

AZ IS30 BAKTERIÁLIS INSZERCIÓS ELEM CÉLSZEKVENCIA VÁLASZTÁSÁNAK MOLEKULÁRIS TÉNYEZŐI

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

SZABÓ MÓNIKA

Gödöllő 2007.

A Doktori Iskola

megnevezése:	Szent István Egyetem Biológia Tudományi Doktori Iskola
tudományága:	Biológia
vezetője:	Dr. Tuba Zoltán Tanszékvezető egyetemi tanár, a biológia tudományok doktora SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Növénytani és Növényélettani Tanszék
témavezető:	Dr. Olasz Ferenc egyetemi doktor Mezőgazdasági Biotechnológia Kutatóközpont
	Dr. Hornok László Tanszékvezető egyetemi tanár, MTA doktora SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Mikrobiológia Tanszék

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

.....

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mivel kutatómunkámat egy olyan csoportban végezhettem, ahol a kutatás nem az egyének elszigetelt munkáján, hanem igazi szellemi együttműködésen alapul, így az értekezésben tárgyalt munkának sem egyetlen szerzője vagyok. A dolgozat megszületéséhez valamilyen módon a csoport minden jelenlegi és korábbi tagja hozzájárult, amiért mindannyiuknak köszönettel tartozom.

Köszönöm Témavezetőimnek:

Dr. Olasz Ferencnek, aki szakdolgozatos hallgatóként csoportjába fogadott és diplomamunkámtól egészen a mai napig irányítja munkámat. Személyében egy igazi tanítóra, s kollegára találtam.

Dr. Hornok Lászlónak, volt tanáromnak, aki mindvégig kitartott mellettem, és bíztatott dolgozatom elkészítésében.

Köszönettel tartozom:

Müller Ferencnek, a halas kísérletekben nyújtott segítségéért és a közös munkáért.

Dr. Uwe Straehlenek, aki biztosította a külföldi munkámat a Karlsruhei Forschungszentrum Toxikológia és Genetika intézetében, valamint Strasbourgi IGBMC.

Külön köszönöm:

Kiss Jánosnak, diplomamunkás szakvezetőmnek, majd kollegámnak, és egy igazi barátnak.

Hálával tartozom csoportunk jelenlegi, és volt tagjainak a közösen elért eredményekért és a labor baráti légköréért:

- a gondos asszisztenciáért: Könczöl Vilmosné, Icának; Sztánáné, Keresztúri Erikának; Nagy Lászlóné, Áginak; Turai Máriának; Lengyel Istvánné, Zsuzsának; Marinka Józsefné, Erzsinek

 - a közös munka és gondolkodás öröméért: Nagy Zitának, Varga Máténak, Kohut Gábornak, Imre Arielnek, Baji Gál Árpádnak, Fischer Tamásnak, Mekli Krisztinának, Farkas Tibornak és Szeverényi Ildikónak

Végül talán a legfontosabb segítségért, a támogatásért és biztos háttérért köszönettel tartozom **Anyukámnak**.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. Transzpozonok és IS elemek felépítése és csoportosítása	8
2.2. A fordítottan ismétlődő IR szekvenciák	9
2.3. A transzpozázok doménszerkezete	10
2. 3.1. Katalitikus domén	10
2. 3.2. DNS kötő domén	13
2. 3.3. Multimerizációs domén	13
2.4. Transzpozíciós reakciók és modellek	14
2.4.1. DDE transzpozázok transzpozíciós mechanizmusa	15
2.4.1.1. "Copy-in" avagy replikatív transzpozíció	15
2.4.1.2. "Cut-out, paste-in" transzpozíció	16
2.4.1.3. "Copy-out, paste in" transzpozíció	18
2.4.2. RC transzpozonok transzpozíciós mechanizmusa	19
2.4.3. IS200/605 család elemeinek transzpozíciója	20
2.4.4. Y/S transzpozonok transzpozíciója	21
2.5. A transzpozonok célszekvencia specificitása	22
2.6. IS30 inszerciós szekvencia	23
2.6.1. IS30 transzpozíciója	24
2.6.2. IS30 targetspecificitása	25
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	26
3.1. Tápoldatok, antibiotikumok, enzimek	26
3.2. Baktérium törzsek és bakteriofágok	26
3.3. Plazmidok	27
3.4. Általánosan alkalmazott molekuláris biológiai módszerek	30
3.5. Az IS30 transzpozáz indukciójának vizsgálata	31
3.6. Intramolekuláris transzpozíció	32
3.7. Intermolekuláris transzpozíció vizsgálata hőmérsékletérzékeny target plazmidok	32
felhasználásával	

3.8. Transzpozíciós célszekvenciák izolálása a pOX38Km plazmidon	33
3.9. Transzpozíciós fúzió vizsgálata R408 transzdukcióval	33
3.10. Az O _R 1-3 régió beépítése a S. typhimurium genomjára	34
3.11. Gél retardációs kísérlet	34
3.12. In vitro transzpozíció tisztított IS30 transzpozáz felhasználásával	35
3.13. Primer extenziós kísérlet	35
4. EREDMÉNYEK	36
4.1. Az IS30 transzpozáz funkcionális vizsgálata	36
4.1.1. Az IS30 családba tartozó transzpozázok számítógépes analízise	36
4.1.2. HTH motívumokban mutáns IS30 transzpozázok jellemzése	36
4.1.2.1. A HTH1 deléciós transzpozáz célszekvencia választásának vizsgálata	39
4.2. Az IS30 target specificitásának módosítása fúziós transzpozázok felhasználásával	41
4.3. Az IS <i>30</i> transzpozíciója zebrahalban	45
4.3.1. A bakteriális transzpozáz aktivitásának vizsgálata zebrahal embriókban	45
4.3.2. Célzott génbevitel zebrahalban fúziós transzpozáz felhasználásával	48
4.4. Az IR végek szerepe az IS <i>30</i> elem transzpozíciójában	50
4.4.1. Az IR mutánsok jellemzése in vivo transzpozíciós kísérletekben	50
4.4.2. A transzpozáz kötőhely azonosítása az IR végekben	53
4.4.3. Az integrációhoz szükséges IR régiók meghatározása	54
4.4.4. Az IR mutációk hatása a spacer bázisok származására	55
4.4.5. A 2-3. IR pozíciók szerepe a DNS hasításban	57
4.5. A szubterminális IS30 szekvenciák szerepe a transzpozícióban	59
4.5.1. Az IR végekkel határos szekvenciák hatása a transzpozícióra	59
4.5.2. A RIR-LIR kapcsolat kialakulásának in vivo vizsgálata	61
4.5.3. A RIR-LIR képzés vizsgálata in vitro transzpozíciós rendszerben	62
4.5.4. A transzpozáz kötődésének vizsgálata a szubterminális szekvenciákhoz	63
4.5.5. Az IR végeket határoló régió deléciós analízise	64
4.5.6. A szubterminális szekvenciák pontmutációs vizsgálata	65
4.5.7. A RIR-LIR képzést segítő motívum azonosítása az IS30 jobb végében	66
4.5.8. Aktivátor elemek meghatározása az IS30 bal végében	67
4.6. Az IS30 végek orientációs hatása	69
4.6.1. Az IR szekvenciák befolyása az IS30 végek kapcsolódására	69
4.6.2. A szubterminális szekvenciák szerepe az orientációs hatás kialakításában	70
4.6.3. Az orientációs hatás megnyilvánulása a cirkuláris transzpozonok keletkezésében	72
4.6.4. Azonos végeket tartalmazó transzpozonok integrációja	74

4.6.5. A hibás IR-IR kapcsolódás in vitro vizsgálata	75
4.6.6. Palindrom szekvenciák hatása a cirkuláris transzpozonok stabilitására	75
4.7. Génkonverzió az IS30 elem transzpozíciójában	76
4.7.1.Génkonverzió az IR-targeting során	76
4.7.2. A donor és target szekvenciák felemás szerepe a konverzióban	78
4.7.3. Homológ szekvenciák jelentősége a konverzió kialakulásában	79
4.7.4. Génkonverzió intramolekuláris transzpozíció alkalmával	80
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	82
5.1. Az IS30 célszekvencia választását befolyásoló fehérje domének	82
5.2. Az IR végek funkcionális felosztása	83
5.3. A szubterminális szekvenciák hatása az IS30 transzpozíciójára	85
5.4. Az IS30 transzpozíciójának molekuláris modellje	87
6. ÖSSZEFOGLALÁS	91
SUMMARY	93
7. MELLÉKLETEK	95
M1 Irodalomjegyzék	95
M2 Saját publikációk jegyzéke	101
M3 Függelékek	102

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

aa	aminosav
Ар	ampicillin
bp	bázispár
CIG	consensus of insertion sites on E. coli genome: genomi inszerciós helyek konszenzusa
CIP	consensus of insertion sites on plasmids and phages: plazmid és fág eredetű inszerciós
CInOX	consensus of insertion sites on pOX38Km plasmid: pOX38Km inszerciós helvek
сцол	konszenzusa
Cm	kloramfenikol
DDS	dimer dissolution. IS elem dimerek megoldódása
FIS	factor for inversion stimulation: inverziót elősegítő gazdafaktor
ofn	green fluorescent protein gén
ων Gln	olutamin
Glu	olutaminsay
GOHS	genomi konszenzus alapián készült oligonukleotid hot spot
HS	hot spot nreferált inszerciós célszekvencia
HU	aspecifikus DNS-kötő tulaidonsággal rendelkező hisztonszerű hakteriális fehérie
IHF	integration host factor: integrációt elősegítő gazdafaktor
intA	a pontyból izolált <i>B-actin</i> gén splice acceptor szekvenciája
IPTG	izonronil-B-D-tiogalaktozid
IS	inszerciós szekvencia
$(IS 30)_{2}$	IS 30 dimer: ellentétes végeivel kancsolódó IS 30 elemek
IR	inverted repeat: fordítottan ismétlődő szekvencia az IS elem végein
khn	kilobázis
Km	kanamycin
Leu	leucin
LIR	bal oldali fordítottan ismétlődő szekvencia
MCS	multiple cloning site: sok restrikciós hasítóhelvet tartalmazó klónozó szekvencia
m.o.i.	multiplicity of infection: az egy gazdasejtre jutó fertőzőképes vírusok száma
MWS	molecular weight standard: molekulatömeg standard
MT	Myc-tag peptid
neo	neomycin/kanamycin foszfotranszferáz gén
NLS	nukleáris lokalizációs szignál peptid
ORF	open reading frame: nyitott leolvasási keret
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció
Phe	fenilalanin
POHS	plazmid, fág konszenzus alapján készült oligonukleotid hot spot
primer	szekvenáláshoz, mutagenezishez, PCR-hez használt oligonukleotid
Rif	rifampicin
shh	sonic hedgehog gén
SDS	nátrium dodecil szulfát
Sm	streptomycin
Sp	spectinomycin
spacer	ismert funkcióval rendelkező DNS szekvenciákat elválasztó régió
SSD	site-specific dimerisation: helyspecifikus dimerizáció
Tc	tetraciklin
TCT	target choice transposition: transzpozíció a célszekvenciába
TD	target duplikáció

- Tp-áz ts x^R x^S transzpozáz
- termoszenzitív, hőmérsékletérzékeny
- rezisztens
- szenzitív
- vad típus wt

1. BEVEZETÉS

A genomban önálló áthelyeződésre képes DNS darabok, azaz a mobilis genetikai elemek leírása Barbara McClintock nevéhez fűződik, aki észrevette, hogy bizonyos kukorica vonalak hibridjeinek szegregációja a mendeli hasadási arányoktól teljesen eltérő (McClintock, 1948). A bakteriális genetikában csak két évtizeddel később írtak le hasonló elemeket, úgynevezett inszerciós szekvenciákat (IS), vagy transzpozonokat, melyek elsősorban mutagén hatásukkal, illetve az antibiotikum rezisztencia gének gyors terjedésével hívták fel magukra a figyelmet (Shapiro, 1969). Az első felfedezések óta napjainkig csak a baktériumokban közel 1500 különböző IS elemet és transzpozont tartanak számon, melyekhez hozzávéve az eukarióták hasonló elemeit, a retrotranszpozonokat, retrovírusokat és egyéb aktív transzpozícióra már nem képes repetitív elemeket, kijelenthetjük, hogy az élővilág egy általánosan elterjedt jelenségéről van szó. A magasabb rendű eukarióták, így az ember (Lander et al., 2001), az egér (Waterston et al., 2002) vagy akár a rizs (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002) genomjának több mint 40 %-a transzpozon eredetű szekvencia, és a géntakarékossági elven működő prokarióták világában is találhatunk olyan fajokat, törzseket, ahol a bakteriális genom 1/10-ét mobilis elemek töltik ki. A Yersinia pestis genomban több mint 150 (Parkhill et al., 2001), míg a Shigella flexneri genomban 314 (Jin et al., 2002) IS elem, illetve transzpozon mutatható ki. Léteznek olyan virulencia plazmidok (Shigella flexneri 5a virulencia plazmidja), melyek összméretének több mint 50 %-a transzpozon vagy IS szekvencia (Venkatesan et al., 2001).

A transzpozíció, azaz a mobilis elemek áthelyeződése előnnyel és hátránnyal egyaránt járhat a gazdaszervezetre nézve. Előny lehet az úgynevezett csendes gének expressziójának bekapcsolása, de ennél valószínűbb, hogy az IS elemek mozgása olyan genomátrendeződéseket indukál, amely már genetikai teher lehet a gazdaszervezetre nézve. Számos bakteriális transzpozon ugyanakkor olyan többlet funkciót is kódol (pl. antibiotikum rezisztenciák, virulencia faktorok), melyek elterjedése hozzájárul a közös bakteriális génkészlet kialakulásához. Az eukarióták körében konzervált V(D)J átrendeződéseket, vagy a telomerek fennmaradását, illetve az intron splicingot mind transzpozáz eredetű gének kódolják, melyek a gazdaszervezethez idomulva a genom struktúra átrendezésében, illetve a gén expresszió szabályozásában játsszanak döntő szerepet. Hogyan mozognak a különböző mobilis elemek? Miben különböznek az egyes transzpozíciós mechanizmusok? Milyen módon tudtak elterjedni figyelmen kívül hagyva az evolúciós határvonalakat? Ezekre és több ehhez hasonló kérdésre kaphatjuk meg a választ a molekuláris genetika és biokémia egyszerű eszközeinek, s modell szervezeteinek felhasználásával.

6

Az értekezésben tárgyalt vizsgálatok általános célja az volt, hogy a mobilis elemről szerzett információkat kibővítsük, és eddig nem vizsgált kérdésekre is választ keressünk, ami alapja lehet mutagenezis, illetve génbeviteli rendszerek fejlesztésének. Kísérleteinket az *Escherichia coli* baktériumban honos IS*30* elemmel végeztük, amely a korábbi vizsgálatok alapján egy "szokványos" inszerciós szekvenciának tekinthető, s így transzpozíciójának részletes vizsgálata hozzájárulhat az IS elemekről rendelkezésre álló ismeretek szélesítéséhez.

A kísérleti célok között a következő főbb szempontok szerepeltek:

- Az IS30 célszekvencia választásának tanulmányozása, a targetszekvenciák felismerését biztosító fehérje domének azonosítása, új specificitású rekombinázok előállítása.

- A prokarióta eredetű IS30 elem aktivitásának és targetspecificitásának vizsgálata zebrahalban (*Danio rerio*).

- Irányított inszerciók generálása olyan kiméra elemek felhasználásával, melyben az IS30 transzpozázt különböző DNS-kötő fehérjékkel kapcsoljuk össze.

- Az IR végek szerepének vizsgálata a transzpozícióban. A transzpozáz kötésben és a katalitikus reakcióban fontos bázisok, illetve pozíciók azonosítása.

- A transzpozíció hatékonyságát befolyásoló DNS-elemek keresése az IS30 szekvenciában.

Az IS30 transzpozíciójában megfigyelhető orientációs hatás tanulmányozása. Az azonos IR végek kapcsolódását megakadályozó genetikai faktorok azonosítása.

 A génkonverziót tartalmazó transzpozíciós termékek kialakulásának vizsgálata, s egy olyan molekuláris modell kialakítása, amely képes az elem transzpozíciójának eddig megismert jellemzőit magyarázni.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Transzpozonok és IS elemek felépítése és csoportosítása

Az IS elemek/transzpozonok minimálisan egy gént, az áthelyeződést katalizáló transzpozáz gént tartalmazzák. Döntő többségükre jellemző, hogy végeiket rövid (7-50 bp), általában nem tökéletesen azonos, fordítva ismétlődő szekvenciák (Inverted Repeat – IR) határolják, és az elem beépülése során a cél DNS néhány bp-nyi (2-14 bp) szakaszának megduplázódását (Target Duplikáció – TD) okozzák. Ez alól kivételt az Y/S (tirozin/szerin), valamint a RC (rolling circle) transzpozázokat kódoló IS elemek képeznek. Ezeket soha nem határolják IR szekvenciák, és TD-t sem okoznak (Machillon and Chandler, 1998).

Felépítésük alapján a bakteriális mobilis elemek három fő csoportba sorolhatók. A legegyszerűbb elemek csupán 0,7-2,5 kb hosszúak és inszerciós szekvenciáknak (IS elemek) nevezték el őket. Az IS elemek csupán 1-2 nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaznak, amely a transzpozázt kódolja (1.1. A ábra). Az eddig izolált több mint 1500 bakteriális IS elem 19 családba sorolható az ORF-ek száma, elhelyezkedése, a transzpozáz domén struktúrája, az IR-ek szerveződése és a TD hossza alapján (Chandler and Mahillon, 2002).

Két azonos IS elemből valamint a transzpozícióhoz nem szükséges génekből állnak az összetett transzpozonok (1.1. B ábra). A transzpozon belsejében leggyakrabban rezisztencia vagy toxin gének találhatók, de elvileg bármely olyan DNS szakasz transzpozonként viselkedhet, melyet két azonos IS elem határol. Az összetett transzpozonok IS elemei önállóan is előfordulhatnak, mint pl. a Tn9-et, Tn2350-et és Tn2671-et alkotó IS1. Bizonyos összetett transzpozonok azonban olyan IS elemekből állnak, melyek kizárólag transzpozonokban fordulnak elő, s gyakran csak az egyikük kódol ép transzpozázt. Ilyen IS elem a Tn5-t felépítő IS50 (Berg, 1989), vagy a Tn10-t alkotó IS10 (Kleckner, 1989).

