koncoch transpozónu.

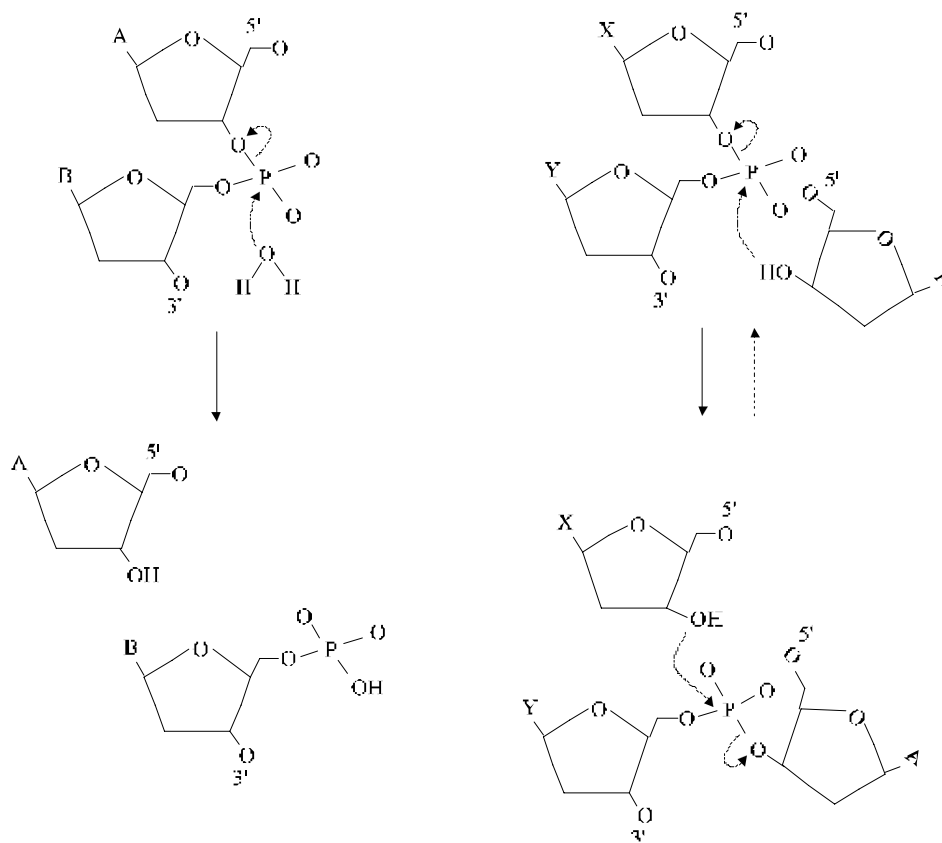
A - Transpozón je znázornený tmavším obdĺžnikom a donorová DNA čiernymi čiarami. Šípka ukazuje štiepenie elementu transpozázou na 3'-konci, pričom vzniká aktívna skupina 3'-OH (prázdny krúžok) a 5'-fosfátová skupina (┤). Plný krúžok predstavuje skupinu 3'-OH vytvorenú v donorovej molekule DNA.

B - Vnútromolekulový prenos, ktorý vytvára jednoduchú cirkularizáciu transpozónového vlákna (hore) alebo ukončenie vlásenkovou štruktúrou (dole).

FIG. 2. Different types of transposase-mediated cleavage at transposon ends.

A - Transposons are represented by hatched boxes and donor DNA by black lines. Arrows demonstrate the transposase-mediated cleavage at the 3' ends of the individual elements giving rise to active 3'-OH groups (empty circles) and 5'-phosphate groups (┤). Full circles indicate 3'-OH groups generated in flanking donor DNA.

B - Intramolecular transfer generating single circularized transposon strands (top) or terminal hairs (bottom).



OBR. 3. Prenos vlákien po chemickom štiepení.

Lavá schéma znázorňuje nukleofilný atak fosfátovej skupiny v transpozóne molekulou vody. Nukleotidy predstavujú A-3'-koniec transpozónu a B predstavuje susedné 5'-nukleotidy cieľovej molekuly DNA. Dochádza k ataku 3'-OH skupiny na konci transpozónu. Vpravo je znázornený prenos vlákna. Skupina 3'-OH z konca transpozónu vystupuje ako nukleofil a atakuje fosfodiesterovú väzbu medzi bázami X a Y v cieľovej molekule DNA, spájajúc 3'-koniec transpozónu s 5'-koncom cieľovej molekuly DNA a vytvárajúc skupinu 3'-OH na susednej báze cieľovej molekuly DNA (X). Prerušované šípky v obrázku ukazujú možnú spätnú reakciu, kde skupina 3'-OH cieľovej molekuly DNA (X) atakuje novovytvorenú fosfodiesterovú väzbu medzi transpozónom (A) a cieľovou molekulou DNA (Y), pričom sa regeneruje pôvodná fosfodiesterová väzba medzi X a Y.

FIG. 3. Transfer of strands following the chemical cleavage.

The left side of the scheme shows a nucleophilic attack of the transposon phosphate group by the water molecule. The nucleotides represent the transposon A-3' terminal and B means the neighbouring 5' nucleotides of the target DNA molecule. An attack of 3'-OH group at the transposon end takes place. The right side of the scheme shows a transfer of the strand. The 3'-OH group at the transposon end acts as a nucleophile in the attack of the target phosphodiester backbone (bases X and Y), joining the 3' transposon end to a 5' target end and generating a 3'-OH group on the neighbouring target base (X). Dashed arrows show the possible reverse reaction, in which the 3'-OH of the target (X) attacks the newly-created phosphodiester bond between the transposon (A) and the target (Y) to regenerate the original phosphodiester bond between X and Y.

mocných kationov kovov (hlavne Mg^{2+}), ktoré sa zúčastňujú pri viacerých nukleofilných reakciách medzi voľnými skupinami. V mnohých inzerčných sekvenciách (IS3, a IS6) a integrázach v retrovírusoch sa vo vysoko konzervatívnej oblasti nachádza motív DD(35)E [7,128,129]. V retrovírusoch tento motív interaguje s koncovými báзовými párami častice [129]. Usporiadanie kyslých aminokyselín u ďalších rodín IS má podobnú trojrozmernú štruktúru ako integráza retrovírusov, transpozáza bakteriofága Mu, RNáza H a RuvC [130].