A mobilis elemek harmadik csoportja a valódi transzpozonoké, melyek strukturális szempontból átmenetet képeznek az IS elemek és az összetett transzpozonok között (1.1. C ábra). Bár nem két IS elem határolja őket, de a transzpozáz génen kívül számos egyéb gént is hordozhatnak. Ide sorolhatók a Tn*3* család transzpozonjai, melyek a transzpozáz génen kívül rezisztencia géneket és egy helyspecifikus rekombinációs rendszert (reszolváz) is tartalmaznak (Sherratt, 1989), a Tn7, amely egy rezisztencia gén csoportot és 5 transzpozíciós gént tartalmaz (Craig, 1989), vagy a Tn*916* és rokonai, melyek a rezisztencia gén mellett egy teljes konjugációs rendszert is hordoznak (Churchward, 2002). Némi általánosító szemlélettel a Mu és a D108 bakteriofágok is ebbe a csoportba sorolhatók, hiszen replikációjuk lényegében nem más, mint többszöri replikatív transzpozíció (Pato, 1989).

Az eukarióta genomokon is számos mobilis elem fordul elő. Ezek között vannak az IS elemeknek megfelelő "egyszerűbb" formák (pl. P elem, Tc1/mariner család tagjai, Tc2), míg mások inkább az összetett transzpozonokra hasonlítanak (pl. FB elemek határolta transzpozonok). Az eukarióta transzpozonok körében különálló csoportot alkotnak a retrotranszpozonok és a velük közeli rokonságban álló retrovírusok, valamint a retropozonok. Ezek közös sajátsága az RNS intermedieren keresztül zajló transzpozíció, melyről a prokarióták világában csak a közelmúltban számoltak be.



1.1. ábra (**A**) IS elemek, (**B**) összetett transzpozonok, (**C**) és valódi transzpozonok egyszerűsített felépítése. Az inszerciós szekvenciát jelképező téglalapon belül fehér, illetve fekete háromszögek szemléltetik az elem bal (LIR) és jobb (RIR) oldali fordítottan ismétlődő végeit. Az IS elem kódolta transzpozáz nyitott leolvasási keretét (ORF) nyíl, míg a transzpozícióhoz nem szükséges "idegen géneket" keskeny téglalap jelzi.

2.2. A fordítottan ismétlődő IR szekvenciák

Az IS elemek, transzpozonok végeit definiáló IR szekvenciák a transzposzóma kialakításában vesznek részt, ahol mindig a transzpozáz fehérjéhez kapcsoltan fordulnak elő (Mu-Lavoie et al., 1991; HIV-Andrake and Skalka, 1996; Tn10-Bolland and Kleckner, 1996; Tn5-Bashin et al., 2000; Davies et al., 2000; IS911-Normand et al., 2001). Jelenlétük minimum két alapvető transzpozíciós funkcióhoz szükséges. Egyrészt a transzpozáz szekvencia-specifikus kötőhelyeit tartalmazzák, valamint kijelölik a transzpozíciós hasítás pontos helyét. A transzpozáz általában az IR-ek belső régiójához kötődik, míg a terminális bázisoknak a hasításban van szerepe (Chandler and Mahillon, 2002). A transzpozáz kötőhely akár több kópiában is előfordulhatnak az IR végben, ahogy azt a Mu fágnál (Craigie et al., 1984; Zou et al., 1991), a Tn5552-nél (Rowland et al., 1995), Tn7-nél (Craig et al., 1996), vagy IS21-nél (Berger et al., 2001) találták. A kötőhelyek számával a transzpozáz kötés, s így a transzpozíció hatékonysága is növelhető. A Tc/mariner családba tartozó Tc3 és Sleeping Beauty (SB) transzpozonoknál kimutatták, hogy a transzpozíció hatékonyságát a két direkt ismétlődésű transzpozáz kötőhely egymástól való távolsága határozza meg (Fischer et al., 1999; Cui et al., 2002). Amíg a kötésben résztvevő IR bázisokat számos IS elemnél meghatározták, viszonylag keveset lehet tudni a katalitikus hasításban fontos szekvenciákról. Csupán az IS3 családba tartozó IS911, IS2, IS3 elemeknél (Polar and Chandler, 1995; Lewis and Grindley, 1997; Sekine et al., 1999), valamint a HIV retrovírusnál (Vink, et al., 1991) igazolták, hogy az 5'-TG...CA-3' terminális nukleotidok határozzák meg a hasítás helyét, s ezek mutációi az IR vég transzpozíciós aktivitásának elvesztésével járnak. Az IS903 transzpozáznál a katalitikus domén aminosav cseréivel szupresszálni is tudták a terminális IR nukleotidok mutációit (Tavakoli and Derbyshire, 1999).

A 7-50 bp hosszú IR szekvenciák általában nem teljesen azonosak az elem két végén. Az esetek többségében a bal (LIR) és jobb (RIR) végek eltérése valamilyen szabályozó funkciót tölt be. Az IS10 vagy IS50 elemeknél az egyik IR szekvencia egy Dam metilációs helyet tartalmaz, így transzpozíciós aktivitása megszűnik, vagy csökken egy dam^+ gazdában, hiszen a metilált véget a transzpozáz nem vagy csak kevésbé ismeri fel (Roberts et al., 1985; Naumann and Reznikoff, 2002). Az IS2 elem egyik vége (LIR) a transzpozíciós hasításhoz fontos 5'-CA terminális nukleotidok helyett 5'-TA terminális szekvenciát tartalmaz, melynek következtében egy erős promóter tud kialakul az elem végeinek összekapcsolódása során, ami a transzpozáz magasabb szintű expresszióját teszi lehetővé (Lewis et al., 2004). Ugyanakkor a báziscsere gátolja a LIR vég melletti hasítást, s így az IS2-nek csak a RIR vége aktív a transzpozícióban. Az IS2-n kívül az IS elemek tekintélyes hányada (IS3, IS30, IS21, IS110 családtagok) tartalmaz oly módon promóter boxokat az IR végekben, hogy a RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó transzpozíciós intermedierben egy viszonylag erős promóter képződik (Duval-Valentin et al., 2001). A transzpozáz gének saját promótere sok esetben ugyancsak az IR szekvenciákban található, s így szintén fontos szerepet tölt be a transzpozíció önszabályozásában, hiszen a transzpozáznak az IR végekhez való kötése a promóter elfedését eredményezi (Zerbib et al., 1990).

2.3. A transzpozázok doménszerkezete

A transzpozázok multifunkcionális enzimek, melynek következtében a fehérje több elkülöníthető doménre osztható. Minden transzpozáznak kell tartalmaznia az elem végeinek (elsősorban az IR-ek) felismerését biztosító DNS-kötő motívumot, és egyfajta katalitikus domént, amely a DNS szálak hasítását, majd ligálását végzi. Mivel a transzpozázok többsége dimerként aktív, ezért tartalmaznak egy fehérje-fehérje kommunikációt biztosító motívumot is. A részletes mutációs analízisek és fehérje kristályosítások révén egyre több transzpozáz struktúrája válik részleteiben is ismerté (Mu- Rice and Mizuuchi, 1995; Tn*5*-Lovell *et al.*, 2002, Steiniger-White *et al.*, 2004; ISHp609-Ronning *et al.*, 2005; IS200-Lee *et al.*, 2006), amely jó alapot nyújthat az elemek csoportosítására.

2.3.1. Katalitikus domén

A bakteriális transzpozázok a katalitikus domént felépítő aminosavak hasonlósága alapján két csoportba, a DDE transzpozázok/ retrovirális integrázok nagyobb, illetve Y/S rekombinázok

kisebb csoportjába sorolhatók. Az eukarióta transzpozázok körében az elemek egy része reverz transzkriptáz (RT) és különböző endonukleáz (En) aktivitású fehérjéket is kódol. Ez utóbbi csoportba sorolhatók a retropozonok vagy LINE szekvenciák, amelyek a legelterjedtebb aktív transzpozábilis elemek a humán genomban.



1.2. ábra A HIV integráz katalitikus doménjének struktúrája. Az α -hélixeket és β -lemezeket számoztuk, a funkcionálisan fontos aminosavakat külön jelöltük. A D64, D116, E152 aminosavak Mg²⁺ ionok koordinálásán keresztül akakítják ki az enzim aktív térszerkezetét. (Haren *et al.*, 1999)

A DDE transzpozázok/ integrázok nevüket arról kapták, hogy az enzim aktív centrumának felépítésében két aszparaginsav (D) és egy glutaminsav (E) játssza a kulcsszerepet. A D, D, E aminosavak két kétértékű kation (általában Mg^{2+} vagy Mn^{2+}) koordinálásával alakítják ki az úgynevezett katalitikus zsebet, ahol a DNS szál hasítása, majd a szálcsere, azaz a transzészterifikációs reakció végbemegy (Haren et. al. 1999). Ezen aminosavak közül bármelyiknek a cseréje vagy hiánya az enzim transzpozíciós aktivitásának elvesztését jelenti (van Gent et al., 1992; Ohta et al., 2002). Az 5 β-lemez és az őket határoló α-hélixek által kialakított aktív transzpozáz térszerkezete (1.2. ábra) az összes eddig leírt DDE transzpozáznál illetve integráznál nagyon hasonló, de a katalitikus zseb mélysége, szélessége, melyet a D, D, E aminosavak egymástól való távolsága, így a β-lemezek és α-hélixek elrendezése valamint az őket felépítő aminosavak oldalcsoportjai határoznak meg, családonként eltérő. A D, D, E aminosavakon kívül a DNS szálak pozícionálásában, illetve a hasításban fontos aminosavak is többé-kevésbé konzerváltak a DDE transzpozázok kisebb csoportjain belül. A terminális nukleotidok pozícionálásában egy arginin vagy lizin aminosav játssza a kulcsszerepet, amely a DDE glutaminsavjától 7 aa távolságban található, míg a triád első aszparaginsavjának környezetében lévő erősen konzervált glutaminsavnak a hasítás és szálátvitel katalízisében van funkciója (Haren et al., 1999). A DDE enzimekhez nagymértékben hasonlítanak az úgynevezett DD(E)D enzimek, ahova a Piv/IS110 család transzpozázai is sorolhatók. A katalitikus zseb kialakításában részt vevő glutaminsavat (E) ezeknél az enzimeknél egy harmadik aszparaginsav

helyettesíti (D), illetve helyenként a második aszparaginsav helyett egy glutaminsav is előfordulhat.

Az Y/S rekombinázok a DDE enzimekkel ellentétben mindig kovalens intermediert képeznek a DNS-sel. A katalitikus aminosavak típusa és száma alapján további három alcsoportba sorolhatók.

Az Y2 vagy rolling circle (RC) transzpozázok nevüket a két konzervált tirozinról kapták, amely közül az egyik kovalens kapcsolatot létesít az elem egyik 5' láncvégével (5' foszfotirozin). Az ide tartozó fehérjék (IS91 család transzpozázai) két olyan konzervált motívumot is tartalmaznak, melyek funkciója bizonyított a katalitikus lépésekben. A HUH (Hishydrophobic-His) motívum szükséges a kétértékű kation (Mg²⁺) megkötéséhez, s így az aktív térszerkezet kialakításában nélkülözhetetlen, míg az YxxxY motívum tartalmazza a két katalitikus tirozint (Garcillan-Barcia et al., 2002). Az RC transzpozázokat kódoló elemek strukturálisan is különböznek a többi IS elemtől: nem IR szekvenciákban végződnek, és targetduplikációt sem generálnak. Mindig 4 nukleotid hosszú, egy-egy elemre specifikus szekvencia 3' vége mellé inszertálódnak, amely szerepet játszik a transzpozíció, s egyben a replikáció iniciációjában is. Az Y2 transzpozázokhoz nagyon hasonló domén struktúrával rendelkeznek az IS200, illetve IS605 családok transzpozázai, melyek hordozzák a konzervált HUH motívumot valamint egy konzervált tirozint, amely kovalens kapcsolatba lép az elem 5' végével (Ronning et al., 2005). Az IS91 család tagjaihoz hasonlóan ezeket az elemeket sem határolják IR szekvenciák, és TD-t sem okoznak, valamint szintén tetra- illetve pentanukleotidok 3' vége mellé inszertálódnak (Kersulyte et al., 1998). Amíg az RC transzpozázok monomerként katalizálják az egymást követő transzpozíciós lépéseket, az IS605 transzpozázok mindvégig dimerként fordulnak elő a transzposzómában (Ronning et al., 2005).

Az Y-transzpozázok a λ integráz család rokonsági körébe tartoznak. Katalitikus doménjükben 4-7 konzervált aminosav szerepel. A katalitikus lépésekben két arginin és egy hisztidin (R-H-R triád), valamint az Y-transzpozázok névadó tirozinja játssza a kulcsszerepet. Az Y transzpozázok mindig 3'-foszfotirozin kapcsolatot létesítenek az elem végeivel, illetve a target szekvenciával. A legtöbb konjugatív transzpozon integráza ebbe a csoportba sorolható (Poyart-Salmeron *et al.*, 1989). Struktúrájukhoz hasonlóan transzpozíciós mechanizmusuk is a lambdoid fágok rekombinációs lépéseihez (kivágódás és integráció) hasonlítható. Egyetlen mérvadó különbség köztük, hogy míg az Y-transzpozázok nem jellemzően, a lambdoid fágokok mindig helyspecifikusan inszertálódnak a target szekvenciákba. Bizonyos elemekről (Tn916) úgy tartják, hogy a target szekvencia megválasztása gazdafüggő folyamat is lehet (Sayers *et al.*, 1995; Burrus *et al.*, 2002).

Az S-transzpozázok a szerin rekombinázok csoportjába tartoznak. Nevüket arról kapták, hogy a katalízisben egy konzervált szerin játssza a kulcsszerepet. A S-rekombinázok nagyobb csoportján belül strukturális és funkcionális szempontok alapján három alcsoportot lehet elkülöníteni: (i.) a szerin reszolvázok/invertázok, mint a Tn3 reszolváz vagy Hin invertáz; (ii.) a szerin integrázok, mint a ΦC31 integráz; illetve (iii.) az IS607 típusú transzpozázok. A bakteriális S-transzpozázok két alcsoportba sorolhatók. A Tn4451, Tn4453 transzpozonok, valamint a konjugatív Tn5397 transzpozon integrázai a fág kódolta szerin rekombinázokkal mutatnak strukturális hasonlóságot, mivel a katalitikus domén mindig a rekombináz N-terminális részén található. A funkcionálisan is különböző IS607, IS1535 transzpozázoknál a szerint tartalmazó katalitikus domén mindig a fehérje C-terminális részén található.

2.3.2. DNS kötő domén

Az IS elemek, transzpozonok terminális végeit többnyire hélix-turn-hélix (HTH) motívumok ismerik fel, melyek túlnyomórészt a transzpozázok N-terminális részén találhatók (Harrison and Aggarwal, 1990). A szekvencia-specifikus kötést létesítő HTH motívum mellett gyakran egy harmadik hélix is segíti a kötés stabilizálásában a transzpozázt (Rouseau et al., 2004). A transzpozázok egy csoportja az IR felismerő struktúrán kívül több HTH motívumot is hordoz, melyek jelenléte a transzposzóma komplex felépítésében nélkülözhetetlen. A Tc1/mariner családba tartozó transzpozázok két egymást követő HTH motívumot (PAI-RED) tartalmaznak, melyek közül az első (PAI) létesít szekvencia-specifikus kapcsolatot az IR végeken belüli nukleotidokkal, míg a második HTH (RED) a szinaptikus komplex felépítését segíti (Izsvák et al., 2002). A MuA transzpozáz N-terminális fragmentje szintén három HTH motívumot hordoz, melyek együttes jelenléte szükséges a szinaptikus komplex kialakításához (Chaconas and Harshey, 2002). A HTH-n kívül ritkábban Zn-finger is részt vesz az IR szekvenciák felismerésében. Az IS1 elemnél az IR végeket egy HTH és egy Zn-finger motívum köti, s bármelyik aminosav cseréje a transzpozíciós képesség elvesztését okozza (Ohta et al., 2004; Ton-Hoang et al., 2004). A Drosophilából származó P elem transzpozáza (Lee et al., 1996), vagy a retrovírusok integrázai (Summers et al., 1990) egyetlen Zn-finger motívumon keresztül kötik a terminális szekvenciákat.

2.3.3. Multimerizációs domén

A transzpozázok többsége dimerként aktív, ezért tartalmazniuk kell egy olyan struktúrát, amely biztosítja a két fehérje közti kommunikációt. A legismertebb dimerizációs doménnek a leucin cipzár motívum tekinthető, melyet hét aminosavból álló α -hélix struktúra jellemez, s a heptádban központi szerepet játszó leucinról kapta nevét (Alber, 1992). Amíg a számítógépes analízisek alapján több IS3 családtagban is megtalálható a leucin cipzár motívum (Rousseau *et al.*, 2002), egyedül az IS911 esetén bizonyították a heptád szerepét a transzpozáz dimerizációjában (Haren *et al.*, 1998). A MuA transzpozáz C-terminális része is hordoz egy α -hélixből álló multimerizációs domént, amely a MuA és MuB fehérjék közötti interakcióban játszik központi szerepet (Wu and Chaconas, 1994). A Tn5 transzpozáznak szintén a C-terminális részén található hélixek tartalmazzák a dimerizációért felelős struktúrát (Steiniger-White and Reznikoff, 2000).

2.4. Transzpozíciós reakciók és modellek

Már a kukorica Ac/Ds elemeinek vizsgálata rámutatott, hogy transzpozonok a növény kromoszómáinak gyakori átrendeződését (transzlokáció, deléció, kromoszóma fúzió) okozzák. Később kiderült, hogy a bakteriális IS elemek sem csupán egyszerű áthelyeződésre képesek, hanem replikonok közötti fúziót, deléciót, inverziót is okozhatnak. Mivel a prokarióta szervezetekben a cirkuláris replikonok tekinthetők általánosnak, így a bakteriális mobilis elemek által generált átrendeződéseket legegyszerűbben a rekombinációban résztvevő replikonok száma alapján csoportosíthatjuk. Az átrendeződések egy része csak azt a replikont érinti, amely az IS elemet hordozza, tehát intramolekuláris reakció, úgymint a deléció- és az inverzióképzés (1.3. A ábra). Replikonok közötti, azaz intermolekuláris reakció a replikonok fúziója, vagy másnéven kointegráció, valamint az elem egyszerű áthelyeződése (1.3. B ábra). Az összetett transzpozonok is ugyanezeket az átrendeződéseket okozhatják. A kép csak annyival bonyolódik, hogy a transzpozon nem feltétlenül egységként mozog, hanem egyetlen IS eleme is indukálhat replikonfúziót, deléciót vagy inverziót.



1.3. ábra A transzpozáz generálta (**A**) intramolekuláris és (**B**) intermolekuláris átrendeződések.

Donornak (vékony vonal) az IS elemet eredetileg tartalmazó replikont, míg targetnek (vastag vonal) azt a plazmidot nevezzük, amelybe az elem újonnan integrálódik. A betűk a gének sorrendjét szemléltetik.

A transzpozíciós rekombináció sajátossága, hogy a transzponálódó elem szempontjából mindig helyspecifikus, hiszen a transzpozáz az elem végeinél pontosan megszabott helyeken hasítja a donor DNS-t. A cél DNS tekintetében azonban a transzpozíció szekvencia-specificitása

a véletlenszerű eloszlástól a szigorú helyspecificitásig terjedhet. A transzpozázok különböző csoportjai ennek megfelelően folytonos átmenetet képeznek a helyspecifikus rekombinázok felé. A transzpozíciós mechanizmusokra leírt modellek száma az újabb elemek felfedezésével és vizsgálatával állandóan bővül. A főbb enzimatikus lépések alapján viszont a modellek csoportokba foglalhatók, ami többé-kevésbé megegyezik a transzpozázok katalitikus doménjén alapuló csoportosítással (Curcio and Derbyshire 2003).

2.4.1. DDE transzpozázok transzpozíciós mechanizmusa

A DDE transzpozázok az IS elem 3' végének kapcsolódását katalizálják a cél DNS 5' végéhez, míg a transzpozon 5' végének csatlakozása a gazda repair vagy replikációs enzimeinek közreműködésével történik. A DDE transzpozázokra jelenleg elfogadott transzpozíciós modellek elsősorban a transzpozáz katalizálta hasítások számában különböztethetők meg egymástól, mivel az első hasítási lépés, amely a transzpozon szabad 3' OH végét eredményezi, minden esetben azonos. Mindegyik modell hasonló mechanizmust feltételez a targetduplikáció kialakulásában is. A beépülő elem vagy transzpozon vége minden esetben a lépcsőzetesen hasított célszekvencia 5' túlnyúló végéhez csatlakozik, így a cél DNS másik szálán levő szabad 3' láncvégről induló gap szintézis magyarázza a transzpozont határoló direkt ismétlődésű szekvencia kialakulását (1.4. ábra).



1.4. ábra ATD képződésének molekuláris mechanizmusa. Dupla vonallal a DNS Watson és Crick szálait, míg az átkötő vonalakkal a hidrogénkötéseket jelöltük. A vastag vonal a GGACT szekvenciával egy tetszőleges célszekvenciát ábrázol. A nyilak a transzpozíciós hasítás helyét mutatják.

2.4.1.1. "Copy-in" avagy replikatív transzpozíció

A replikatív transzpozíciós mechanizmusra Shapiro állított fel modellt (Shapiro, 1969), majd részleteit a Mu bakteriofágra kidolgozott *in vitro* transzpozíciós rendszer segítségével sikerült csak feltárni (Craigie and Mizuuchi, 1985, 1987; Surette *et al.*, 1987). A reakciót a MuA fehérje (transzpozáz) indítja el Mg²⁺ és HU gazdafaktor jelenlétében, miközben a transzpozon két végén egyszálú DNS hasítással szabad 3'OH végeket hoz létre (1.5. ábra). Ehhez a transzposzóma komplexhez kapcsolódik a MuB fehérje közreműködésével a cél DNS, melynek lépcsőzetesen hasított 5' túlnyúló végeihez a transzpozon szabad 3'OH végei csatlakoznak. Így egy átmeneti struktúra keletkezik, melyben a transzpozon végei egyik DNS szálon a donor, másik szálon a target molekulához kapcsolódnak. Ezt követően a gazdasejt replikációs enzimei lépnek működésbe, melynek eredményeként egy kointegrátum képződik, melyben a donor és a cél replikonokat egy-egy teljes Mu genom választja el. A Mu egyszerű áthelyeződéséhez a két Mu kópia közötti homológ rekombináció vezet. Intramolekuláris reakcióban ugyanezek a lépések inverziós vagy deléciós termékek képződését eredményezik. A modell jelenleg a Mu fág és rokonai, valamint a Tn*3* család elemeinek transzpozíciójára tekinthető elfogadottnak. A Tn*3* transzpozíciója egyedül abban különbözik az eddig leírtaktól, hogy a transzpozon maga kódolja a kointegrátum megoldódásához vezető reszolváz enzimet, míg a Mu fág esetén mindig a gazda rekombinációs rendszere végzi a kointegrátum átalakítását.



1.5. ábra A Mu bakteriofág replikatív vagy "copy-in" transzpozíciója. A nyilak egyszálú hasításokat jeleznek a donor molekulán (vékony vonal) az elem 3' végeinél. A szabad 3' OH gyökök támadják a target DNS (vastag vonal) hordozta célszekvenciát (szürke négyzet). A target DNS két szálát 5 bp távolságra hasítja a transzpozáz. Az így képződött intermedier struktúrát a gazda replikációs apparátusa alakítja kointegrátummá, miközben az egyszálú DNS szakaszok javítódnak és kialakul az 5 bp TD. Az egyszerű inszerciós termékek képződése a két Mu kópia közötti homológ rekombinációval magyarázható.

2.4.1.2. "Cut-out, paste-in" transzpozíció

Kleckner és munkatársai bizonyították, hogy a Tn10 mindkét szálon elválik a donor replikonból, lineáris transzpozont eredményezve (Bender and Kleckner, 1986). In vitro transzpozíciós kísérletekben kimutatták, hogy a transzpozáz IHF fehérje és Mg²⁺ jelenlétében a transzpozon mindkét végén egyszálú DNS hasítással egy-egy szabad 3'OH véget hoz létre (1.6. A ábra). A szabad 3' OH végek a szemközti szál foszfodiészter kötésének nukleofil támadása révén (transzészterifikáció) hajtű struktúrával lezárják a transzpozon végeit, elválasztva az elemet a donor replikontól (Kennedy *et al.*, 1998). A transzposzóma komplex csak a transzpozon kivágódása után köti a cél DNS-t (Sakai and Kleckner, 1997), amelyhez a hajtű struktúrák

felbontásával keletkező szabad 3'OH végek egy második transzészterifikációs lépésben csatlakoznak. Az elem transzpozíciójához így replikáció nem szükséges. A modell jelenleg elfogadott a Tn5 (Bhasin *et al.*, 1999; Reznikoff, 2003), és a Tn7 transzpozíciójára is. Bár a Tn7 lineáris formában szintén kivágódik a donor DNS-ből, az egymást követő szálhasításokat két különböző fehérje katalizálja, és nem alakul ki hairpin struktúra sem az elem végeinél (Sarnovsky *et al.*, 1996). A TnsB (transzpozáz) katalizálja 3' végek melletti hasítást, míg a második szál hasítását a TnsA fehérje (endonukleáz) végzi 3 bp-os 5' túlnyúló végeket eredményezve a transzpozonon (1.6. B ábra). "Cut and paste" mechanizmus útján transzponál számos eukarióta transzpozon is, így a *Drosophilából* izolált P elem, a Tc1/mariner, valamint a *hAT* családba tartozó transzpozonok. Transzpozíciójukban azonban csak annyi a közös, hogy a transzpozonok lineáris formában kivágódnak a donor DNS-ből, mielőtt új lókuszba integrálódnának. A pontos molekuláris mechanizmus azonban családonként, sőt néha elemenként is eltérő lehet.



1.6. ábra A Tn10 (A), illetve a Tn7 transzpozonok (B) "cut-out-paste-in" transzpozíciója. A transzpozáz a transzpozonok végeinél hasítja a donor DNS egyik-egyik szálát, szabad 3' OH csoportokat eredményezve az elem végein. A Tn10-nél a 3' OH gyökök támadják az elem másik végét, melynek következtében a transzpozon mindkét DNS szálon elválik a donor molekulától. A Tn10 végeit hajtű-szerű struktúra zárja le a target DNS megkötéséig és hasításáig. A Tn7 is elkülönűl a donor DNS-től, de a második hasítási lépést (fehér nyílhegy jelzi) nem a transzpozáz végzi, és hairpin sem alakul ki a transzpozon végein. A transzészterifikációs reakcióban a lépcsőzetesen hasított target DNS 5' végei a transzpozon 3' végeihez kapcsolódnak. A rövid egyszálú szakaszokat a gazda enzimek javítják, kialakítva a transzpozonokra jellemző néhány bp-os TD-t.

2.4.1.3. "Copy-out, paste in" transzpozíció

Egyes DDE elemeknél (IS2, IS911) a transzpozáz csupán az egyik IR vég mellett hasítja a DNS egyik szálát egyetlen 3'OH csoportot eredményezve (1.7. ábra). A felszabaduló 3'OH csoport indít nukleofil támadást ugyanazon a molekulán a másik IR végtől néhány bp távolságra, körré zárva ezzel az IS elem egyik DNS szálát (Polard and Chandler, 1995). Az így képződő 8-as alakú molekula elméletileg többféle úton is megoldódhat, ami egy kovalensen körré zárt RIR-LIR csatlakozást tartalmazó IS elem kialakulásához vezet (Lewis and Grindley, 1997; Ton-Hoang *et al.*, 1997). IS911 esetén a 8-forma transzpozáztól független, replikatív megoldódása a közelmúltban nyert bizonyítékot (Duval-Valentin *et al.*, 2004). Az inszerció során a körré zárt IS elemben az IR-IR csatlakozás lépcsőzetesen felhasad és a szabad 3'OH végek reagálnak a cél DNS megfelelő polaritású szálaival. Az IR-IR kapcsolódás kialakulásával járó transzpozíciós modell egyre több bakteriális inszerciós elemre válik részben, illetve tökéletesen bizonyítottá (IS1, IS3, IS150, IS256, IS30), míg az eukarióta mobilis elemek körében ez a típusú transzpozíció egyelőre ismeretlen.



1.7. ábra Az IS*911*, "copy-out paste-in" transzpozíciója. A transzpozáz az IS elem 3' végénél hasítja a donor DNS egyik szálát. A szabad 3' OH csoport nukleofil támadást indít a DNS ugyanazon szálánaz IS elem másik végétől 3 bp-os távolságban, melynek következtében egy átmeneti, 8-as formájú struktúra képződik. Az így keletkezett intermediert a gazda replikációs/repair aparátusa oldja meg, körré zárva ezzel az IS elemet. A második lépésben a körré zárt IS kört hasítja a transzpozáz felszabadítva az elem 3' végeit, amely a target DNS támadását végzi. A rövid egyszálú szakaszokat a gazda enzimek javítják, kialakítva az IS*911*-re jellemő 3 bp-os TD-t.

2.4.2. RC transzpozonok transzpozíciós mechanizmusa

Az RC vagy Y2 transzpozázok az IS elem egyik végét határoló 4 bp hosszú szekvencia 3' vége mellett hasítják a DNS egyik szálát felszabadítva az elem 5' végét, amelyhez a transzpozáz katalitikus tirozinján keresztül kovalensen kapcsolódik (1.8. A ábra).



1.8. ábra Az RC transzpozonok transzpozíciós modelljei.

(A) A transzpozáz a IS91-t határoló 4 bp hosszú szekvencia (fehér karikák) 3' vége mellett hasítja a DNS egyik szálát felszabadítva az elem 5' végét, amelyhez egy tirozin aminosavon (Y) keresztül kovalensen kapcsolódik. A szabad 3' láncvégről megindul a DNS szintézis (szaggatott nyíl), melyet az elem másik végében található terminátor (ter) szekvencia (fekete négyzet) állít le. A replikációs komplexek gátlásának következtében a a transzpozáz második lépésben a terminátornál hasítja a DNS-t, felszabadítva az IS91 egyik szálát, melynek 5' vége továbbra is transzpozázhoz kötött. Ezt követi a target DNS egyszálú hasítása a 4 bp hosszú CTTG konszenzussal jellemezhető célszekvencia 3' vége mellett, melynek során a transzpozáz az 5' véghez kovalensen kapcsolódik. A DNS és transzpozáz közötti foszfotirozin kapcsolatot a szabad 3'OH gyökök támadják, melynek következtében az IS91 egyik szála integrálódik a c;l DNS-be. A heteroduplex struktúrát a gazda repair és replikációs enzimrendszere alakítja inszerciós termékké. (**B**) Alternatív modell az RC transzpozonok transzpozíciójára. Az előző modellhez képest egyetlen különbség, hogy a donor és target DNS-ek hasítása időben és térben összehangoltan történik.

A szabad 3' láncvégről megindul a DNS szintézis, melyet az elem másik végében található terminátor szekvencia állít le. A replikációs komplex gátlásának következtében a transzpozáz másodjára a terminátornál hasítja az IS elem 3' végét, felszabadítva egy -OH csoportot, amely a

target DNS nukleofil támadását végzi. A RC transzpozázok a target DNS-en is ugyanazzal a 4 bp hosszú konszenzussal jellemezhető szekvenciát ismerik fel, amely mellett az első hasítás is történt. Az IS elem 3' végén felszabaduló -OH csoport a target DNS és a transzpozáz között kialakult 5'-foszfotirozin kapcsolatot támadja, melynek következtében az elem egyik szála integrálódik a target DNS-be. Ez a heteroduplex struktúra a gazda replikáció és/vagy repair enzimjeinek közreműködésével megoldódik, és vezet az IS inszerciót hordozó DNS-hez. Az RC elemek "idegen" géneket is mozgathatnak, melyek kivétel nélkül az elem 3' végén találhatók. Ez akkor fordulhat elő, ha a transzpozáz nem ismeri fel az elem 3' végében található terminátor szekvenciát, és a szabad 3' végről meginduló replikáció az elem szekvenciáját túlolvasva egy pseudo ter helyen áll le (Mendiola et al., 1994). A modellt ebben a formában az IS91 transzpozíciójára írták le először (Garcillan-Barcia et al., 2002). Az első elképzelések óta azonban egy alternatív modell is napvilágot látott, amely csak annyiban különbözik az előzőtől, hogy az IS donor és target DNS-ek hasítása egyidejűleg történik (1.8. B ábra). Az eukarióta helitronok (Kapitonov and Jurka, 2001) hasonló mechanizmust alkalmazva inszertálódnak a target DNS-be azzal a különbséggel, hogy transzpozázaiknak helikáz aktivitása is van, amely elősegíti a 3' végről induló DNS szintézist.

2.4.3. IS200/605 család elemeinek transzpozíciója

IS200/605 család elemeinek transzpozíciója sok tekintetben hasonlít az RC transzpozázok transzpozíciós modelljeire. A transzpozáz az IS elem bal végét határoló 4-5 bp hosszú szekvencia mellett hasítja a DNS egyik szálát felszabadítva az elem 5' végét, amelyhez a transzpozáz katalitikus tirozinján keresztül kovalensen kapcsolódik (1.9. ábra). Ezt követően, esetleg ezzel egyidejűleg egy másik transzpozáz az IS elem végét definiáló néhány bp-os szekvencia mellett hasítja a DNS ugyanazon szálát. Az így képződő 3'OH csoport végzi az 5'foszfotirozin kapcsolat támadását, körré zárva ezzel az IS elem egyik szálát. Az egyszálú IS kört a gazda repair rerendszere alakítja duplaszálúvá. Az inszerció a kivágódással ellentétes folyamat. A cirkuláris elemet a jobb vég néhány bp-os szekvenciája után, míg a target DNS-t a 4-5 bp-os célszekvenciát követően hasítja a transzpozáz szabad 3'OH végeket eredményezve, amelyek a transzpozázhoz kötött 5' láncvégekkel lépnek reakcióba. Így egy átmeneti struktúra keletkezik, melyben az IS elem végei az egyik DNS szálon önmagukhoz, másik szálon a target molekulához kapcsolódnak. Ezt követően a gazdasejt repair enzimei lépnek működésbe, megoldva a Hollidayszerű struktúrát, amely az inszerciós termékek képződéséhez vezet. A modellt az ISHp608 transzpozíciójára dolgozták ki (Ton-Hoang et.al., 2005), melynek bizonyos részletei azonban jelenleg is bizonyításra várnak.



1.9. ábra Az IS200/605 elemek transzpozíciója.

A transzpozáz először az ISHp608 bal végét határoló 4 bp hosszú szekvencia (fehér karikák) 3' vége mellett hasítja a DNS egyik szálát felszabadítva az elem 5' végét, melyhez kovalensen kapcsolódik. A második hasítás az IS elem jobb végét definiáló 4 bp-os szekvencia (fekete karikák) mellett történik. A felszabaduló 3'-OH csoport az 5'-foszfotirozin kapcsolatot támadja, kovalensen körré zárva az elem egyik szálát illetve kialakítva egy heteroduplex molekulát, melyet a gazda repair és replikációs enzimrendszere állít helyre. Az integráció a kivágódási folyamat reciproka. A transzpozáz egyetlen szálon hasítja a körré zárt IS elemet a végét definiáló 4 bp-os szekvencia 3' vége mellett. A felszabaduló 3'-OH csoportok támadják az 5' foszfotirozin kapcsolatot kialakítva egy Holliday-szerű struktúrát, melyet a gazda repair és replikációs apparátusa old meg.

2.4.4. Y/S transzpozonok transzpozíciója

Az Y-, valamint az S-transzpozonok ugyancsak egy cirkuláris intermedieren keresztül integrálódnak a target DNS-be (Curcio and Derbyshire 2003). Az Y-transzpozázok a transzpozon mindkét végénél hasítják a DNS egyik szálát, miközben a 3' végek a transzpozáz aktív tirozinjához kapcsolódnak (1.10. A ábra). A felszabaduló 5'-OH csoportok a 3'-foszfotirozin kapcsolatokat támadását végzik, körré zárva ezzel az elem egyik szálát. A gazda repair és replikációs apparátusa helyreállítja a kivágódás után visszamaradt donor DNS-t, illetve duplaszálúvá alakítja a transzpozon köröket. Az integráció molekuláris mechanizmusát tekintve a kivágódással tökéletesen azonos folyamat. A target DNS, és a körré zárt transzpozon is egyetlen szálon hasítódik, s a rekombináció a gazda repair és replikációs enzimeinek közreműködését is igényli. Az S-transzpozázok az Y-transzpozázokkal ellentétben a DNS mindkét szálát hasítják (1.10. B ábra). Amíg az Y-transzpozázok az 5', az S-transzpozázok a 3' végekkel létesítenek kovalens kapcsolatot, s a rekombinációhoz gazdafaktorok jelenlétére nincs szükség. A DNS szálak hasítását és ligálását önmagában a transzpozáz végzi.



1.10. ábra Y- és S-transzpozonok transzpozíciós modelljei.