Enzyémy nie všetkých inzerčných sekvencií obsahujú DDE motív. Napríklad jedna zo skupín elementov rodiny IS91 má enzyémy podobné tomu, ktorý sa zúčastňuje pri replikácii metódou valivej kružnice. Údaje naznačujú, že v IS91 sa uplatňuje transpozícia mechanizmom valivej kružnice, ako to predpokladali Galas a Chandler [131].

Transpozičná reakcia

Zatiaľ čo pri iniciácii transpozičnej reakcie dochádza k prenosu z 3'-konca transpozónu, výsledkom reakcie je štiepenie 5'-konca elementu (obr. 2A). Ak sa štiepenie 5'-konca častice uskutoční súbežne so štiepením 3'-konca, transpozón sa fyzicky oddelí od svojej donorovej molekuly. Dochádza k prenosu inzerčnej sekvencie do cieľovej molekuly (obr. 4A vľavo). Ak 5'-koniec štiepi 3'-vlákno donorovej a cieľovej molekuly DNA, vznikne kovalentná väzba (obr. 4A vpravo). Následným štiepením 5'-vlákna sa uvoľní častica z donora, výsledkom je riadená inzercia. Na druhej strane, práve prenos 3'-vlákna transpozónu a cieľovej molekuly DNA zanechá skupinu 3'-OH v cieľovej prekríženej molekule. Následne môže slúžiť ako primer pre replikáciu častice a môže generovať kointegrát medzi donorovou a cieľovou molekulou (obr. 4A vpravo, B-štruktúra I). Vznikne kointegrát (zdvojenie molekuly) bez replikačného procesu - vytvorí sa plazmidový dimér (štruktúra II) alebo tandemové usporiadanie opakujúcich sa štruktúr (štruktúra III). Štiepením 5'-konca inzerčnej sekvencie sa môže segment vyštiepiť z častice (obr. 2A). U retrovírusov sa 3'-štiepením vyštiepia 2 bp z konca dvojvláknovej molekuly vírusovej DNA. Podobne aj v prípade bakteriofága Mu dochádza k 3'-štiepeniu a výsledkom je molekula kointegrátu (obr. 2A, 4A vpravo). Pre IS10 a Tn7 je typické dvojité štiepenie koncov IS10 zabezpečené jednou molekulou transpozázy. Dvojité štiepenie konca Tn7 zanecháva na 5'-konci tri prečnievajúce nukleotidy, pričom sa využívajú dva odlišné proteíny na štiepenie 3'-konca (TnsB) a 5'-konca (TnsA) vlákna DNA. Dvojité štiepenie je vlastné aj pre eukaryotické Te1/3 a P častice, pričom v prípade Te1 a Te3 ostávajú na 3'-konci dva prečnievajúce nukleotidy a v prípade P častice 17 nukleotidov [50].

Transpozičná imunita

Transpozičná imunita je jednou z dôležitých vlastností transpozónov, pri ktorej cieľová molekula, ktorá už obsahuje jednu kópiu inzerčnej sekvencie, sa zníženou afinitou bráni prijať ďalšiu kópiu. Táto skutočnosť v plnej miere platí pri zložitejších transpozónoch, ako sú bakteriofág Mu, Tn7 a inzerčné sekvencie patriace do rodiny Tn3. V súčasnosti sa zdá, že známe inzerčné sekvencie sa neriadia transpozičnou imunitou, ale sú aj inzerčné sekvencie napr. IS21, ktorá zanecháva iba jednu svoju kópiu v molekule hostiteľa [132]. V tomto prípade je dôvodom pravdepodobne syntéza peptidu, ktorý obmedzuje prístup ďalšieho transpozónu.

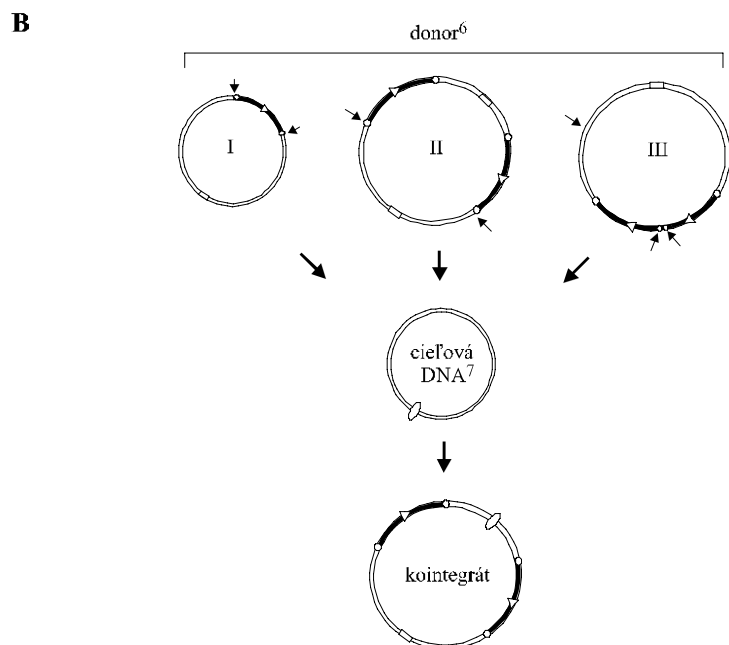
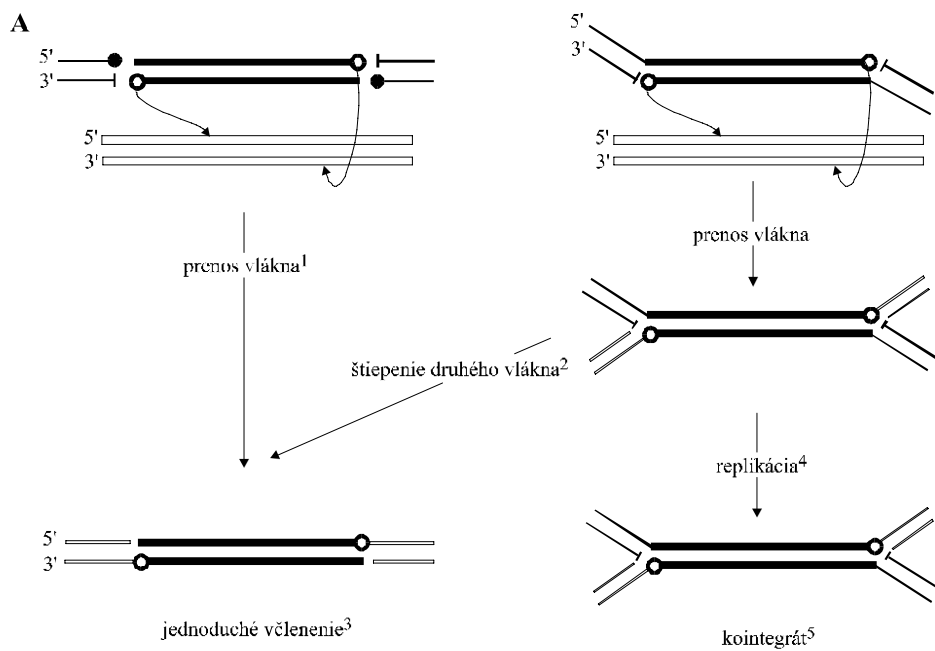
U zložitejších inzerčných sekvencií má zmysel zaoberať sa problémom transpozičnej imunity. Pre bakteriofág Mu je transpozičná imunita sústredená v cieľovej DNA nesúcej Mu koncové sekvencie a je prenášaná prostredníctvom proteínu MuB. Tento proteín hrá kľúčovú úlohu pri vyhľadávaní cieľového miesta a naviaže sa na reťazec DNA nešpecifickým spôsobom, pričom zabezpečuje preferenčné miesto pre Mu-transpozázu v spojení s koncami fága Mu a zvyšuje aktivitu tohoto enzýmu. Zvýšenie tejto aktivity sa predpokladá jednak u cieľovej molekuly DNA, ako aj u samotného MuA proteínu [133]. Na väzbu proteínu MuB sa vyžaduje energia v podobe ATP [134]. Interakcia proteínov MuA a MuB sa ruší hydrolýzou ATP s následným uvoľnením proteínu MuB, čo znižuje možnosť ďalšej transpozície [133].