(A) Az Y-transzpozázok az IS elem mindkét végénél hasítják a DNS egyik szálát, miközben a 3' végek a transzpozáz aktív tirozinjához (Y) kapcsolódnak. A felszabaduló 5'-OH csoportok támadják a 3'-foszfotirozin kapcsolatokat, körré zárva a transzpozon egyik szálát. A gazda repair rendszere helyreállítja a kivágódás után visszamaradt donor DNS-t, illetve duplaszálúvá alakítja a transzpozon köröket. Az integráció során a target DNS és a körré zárt transzpozon is egyetlen szálon hasítódik, miközben a 3' végek kovalens kapcsolatot létesítenek a transzpozázzal. Az 5'-OH csoportok támadják a 3'-foszfotirozin kapcsolatot integrálva a transzpozon egyik szálát a target DNS-be. Az átmeneti heteroduplex struktúra replikációval oldódik meg integráns terméket eredményezve. (B) Az S-transzpozázok a transzpozon mindkét végénél hasítják a DNS-t, miközben az 5' végek a transzpozáz aktív szerinjéhez (S) csatlakoznak. A felszabaduló 3'-OH csoportok támadják a 5'-foszfoszerin kapcsolatokat, körré zárva az elemet, illetve a transzpozon kivágódása után visszamaradt donor molekulát.

2.5. A transzpozonok célszekvencia specificitása

A transzpozonok és IS elemek elméletileg a DNS bármely két nukleotidja közé beépülhetnek. A kísérleti tapasztalatok azonban azt mutatják, hogy szinte minden elem mutat valamilyen mértékű preferenciát egyes célszekvenciákkal szemben. Azt a jelenséget, hogy egy elem eltérő gyakorisággal inszertálódik a cél DNS különböző pozícióiba, targetspecificitásnak nevezzük. A célszekvencia specificitásnak különböző fokozatai lehetnek. A Mu fág alig válogat, szinte bármilyen szekvenciába képes integrálódni, és csak igen kis mértékű specificitást

(NYG/CRN) mutat (Castilho and Casadaban, 1991). Egyes IS elemek (IS1, IS2, IS50) a cél DNS bizonyos régióiba (néhány 100 bp) nagy gyakorisággal inszertálódnak, ugyanakkor a régión belül az inszerciók eloszlása közel egyenletes (Galas et al., 1980; Zerbib et al., 1985; Sengstag and Arber, 1983; Szeverényi et al., 1996; Berg, 1983; Goryshin et al., 1998). A régióspecificitás sok esetben a DNS strukturáltságával, hajlottságával magyarázható, mint ahogy azt az IS231A elemnél (Hallet et al., 1994) vagy a retrovirális integrázoknál (Muller and Varmus, 1994; Pruss et al., 1994) kimutatták. Ismertek olyan elemek (IS4, IS5, IS10, IS30, IS91), melyek rövid, viszonylag jól definiált szekvenciákba inszertálódnak, és célszekvenciáik konszenzussal jellemezhetők (Mayaux et al., 1984; Engler and van Bree, 1981; Halling and Kleckner, 1982; Mendiola and de la Cruz, 1989). Végül az utolsó csoportba azok az elemek (Tn7, Tn554) tartoznak, melyek targetspecificitását leginkább a helyspecifikus rekombinázokéhoz hasonlíthatjuk, mivel egy adott szekvencián belül mindig pontosan azonos pozícióba (att régió) inszertálódnak (Lichtenstein and Brenner, 1981; Craig, 1991; Murphy et al., 1991). Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy a targetspecificitás típusok szinte folytonos sorba rendezhetők a véletlenszerűtől a helyspecifikus inszerciókig.

2.6. IS30 inszerciós szekvencia

Az IS30 inszerciós szekvenciát P1 profágból (Sengstag and Arber, 1983), valamint az NR1-Basel nevű rezisztencia plazmidból (Caspers, 1984) izolálták. Struktúráját tekintve tipikus képviselője a bakteriális IS elemeknek (1.11. ábra). 1221 bp hosszú, végeit 26 bp-os IR szekvencia határolja. Inszerciója során a cél DNS 2 bp-os duplikálódását okozza (Sengstag and Arber, 1983, Olasz *et al.*, 1998). Az elem teljes hosszának 96 %-át foglalja el a leghosszabb nyitott leolvasási keret, ORF-A, amely a transzpozáz enzimet kódolja. Az ORF-A-n kívűl további ORF-eket is találhatunk a szekvenciában (Dalrymple *et al.*, 1984), amelyből azonban csak egyet (ORF-C) előz meg funkcionális promóter. Az ORF-A-t és az C-t megelőző promóterek viszonylag alacsony szintű RNS átírást tesznek lehetővé (Dalrymple and Arber, 1985), amely a transzpozíció szabályozásának fontos tényezője. Ugyanakkor a 26 bp-os IR szekvenciák is tartalmaznak -10 illetve -35 promóter boxokat, melyek az IS30 végek kapcsolódásával megfelelő távolságba kerülve jóval erősebb promótert eredményeznek, mint az ORF-A saját promótere (Dalrymple, 1987). A transzpozíció szabályozásában transzkripciós terminátorok is részt vesznek, melyek az elem mindkét szálán azonosíthatók (Dalrymple and Arber, 1986).

Az ORF-A által kódolt transzpozáz 44 kDa molekulatömegű. Az IR végek felismerését biztosító DNS-kötő motívumot a fehérje N-terminális része (Stadler et. al., 1990), míg a

katalitikus DDE aminosavakat a transzpozáz C-terminálisa tartalmazza (Olasz *et al.*, 1997a). Az ORF-C transzkriptuma nem fordítódik le fehérjévé, antisense RNS-ként a transzpozáz transzlációját gátolja, s ezáltal fontos szabályozó faktora a transzpozíciónak (Arini *et al.*, 1997).



1.11. ábra Az IS30 inszerciós szekvencia felépítése.

Az 1221 bp hosszú elem 26 bp-os LIR és RIR végeit fehér és fekete háromszögek szemléltetik. Az ORF-A a 383 aminosav hosszú transzpozáz génje, az ORF-C a transzpozáz mRNS transzlációját szabályozó antisense RNS génje. A promótereket és irányukat fekete nyílhegy jelzi. A P30B Δ és P30B' Δ -10 illetve -35 promóter boxokat jelöl az IR végekben. A terminátor szekvenciákat fekete négyzetek szemléltetik.

2.6.1. IS30 transzpozíciója

Az eddigi kísérleti eredmények igazolták, hogy az IS30 az összes ismert transzpozíciós reakciót (inszerció, transzpozíciós fúzió, deléció, inverzió) képes végrehajtani. Bár természetes összetett transzpozonja nem ismert, de a két IS30 elemből, és különböző rezisztencia génekből mesterségesen előállított transzpozonjai egységként is képesek áthelyeződni. Az összetett transzpozonokat hordozó plazmidok átrendeződéseinek részletes analízise egy új, az eddig vázolt transzpozíciós sémáktól kicsit eltérő modell kidolgozásához vezetett (Olasz *et al.*, 1993), amely az ellentétes végeivel kapcsolódó IS30 dimer ((IS30)₂) reakcióin keresztül magyarázza az összes ismert transzpozíciós termék képződését (1.12. ábra).

A reakciók mindig két lépésben játszódnak le. Először az egy replikonon jelenlévő két IS30 kópia helyspecifikus rekombinációval egymás mellé helyeződik, létrehozva a transzpozíciós intermedierként szolgáló (IS30)₂-t (SSD – site specific dimerization). A reakció feltétele, hogy a DNS molekulán két IS30 legyen azonos irányban, amely egy transzpozon jelenlétében eleve teljesül, viszont egyetlen IS30 elemet tartalmazó replikonból valamilyen mechanizmus révén ki kell alakuljon. Az IS30 elemek molekulán belüli megduplázódására több lehetőség is kínálkozik. Az azonos DNS molekulákból homológ rekombináció révén bizonyos gyakorisággal dimer replikonok képződhetnek (Berg, 1983), vagy akár a replikáció során is kerülhet olyan stádiumba a plazmid (théta struktúra), amikor a teljes replikon még nem, de az IS elem és környezete már megkettőződött (Lichens-Park and Syvanen, 1988). A harmadik lehetőség maga a transzpozíció: az IS30 kivágódásával kialakuló körré zárt IS30 eleme inszertálódhat egy olyan replikonba, amely egy IS30 elemet már tartalmaz.

Tényleges transzpozíciós termékekhez az IR-IR kapcsolatot hordozó intermedier és a cél DNS reakciója vezet (TCT – target choice transposition). Intramolekuláris reakcióban a (IS30)₂

deléciót, inverziót okozhat, illetve az egyik elem kivágódásával visszaadja a kiindulási, egy IS30 elemet tartalmazó molekulát (DDS – dimer dissolution). Intermolekuláris reakcióban a dimer a target replikonnal fúziós terméket vagy kointegrátumot képez, míg az elem, illetve az összetett transzpozonok egyszerű áthelyeződését a körré zárt IS30 illetve Tn képződésén keresztül magyarázza a modell (Kiss and Olasz, 1999).



1.12. ábra Az IS*30* transzpozíciójára kidolgozott IS-dimer modell. A szaggatott nyíl transzpozáztól független folyamatokat (homológ rekombináció, replikáció, gap repair), míg a folytonos nyilak a transzpozíciós reakciókat jelzik. A többi jelölés megegyezik az eddig használtakkal.

2.6.2. IS30 targetspecificitása

Az IS30 már felfedezésekor felhívta magára a figyelmet azzal, hogy a P1 fág genomjára történt beépülései azonos pozíciókba térképeződtek (Sengstag and Arber, 1983). Az első kointegrációs kísérletek igazolták, hogy az elem jól definiált targetspecificitással rendelkezik (Caspers *et al.*, 1984). A plazmid, fág illetve a genomi inszerciók szekvenciáinak egymás alá rendezése egy 24 bp hosszú, a középső 2 nukleotidra szimmetrikus, AT gazdag konszenzus megállapításához vezetett. A konszenzus alapján szintetizáltatott GOHS (genomi inszerciók alapján készült oligonukleotid hot spot), illetve POHS (plazmid és fág inszerciók alapján készült oligonukleotid hot spot), illetve a genomi zekvenciának bizonyultak a transzpozíciós kísérletekben (Olasz *et al.*, 1998). Az (IS30)₂ képződésének és megoldódásának tanulmányozása során arra is fény derült, hogy az IS30 inszercióknak az elem IR végei is célszekvenciái lehetnek, melyet később transzpozíciós fúziós kísérletekkel is igazoltak (Olasz *et al.*, 1997b). Mindezek alapján azt állíthatjuk, hogy az IS30 kettős célszekvenciá specificitással rendelkezik: integrálódhat viszonylag jól definiálható hot spot (HS) szekvenciákba, illetve saját IR végei mellé.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Tápoldatok, antibiotikumok, enzimek

Az M9, LB, 2xYT tápoldatot, valamint az LA táptalajt Sambrook *et al.* (1989) leírása alapján készítettük. Az antibiotikumokat az alábbi koncentrációban alkalmaztuk: ampicillin (Ap) 150 µg/ml; kanamycin (Km) 30 µg/ml; kloramfenikol (Cm) 20 µg/ml; rifampicin (Rif) 60 µg/ml; streptomycin (Sm) 50 µg/ml; spektinomycin (Sp) 50 µg/ml; tetraciklin (Tc) 10 µg/ml. A restrikciós endonukleázokat, alkalikus foszfatázt, T4 DNS ligázt, T4 polinukleotid kinázt, S1 nukleázt, Klenow-, Sequenase (Version 2.0)-, Taq-, Pwo-, Pfu DNS polimerázokat, és az egyéb molekuláris biológiában használatos enzimeket a Fermentase, Roche, Amersham, NEB, Promega és Applied cégektől vásároltuk, és a gyártók utasításai szerint alkalmaztuk. A radioaktívan jelzett [γ -³²P] dATP (10 µCi/µl), [α -³²P] dATP az Izinta terméke.

3.1. táblázat		
Név	Genetikai markerek	Referencia
Escherichia coli		
TG1	supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB)	Sambrook et al., 1989
	F' [$traD36 \ proAB^+ \ lacI^q \ lacZ \ \Delta M15$]	
TG2	$supE hsd\Delta 5 thi \Delta(lac-proAB)$	Sambrook et al., 1989
	$\Delta(srl-recA)$ 306::Tn10(tet ^r)	
	F' [traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15]	
TG90	TG1 származék, <i>pcn</i> B80 <i>zad</i> ::Tn10 Tc ^k	Lopilato et al., 1986
TG90 F ⁻	F' mentes TG90 származék	jelen dolgozat
JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi	Yanisch-Perron et al., 1985
	Δ (<i>lac-proAB</i>) F' [<i>tra</i> D36 <i>proAB</i> ⁺ <i>lac</i> I ⁴ <i>lac</i> Z Δ M15]	
HB101	F supE44 endA1 hsdS20(r_B m _B) recA13 ara-14 proA2	Boyer and Roulland-Dussoix,
	lac Y I gal K2 rps L20 xyl-5 mtl-1	1969
One Shot [*] TOP10	Sm ² F mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Ψ 80lacZ Δ M15	Gough and Murray, 1983
	$\Delta lac X / 4 \ aeo K \ rec A1 \ ara D139 \ \Delta (ara-leu) / 69 / gal U$	
EP2504 (DE2)	gain rpsL enant nupo	D Dila para somm
ER2304 (DE3)	$\Gamma \int nuA2 (ion) omp \Gamma gai SuiAII \Delta(mcrC-mir)$ $114IS 10 P(mar 73miniTn 10totS)2 (zab210Tn 10)$	D. Dha, pers. comm.
	Tet ^S and $\Delta 1 \lambda$ DE3	
S17-1	$Tn^{R} Sm^{R} Km^{S}$ pro thi rec A hsd($r^{-}m^{+}$)	Simon et al 1983
517 1	$[O RP4 \cdot 2 - T_{C} \cdot M_{U} - K_{m} \cdot T_{n}7]$	
S17-1 (λ pir)	$Tp^{R} Sm^{R} Km^{S}$ pro thi recA hsd(r ⁻ m ⁺)	Simon <i>et al.</i> , 1983
	$[\Omega \text{ RP4: } 2\text{-Tc:::Mu-Km::Tn7]} \lambda \text{ pir}$	
MDS39	MG1655 származék	G. Posfai, pers.comm.
		(Kolisnyichenko et al., 2002)
Salmonella typhimurium		
MS1868	leuA414(Am) Fels ⁻ hsdSB (r ⁻ m ⁻)	M. Susskind, pers. comm.
MS1883	leuA414(Am) Fels hsdSB (rm) supE40	M. Susskind, pers. comm.
MA1703	recA1 srl	L. Bossi, pers. comm.
Bakteriofágok		
R408	f1 fág származék (helper a transzdukciós kísérletekben)	Russel et al., 1986
λ cI857	ts mutáció a cI represszorban	saját törzsgyűjtemény

3.2. Baktérium törzsek és bakteriofágok

3.3. Plazmidok

A kísérletekben alkalmazott plazmid konstrukciókat és rövid leírásukat az 3.2-3.6. táblázatok tartalmazzák. Azokat a plazmidokat, melyek leírásánál nem szerepel hivatkozás, munkatársaim készítették. A pMUT nevű konstrukciókat Achile Arini, a pAW és pFOL nevűeket Olasz Ferenc, a pJKI nevűeket Kiss János, pTFA nevűeket Farkas Tibor, pZNA nevűeket Nagy Zita készítették. A pMSZ nevűeket magam állítottam elő.

Plazmid	Rezisztencia	Replikációs	Rövid leírás és referencia
		origó	
pOX38Km	Km		F plazmid származék (Chandler and Galas, 1983)
pGB2	Sp/Sm	pSC101	klonozó vektor termoszenzitív replikációs origóval (Churchward et al., 1984)
pBluescript	Ap	colE1, f1	lacZα klónozó vektorok (Short et al., 1988, Stratagene)
KS/SK			
pEMBL18/19	Ар	colE1, f1	lacZa klónozó vektorok (Dente et al., 1983)
pACYC177	Km Ap	p15A	klónozó vektorok (Chang, 1978)
pJKI88	Km	p15A	pEMBL19 MCS-t tartalmazó klónozó vektor (Kiss and Olasz, 1999)
pCS2	Ар	colE1	expressziós vektor SP6 promóterrel, sCMV IE94 enhancer/promóterrel, SV40 polyA szekvenciával (Turner and Weintraub, 1994)
TOPOII	Ap Km	colE1 f1	PCR teméket klónozó vektor (Invitrogen)
pKK223-3	Ap	colE1	expressziós vektor tac promóterrel (Brosius and Holy, 1984)
pTYB1	Ар	colE1	expresszós vektor T7 promóterrel, Sce VMA intein tag-gel (NEB)
pET32a	Ар	colE1	expressziós vektor T7 promóterrel, His tag-gel (Novagen)
pLOF/Km	Ap, Km	R6K	IS10 transzpozázt expresszáló plazmid miniTn10 –zel, RP4 mob funkcióval (Herrero et al., 1990)
pMSZ403	Ap, Km	R6K	IS10 transzpozázt expresszáló plazmid, a λ fág O _R 1-3 régióját tartalmazó miniTn10 –zel, RP4 mob funkcióval

3.2. táblázat Klónozó v	ektorok,	plazmidok
-------------------------	----------	-----------