Podobný mechanizmus sa predpokladá aj u transpozónu Tn7, kde pravý koniec je zodpovedný za imunitu [135]. V tomto prípade je Tn7 transpozáza zložená z dvoch proteínov TnsA a TnsB. Tieto účinkujú v spojení s proteínom TnsC, ktorý je, podobne ako proteín MuB, nešpecifický väzbový proteín s ATP-ázovou aktivitou.

Transpozičná imunita Tn3 a príbuzného Tn1000 ($\gamma\delta$) je dobre preštudovaná a je známe, že vyžaduje prítomnosť 38 bp na konci IR, aby fungovala ako imunitný cieľ [136]. Hlavný rozdiel medzi Tn3 a fágom Mu ako aj Tn7 systémami spočíva v tom, že u Tn3 hrá úlohu iba jeden proteín (transpozáza Tn3), a to TnpA. U spomínaných dvoch systémov je imunita spôsobená viazaním transpozázy na koniec [137], pričom IHF zvyšuje viazanie transpozázy na IR v Tn1000 [138], čím sa tiež zvyšuje imunita [139].

Cieľová špecifita

Výber cieľového miesta sa výrazne líši od jednej inzerčnej sekvencie k druhej. Je stabilný v prípade Tn7, kde prebieha jednou alebo dvoma cestami. Beží s vysokou účinnosťou do unikátneho chromozómového miesta (*att* Tn7) [140]. IS91 vyžaduje cieľové sekvencie GAAC/CAAG. Členovia rodiny IS630 a mariner/Tc vyžadujú dinukleotidy TA v cieľovom mieste,



OBR. 4. Jednoduché včlenenie a vznik kointegrátov.

A - Prenos vlákna a replikácia vedúce k jednoduchému včleneniu a kointegrátu. DNA inzerčnej sekvencie je znázornená hrubými čiarami. V ľavej časti obrázku je príklad inzerčnej sekvencie, v ktorej dochádza pred prenosom vlákna k štiepeniu oboch vláken. Pravá časť obrázku znázorňuje element, v ktorom dochádza k štiepeniu jedného vlákna na jeho koncoch.

B - Replikatívna a nereplikatívna transpozícia ako mechanizmus vzniku kointegrátu. I - replikatívna transpozícia, II - jednoduché včlenenie dimérnej formy z donorovej molekuly, III - jednoduché včlenenie od donora nesúceho tandemové kópie transponovateľného elementu. Transpozón je znázornený hrubou čiarou, koncové opakovania sú znázornené malými prázdnyimi krúžkami.

FIG. 4. Simple insertions and cointegrate formation.

A - Strand transfer and replication leading to simple insertions and cointegrates. The IS DNA is shown as thick lines. The left panel shows an example of an IS which undergoes double strand cleavage prior to strand transfer. The right panel shows an element which undergoes single strand cleavage at the ends.

B - Replicative and nonreplicative transposition as mechanisms leading to cointegrates. I - replicative transposition, II - simple insertion of a dimeric form from the donor molecule and III - simple insertion from a donor carrying tandem copies of the transposable element. The transposon is shown as a thick line, terminal repeats are shown as small open circles.

1 - strand transfer, 2 - second strand cleavage, 3 - simple insertion, 4 - replication, 5 - cointegrate, 6 - donor, 7 - target DNA.

pre *IS10* je to symetria 5'-NGC TNA GCN-3' a pre *IS231* je to sekvencia 5'-GGG(N)5CCC-3' [141]. Bakteriofág Mu uprednostňuje nasledovné poradie nukleotidov: 5'-NYGICRN-3' [142]. Pre *IS10* a *TC1/3* tiež sekvencie prilehajúce k týmto konsenzus sekvenciám vplývajú na výber cieľa. U špecifických mutantov, tak ako u *Tn10*, transpozáza priamo vplýva na výber cieľa. Táto skutočnosť platí aj pre iné inzerčné sekvencie. Ostatné inzerčné sekvencie majú regionálny vplyv, napr. oblasti DNA bohaté na GC a AT páry u *IS186* a *IS1*. Na výber cieľa vplýva ďalej stupeň superšpiralizácie DNA, ako bolo zistené u *IS50*, ohyb DNA, ako bolo potvrdené u retrovírusov, a replikácia DNA, ako bolo zistené u *Tn7*, *IS231* a *IS102*. Ďalej môže mať vplyv na výber cieľa aj transkripcia, ako to bolo pozorované u *IS102*, *Tn5* a *Tn10*. U bakteriofága Mu a u kvasinkového Ty1 bol pozorovaný vplyv proteínu meneného hľadania cieľa a vylúčenia z transkripčnej kontroly. Povaha cieľa, t. j. či sa jedná o chromozóm alebo o plazmid, hrá tiež dôležitú úlohu. V tomto prípade cieľová imunita môže byť iba dodatkovým faktorom.