3.3. táblázat IS30 transzpozázt expresszáló plazmidok

Plazmid	Rezisztencia	Replikációs	Rövid leírás és referencia
		origó	
pJKI132	Ар	colE1	IS30 transzpozázt expresszáló plazmid tac promóterrel (Farkas et al., 1996)
pAW380	Ар	colE1	IS30 N-terminális fragmentjét expresszáló plazmid tac promóterrel (Stadler et al.,1990)
pJKI397	Ар	colE1	delHTH1 (1aa-39aa) IS30 transzpozázt expresszáló plazmid (Nagy et al., 2004)
pZNA68	Ар	colE1	E15P mutációt hordozó IS30 transzpozázt expresszáló plazmid (Nagy et al., 2004)
pZNA69	Ар	colE1	A27P mutációt hordozó IS30 transzpozázt expresszáló plazmid (Nagy et al., 2004)
pZNA109	Ар	colE1	E66P mutációt hordozó IS30 transzpozázt expresszáló plazmid (Nagy et al., 2004)
pZNA67	Ар	colE1	A81P mutációt hordozó IS30 transzpozázt expresszáló plazmid (Nagy et al., 2004)
pZNA70	Ар	colE1	R93P mutációt hordozó IS30 transzpozázt expresszáló plazmid (Nagy et al., 2004)
pZNA73	Ap	colE1	λ cI kiméra transzpozázt expresszáló plazmid, az IS30 transzpozáz HTH1 motívuma (1aa-39aa) cserélve λ cI represszor HTH motívumával (24aa-59aa)
pMSZ329	Ар	colE1	cI represszorral fúzionált IS30 transzpozázt expresszáló plazmid (4.6. ábra)
pFOL876	Ар	colE1	IS30 transzpozázt expresszáló pCS2 származék (Szabó et al., 2004)
pFOL878	Ap	colE1	Myc-tag-gel fúzionáltatott IS30 transzpozázt expresszáló pCS2 származék (Szabó et al., 2004)
pFOL872	Ар	colE1	NLS fehérjével fúzionáltatott IS30 transzpozázt expresszáló pCS2 származék (Szabó <i>et al.</i> , 2004)
pFOL873	Ар	colE1	Myc-tag-gel és NLS-sel fúzionáltatott IS30 transzpozázt expresszáló pCS2 származék (Szabó <i>et al.</i> , 2004)
pMSZ297	Ap	colE1	a humán Gli1 fehérje Zn-finger motivumával (235aa-393aa) fúzionáltatott IS30 transzpozázt expresszáló pCS2 származék (Szabó <i>et al.</i> , 2004)
pJKI324	Km	p15A	IS30 transzpozázt expresszáló plazmid tac promóterrel
pMSZ360	Km	p15A	λ cI kiméra transzpozázt expresszáló plazmid, az IS30 transzpozáz HTH1 motívuma (1aa-39aa) cserélve λ cI represszor HTH motívumával (24aa-59aa)
pGK1	Km	p15A	delHTH1 (1aa-39aa) IS30 transzpozázt expresszáló plazmid tac promóterrel
pGK21	Km	p15A	E15P mutációt hordozó IS30 transzpozázt expresszáló plazmid tac promóterrel
pGK22	Km	p15A	A27P mutációt hordozó IS30 transzpozázt expresszáló plazmid tac promóterrel
pJKI380	Ар	colE1	inteinnel fúzionáltatott IS30 transzpozázt expresszáló plazmid T7 promóterrel, pTYB1 származék
pMSZ179	Ар	colE1	His tag-gel fúzionáltatott IS30 transzpozázt expresszáló plazmid T7 promóterrel, pET32a származék
pMSZ8/309	Ар	colE1	delHTH1 (1aa-39aa) IS30 transzpozázt expresszáló plazmid p _{junc} promóterrel (4.4. ábra)

pMSZ7/313 pMSZ267/310	Ap Ap	colE1 colE1	IS30 transzpozázt expresszáló plazmid p_{junc} promóterrel (4.38. ábra) λ cI kiméra transzpozázt expresszáló plazmid p_{junc} promóterrel, az IS30 transzpozáz HTH1 motívuma cserélye λ cI represszor HTH motívumával (24aa-59aa) (10. ábra)
pMSZ184	Km, Cm	p15A	A cI represszoral fúzionáltatott IS30 transzpozázt expresszáló plazmid (4.5 A ábra) (Szabó <i>et al.</i> , 2004)
pMSZ185	Km, Cm	p15A	IS30 transzpozázt expresszáló plazmid (Szabó <i>et al.</i> , 2004)

3.4. táblázat IR-IR csatlakozást tartalmazó plazmidok

Plazmid	Rezisztencia	Replikáció	ós Csatlakozó	Rövid leírás és referenciák
		origó	IS30 végek	
pAW1039	Km	p15A	(IS30) ₂	pAW332 származék (4.29. A, 4.34. A ábrák) (Olasz et al., 1993)
pJKI216	Ap, Cm, Km	p15A	106R-464L	pACYC177 származék (4.7. ábra) (Farkas et al., 1996)
pZNA40	Km	p15A	257R-58L	pJKI88 származék (4.3.C, D ábra) (Nagy et al., 2004)
pZNA124	Km, Cm	p15A	763R-173L	pJKI88 származék, amely az IS30 végek kapcsolódásán kívűl a 257R véget is tartalmazza (4.3. A ábra) (Nagy <i>et al.</i> , 2004)
pZNA127	Km, Cm	p15A	106R-45L	pJKI88 származék, amely az IS <i>30</i> végek kapcsolódásán kívűl a GOHS szekvenciát is tartalmazza (4.3. B ábra) (Nagy <i>et al.</i> , 2004)
pFOL1069	Cm	R6K	106R-173L	pLOF/Km származék RP4 mob funkcióval (4.6. ábra)
pMSZ198	Ap, Cm	colE1	106R-464L	pEMBL19 származék, amely az IS30 végek kapcsolódásán kívűl hordozza a splice acceptor szekvenciával (intA) ellátott promóter nélküli <i>gfp</i> gént (4.8. A ábra) (Szabó <i>et al.</i> , 2004)
pMSZ87C	Ар	colE1	257R-59L	pEMBL19 származék
pMSZ85C	Ap	colE1	257R-173L	pEMBL19 származék (4.20. A ábra)
pMSZ88C	Ap	colE1	RIR-LIR	pEMBL19 származék (4.20. A ábra)
pMSZ537C*	Ap	colE1	65R*-122L*	pSK származék (4.13. A ábra)
pMSZ358C*	Ap	colE1	65R*-464L	pSK származék (4.13. A ábra)
pMSZ567	Ap	colE1	19RIR-19LIR	pEMBL19 származék (4.15. A ábra)
pMSZ576	Ap	colE1	15RIR-15LIR	pEMBL19 származék (4.15. A ábra)
pMSZ587	Ар	colE1	11RIR-11LIR	pEMBL19 származék (4.15. A ábra)
pMSZ577	Ар	colE1	9RIR-9LIR	pEMBL19 származék (4.15. A ábra)
pMSZ569	Ap	colE1	RIR-19LIR	pEMBL19 származék (4.15. A ábra)
pMSZ578	Ap	colE1	RIR-15LIR	pEMBL19 származék (4.15. A ábra)
pMSZ579	Ap	colE1	RIR-11LIR	pEMBL19 származék (4.15. A ábra)
pMSZ580	Ap	colE1	RIR-9LIR	pEMBL19 származék (4.15. A ábra)
pMSZ506C	Ap	colE1	LIR-LIR	pEMBL19 származék
pMSZ105C	Ap	colE1	RIR-RIR	pEMBL19 származék
pMSZ102C	Ap	colE1	RIR-257R	pEMBL19 származék
pMSZ207C	Ap	colE1	65R-257R	pEMBL19 származék
pMSZ45C	Ар	colE1	LIR-464L	pEMBL19 származék
pMSZ483C	Ap	colE1	68L-464L	pSK származék
pTFI26	Ар	colE1	257R-464L	pEMBL19 származék, az IS30 végekben bázis cserék találhatók:
pJKI551	Ap	colE1		G ₇₀ →t, A ₈₀ →t (<i>Pst</i> I) és A ₁₁₃₆ →g (<i>Pvu</i> II) (4.36. ábra) IS1655 végek csatlakozását (45R-45L) tartalmazó pEMBL19 származék (4.19. C ábra)

3.5. táblázat IS30 transzpozáz célszekvenciáit tartalmazó target plazmidok

Plazmid	Vektor	Target régió
pTFA305	pEMBL19	RIR (Olasz et al., 1997b)
pTFA303	pEMBL19	LIR (Olasz et al., 1997b)
pAW1017	pEMBL19	464L (Olasz et al., 1997b)
pAW1005	pEMBL19	106R (Olasz et al., 1997b)
pMSZ494	pEMBL19	bal IS30 vég: 27-173 bp
pMSZ410	pEMBL19	jobb IS30 vég: 27-106 bp
pFOL546	pEMBL19	GOHS (Olasz et al., 1998)
pZNA148	pGB2	¹ / ₂ POHS-49R (4.3. C ábra) (Nagy et al., 2004)
pZNA133	pGB2	GOHS (4.3. D ábra) (Nagy et al., 2004)
pFOL1032	pEMBL19	shh génben GOHS és Tn903 Km ^R gént (4.8. A ábra) (Szabó et al., 2004)
pMSZ630	pGB2	¹ / ₂ POHS-RIR (4.20. ábra)
pMSZ634	pGB2	¹ / ₂ POHS-257R (4.20. ábra)
pMSZ633	pGB2	¹ / ₂ POHS-LIR (4.20. ábra)
pMSZ632	pGB2	¹ / ₂ POHS-464L (4.20. ábra)
pFOL703	pEMBL19	½ POHS-464L (4.29. ábra)
pMSZ29	pEMBL19	¹ /2 POHS-58L (4.29.ábra)
pJKI312	pEMBL19	¹ /2 POHS-45L (4.29. ábra)
pJKI313	pEMBL19	¹ / ₂ POHS-35L (4.29. ábra)

pMSZ24	pEMBL19	¹ / ₂ POHS-LIR (4.29. ábra)
pFOL701	pEMBL19	¹ / ₂ POHS-257R (4.29. ábra)
pJKI305	pEMBL19	¹ /2 POHS-66R (4.29. ábra)
pJKI304	pEMBL19	¹ / ₂ POHS-49R (4.29. ábra)
pMSZ28	pEMBL18	¹ / ₂ POHS-RIR (4.29. ábra)
pFOL73	pEMBL19	464L: T ₁ →c (4.34. ábra)
pFOL744	pEMBL19	106R: GTACA ₁₂₁₇₋₁₂₂₁ →tcctg (4.34. ábra)
pMUT1	pEMBL19	464L: TG _{13·14} →ct, C ₂₀ →t (4.34. ábra)
pMUT3	pEMBL19	106R: AG ₁₂₀₈₋₁₂₀₉ →ca, A ₁₂₀₂ →g (4.34. ábra)
pMSZ427	pEMBL19	464L: T ₅₉ → c, GA ₆₁₋₆₂ →ag (<i>Xba</i> I) ACT ₁₇₇₋₁₇₉ →tag (<i>Xba</i> I) (4.34. ábra)
pMSZ428	pEMBL19	464L: T ₅₉ →c, GA ₆₁₋₆₂ →ag (<i>Xba</i> I) (4.34. ábra)
pMSZ429	pEMBL19	464L: ACT ₁₇₇₋₁₇₉ →tag (<i>Xba</i> I) (4.34. ábra)
pJKI523	pGB2	IS1655 LIR (4.19. B ábra)
pMSZ629	pGB2	IS1655 RIR (4.19. B ábra)
pMSZ176	pEMBL19	λ fág O _R 1-3 régiója (4.5. A ábra) (Szabó et al., 2004)
pMSZ239	pEMBL19	shh génben gli1 kötőhely (GACCACCCA) (4.8. ábra) (Szabó et al., 2004)

3.6. táblázat Cm^R transzpozondonor plazmidok

Plazmid	Vektor	IS30 vége	k hossza a transzpozonokban
pMSZ88	pEMBL19	LIR +	RIR (4.20. A ábra)
pMSZ85	pEMBL19	173L +	257R (4.20. A ábra)
pMSZ86	pEMBL19	LIR +	257R (4.24. A ábra)
pMSZ84	pEMBL19	35L +	257R (4.24. A ábra)
pMSZ83	pEMBL19	45L +	257R (4.24. A ábra)
pMSZ87	pEMBL19	58L +	257R (4.24. A ábra)
pMSZ520	pSK	68L +	257R (4.24. A ábra)
pMSZ521	pSK	77L +	257R (4.24. A ábra)
pMSZ123	pEMBL19	99L +	257R (4.24. A ábra)
pMSZ119	pEMBL19	122L +	257R (4.24. A ábra)
pMSZ70/469	pEMBL19	464L +	257R (4.24. A, B ábra)
pMSZ497	pEMBL19	464L +	RIR (4.24. B ábra)
pMSZ498	pEMBL19	464L +	49R (4.24. B ábra)
pMSZ499	pEMBL19	464L +	66R (4.24. B ábra)
pMSZ506	pEMBL19	LIR +	LIR
pMSZ105	pEMBL19	RIR +	RIR
pMSZ537*	pSK	122L*+	66R* (4.10., 4.11. A ábrák)
pMSZ358*	pSK	464L +	66R* (4.11. A, 4.18. A, 4.25. A, C ábrák)
pJKI499*	pEMBL19	464L +	66R* (4.16. ábra)
pMSZ416	pSK	464L +	66R* AC ₁₂₁₉₋₁₂₂₀ →cg
pMSZ522	pSK	122L +	$66R^* GT_{2-3} \rightarrow cg, AC_{1219-1220} \rightarrow cg$
pMSZ445*	pSK	122L* +	106R (4.25. D, E ábra)
pMSZ589	pEMBL19	464L +	RIR + GAGATAATTG ₁₁₇₉₋₁₁₈₈ box (4.26. A ábra)
pMSZ619	pEMBL19	464L +	RIR + GAGATAATTG ₁₁₇₅₋₁₁₈₄ box (4.26. A ábra)
pMSZ622	pEMBL19	257R +	LIR + AAAC ₃₆₋₃₉ + AGACGAACATTT ₆₆₋₇₇ (4.27. ábra)
pMSZ624	pEMBL19	257R +	43L + AGACGAACATTT ₆₆₋₇₇ (4.27. ábra)
pMSZ646	pEMBL19	257R +	$51L + AGACGAACATTT_{66-77}$ (4.27. ábra)
pMSZ656	pEMBL19	257R +	$58L + AGACGAACATTT_{66-77}$ (4.27. ábra)
pMSZ102	pEMBL19	RIR +	257R (4.30. A ábra)
pMSZ68	pEMBL19	49R +	257R (4.30. A ábra)
pMSZ125	pEMBL19	56R +	257R (4.30. A ábra)
pMSZ67	pEMBL19	66R +	257R (4.30. A ábra)
pMSZ59	pEMBL19	257R +	257R (4.30. A ábra)
pMSZ45	pEMBL19	LIR +	464L (4.30. C ábra)
pMSZ31	pEMBL19	35L +	464L (4.30. C ábra)
pMSZ30	pEMBL19	45L +	464L (4.30. C ábra)
pMSZ55	pEMBL19	58L +	464L (4.30. C ábra)
pMSZ483	pSK	68L +	464L (4.30. C ábra)
pMSZ484	pSK	77L +	464L (4.30. C ábra)
pMSZ71	pEMBL19	173L +	464L (4.30. C ábra)
pMSZ54	pEMBL19	464L +	464L (4.30. C ábra)
pMSZ96	pEMBL19	LIR +	LIR (4.33. ábra)

A * pontmutációkat jelöl az IS30 végekben. A báziscserék szekvenciája a hivatkozott ábrán megtekinthető.

3.4. Általánosan alkalmazott molekuláris biológiai módszerek

Plazmid DNS izolálás: alkalikus plazmid preparálás (miniprep) módszer szerint (Sambrook *et al.*, 1989).

Totál DNS izolálás E. coli és S. typhimurium baktériumokból: 2 ml LB tápoldatban növesztett éjszakás baktérium tenyészetet centrifugáltuk (1 perc 10000rpm) és 100µl TE pufferben (50 mM Tris pH8, 5 mM EDTA) felszuszpendáltuk. A sejteket 30 percig jégen tartva lizozimmel kezeltük (0,1 mg/ml végkoncentrációban), majd 1/10 térfogat 10×STE (50 mM Tris pH7,5; 400 mM EDTA; 5 % SDS) és proteináz-K (0,1 mg/ml végkoncentrációban) hozzáadásával 56 °C-on feltisztulásig inkubáltuk. A lizátumokat 1:1 arányú fenol:kloroform extrakcióval tisztítottuk, majd kétszer mostuk 1/2 térfogat kloroformmal. A DNS-t 1/20 térfogat 5 M K-acetát oldat hozzáadásával 2 térfogat cc. etanollal kicsaptuk, 70 % etanollal kétszer mostuk és vákuum alatt szárítottuk. A kész preparátumokat 100 µl TE pufferben oldottuk és -20 °C-on tároltuk.

Totál DNS izolálás zebrahal embriókból: az 5-6 órás embriókat 500µl SET pufferben (50 mM Tris pH 7,8; 100 mM NaCl; 20 mM EDTA; 0,5 % SDS) felszuszpendáltuk, és proteináz-K-val (40 µg/ml végkoncentrációban) 55 °C-on éjszakán át emésztettük. A lizátumokat 1:1 arányú fenol:kloroform extrakcióval tisztítottuk, majd kétszer mostuk 1/2 térfogat kloroformmal. A DNS-t 2 térfogat cc. etanol és 1/10 térfogat 3 M Na-acetát hozzáadásával kicsaptuk, 70 % etanollal kétszer mostuk, és vákuum alatt szárítottuk. A kész preparátumokat 40 µl TE pufferben oldottuk, és -20 °C-on tároltuk.

A PCR reakciókat 25-50 μl térfogatban 2-2,5 mM MgCl₂ vagy MgSO₄, 0,2-1 μM primer, 0,2 mM dNTP, valamint Taq, Pwo (Roche), Pfu (Fermentase) polimerázok felhasználásával végeztük a gyártó utasítása szerint. A reakciókhoz a Techne (UK) Progene, illetve az Applied GeneAmp PCR System 9700 készülékeit használtuk. A ciklusok paramétereit kísérleti úton állítottuk be, figyelembe véve a templát DNS tulajdonságait és a primerek hibridizálási hőmérsékletét. A PCR reakciókhoz, szekvenáláshoz használt oligonukleotidokat a 3.7. táblázat tartalmazza. Az IS*30* végek mutageneziséhez megaprimeres PCR technikát (Sarkar and Sommer, 1990), a transzpozáz mutagenezishez OE-PCR-t (Ho *et al.*, 1989) használtunk.

A Southern hibridizációs kísérleteket és a DNS-próbák jelölését a Roche PCR DIG Labelling and Detection Kit felhasználásával a gyártó utasításai szerint végeztük. A DNS mintákat 4 °C-on 20 mA áramerősség mellett futtattuk 0,8 %-os agaróz gélen, melyeket azután Hybond-N nylon membránra blottoltunk 20x SSC oldatban (3 M NaCl; 0,3 M Na-citrát pH7).

3.7. táblázat A kísérletekhez felhasznált oligonukleotidok

Név	Szekvencia (5'-3')	Csatolási hely
pUCfor	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	pBSK (576-599)
		pEMBL19 (3630-3653)
pUCrev	ATTTCACACAGGAAACAGCTATGAC	pSK (836-812)
		pEMBL19 (3767-3743)
pGBfor	AACTATCAGGTCAAGTCTGC	pGB2 (3868-3887)
pGBrev	GCTGTTCAGCAGTTCCTGCC	pGB2 (170-151)
cat5	GTATCAACAGGGACACCAGGATTTA	Tn9 cat (101-77)
903KmR5	TATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGA	Tn903 neo (67-41)
903KmRfor	CAGTAATACAAGGGGTGTTATG	Tn903 neo (111-132)
903KmRrev	CATCCAGCCAGAAAGTGAGG	Tn903 neo (1170-1151)
neo5	AATAGCCTCTCCACCCAAGCGG	Tn5 neo (209-188)
IS30seq261	TCTCCTCGCGCTCAGACAGTG	IS30 (261-241)
IS30seq961	GACATCTAGAATTTACTGTCA	IS30 (961-981)
IS30nco	GACGCCTGCCATGGCGAAGGCTATG	IS30 (663-639)
IS30L	GTTCGTCTCATTCAA	IS30 (73-59)
ildi6	CCGAAAGAGATAATTGAAAGG	IS30 (1173-1193)
S3	CGGACTCGAGCCGCACCTGATCTGAAGGGA	Shh locus (3306-3335)
S5	TAGACTCGAGCACAATGGACTATCATCGCC	Shh locus (3556-3585)

A zebrahal embriók nevelését, injektálását Westerfield (1993) leírása alapján végeztük. Az injektáláshoz felhasznált transzpozáz mRNS-t *in vitro* állítottuk elő az mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit (Ambion) felhasználásával. Az injektált plazmid DNS-eket QIAfilter vagy QIAprep Kitek felhasználásával tisztítottuk, és RN-áz mentes vízben oldottuk. Az injektáló oldat 10 μl-re 1-2 μg mRNS-t és/vagy 0,5-1 μg DNS-t tartalmazott.

A nukleotidsorrend meghatározást az ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) készüléken végeztük a gyártó által kínált kit és manual alapján. A szekvencia analízisekhez a Wisconsin GCG programcsomagot (Devereux *et al.*, 1984) MultAlin (Corpet, 1988), PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000), WebLogo (Crooks *et al.*, 2004) és a DNA tools (Vlahovicek *et al.*, 2003) programokat használtuk.

3.5. Az IS30 transzpozáz indukciójának vizsgálata

A transzpozázt termelő plazmidokat (3.3. táblázat) transzformálással illetve elektroporálással *E. coli*, illetve *S. typhimurium* baktériumba juttattuk. A transzformánsokat megfelelő antibiotikumok jelenlétében 2 ml LB tápoldatban OD₆₀₀: 0,4-0,5 értékig növesztettük, majd a transzpozáz expresszióját 0,5 mM IPTG hozzáadásával 4-5 órán keresztül indukáltuk. A tenyészetekből SDS-es feltárással totál fehérjepreparátumot készítettünk, melyet 12 %-os poliakrilamid gélen választottunk el. A gélt Coomassie Brillant Blue G250-nel festettük (Hames and Rickwood, 1990).

A transzpozáz azonosításához az LKB NovaBlot készülék felhasználásával immunoblottot készítettük. A blothoz a Hybond-P PVDF membránt használtuk. Az IS30 transzpozáz ellen készült primer ellenanyagot (Stalder *et al.*, 1990) Rolf Stalder-től kaptuk. Az előhívást a

monoklonális anti-nyúl IgG alkalikus foszfatáz konjugátum (Sigma), X-foszfát és NBT (Roche) szubsztrát felhasználásával a gyártók utasításai alapján végeztük.

3.6. Intramolekuláris transzpozíció

A transzpozáz expresszáló plazmidokat elektroporálással, illetve transzformálással a kiválasztott gazdabaktériumba (MA1703, TG2, MDS) juttattuk. A transzformánsokba a fehérjeindukció ellenőrzése után bejuttattuk a transzpozáztermelő plazmidokkal kompatibilis mérőplazmidot. A transzformánsokat a mérő- és a transzpozáztermelő plazmid rezisztencia markerére együtt szelektáltuk. A mérőplazmidok deléciós események kimutatására alkalmasak, amely az IS30 két IR vége között (SSD), vagy a transzpozíciósan aktív IR-IR kapcsolat és egy kiválasztott target szekvencia között (TCT) játszódik le. A deléció minden esetben egy antibiotikum rezisztencia (általában Cm^R) gén vesztését eredményezi, amely mikrobiológiai módszerekkel könnyen detektálható. A transzpozáztermelő- és a mérőplazmidokat tartalmazó kolóniákból éjszakás tenyészeteket növesztettünk, miközben a transzpozáz expresszióját 10 µM IPTG hozzáadásával indukáltuk. A 17-20 óra elteltével DNS-t izoláltunk a baktériumokból, melynek 1/20 részével MA1703 vagy TG2 sejteket transzformáltunk. A transzformánsokat a mérőplazmidok azon rezisztencia markerére szelektáltuk, melyet a deléció nem érintett (Ap^R, vagy Km^R). Az eredeti (Cm^R) és átrendeződött (Cm^S) plazmidokat rezisztencia mintázatuk alapján "replica-plating" felhasználásával válogattuk szét. Az átrendeződött termékek struktúráját (párhuzamosonként legalább 5 darabot) restrikciós hasítással ellenőriztük. A transzpozíciós gyakoriságot az átrendeződött termékeket tartalmazó (általában Cm^S baktériumok), illetve az összes transzformáns hányadosaként határoztuk meg.

3.7. Intermolekuláris transzpozíció vizsgálata hőmérsékletérzékeny target plazmidok felhasználásával

A *ts* replikációs origóval jellemezhető pSC101-alapú target (Sp/Sm^R), a transzpozáztermelő (Ap^R vagy Km^R), valamint a transzpozondonor (Km^R vagy Ap^R) plazmidokat egymást követő elektroporálásokkal MA1703 sejtekbe juttattuk. A transzformánsokat az utolsó lépésben mindhárom plazmid rezisztencia markerére (Sp/Sm, Km, Ap) szelektálva növesztettük. Kísérletenként 4-6 telepet 2 ml LB + Sm + Km + Ap tápoldatban 5 órán keresztül 30°C-on (OD₆₀₀: 0,3-0,5) inkubáltunk. A transzpozáz expressziót 0,3 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk további 3 órán át tartó növesztéssel. A tenyészeteket a target és a donor plazmidok rezisztencia markereire szelektálva (LA + Sp/Sm + Ap vagy LA + Sp/Sm + Km) 30 és 42 °C-on titráltuk. Az antibiotikumok jelenlétében 30 °C-on minden olyan sejt képes teleppé nőni, amely tartalmazza a donor és target plazmidokat, míg 42 °C-on csak azok képesek kolóniát képezni, melyekben fúzió

alakult ki a két replikon között. A transzpozíciós gyakoriságot a 42 °C-on és 30 °C-on meghatározott baktérium titerek hányadosaként számoltuk. A fúziós plazmidok struktúráját restrikciós vagy PCR tesztekkel ellenőriztük.

3.8. Transzpozíciós célszekvenciák izolálása a pOX38Km plazmidon

A pOX38Km target (Km^R) és a pMSZ309, pMSZ310, pMSZ313, pMSZ87C donor plazmidokat (Ap^R) *S. typhimurium* MS1883 törzsébe elektroporáltuk. A kettős transzformánsokat Km + Ap tartalmú táptalajon szelektáltuk, majd 4-5 telepet éjszakán át növesztettünk. A *Salmonella* tenyészeteket LA táptalajon F⁻ TG90 (Tc^R) illetve HB101 (Sm^R) baktériumokkal konjugáltattuk. 8 óra elteltével a baktériumpázsitot fiziológiás sóoldattal lemostuk, és a szuszpenziót különböző higításokban LA + Km + Tc/Sm, valamint LA + Km + Ap +Tc/Sm táptalajra szélesztettük. A Km + Tc/Sm tartalmú táptalajon kialakult kolóniák a transzkonjugánsok titerét, míg a Km + Ap + Tc/Sm táptalajon felnőtt telepek azoknak az integránsoknak a titerét mutatják, melyekben a donor plazmid integrálódott a konjugatív plazmidba. A transzpozíciós gyakoriságot az integráns és a transzkonjugáns titerek hányadosaként számoltuk.

Ahhoz, hogy az integrációs helyek szekvenciáját meghatározzuk, DNS-t tisztítottunk a fúziós plazmidokat tartalmazó *E. coli* sejtekből. A DNS-eket *Pst*I endonukleázzal hasítottuk, melynek nincs felismerőhelye egyik donor plazmidban sem, de a pOX38Km target plazmidot 5 kbp-nál kisebb DNS fragmensekre darabolja. A hasított DNS populációt T4 ligáz felhasználásával ligáltuk, majd TG2 sejtekbe transzformáltuk, szelektálva a donor plazmid (Ap^R) markerére. Az inszerciós helyek szekvenciáját IS30seq261 és pUCrev primerek felhasználásával határoztuk meg (ld. 4.4 ábra).

3.9. Transzpozíciós fúzió vizsgálata R408 transzdukcióval

A módszer a pEMBL és pBluescript vektorok azon tulajdonságán alapul, hogy tartalmazzák az f1 fág replikációs origóját, s így megfelelő helper fág (pl. R408) segítségével egyszálú DNS-ként fág részecskékbe pakolhatók. Az eljárás felhasználásával a transzpozíciós termékek egymástól elkülönítve, egyedi klónként izolálhatók és vizsgálhatók.

A Km^R génnel jellemezhető donor (pMSZ184, pMSZ185, illetve pAW1039), valamint az Ap^R markerrel és f1 origóval rendelkező target plazmidokat (ld. 3.5. táblázat) egymást követő transzformálássokkal TG2 sejtekbe juttattuk. Kísérletenként 5-5 telepből folyamatos szelekció mellett (Km, Ap) éjszakás tenyészeteket növesztettünk 37 °C-on, melynek 1/10-ét 2 ml 2YT + Km + Ap tápoldatba oltottuk, és 30 perces inkubálás után R408 fággal fertőztük (m.o.i.>10). A fertőzést követően a baktériumkultúrát 5-6 órán keresztül növesztettük, majd a sejteket
centrifugálással eltávolítottuk (5 perc, 12000 rpm). A fágszuszpenziót 80 °C-on tartottuk 1 órán keresztül, hogy a felülúszóban maradt baktériumoktól megszabaduljunk. A fáglizátumokkal exponenciális növekedési fázisban lévő TG2 sejteket (OD₆₀₀: 0,5-0,7) fertőztünk (0,2 ml baktérium + 0,1 ml fág szuszpenzió), majd pár perces inkubáció után a baktériumokat különböző higításokban szelektív (LA + Km + Ap illetve LA + Ap) táptalajra cseppentettük. A két marker együttes transzdukciója csak akkor történhetett meg, ha azok egyetlen DNS molekulán, azaz fúziós termékben voltak jelen. A transzpozíciós fúzió gyakoriságát a Km^R + Ap^R, illetve az Ap^R transzduktáns titerek hányadosaként számoltuk. A Km^R + Ap^R telepekből plazmid DNS-t izoláltunk, és struktúrájukat restrikciós hasítással vizsgáltuk.

3.10. Az O_R1-3 régió beépítése a S. typhimurium genomjára

Az integrációhoz a Tn10 alapú mutagenezis rendszert használtuk, amely viszonylag gyakori, stabil inszerciós mutációkat eredményez (Herrero et al., 1990). A mini Tn10 transzpozont tartalmazó pMSZ403 plazmidot (3.2. táblázat) először S-17 (λ pir) E. coli sejtekbe (3.1. táblázat) transzformáltuk. A transzpozon a Tn903 Km^R génnel kapcsoltan hordozza a λ fág O_R1-3 operátor régióját, míg az IS10 transzpozáz tac promóterről, a transzpozontól elkülönítve expresszálódik. A plazmidot konjugációval juttattuk S. typhimurium MS1883 sejtekbe. A konjugációhoz a donor S-17 és a recipiens MS1883 tenyészeteket 1:1 arányban összekevertük és 6 órán át LA táptalajon 0,01 mM IPTG jelenlétében inkubáltuk. A baktériumokat fiziológiás sóoldattal mostuk le a táptalaj felszínéről, majd különböző hígításokban M9 + Km táptalajra szélesztettük. Mivel az S17-1 nem tud minimál táptalajon osztódni, az R6K-alapú plazmid pedig nem tud MS1883 sejtekben replikálódni (suicide), ezért M9 + Km szelekció mellett csak azok a S. typhimurium sejtek fejlődhetnek kolóniává, melyekben a mini Tn10 integrálódik a genomra. A Tn10 transzpozon kivágódását és integrációját az IPTG indukálta IS10 transzpozáz katalizálja, amely azonban az osztódások révén a donor plazmiddal együtt kihígul a sejtekből. Egyszeri átoltás után tíz Km^R telepből genomiális DNS-t izoláltunk, melyben az inszerciók számát Southern hibridizációval ellenőriztük.

3.11. Gélretardációs kísérlet

A bandshift kísérletekhez a wt IS30 transzpozázt a pMSZ179-ről (3.3. táblázat) expresszáltattuk *E. coli* ER2504 (DE3) törzsében. A fehérje tisztítást Ni-NTA agaróz oszlopon (Qiagen) a gyártó utasítása alapján végeztük. Az IS30 transzpozáz N-terminális részét (1-134 aa) a pAW387 plazmidról és származékaikról termeltettük. A fehérje tisztítását Stadler (Stadler *et al.*, 1990) módszere szerint végeztük. A transzpozáz expressziót és a tisztítás hatékonyságát SDS poliakrilamid gélen, illetve Western blottal ellenőriztük (ld. 3.5 fejezet). Az IS30 transzpozáz

célszekvenciáit (3.5. táblázat) tartalmazó DNS szakaszokat PCR reakciókban amplifikáltuk [γ -³²P] dATP-vel jelölt pUCrev és jelöletlen pUCfor, illetve [γ -³²P] dATP-vel jelölt neo5 és cat5 primer párok jelenlétében. A radioaktívan jelölt DNS szakaszokat (500 cpm) 37 °C-on 30 percig inkubáltuk az IS*30* transzpozázzal vagy annak N-teminális fragmentjével (~1 µg/reakció) 10 mM Tris pH8, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT és 1µg poli dIdC jelenlétében. A mintákat 4 °C-on, 5 % poliakrilamid gélen, TBE pufferben választottuk el. A detektálást Storm840 készülék (Amersham) felhasználásával végeztük.

3.12. In vitro transzpozíció tisztított IS30 transzpozáz felhasználásával

Az *in vitro* reakciókhoz az IS30 transzpozázt a pJKI380 plazmidról (3.3. táblázat) expresszáltattuk *E. coli* ER2504 (DE3) törzsében. A fehérje tisztítást a NEB IMPACTTM-CN (one-step purification of recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag) Kit felhasználásával végeztük a gyártó utasításai alapján.

A tisztított transzpozázt (~0,5 μg) 30 °C-on, 1 órán át inkubáltuk a transzpozondonor plazmidok (pMSZ85, pMSZ88, pMSZ55, pMSZ59, pMSZ67, pMSZ125, pMSZ483, pMSZ524) ~0,5 μg-jaival 10 mM HEPES pH8, 10 % glycerol, 50 mM NaCl és 10 mM MnCl₂ jelenlétében. A transzpozáz negatív reakciókba csak a fehérje higítópufferét (20 mM HEPES pH8; 0,1 mM EDTA; 0,1 % Triton X-100; 150 mM NaCl; 27 mM DTT) mértük. A DNS-t a PCR Purification Kit (Qiagen) felhasználásával választottuk el a fehérjétől, majd restrikciós hasítással, illetve PCR felhasználásával analizáltuk.

3.13. Primer extenziós kísérlet

Az *in vitro* transzpozíciós reakciókból visszanyert DNS-eket *Bst*YI enzimmel kezeltük, amely a pMSZ358, pMSZ416, és pMSZ522 plazmidokat 1 kbp-nál kisebb szakaszokra darabolja. Az enzimet 80 °C-on inaktiváltuk. A DNS populációt 2,5 térfogat cc. etanollal 0,1 térfogat 3 M Na-acetát jelenlétében kicsaptuk, 70 % etanollal kétszer mostuk, beszárítottuk, és 5 µl vízben feloldottuk. A DNS-eket (~0,5 µg/reakció) 2 percig 94 °C-on denaturáltuk, majd hozzámértük a [γ -³²P] dATP-vel jelölt cat5 primert 0,1 pM koncentrációban. A csatolást 55 °Con 2 percig, a szintézist 2 mM MgSO₄ és 0,5 mM dNTP jelenlétében 5 u Pwo polimeráz felhasználásával 72 °C-on 10 percig végeztük. A pMSZ416 szekvenálását a [γ -³²P] dATP-vel jelölt cat5 primerrel a Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB) felhasználásával végeztük. A DNS darabokat 1800V-on választottuk szét 6 % poliakrilamid + 8 M urea gélben.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az IS30 transzpozáz funkcionális vizsgálata

4.1.1. Az IS30 családba tartozó transzpozázok számítógépes analízise

Számítógépes programok felhasználásával lehetőségünk nyílt arra, hogy meghatározzuk az IS30 transzpozáz másodlagos térszerkezetét (7.1. függelék), amit összehasonlítottunk az IS30 családba tartozó transzpozázok aminosav szekvenciáival és prognosztizált térszerkezetével (7.2. függelék). Az egymás alá rendelt szekvenciák illesztése több erősen konzervált régiót is kiemelt, melyekhez meghatározott fehérje struktúra, és így feltehetőleg alapvető transzpozíciós funkció is köthető. A legnagyobb homológiát a fehérjék C-terminális részén találtuk (300-500. pozíció), amely a katalitikus D, D, E aminosavakat is tartalmazza. Ugyancsak nagymértékű hasonlóságot lehetett megfigyelni a transzpozázok elején (100-150. pozíció), ahol a másodlagos szerkezetet prognosztizáló program 90 %-os bizonyossággal egy hosszabb α-hélix (H) és egy α-hélix-turn-αhélix (HTH) motívumot emelt ki. Mivel a HTH struktúrák nagyon sok fehérje esetén – beleértve transzpozázokat is - szekvencia-specifikus DNS kötésekben vesznek részt (Harrison and Aggarwal, 1990), így felmerült annak lehetősége, hogy a szoftver által azonosított konzervált hélixek az IR végek megkötését végzik, amely minden transzpozáz közös sajátossága. Négy IS30 családtagnál, köztük az IS30-nál is a konzervált HTH előtt azonban addicionális hélixeket, illetve egy HTH motívumot is ki lehetett mutatni (50-90. pozíció), ami további DNS kötésre utal. Az IS30 jól jellemzhető célszekvencia specificitása okán felmerült annak lehetősége, hogy a transzpozáz elején talált addicionális HTH a természetes target szekvenciák, azaz a HS-ok felismerésében vesz részt.

4.1.2. A HTH motívumokban mutáns IS30 transzpozázok jellemzése

Az N-terminális régióban előforduló HTH motívumok célszekvencia felismerésének vizsgálatára pont- és deléciós mutáns transzpozázokat állítottunk elő.



4.1. ábra Az IS30 transzpozáz N-terminálisának másodlagos térszerkezete és mutagenezise.

Az IS30 családba tartozó 5 különböző transzpozáz szekvencia illesztése, és konszenzusa. A 100%-ban konzervált aminosavakat szürke oszlopok szemléltetik. Az α -hélixeket felépítő aminosavakat oválisokkal, az IS30 transzpozáz α -hélixeiben központi szerepet játszó aminosavak cseréit az oválisok felett jelöltük.

Delécióval eltávolítottuk az addicionális HTH1 motívumot az IS30 transzpozáz elejéről, míg a pontmutációkat úgy terveztük, hogy azok egy-egy hélixtörő prolint eredményeztek a program által valószínűsített hélixek közepén (4.1. ábra). A mutánsok fenotipizálására genetikai és biokémiai megközelítést alkalmaztunk.