Populačná dynamika a horizontálny prenos

Distribúcia mnohých inzerčných sekvencií medzi rôznymi bakteriálnymi druhmi bola sledovaná metódou Southernovej hybridizácie. Hart so spolupracovníkmi zistili distribúciu *IS1*, *IS2*, *IS3*, *IS4*, *IS5*, *IS30*, *IS103* u rôznych kmeňov *E. coli*. Na základe výsledkov pozorovania rozdelili inzerčné sekven-

cie do troch skupín podľa výrazného vplyvu na reguláciu: slabo regulované (IS1, IS5), stredne silno regulované (IS2, IS4, IS30), silno regulované (IS3). Opierali sa o pozorovanie, že bakteriofág P1 akumuloval mutácie spojené s inzerčnými sekvenciami, aj keď bol hostiteľský kmeň uchovávaný v agarových vpichoch. Arber a kol. [143] sledovali 8 skupín IS u 118 individuálnych klonov izolovaných z 30-ročných vpichov *E. coli* K12 W3110. Experimenty potvrdili, že prítomnosť inzerčných sekvencií v kmeňoch nie je fenoménom iba súčasného obdobia, ale že inzerčné sekvencie sa v bunkách vyskytovali s rovnakou frekvenciou aj v minulosti.

Literatúra

1. COLLINS, C. M. - GUTMAN, D. M.: Insertional inactivation of an *Escherichia coli* urease gene by IS3411. *Journal of Bacteriology*, 174, 1992, s. 883-888.
2. KLECKNER, N. - CHALMER, R. M. - KNOW, D. - SAKAY, J. - BOLLAND, S.: Tn10 and IS10 transposition and chromosome rearrangements: mechanisms and regulation in vivo and in vitro. In: SAEDLER, H. - GIERL, A.: Transposable elements. Heidelberg : Springer Verlag KG, 1996, s. 49-82.
3. MIZUUCHI, K.: Transposition recombination: mechanistic insights from studies of Mu and other elements. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 1992, s. 1011-1051.
4. POLARD, P. - CHANDLER, M.: Bacterial transposases and retroviral integrases. *Molecular Microbiology*, 15, 1995, s. 13-23.
5. GALAS, D. J. - CHANDLER, M.: Bacterial insertion sequences. In: BERG, D. E. - HOWE, M. M.: Mobile DNA. Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1989, s. 109-162.
6. ROBERTSON, H. M. - LAMPE, D. J.: Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between *Diptera* and *Neuroptera*. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 1995, s. 850-862.
7. DOAK, T. G. - DOERDER, F. P. - JAHN, C. J. - HERRICK, R. C.: A proposed superfamily of transposase gene: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common „D35E“ motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 1994, s. 942-946.
8. MULLER, H. P. - VARMUS, H. E.: DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes. *EMBO Journal*, 13, 1994, s. 4704-4714.
9. FINNEGAN, D. J.: Transposable elements: how non LTR retrotransposone do it. *Current Biology*, 7, 1997, s. R445-R448.
10. SKALAKA, A. M.: Retroviral DNA integration: lessons for transposon shuffling. *Gene*, 135, 1993, s. 175-182.
11. SCOTT, J. R. - CHURCHWARD, G. G.: Conjugal transposition. *Annual Review of Microbiology*, 49, 1995, s. 367-397.
12. MURPHY, E.: Transposable elements in gram-positive bacteria. In: BERG, D. E. - HOWE, M. M.: Mobile DNA. Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1989, s. 269-288.
13. BUKHARI, A. I. - SHAPIRO, J. A. - ADHAY, S. L.: DNA insertion elements, plasmids and episomes. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory, 1977. 782 s.
14. STARK, W. M. - BOOCOK, M. R. - SHERRATT, D. J.: Site-specific recombination by Tn3 resolvase. *Trends in Genetics*, 5, 1989, s. 304-309.
15. YURIEVA, O. - NIKIFOROV, V.: Catalytic center quest: comparison of transposases belonging to the Tn3 family reveals an invariant triad of acidic amino acid residues. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 38, 1996, s. 15-20.
16. DI GIOIA, D. - PEEL, M. - FAVA, F. - WYNDHAM, R. C.: Structure of homologous composite transpo-

- son carrying *abcABC* gene from Europe and North America. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 1998, s. 1940-1946.
17. NAKUTSU, C. - SINGH, J. N. R. - STRAUS, N. - WYNDHAM, C.: Chlorobenzoate catabolic transposon TN5271 is a composite class I element with flanking class II insertion sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 1991, s. 8312-8316.
18. RECCHIA, G. D. - HALL, R. M.: Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends in Microbiology*, 5, 1997, s. 389-394.
19. LEDERBERG, E. M.: Plasmid reference center registry of transposon (Tn) allocation through July 1981. *Gene*, 16, 1981, s. 59-61.
20. MAHILLON, J. - ROZSOHAZY, R. - HALLET, B. - DELCOUR, J.: IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. *Genetica*, 93, 1994, s. 13-26.
21. BRYNESTAD, S. - SYNSTAD, B. - GRANUM, P. E.: The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology*, 143, 1997, s. 2109-2115.
22. CORNILLON, E. B. - SAINT-JOANIS, B. - GAUBE, G. - KATAYAMA, S. - GRANUM, P. E. - CANARD, B. - COLE, S. T.: The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid borne. *Molecular Microbiology*, 15, 1995, s. 639-647.
23. GARCIA, M. I. - LE BOUGUENEC, C.: Nucleotide sequence of the afimbrial-adhesin-encoding *afa-3* gene cluster and its translocation via flanking *IS1* insertion sequences. *Journal of Bacteriology*, 176, 1994, s. 7601-7613.
24. HU, S. T. - LEE, C. H.: Characterisation of the transposon carrying the *STII* gene of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, 214, 1988, s. 490-495.
25. SO, M. - HEFFRON, F. - MCCARTHY, B. J.: The *E. coli* gene encoding heat stable toxin is a bacterial transposon flanked by inverted repeat of *IS1*. *Nature*, 277, 1979, s. 453-456.
26. DODSON, K. W. - BERG, D. E.: Factors affecting transposition activity of *IS50* and *Tn5* ends. *Gene*, 76, 1989, s. 207-213.
27. HAMMERSCHMIDT, S. - HILSE, R. - VAN PUTTEN, J. P. - GERARDY-SHAHN, R. - UNKMEIR, A. - FROSCH, M.: Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO Journal*, 15, 1996, s. 192-198.
28. STROEHER, U. H. - JEDENI, K. E. - DREDGE, B. K. - MORONA, R. - BROWN, M. H. - KARAGEORGOS, L. E. - ALBERT, M. J. - MANNING, P. A.: Genetic rearrangements in the *rfb* regions of *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 1995, s. 10374-10378.
29. FETHERSTON, J. D. - PERRY, R. D.: The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2. *Molecular Microbiology*, 13, 1994, s. 697-708.
30. FILIPPOV, A. A. - OLEINIKOV, P. N. - DROZDOV, A. V. - PROTSENKO, O. A.: The role of *IS* element of *Yersinia pestis* (Lehman, Neumann) in the emergence of calcium-independent mutations. *Genetika*, 26, 1990, s. 1740-1748.
31. GROISMAN, E. A. - OCHMAN, H.: Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*, 87, 1996, s. 791-794.
32. HACKER, J. - BLUM-OEHLER, G. - MUHLDOERFER, I. - TSCHAPE, H.: Pathogenic islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology*, 23, 1997, s. 1089-1097.
33. OTTEN, L. - CANADAY, J. - GERARD, J. C. - FOURNIER, P. - CROUZET, P. - PAULUS, F.: Evolution of agrobacterium and their *Ti* plasmids - a review. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 1992, s. 279-287.
34. FREIBERG, C. - FALLAY, R. - BAIROCH, A. - BROUGHTON, W. J. - ROSENTHAL, A. - PERRET, X.: Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, 387, 1997, s. 394-401.
35. CAMPBELL, W. R. - CASHORE, A. E. - NAKUTSU, C. H. - PEEL, M. C.: Catabolic transposons. *Biodegradation*, 5, 1994, s. 323-342.
36. LYON, B. R. - GILLESPIE, M. T. - SKURRAY, R. A.: Detection and characterisation of *IS256*, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology*, 133, 1987, s. 3031-3038.
37. LOUARN, J. M. - BOUCHE, J. P. - LEGENDRE, F. - LOUARN, J. - PATTE, J.: Characterisation and properties of very large inversion of the *E. coli* chromosome along the origin-to-terminus axis. *Molecular and General Genetics*, 201, 1985, s. 467-476.

38. SAVIC, D. J. - ROMAC, S. P. - EHRLICH, S. D.: Inversion in the lactose region of *Escherichia coli* K-12: inversion termini map within IS3 elements alpha 3 beta and 5 alpha 5. *Journal of Bacteriology*, 155, 1983, s. 943-946.
39. CHARLIER, D. - PIETTE, J. - GLANSORFF, N.: IS3 can function as a mobile promoter in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 10, 1982, s. 5935-5948.
40. CHENG, X. - NICOLET, J. - POUMARAT, F. - REGALLA, J. - THIAUCOURT, F. - FREY, J.: Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line from African and Australian strains. *Microbiology*, 141, 1996, s. 3221-3228.
41. BIK, E. M. - GOUW, R. D. - MOOI, F. R.: DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1996, s. 1453-1461.
42. YOUNGMAN, P.: Transposons and their applications. In: SONENSTHEIN, A. L. - HOCH, J. A. - LOSIEK, R.: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1993, s. 585-596.
43. BERG, D. E. - HOWE, M. M.: Mobile DNA. Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1989. 972 s..
44. SMALL, P. M. - VAN EMBDEN, J. D. A.: Molecular epidemiology of tuberculosis. In: BLOOM, B. R.: *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington D.C. : American Society for Microbiology, 1994, s. 569-582.
45. ISHIGURO, N. - SATO, G. - SASAKAWA, C. - DANBARA, H. - YOSHIKAWA, M.: Identification of citrate utilisation transposon IS3411 from a naturally occurring citrate utilisation plasmid. *Journal of Bacteriology*, 149, 1982, s. 961-968.
46. HUISMAN, O. - ERRADA, P. R. - SIGNON, L. - KLECKNER, N.: Mutational analysis of IS10's outside end. *EMBO Journal*, 8, 1989, s. 2101-2109.
47. MAKRI, J. C. - NORDMAN, P. L. - REZNIKOFF, W. S.: Mutational analysis of insertion sequence 50 (IS50) and transposon 5 (Tn5) ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 1988, s. 2224-2228.
48. ZERBID, D. - PRETKIN, P. - GAMES, P. - FREUND, E. - GALAS, D. J. - CHANDLER, M.: Functional organization of the ends of IS1: specific binding site for an IS1-encoded protein. *Journal of Bacteriology*, 177, 1990, s. 1393-1398.
49. ICHIKAWA, H. - IKEDA, K. - AMEMURA, J. - OHTSUBO, N.: Two domains in the terminal inverted-repeat sequence of transposon Tn3. *Gene*, 86, 1990, s. 11-17.
50. CRAIG, N. L.: Transposon Tn7. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 204, 1996, s. 27-48.
51. MOORE, S. P. - POWERS, M. - GARFINKEL, D. J.: Substrate specificity of Ty1 integrase. *Journal of Virology*, 69, 1995, s. 4683-4692.
52. GIERT, A.: The En/Spm transposable elements of maize. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 204, 1996, s. 145-159.
53. KUNZE, Z. M. - WALL, S. - APPELBERG, R. - SILVA, M. T. - PORTAELS, F. - MCFADDEN, J. J.: IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequence, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Molecular Microbiology*, 5, 1991, s. 2265-2272.
54. MACHIDA, C. - MACHIDA, Y.: Regulation of IS1 transposition by the *insA* gene product. *Journal of Molecular Biology*, 208, 1989, s. 567-574.
55. ZERBIB, D. - POLARD, P. - ESCOUBAS, J. M. - GALAS, D. - CHANDLER, M.: The regulatory role of the IS1 encoded InsA protein in transposition. *Molecular Microbiology*, 4, 1990, s. 471-477.
56. STALDER, R. - CASPERS, P. - OLASZ, F. - ARBER, W.: The N-terminal domain of the insertion sequence 30 transposase interacts specifically with the terminal inverted repeats of the element. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 1990, s. 3757-3762.
57. LAVOIE, B. D. - CHACONAS, G.: Transposition of phage Mu DNA. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 204, 1996, s. 83-102.
58. MAEKAWA, T. - AMEMURA-MAEKAWA, J. - OHTSUBO, E.: DNA binding domains in Tn3 transposase. *Molecular and General Genetics*, 236, 1993, s. 267-274.
59. WIEGAND, T. W. - REZNIKOFF, W. S.: Interaction of Tn5 transposase with the transposon termini. *Journal of Molecular Biology*, 235, 1994, s. 486-495.
60. POLARD, P. - TON-HOANG, B. - HAREN, L. - BETERMIER, M. - WALTZAK, R. - CHANGLER, M.: IS911 mediated transpositional in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 264, 1996, s. 68-81.
61. JAIN, C. - KLECKNER, N.: Preferential cis action of IS10 transposase depends upon its mode of syn-