Gélretardációs kísérletben (3.10. fejezet) vizsgáltuk a mutáns fehérjék kötését az IS30 végekhez, illetve a genomi inszerciós helyek alapján szintetizáltatott HS szekvenciához (GOHS). A HTH1 mutánsok (E15P, A27P, delHTH1) és a közbülső hélix mutáns (E66P) a vad (wt) transzpozázhoz hasonlóan kötötte az IS30 terminális végeit, míg a HTH2 mutánsokkal (A81P, R93P) nem tudtunk gyenge kölcsönhatást sem kimutatni a transzpozáz és a 26 bp-os RIR szekvencia között (4.2. ábra). A GOHS szekvencia megkötésére irányuló kísérletek viszont eredménytelenül végződtek, mivel még a wt IS30 transzpozáz jelenlétében sem sikerült specifikus DNS kötést detektálnunk (Nagy, 2004).



4.2. ábra A HTH mutánsok szerepe az IR végek kötésében. A gélretardációs kísérlethez az IS*30* transzpozáz Nterminális darabját (1-133 aa), és a ³²P-vel jelölt 26 bp-os RIR véget használtuk (3.11. fejezet). A HTH mutációkat a gélkép felett jelöltük. A transzpozáz által nem kötött RIR szekvenciát nyíl, míg a DNS-fehérje komplex jelenlétét vonal jelzi.

Az *in vitro* kötési kísérleteket követően *in vivo* rendszerekben vizsgáltuk a GOHS szekvenciába, illetve az IS30 végek mellé irányuló transzpozíciós események előfordulását. A kísérleteket *S. typhimurium* MA1703 baktériumban végeztük, melynek kromoszómája az *E. coli* genommal szemben nem tartalmaz aktív IS30 kópiákat (Cassadeus *et al.*, 1999). A HTH mutációkat hordozó transzpozázokat *tac* promoterről expresszáltattuk egy colE1 replikációs origóval rendelkező plazmidról (ld. 3.3. táblázat). Intra- illetve intermolekuláris kísérletekben mértük a deléciós- és inszerciós események gyakoriságát. Az intramolekuláris kísérleteben (ld. 3.6. fejezet) használt mérőplazmidok egyetlen DNS molekulán tartalmazták a transzpozíciósan aktív RIR-LIR kapcsolatot, valamint a targetként funkcionáló IS30 véget vagy a GOHS szekvenciát (4.3. A, B ábra). A transzpozáz indukcióját követően deléciót generált az összekapcsolt IS30 végek és target szekvenciák között, ami a kloramfenikol rezisztenciagén (Cm^R) vesztését eredményezte. A mutáns transzpozázok aktivitását a Cm^S deléciós termékek előfordulásának gyakoriságával jellemeztük. Az intermolekuláris kísérletben (ld. 3.7. fejezet) az összekapcsolt IR végeket, illetve a transzpozíciós célszekvenciákat (49R vég, illetve GOHS) külön replikonokon helyeztük el (4.3. C, D ábra). Mivel a target plazmidok replikációja

hőmérsékletfüggő (ts), ezért a donor és target plazmidok együttes szelekciója mellett, 42°C-on csak azok a baktériumok tudnak kolóniává fejlődni, melyekben fúzió alakul ki a két szülői DNS között. A HTH mutáns transzpozázok aktivitását a 42°C-on és 30°C-on mért baktérium titerek arányával jellemeztük. A transzpozíciós gyakoriságokat a 4.3. ábra E és F diagramjai szemléltetik.



4.3. ábra A HTH mutációk hatása az elem transzpozíciójára.

(A, B) Az intramolekuláris kísérletben használt mérőplazmidok és transzpozíciós termékeik sematikus ábrázolása. A pZNA124 és pZNA127 mérőplazmidok tartalmazzák az IS30 összekapcsolt IR végeit (fekete és fehér háromszögek egy téglalapban), a Cm^{R} gént (szürke téglalap), valamint a 49 bp-os jobb IS30 véget (49R), illetve a GOHS szekvenciát (csíkos téglalap). A transzpozáz indukcióját követően katalizálja a RIR-LIR kapcsolat integrációját a target szekvenciákba, amely deléciós termékek képződéséhez vezetett. (C, D) Az intermolekuláris kísérletben használt plazmidok és transzpozíciós termékeik ábrázolása. A p15A replikációs origóval (fekete kör) rendelkező pZNA40 donor (vékony vonal) a RIR-LIR kapcsolatot, míg a hőmérsékletérzékeny replikációs origóval (fehér kör) jellemezhető target plazmidok (szaggatott vonal) a 49R véget vagy a GOHS szekvenciát hordozzák. A transzpozáz indukció fúziós replikonok képződéséhez vezet. Az oszlopdiagramok az IR végek mellé (E) és a GOHS szekvenciába (F) irányuló inszerciók gyakoriságát szemléltetik. A HTH mutáns transzpozázok aktivitását wt transzpozáz gyakorisági adataihoz hasonlítva ábrázoltuk. A tényleges transzpozíciós gyakoriságokat az intramolekuláris reakcióban a Cm^{S} deléciós termékek, míg az intermolekuláris kísérletekben a fúziós plazmidok képződésének gyakorisága alapján számoltuk (ld. 3.6. és 3.7. fejezet).

Akár az intra-, akár az intermolekuláris kísérletek adatait tekintjük, azt állíthatjuk, hogy a HTH2 prolin mutánsok (A81P, R93P) nem tudtak beépüléseket generálni sem az IR végek mellé, sem a GOHS szekvenciába. A közbülső hélixben mutáns transzpozáz (E66P) bár megőrizte aktivitását, de a wt transzpozázhoz viszonyítva 4-5-ször kisebb gyakorisággal inszertálódott mindkét target szekvenciába. A HTH1 motívumban sérült transzpozázok (delHTH1, E15P, A27P) az IR végek mellé történő beépüléseket katalizálták, de nem tudták az összekapcsolt IR végeket a GOHS szekvenciába irányítani. Eredményeink tehát igazolták a számítógépes szekvencia analízis

alapján felállított hipotézisünket, miszerint a transzpozáz elején talált HTH1 az IS30 HS felismerésében játszhat lényeges szerepet, míg a HTH2 az IR végek megkötésében vesz részt, s így mind a HS-targetinghez, mind az IS30 végek mellé történő inszercióhoz szükséges.

4.1.2.1. A HTH1 deléciós transzpozáz célszekvencia választásának vizsgálata

A HTH1 mutáns transzpozázok célszekvencia választásának jellemzéséhez számos független inszerciós helyet kellett megvizsgálnunk. Az inszerciókat a pMSZ309 plazmiddal hoztuk létre, amely a delHTH1 transzpozáz expresszióját az IR végek kapcsoltatásával létrehozott p_{junc} (Dalrymple *et al.*, 1987) promóterről biztosítja. A kísérleteket *S. typhimurium* MS1883 törzsében végeztük egy 38 kbp méretű konjugatív plazmid (pOX38Km) jelenlétében. Az integráció a pOX38Km plazmidra olyan fúziós termékeket eredményezett (4.4. ábra), melyet konjugációval elkülönítettünk a szülői plazmidoktól (ld. 3.8. fejezet).



4.4. ábra A delHTH1 transzpozáz célszekvencia választásának meghatározása.

A HTH1mutáns IS30 transzpozázt expresszáló pMSZ309, és a pOX38Km target plazmidok sematikus struktúrája. Az $Ap^{R} + Km^{R}$ fúziós plazmidokat konjugációval választottuk el a szülői replikonoktól. Az integrációs helyek szekvenciáját IS30seq261 (i), és pUCrev (ii) primerek felhasználásával határoztuk meg.

Amíg a delHTH1 transzpozáz a wt transzpozázhoz hasonlóan $1-5x10^{-4}$ gyakorisággal generált inszerciókat a target replikonba, transzpozáz hiányában nem tudtunk fúziós plazmidokat izolálni (< 4x10⁻⁶). Az inszerciós helyek szekvenciáit a 4.1. és 4.2. táblázatok tartalmazzák. A szekvenciákat úgy rendeztük, hogy az inszerció során megduplázódott bázisok azonos pozíciókba kerültek, és a TD jobb oldalára eső szárnyi szekvencia mindig az integrálódott IS elem RIR végét határolta. Ebben az elrendezésben vizsgáltuk a bázisok előfordulási gyakoriságát az egymást követő pozíciókban, ami a wt transzpozáz esetén egy 24 bp-os szimmetrikus, a szárnyi régiókban AT-gazdag konszenzus szekvenciát (CIpOX) eredményezett (4.1. táblázat). A CIpOX 73-76 % egyezést mutat a genomi, valamint a plazmid és fág inszerciókból származó konszenzusokkal (Olasz *et al.*, 1998). A CIpOX egyes pozícióiban 40-90 %-ban fordulnak elő konzervált bázisok, ahogy a CIG (genomi inszerciók konszenzusa) és CIP (plazmid és fág inszerciók konszenzusa) szekvenciáknál is tapasztalták. Két pozíciót kétféle bázis alternatív jelenléte jellemez, míg további két pozícióban nem lehetett konszenzust megállapítani. Az egyedi inszerciós helyek 41-72 % egyezést mutatnak a CIpOX, 50-68 %-t a CIG és 57-67 %-t a CIP konszenzusokkal.

A wt IS30 célszekvenciái			Izolátum	Illeszkedés a CIpOX, CIG,			
			neve	és CIP konszenzusokhoz			
Α							
szárnyi	targe	t- szárnyi					
régió du	pliká	ició régió		CIpOX	CIG	CIP	
>		<		11/00	14/00	14/01	
TGA a g A Aat C A	.tc	c G cga T g T aCt	mszts26	11/22	14/22	14/21	
TcAa A AAGGtg	AT	gGTgaa T acCg	mszts25	13/22	13/22	13/21	
T G A cActGGCg	Gg	TtTgTTcT T t a	mszts21	14/22	14/22	14/21	
TG AaAA AGGCI	AT	gaatc TTTT Cc	mszts18	17/22	15/22	14/21	
gacGg AA cG CA	. Gg	TG Tc TT TTCCg	mszts17	15/22	11/22	13/21	
TGA c g A A GGC I	AT	c Gcc a T T g cac	mszts14	14/22	15/22	14/21	
cG A GA A catgI	Ac	TGTac T gT T aa	mszts13	13/22	10/22	12/21	
cGgGg AA GGaA	GT	gGTt TT TTatc	mszts12	15/22	12/22	13/21	
cG A GA A catgI	Ac	TGTac T gT T aa	mszts11	13/22	10/22	12/21	
T a AtgA A caCA	Ga	acca T gaTg t g	mszts10	9/22	11/22	12/21	
В							
2							
	e 8_	GI TTTS					
-12		+12	pozíciók				
	><		szimmetria				
T GA G AAA GG C V	I RT	TGTnTTTTCn	CIpOX – i	nszerciós he	lyek koi	nszenzusa	
С							
TAAAAAW G GC n	RY	C GC n WTTTTTA	CIG				
: : ::::::	::	: :::::					
T GA G AAA GG C W	RT	T G Tn TTTTTC N	CIpOX		16/22	16/21	
: : ::: ::.	::	:: :::::	•				
Yn AAAAW n GC A	RY	Y GC n WTTTT TR	CIP				

4.1. táblázat Az IS30 inszerciók konszenzus szekvenciája a pOX38Km plazmidon.

(A) A konszenzus készítéséhez felhasznált integrációs helyek szekvenciája. A szünetekkel elválasztott középső két bázis az inszerció során duplikálódott szekvenciát (target duplikáció) jelöli. A bal oldali szárnyi szekvencia az IS30 bal végét, a jobb oldali a jobb végét határolta a fúziós termékekben. A szekvenciákat mindig 5'→3' irányban tüntettük fel. Aláhúzással a kétszer azonosított izolátumokat jelöltük. A nagybetűk a CIpOX konszenzussal megegyező, a kiemelt betűk a target duplikációra szimmetrikus bázisokat jelölik. A törtek az egyes izolátumok szekvenciáinak hasonlóságát mutatják a CIpOX (a pOX38Km inszerciók alapján készült konszenzus), a CIG (a genomi inszerciós helyek alapján készült konszenzus) és a CIP (a fág és plazmid inszerciók alapján készült konszenzus) konszenzusokkal. Minden esetben a konszenzussal megegyező bázisok számát hasonlítottuk a konzervált pozíciók számához. (B) Az inszerciós helyek összehasonlítása alapján meghatározott CIpOX konszenzus. A konszenzus szekvenciát a CIG és CIP előállításánál alkalmazott kritériumok alapján készítettük (Olasz et.al., 1998). Konzerváltnak tekintettünk egy bázist, ha az adott pozícióban legalább 40% volt az előfordulási gyakorisága. Alternatív bázisokat akkor alkalmaztunk (W: A vagy T; R: A vagy G; Y: C vagy T; n: nincs konzervált bázis), ha a két bázis gyakorisága együttesen elérte a 70%-ot és egyenként is megközelítette a 40%-ot. Szürkével a minimálisan 60%ban konzervált nukleotidokat jelöltük. A target duplikációra szimmetrikus bázisokat kiemelt betűtípussal, valamint vonalakkal jelöltük. A szekvencialogot a WebLogo programmal (http://weblogo.berkeley.edu/logo. cgi) állítottuk elő. (C) A CIG, a CIP és CIpOX konszenzusok összehasonlítása. Két pont a tökéletes egyezést, egy pont az alternatív bázisok valamelyikével való egyezést jelöli.

Amíg a wt transzpozáz jelenlétében mindig 2 bp TD-t azonosítottunk, a delHTH1 transzpozáz katalizálta inszerciók során a célszekvencia 3 bp hosszan duplikálódott. A TD alapján egymás alá rendezett inszerciós helyek között 60 %-nál nagyobb egyezést csak négy pozícióban lehetett

kimutatni (4.2. táblázat). A 47 bp hosszú konszenzus szekvencia mindössze 27 %-os egyezést mutat a wt transzpozáz targetválasztását jellemző CIpOX konszenzussal, és az egyedi inszerciós helyek külön-külön is legfeljebb 50 %-ban hasonlítanak a CIpOX, a CIG és CIP szekvenciákhoz. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy HTH1 motívum eltávolításával a transzpozáz targetválasztása véletlenszerűvé vált.

A delHTH1 transzpozáz célszekvenciái			Izolátu m neve	Illeszkedés a CIpOX, CIG, és CIP konszenzusokhoz		
Α	TD			CIpOX	CIG	CIP
				-		
cagaaaGagaaAAccCTgGgtG	GaG	acTgAtacaGgaAgaCaaAcgc	mszts2	5/22	6/22	5/21
tatGagcgtgGAgagCTtGttG	aTG	TGCTgtgggGggAactgGAATG	mszts3	9/22	8/22	9/21
atgGtTatctGAAcgCTgaagG	GgG	TtTTccagcacctgttTctccG	mszts4	4/22	2/22	2/21
tGccaTGCgtttAtaCgaatCc	cTG	TGTcAgtatcgtAagCcGgATG	mszts6	9/22	9/22	11/21
tGattatCcgGCAGctCtGgCa	cTt	cGCcAgatgtcgAtggTccATG	mszts8	7/22	12/22	12/21
ccgccgaggcGAAGaCTcGggc	Ggc	gcCctgcccGtcccaCcaggTc	mszts53	4/22	7/22	5/21
gacGtTaCtgaCccgCCaGaCt	cgc	cGCTttcgcctggtcgTGAAgG	mszts55	9/22	8/22	8/21
gGaGccGgaaGCgGtgCtGaCG	GaG	gcagAagaaGaacgcCTGAAcG	mszts56	4/22	8/22	6/21
gGtGcTGCtaGCgGcgCgGtgt	GTt	TtTTtatagGatAccgctAggG	mszts59	9/22	6/22	7/21
В						
-22		+22	pozíciók			
nGnGnT G CnnGMAGnCYnGn C G	GTG	T G YTAnnnnGnnAnn C TGAATG	inszerciós	nszerciós helvek konszenzusa		
· · <u>·</u> · · · · · · · · · · · · · · · ·	::	····	11152010105	neryek kon	JECHE USU	•
T GA G AAA GG C W	RT	T G Tn TTT T TC n	CIpOX			

4.2. táblázat A delHT1 transzpozáz target szekvenciái a pOX38Km plazmidon.

(A) A jelölések megegyeznek a 4.1. táblázatban használtakkal. A szünetekkel elválasztott bázisok a TD jelölik. A bal oldali szárnyi szekvencia az IS30 bal végét, a jobb oldali a jobb végét határolta a fúziós termékekben. A nagy betűk a konszenzussal megegyező bázisokat jelzik. A törtek az egyedi szekvenciáknak a CIpOX, a CIG, és a CIP szekvenciákkal való hasonlóságát mutatják. (B) A konszenzus hasonlósága a wt transzpozáz target választását jellemző CIpOX konszenzussal. A konszenzust a CIpOX, a CIG és a CIP szekvenciák előállításánál alkalmazott kritériumok alapján készítettük (ld. 4.1. táblázat). Szürkével a 60%-ban konzervált bázisokat, aláhuzással és kiemeléssel a szimmetrikus pozíciókat, míg pontokkal a szekvenciák közötti egyezést jelöltük.

4.2. Az IS30 target specificitásának módosítása fúziós transzpozázok felhasználásával

Bizonyos rekombinázok, így egyes endonukleázok vagy integrázok specificitása ismert DNS kötő fehérjék fúziójával megváltoztatható (Kolb *et al.*, 2005). Annak eldöntésére, hogy az IS30 targetválasztását lehet-e módosítani, a transzpozázt a λ fágból származó hőmérsékletérzékeny (ts587) cI represszorral fúzionáltattuk. A represszor fehérjét Leu és Gln aminosavakon keresztül csatlakoztattuk a transzpozáz C-terminális részéhez, s a fúziós fehérjét *tac* promótert használva expresszáltattuk. Kimutattuk, hogy a fúziós transzpozáz 30°C-on immunitást biztosít a baktériumsejteknek a λ fág fertőzéssel szemben, amely bizonyító erejű arra nézve, hogy a fúziós fehérje felismeri a cI represszor kötőhelyét (Pabo and Lewis, 1982; Jordan and Pabo, 1988). Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a hibrid transzpozáz képes-e inszerciókat irányítani a represszor kötőhelyének közelébe, a fúziós enzimet expresszáló pMSZ184 donor és a pMSZ176 target plazmidokat TG2 sejtekbe juttattuk (4.5. A ábra). A pEMBL19-alapú target plazmid a cI represszor kötőhelye (λ fágból izolált O_R1-3 szekvencia) mellett hordozza az f1 fág replikációs origóját, s így egy helper fág segítségével fág partikulumokba csomagolható. Amennyiben a transzpozáz indukálja a donor plazmid integrációját az operátor szekvenciába, olyan fúziós replikonok képződnek, amelyek R408 transzdukcióval elválaszthatók a szülői replikonoktól (3.9. fejezet). Az integrációs helyek eloszlását restrikciós térképezéssel, míg az inszerciók pontos helyét szekvenálással határoztuk meg. Amíg a wt transzpozáz jelenlétében egyáltalán nem tudtunk fúziós plazmidokat izolálni (< 2,5x10⁻⁵), a hibrid enzim 1,5±0,9x10⁻⁴ gyakorisággal integrálta a RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó donor plazmidot a pMSZ176 targetbe. 53 restrikciósan megvizsgált transzpozíciós termék közül 31-ben az O_R1-3 régió 400 bp-os környezetében helyezkedtek el az inszerciók, míg 22 esetben ettől távolabbra térképeződtek (4.5. B ábra).