- thesis. *Molecular Microbiology*, 9, 1993, s. 249-260.
62. WEINREICH, M. D. - MAHNKE-BRAAM, L. - REZNIKOFF, W. S.: A functional analysis of the Tn5 transposase. Identification of domains required for DNA binding and multimerization. *Journal of Molecular Biology*, 241, 1994, s. 166-177.
63. POLARD, P. - CHANDLER, M.: Bacterial transposase and retroviral integrases. *Molecular Microbiology*, 15, 1995, s. 13-23.
64. CHACONAS, G. - LAVOIE, B. D. - WATSON, M. A.: DNA transposition: jumping gene machine, some assembly required. *Current Biology*, 6, 1996, s. 817-820.
65. BOLLAND, S. - KLECKNER, N.: The three chemical steps of Tn10/IS10 transposition involve repeated utilisation of a single active site. *Cell*, 84, 1996, s. 223-233.
66. KATZ, R. A. - SKALKA, A. M.: The retroviral enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 1994, s. 133-173.
67. SERRE, M. C. - TURLAN, C. - BORTOLIN, M. - CHANDLER, M.: Mutagenesis of the IS1 transposase: importance of a His-Arg-Tyr triad for activity. *Journal of Bacteriology*, 177, 1995, s. 5070-5077.
68. GRINDLEY, N. D. - LESCHZNER, A. E.: DNA transposition: from a black box to a collar monitor. *Cell*, 83, 1995, s. 1063-1066.
69. RICE, P. - CRAIGIE, R. - DAVIE, D. R.: Retroviral integrases and their cousins. *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 1996, s. 76-83.
70. SCORDILIS, G. E. - REE, H. - LESSIE, T. G.: Identification of transposable elements which activate gene expression in *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Bacteriology*, 169, 1987, s. 8-13.
71. PODGLAJEN, I. - BREUIL, J. - COLLATZ, E.: Insertion of a novel DNA sequences IS1186, upstream of the silen carbopenemase gene *cfiA*, promotes expression of carbopenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Molecular Microbiology*, 12, 1994, s. 105-114.
72. DESHARES, D. - WOOD, G. E. - FRIEDMAN, R. L.: Molecular characterization of catalase from *Bordetella pertussis*: identification of the *katA* promoter in an upstream insertion sequence. *Molecular Microbiology*, 14, 1994, s. 123-130.
73. DEMUTH, D. R. - DUAN, Y. - JENKINSON, H. F. - McNAB, R. - GILL, S. - LAMONT, R. J.: Interruption of the *Streptococcus gordonii* M5 *sspA/sspB* intergenic region by an insertion sequence related to IS1167 of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 143, 1997, s. 2047-2255.
74. HUBNER, A. - HENDRICKSON, W.: A fusion promoter created by a new insertion sequence, IS490, activates transcription of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid catabolic genes in *Burkholderia cepacia* AC1100. *Journal of Bacteriology*, 179, 1997, s. 2717-2723.
75. TOLMASKY, E. M. - CROSA, J. H.: Iron transport genes of the pJM1-mediated iron uptake system of *Vibrio anguillarum* are included in a transposonlike structure. *Plasmid*, 33, 1995, s. 180-190.
76. REIMMANN, C. - MOORE, R. - LITTLE, S. - SAVIOZ, A. - WILLETTTS, N. S. - HAAS, D.: Genetic structure, function and regulation of the transposable element IS21. *Molecular and General Genetics*, 215, 1989, s. 416-424.
77. DALRYMPLE, B.: Novel rearrangements of IS30 carrying plasmids leading to the reactivation of gene expression. *Molecular and General Genetics*, 207, 1987, s. 413-420.
78. LEELAPORN, A. - FIRTH, N. - BYRNE, M. E. - ROPER, E. - SKURRAY, R. A.: Possible role of insertion sequence IS257 in dissemination and expression of high- and low-level trimetoprim resistance in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 1994, s. 2238-2244.
79. SZEVERENYI, I. - BODOKY, T. - OLASZ, F.: Isolation, characterisation and transposition of an (IS2) intermediate. *Molecular and General Genetics*, 251, 1996, s. 281-289.
80. TON-HOANG, B. - BETERMIER, M. - POLARD, P. - CHANDLER, M.: Assembly of a strong promoter following IS911 circularization and the role of circles in transposition. *EMBO Journal*, 16, 1997, s. 3357-3371.
81. LOPEZ DE FELIPE, F. - MAGNI, C. - DE MENDOZA, D. - LOPEZ, P.: Transcriptional activation of the citrate permease P gene of *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis by an insertion sequence-like element present in plasmid pCIT264. *Molecular and General Genetics*, 250, 1996, s. 428-436.
82. REYNOLDS, A. E. - FELTON, J. - WRIGHT, A.: Insertion of DNA activates the cryptic *bgl* operon in *E. coli* K12. *Nature*, 293, 1981, s. 625-629.
83. REYNOLDS, A. E. - MAHADEVAN, S. - LEGRICE, S. F. - WRIGHT, A.: Enhancement of bacterial gene expression by insertion elements or by mutation in a CUP-cAMP binding site. *Journal of Molecular Biology*, 191, 1986, s. 85-95.
84. DOOLITTLE, W. F. - KIRKWOOD, T. B. - DEMPSTER, M. A.: Selfish DNAs with self-restraint. *Nature*,

- 307, 1984, s. 501-502.
85. ESCOUBAS, J. M. - PRERE, M. F. - FAYET, O. - SALVINGNOL, I. - GALAS, D. - ZERBIB, D. - CHANDLER, M.: Translational control of transposition activity of the bacterial insertion sequence IS1. *EMBO Journal*, 7, 1991, s. 705-712.
86. MACHIDA, C. - MACHIDA, Y.: Regulation of IS1 transposition by the *insA* gene product. *Journal of Molecular Biology*, 208, 1989, s. 567-574.
87. HU, S. T. - HWANG, J. H. - LEE, C. H. - LI, P. L. - HSIEH, Y. C.: Functional analysis of the 14 kDa protein of insertion sequence 2. *Journal of Molecular Biology*, 236, 1994, s. 503-513.
88. DAVIS, M. A. - SIMONS, R. W. - KLECKNER, N.: Tn10 protects itself at two levels from fortuitous activation by external promoters. *Cell*, 43, 1985, s. 379-387.
89. KREBS, M. P. - REZNIKOFF, W. S.: Transcriptional and translational initiation sites of IS50. Control of transposase and inhibitor expression. *Journal of Molecular Biology*, 192, 1986, s. 781-791.
90. REZNIKOFF, W. S. - JILK, R. - KREBS, M. P. - MAKRI, J. C. - NORDMANN, P. L. - WENREICH, M. - WIEGAND, T.: Tn5 LacZ translation fusion element isolation and analysis of transposition mutants. *Methods in Enzymology*, 217, 1993, s. 312-322.
91. GRINDLEY, N. D.: IS1 insertion generates duplication of a nine base pair sequence at its target site. *Cell*, 13, 1978, s. 419-426.
92. SEKINE, Y. - OHTSUBO, E.: Frameshifting is required for production of the transposase encoded by insertion sequence 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 1989, s. 4609-4613.
93. CHEN, C. W. - YU, T. W. - CHUNG, H. M. - CHOU, C. F.: Discovery and characterization of a new transposable element, Tn4811, in *Streptomyces lividans* 66. *Journal of Bacteriology*, 174, 1992, s. 7762-7769.
94. DE LA CRUZ, N. B. - WEINREICH, M. D. - WIEGAND, T. W. - KREBS, M. P. - REZNIKOFF, W. S.: Characterisation of the Tn5 transposase and inhibitor proteins: a model for the inhibition of transposition. *Journal of Bacteriology*, 175, 1993, s. 6932-6938.
95. MARIANI, F. - PICCOLELLA, E. - COLIZZI, V. - RAPPUOLI, R. - GROSS, R.: Characterisation of an IS-like element from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of General Microbiology*, 139, 1993, s. 1767-1772.
96. FOURNIER, P. - PAULUS, F. - OTTEN, L.: IS870 requires a 5'-CTAG-3' target sequence to generate the stop of codon for its large ORF1. *Journal of Bacteriology*, 175, 1993, s. 3151-3160.
97. GOOSEN, N. - VAN DE PUTTE, P.: Role of *ner* protein in bacteriophage Mu transposition. *Journal of Bacteriology*, 167, 1986, s. 503-507.
98. DERBYSHIRE, K. M. - KRAMER, M. - GRINDLEY, N. D.: Role of instability the *cis* action of the insertion sequence IS903 transposase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1990, s. 4048-4052.
99. MACHIDA, Y. - MACHIDA, C. - OHTSUBO, H. - OHTSUBO, E.: Factor determining frequency of plasmid cointegration mediated by insertion sequence IS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 1982, s. 277-281.
100. PRENTKI, P. - PHAM, M. H. - GAMAS, P. - CHANDLER, M. - GALAS, D. J.: Artificial transposable elements in the study of ends of IS1. *Gene*, 61, 1987, s. 91-101.
101. MORISATO, D. - WAY, J. C. - KIM, H. J. - KLECKNER, N.: Tn10 transposase acts preferentially on near-by transposon end in vivo. *Cell*, 32, 1983, s. 799-807.
102. ISBERG, R. R. - SYVANEN, M.: Replication function promoted by the inverted repeat of Tn5. The right repeat is an insertion sequence. *Journal of Molecular Biology*, 150, 1981, s. 15-32.
103. GRINDLEY, N. D. - JOYCE, C. M.: Genetic and DNA sequence analysis of the kanamycin resistance transposon Tn903. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 1980, s. 7176-7180.
104. GRINDLEY, N. D. - JOYCE, C. M.: Analysis of the structure and function of the kanamycin-resistance transposon Tn903. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 45, 1981, s. 125-133.
105. DERBYSHIRE, K. M. - GRINDLEY, N. D.: *Cis* preference of the IS903 transposase is mediated by a combination of transposase instability and inefficient translation. *Molecular Microbiology*, 21, 1996, s. 1261-1272.
106. GAMAS, P. - GALAS, D. - CHANDLER, M.: DNA sequence at the end of IS1 required for transposition. *Nature*, 317, 1985, s. 458-460.
107. SIGNON, L. - KLECKNER, N.: Negative and positive regulation of Tn10/IS10-promoted recombination

- by IHF: two distinguishable processes inhibit transposition off multicopy plasmid replicons and activate chromosomal events that favor evolution of new transposons. *Genes & Development*, 9, 1995, s. 1123-1136.
108. REZNIKOFF, W. S.: The Tn5 transposon. *Annual Review of Microbiology*, 47, 1993, s. 945-963.
109. KRUKLITIS, R. - WELTY, D. J. - NAKAI, H.: ClpX protein of *Escherichia coli* activates bacteriophage Mu transposase in the strand transfer complex for initiation of Mu DNA synthesis. *EMBO Journal*, 15, 1996, s. 935-944.
110. LEVCHENKO, I. - LUO, I. - BAKER, T. A.: Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. *Genes & Development*, 9, 1995, s. 2399-2408.
111. MHAMMEDI-ALAOUI, A. - PATO, M. - GAMA, M. J. - TOUSSAINT, A.: A new component of bacteriophage Mu replicative transposition machinery: The *Escherichia coli* CipX protein. *Molecular Microbiology*, 11, 1994, s. 1109-1116.
112. LEVCHENKO, I. - YAMAUCHI, M. - BAKER, T. A.: ClpX and MuB interact with overlapping regions of Mu transposase: implications for control of the transposition pathway. *Genes & Development*, 11, 1997, s. 1561-1572.
113. LAACHOUCHI, J. E. - DESMET, L. - GEUSKENS, V. - GRIMAUD, R. - TOUSSAINT, A.: Bacteriophage Mu repressor as a target for the *Escherichia coli* ATP-dependent CIP protease. *EMBO Journal*, 15, 1996, s. 437-444.
114. SCOTT, J. R. - CHURCHWARD, G. G.: Conjugative transposition. *Annual Review of Microbiology*, 49, 1995, s. 367-397.
115. WEINREICH, M. D. - MAKRI, C. J. - REZNIKOFF, W. S.: Induction of the SOS response in *Escherichia coli* inhibits Tn5 and IS50 transposition. *Journal of Bacteriology*, 173, 1991, s. 6910-6918.
116. KUAN, C. T. - LIU, S. K. - TESSMAN, I.: Excision and transposition of Tn5 as an SOS activity in *Escherichia coli*. *Genetics*, 128, 1991, s. 45-57.
117. KUAN, C. T. - TESSMAN, I.: LexA protein of *Escherichia coli* represses expression of Tn5 transposase gene. *Journal of Bacteriology*, 173, 1991, s. 6406-6410.
118. KUAN, C. T. - TESSMAN, I.: Further evidence that transposition of Tn5 in *Escherichia coli* is strongly enhanced by constitutively activated RecA proteins. *Journal of Bacteriology*, 174, 1992, s. 6872-6877.
119. AHMED, A.: Evidence for replicative transposon Tn5 and Tn9. *Journal of Molecular Biology*, 191, 1986, s. 75-84.
120. ZABALA, J. C. - GARCIA-LOBO, J. M. - DIAZ-ARCA, E. - DE LA CRUZ, F. - ORTIZ, J. M.: *Escherichia coli* alpha-hemolysin synthesis and export genes are flanked by a direct repetition of IS91-like elements. *Molecular Biology and Genetics*, 197, 1984, s. 90-97.
121. ISBERG, R. R. - SYVANENE, M.: DNA gyrase is a host factor required for transposition of Tn5. *Cell*, 30, 1982, s. 9-18.
122. SASAKAWA, C. - UNO, Y. - YOSHIKAWA, M.: The requirement for both DNA polymerase and 5' to 3' exonuclease activities of DNA polymerase I during Tn5 transposition. *Molecular and General Genetics*, 182, 1981, s. 19-24.
123. PATO, M. L. - BANERJEE, M.: The Mu strong origin binding site promotes efficient synapsis of the prophage terminus. *Molecular Microbiology*, 22, 1996, s. 283-292.
124. ROBERTS, D. - HOOPES, B. C. - MCCLURE, W. R. - KLECKNER, N.: IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell*, 43, 1985, s. 117-130.
125. SPIELMANN-RYSER, J. - MOSER, M. - KAST, P. - WEBER, H.: Factors determining the frequency of plasmid cointegrate formation mediated by insertion sequence IS3 from *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, 226, 1991, s. 441-448.
126. CHOW, S. A. - VINCENT, K. A. - ELLISON, V. - BROWN, P. O.: Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. *Science*, 255, 1992, s. 723-726.
127. POLARD, P. - TON-HOANG, B. - HAREN, L. - BETERMIER, M. - WALCZAK, R. - CHANDLER, M.: IS911-mediated transpositional recombination in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 264, 1996, s. 64-81.
128. KULKOSKY, J. - JONES, K. S. - KATZ, R. A. - MACK, J. P. - SKALKA, A. M.: Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrase and bacterial insertion sequence transposase. *Molecular and Cellular Biology*, 12, 1992, s. 2331-2338.
129. JENKINS, T. M. - ESPOSITO, D. - ENGELMAN, A. - CRAIGIE, R.: Critical contacts between HIV-1 integrase and viral DNA identified by structure-bases analysis and photo-crosslinking. *EMBO Journal*,

- 16, 1997, s. 6849-6859.
130. RICE, P. - MIZUUCHI, K.: Structure of the bacteriophage Mu transposase core: a common structural motif for DNA transposition and retroviral integration. *Cell*, 82, 1995, s. 209-220.
131. GALAS, D. J. - CHANDLER, M.: Structure and stability of Tn9-mediated cointegrates. Evidence for two pathways of transposition. *Journal of Molecular Biology*, 154, 1982, s. 245-272.
132. DANILEVICH, V. N. - KOSTIUCHENKO, D. A.: Immunity to repeated transposition of the insertion sequence IS21. *Molecular Biology*, 19, 1985, s. 1242-1250.
133. ADZUMA, K. - MIZUUCHI, R. H.: Interaction of protein located at a distance long DNA: mechanism of target immunity in the Mu DNA strand-transfer reaction. *Cell*, 57, 1989, s. 41-47.
134. ADZUMA, K. - MIZUUCHI, R. H.: Target immunity of Mu transposon reflects a differential distribution of Mu B protein. *Cell*, 53, 1988, s. 257-266.
135. BANTON, R. L. - KUBO, K. M. - FENG, J. N. - CRAIG, N. L.: Tn7 transposition: target DNA recognition is mediated by multiple Tn7-encoded proteins in a purified in vitro system. *Cell*, 72, 1993, s. 931-943.
136. ARTHUR, A. - NIMMO, E. - HETTLER, S. - SHERRATT, D.: Transposition and transposition immunity of transposon Tn3 derivatives having different ends. *EMBO Journal*, 3, 1984, s. 1723-1729.
137. AMEMURA, J. - ICHIKAWA, H. - OHTSUBO, E.: Tn3 transposition immunity is conferred by the transposase-binding domain in the terminal inverted-repeat sequence of Tn3. *Gene*, 88, 1990, s. 21-24.
138. WIATER, L. A. - GRINDLEY, N. D.: Gamma delta transposase and integration host factor bind cooperatively at both ends of gamma delta. *EMBO Journal*, 7, 1988, s. 1907-1911.
139. WIATER, L. A. - GRINDLEY, N. D.: Integration host factor increase the transpositional immunity conferred by gamma delta ends. *Journal of Bacteriology*, 172, 1990, s. 4951-4958.
140. CRAIG, N. L.: Transposition Tn7. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 204, 1996, s. 27-48.
141. HALLET, B. - REZSOHAZY, R. - MAHILLON, J. - DELCOUR, J.: IS231A insertion specificity: consensus sequence and DNA bending at the target site. *Molecular Microbiology*, 14, 1994, s. 131-139.
142. MIZUUCHI, M. - MIZUUCHI, K.: Target site selection in transposition of phage Mu. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 58, 1993, s. 515-523.
143. ARBER, W. - IIDA, S. - JUTTE, H. - CASPERS, P. - MEYER, J. - HANNI, C.: Rearrangements of genetic material in *Escherichia coli* as observed on the bacteriophage P1 plasmid. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 43, 1979, s. 1197-1208.

Do redakcie došlo 28.9.1999.

Characterisation of insertion sequences in bacterial cells

MAČOR, M. - SIEKEL, P. - GRONES, J.: *Bull. potrav. Výsk.*, 39, 2000, p. 23-48.

SUMMARY. The presented article gives a general review of the function, properties and occurrence of insertion sequences isolated from bacterial cells and demonstrates a correlation between mobile insertion sequences and the possibility of the generation of spontaneous mutations of bacteria.

KEYWORDS: insertion sequences; transposons; mutation