4.5. ábra A cI represszorral fúzionáltatott IS*30* transzpozáz katalizálta transzpozíció.

(A) A fúziós transzpozázt expresszáló pMSZ184, valamint a cI represszor operátor régióját tartalmazó pMSZ176 plazmidok sematikus struktúrája. Az O_R1-3 operátor régiót fekete négyzet jelzi. A fúziós plazmidokat R408 transzdukcióval válogattuk ki a transzpozon donor és target plazmidok közül (3.9. fejezet). Az integrációk pontos helyét restrikciós és szekvencia analízissel határoztuk meg. (B) Az integrációs helyek eloszlása a target replikonon. A fehér négyzetek az inszerciós események helyét, és számát mutatják.

Az inszerciós helyek szekvenciája bizonyította, hogy a fúziós fehérje szabályos transzpozíciós beépüléseket eredményezett a wt transzpozázra jellemző 2 bp-os TD-val. 16 szekvenált izolátum közül mindössze egyetlen esetben (27/1) fordult elő a célszekvencia 3 bp-os duplikációja. A target szekvenciák egymás alá rendezését követően meghatároztunk egy 24 bp többé-kevésbé szimmetrikus konszenzust (ld. 4.3. táblázat), amelyről igazoltuk, hogy több mint 50 %-ban azonos a wt transzpozáz katalizálta inszerciós helyek konszenzusával. A target szekvenciák 5 pozíciójában 60 %-nál nagyobb hasonlóságot tudtunk kimutatni, és a homológ helyek mindegyike megegyezett a CIG és CIP konszenzusokban is konzervált bázisokkal. Ugyanakkor izoláltunk három olyan inszerciós helyet (7/1, 15/1, 16/2), melyek szekvenciája csak 32-41 %-ban hasonlított a wt transzpozáz konszenzusaihoz.

A cI fúziós transzpozáz célszekvenciái	Izolátum	Távolság az	Illeszkedés a CIG és		
	neve	O _R 1-5 regiotor	CIP KOIIS	zenzusnoz	
Α					
TD		bp	CIG	CIP	
> <	1 7 /1	1702	0/22	0/21	
TAggc g tat C A cg a G gcc c TTTcg	15/1	1703	8/22	9/21	
T A tt a cAgggt ca taatgt T TT t g	1/1	1347	11/22	11/21	
c A C aT tActCA Gg caTtgc AT T t A	9/2; 19/1	1260	10/22	11/21	
TA Aagt A ta tA tg aG Ta a acTT gg	24/2	1211	9/22	10/21	
T A A aTc A at Ct Aa aG Ta T aTa T g A	28/1	1201	12/22	11/21	
T g A c g ttg g ag tc c a c gTt c T T t A	3/1; 22/2	805	13/22	13/21	
Tc tt TtA ct C g Gt g G cc T cAcT gA	17/2	379	10/22	10/21	
g t A tTgcg aC A Ac g GT taaTT T g c	29/1	342	10/22	9/21	
TAAtcaAag a A Gt a t TgcgAcaac	16/2	331	8/22	8/21	
T c Ag gc A agtg At gtTa T tA cT a A	13/1; 25/1	310	10/22	10/21	
ct A cTcAgg CA Ag tG atgtTa T tA	6/2	306	12/22	14/21	
cA A g g ccgat A Gtt t GagTt c T T ct	27/1	283	10/22	11/21	
gtc gT tttaCA Ac gtcgTg Ac Tgg	7/1	38	7/22	9/21	
B					
	pozíciók				
- $ -$	inszorojók k	constantise a pEM	BI 10 inszor	viák alanián	
	IIISZCICIOK F	Conszenzusa a pelvi	DL19 IIISZEIC	lok alapjali	
	CIC				
TAAAAAWGGCn RY CGCnWTTTTTA	CIG				
::: : : : : : : : : ፕልልስሞክልክክሮሽ ይከ ክሮሞክጥካካካሞጥልን	λ cI fúziós transzpozáz konszenzusa				
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			
Yn aaaaw n gc a ry y gc n wtttttr	CIP				

4.3. táblázat A cI represszorral fúzionáltatott IS*30* inszerciók konszenzusa a pEMBL19 plazmidon. (A) A konszenzus készítéséhez felhasznált integrációs helyek szekvenciája. A bal oldali szárnyi szekvencia az IS*30* bal végét, a jobb oldali a jobb végét határolta a fúziós termékekben. A nagy betűk a konszenzussal megegyező, a kiemelt betűk a TD-ra szimmetrikus bázisokat jelölik. A törtek az egyedi szekvenciáknak a CIG és a CIP szekvenciákkal való hasonlóságát mutatják. (B) Az integrációs helyek összehasonlítása alapján meghatározott konszenzus szekvencia. A konszenzust a CIG és CIP szekvenciák előállításánál alkalmazott kritériumok alapján készítettük (ld. 4.1. táblázat). Szürkével a 60%-ban konzervált bázisokat, kiemelt betűtípussal a szimmetrikus pozíciókat jelöltük. A szekvencialogot a WebLogo program felhasználásával (http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) állítottuk elő. (C) A konszenzus hasonlósága a CIG és CIP szekvenciákkal. Két pont a tökéletes egyezést, egy pont az alternatív bázisok valamelyikével való egyezést jelöli.

Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a fúziós enzim a represszor DNS kötő funkciója révén irányította az inszerciókat a target plazmidba. Ezt igazolja az is, hogy az operátor régió hiányában sem a fúziós, sem a wt transzpozázzal nem tudtunk inszerciókat generálni ($< 2,5 \times 10^{-5}$). Ugyanakkor a szekvencia adatok részletes elemzése alapján úgy tűnik, hogy a fúziós és a wt transzpozáz célszekvencia választása sok tekintetben megegyezik, s a transzpozázhoz kapcsolt DNS-kötő fehérje csak részben módosította a fúziós enzim target felismerését. A fúziós transzpozáz elsősorban olyan szekvenciákba indukált beépüléseket, melyek a represszor kötőhelyének közelében helyezkednek el, de nem különböznek nagyon a wt transzpozáz által preferált szekvenciáktól. Ezt igazolja az is, hogy a fúziós enzim a wt transzpozázzal megegyező

gyakorisággal integrálta a donor replikont a GOHS szekvenciába $(2\pm1,1\times10^{-2})$, illetve a RIR vég mellé $(3,9\pm2,1\times10^{-4})$. A gyakorisági adatokat tekintve azt is kijelenthetjük, hogy a GOHS sokkal vonzóbb target volt a fúziós transzpozáz számára, mint az O_R1-3 régió közeli szekvenciák $(1,5\pm0,9\times10^{-4})$, ami arra utal, hogy a hibrid enzim aktívabb lehet az IS*30* természetes HS szekvenciáin, mint a represszor kötőhelyének közelében.

Ennek ismeretében felmerült bennünk a kérdés, hogy egyáltalán sikerülhet-e ismert DNSkőtő fehérjék kötőhelyeit azonosítani az IS*30*-alapú fúziós transzpozázok felhasználásával. Ennek tanulmányozására az O_R1-3 régiót beépítettük a *S. typhimurium* MS1883 kromoszómájára (3.10. fejezet), s így nagyszámú természetes HS jelenlétében tudtuk vizsgálni a cI represszorral fúzionált transzpozáz katalizálta inszerciókat. Az integrációra képes RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó pFOL1069 konstrukciót konjugációval juttattuk a represszor kötőhelyét hordozó recipiens baktériumba, miközben a fúziós transzpozázt tac promóter felhasználásával expresszáltattuk (4.6. ábra). A beépülések pontos helyét és irányát PCR reakciókkal, illetve szekvenálással ellenőriztük.





A RIR-LIR kapcsolatot hordozó pFOL1069 plazmidot konjugációval olyan *S. typhimurium* sejtekbe juttattuk, amely egyetlen kópiában tartalmazza a genomján az $O_R 1$ -3 régiót, a cI represszorral kapcsolt IS*30* transzpozázt pedig a pMSZ329 plazmidról expresszálja. A pFOL1069 donor az R6K plazmid kódolta π fehérje hiányában nem tud replikálódni (suicide), ezért Cm^R telepeket egyedül azok a *Salmonella* sejtek képeztek, melyekben a donor plazmid integrálódott a genomba. Mivel az $O_R 1$ -3 szekvencia közvetlen a Km^R gén szomszédságában található, ezért a Km^S és Cm^R telepek aránya az operátor szekvencia közelébe irányított inszerciók gyakoriságát mutatja. A transzpozon inszerciók pontos helyét és irányát PCR reakciókkal ellenőriztük 903KmRfor (i), cat5 (ii), ildi6 (iii), és 903KmRrev (iv) primerek felhasználásával.

Amíg a wt transzpozáz 5 párhuzamos kísérletből egyetlen esetben sem eredményezett inszerciókat a markergénbe ($< 2x10^{-4}$), a fúziós fehérje jelenlétében sikerült azonosítanunk egy Km^S klónt ($6,2x10^{-4}$), melyben az integrációt 385 bp-ra térképeztük az operátor szekvenciától. Kutatócsoportunk hasonló eredményeket ért el az FljA represszorral fúzionált IS*30* transzpozáz felhasználásával is (Imre *et al.*, 2004). A kísérlet céljaként az szerepelt, hogy mozgásképtelen mutánsokat állítsanak elő egy, a baromfiból származó *S. enteritidis* izolátumból. Mivel az FljA fehérje a flagellin bioszintézisben résztvevő *fli* operon represszora, ezért esett a választás rá. Míg a wt IS*30* transzpozázzal nem sikerült mozgásképtelen mutánsokat előállítani, a fúziós transzpozázzal 600 integránsból 3 nem mozgó baktériumot izoláltak. A transzpozon inszerciót

mindhárom esetben a *fli*D génben azonosították, amely a represszor kötőhelyeként ismert operátor szekvencia közelében helyezkedik el. Eredményeink tehát egyértelműen bizonyítják, hogy a DNS-kötő fehérjékkel fúzionált IS*30* transzpozázzal célzott beépüléseket lehet generálni. Ugyanakkor mind a plazmid-, mind a genomi integránsok között viszonylag kis gyakorisággal (10⁻⁴-5x10⁻³) fordultak elő az irányított transzpozícióra utaló beépülések, amely azzal magyarázható, hogy az IS*30* transzpozáz saját DNS-kötő képessége megmaradt, s így a fúzióban használt fehérje DNS-kötése mintegy versengett a transzpozáz saját DNS-kötő aktivitásával.

4.3. Az IS30 transzpozíciója zebrahalban

4.3.1. A bakteriális transzpozáz aktivitásának vizsgálata zebrahal embriókban

A transzpozon mutagenezis rendszerek széleskörű felhasználásának többnyire az szab gátat, hogy a transzpozícióhoz sok esetben gazdafaktorok szükségesek, melyek csak rokon fajokban találhatók meg. Filogenetikai vizsgálatok során azonban egyre több esetben van arra utaló jel, hogy a transzpozonok horizontális génátvitel útján terjedhettek el a magasabb rendű élőlényekben, ami felveti annak lehetőségét, hogy találhatunk olyan kevésbé specializált mobilis elemet, amely képes transzponálni nem rokon fajok között. 1997-ben Frederico és Stephen kísérletesen is igazolta, hogy a Drosophila mauritianaból származó Mosl mariner elem megtartotta aktivitását az ízeltlábúak törzsétől filogenetikailag meglehetősen távol eső Leishmania major humán parazitában. Egy évvel később bizonyították, hogy a Mosl elem bár kis gyakorisággal, de transzponál zebrahalban is (Fadool et al., 1998). Mindezek alapján úgy gondoltuk, hogy érdemes lehet kipróbálni az IS30 alapú mutagenezis rendszert egy magasabb rendű szervezetben. Mivel a hal fejlődésgenetikai vizsgálatokhoz és a funkcionális genomtérképezéshez egyaránt szükség lenne egy hatékony, időben és térben szabályozható mutagenezis rendszerre, ezért esett választásunk a zebrahalra (Danio rerio). Első lépésben a transzpozáz katalizálta delécióképzést tanulmányoztuk egy plazmid alapú tesztelőrendszer (Farkas et al., 1996) felhasználásával. A transzpozázt egy pCS2 alapú plazmidról expresszáltattuk, vagy szintetikus mRNS formában injektáltuk az 1-2 sejtes hal embriókba. Amennyiben a transzpozáz katalizálja a rekombinációt a pJKI216 plazmidon elhelyezett IR szekvenciák között, olyan Cm^S deléciós plazmidok képződnek, melyek mikrobiológiai módszerekkel könnyen elkülöníthetők a szülői replikonoktól (4.7. ábra). A 8-10 órás embriókból (a gasztruláció vége) izolált DNS-t elektroporálással TOP10 E. coli sejtekbe juttattuk, majd replica-plating felhasználásával meghatároztuk a $\text{Cm}^{\text{S}} + \text{Km}^{\text{R}}$ és $\text{Cm}^{\text{R}} + \text{Km}^{\text{R}}$ kolóniák arányát, amely a deléciós plazmidok képződésének gyakoriságát mutatja. A Cm^S klónok struktúráját restrikciós térképezéssel és szekvenálással vizsgáltunk.



4.7. ábra Az IS*30* transzpozáz aktivitásának vizsgálata zebrahalban. Az IS*30* transzpozázt expresszáló pCS2-alapú plazmidokat, vagy az *in vitro* szintetizáltatott transzpozáz mRNS-t a pJK1216 mérőplazmiddal együtt injektáltuk az 1-2 sejtes halembriókba. A transzpozáz katalizálja a Cm^R transzpozon kivágódását a mérőplazmidból, amely Km^R + Cm^S replikonok keletkezését eredményezi. A transzpozáz aktivitását az embrionális DNS-ben található Cm^S/Km^R plazmidok aránya mutatja.

A Cm^S klónok struktúráját restrikciós térképezéssel és szekvenálással vizsgáltunk. A transzpozáz aktivitását az IR-IR kapcsolatot tartalmazó Cm^S transzpozíciós termékek előfordulásának gyakoriságával jellemeztük. A kísérletet elvégeztük olyan fúziós fehérjékkel is, melyekben az IS*30* transzpozázt a nukleoszóma lokalizációs szignál fehérjével (NLS) és/vagy a Myc-tag (MT) peptiddel kapcsoltuk össze, ami elősegítheti a transzpozáz sejtmagba jutását, illetve jelenlétében a transzpozáz nyomon követhető az embriókban. Az eredményeket a 4.4. táblázatban foglaltuk össze.

Injektált komponensek	Km ^R	Cm ^S ,Km ^R	transzpozíciós	egyéb	transzpozíciós
	kolóniák	kolóniák	termékek száma	rekombináns	aktivitás (%)
	száma	száma		termékek száma	
zebra hal					
pJKI216 + pCS2 vektor	3797	3	1	2	0.03
pJKI216 + Tp-áz termelő plazmid	1680	15	12	3	0.71
pJKI216 + NLS-Tp-áz termelő plazmid	1718	14	10	4	0.58
pJKI216 + NLS + MT-Tp-áz termelő plazmid	516	4	4	0	0.78
pJKI216 + Tp-áz mRNS	907	3	2	1	0.22
pJKI216 + NLS-Tp-áz mRNS	787	13	11	2	1.40
pJKI216 + MT-Tp-áz mRNS	567	8	7	1	1.41
pJKI216 + NLS + MT-Tp-áz mRNS	282	3	3	0	1.06

4.4. táblázat Az IS30 transzpozáz katalizálta kivágódás zebrahalban.

Függetlenül attól, hogy a transzpozázt DNS vagy mRNS formában juttattuk az embriókba, a transzpozíciós gyakoriság a transzpozáz nélküli kontroll kísérlethez hasonlítva 4-28-szorosára növekedett. Mivel az NLS fúziós transzpozáz jelenlétében sem tudtunk szignifikánsan több Cm^S transzpozíciós terméket izolálni, mint a wt transzpozáz esetén, ezért úgy gondoljuk, hogy az IS*30* transzpozáz önmagában is képes volt áthatolni a sejtmag kettős membránján, melyet később *in situ* hibridizációs kísérletekkel is alátámasztottunk, melyhez a Myc-tag ellen termeltetett monoklonális ellenanyagot használtuk.

Az inszerciós reakciók vizsgálatára egy géncsapda rendszert hoztunk létre (4.8. A ábra). A transzpozázt szintetikus mRNS formában juttattuk az 1-2 sejtes embriókba a RIR-LIR kapcsolatot hordozó donor és a GOHS szekvenciát tartalmazó target plazmidokkal együtt.



4.8. ábra Az IS30 inszerciók kimutatására kidolgozott géncsapda rendszer működése zebrahalban. (A) Az in vitro szintetizáltatott transzpozáz mRNS-t, a RIR-LIR kapcsolatot hordozó gfp-donor és a GOHS szekvenciát tartalmazó pFOL1032 target plazmidokat koinjektáltuk az 1-2 sejtes halembriókba. A target plazmid a zebrahalból izolált shh gén (vastag vonal) 1. és 2. exonja (fekete négyzetek) között hordozza a GOHS szekvenciát (szürke téglalap), míg a donor plazmid a promóter nélküli *gfp* gént tartalmazza. A splice acceptor szekvencia (intA) a ponty β -*actin* génjéből, míg a poliadenilációs szignál (polyA) SV40 vírusból származik. (B) Amennyiben a donor plazmid megfelelő irányban (sense) integrálódik a GOHS szekvenciába, a gfp génről a shh gén szabályozó elemei révén fehérje tud szintetizálódni, melynek következtében az idegcsíra állapotú embriók notocord sejtei zölden világítanak. (C) A fúziós plazmidok struktúráját PCR reakciókban ellenőriztük, amelyhez templátként a 6-8 órás embriókból izolált DNS-eket használtuk. A gfpdonornak a sense beépülését S3 (i) és IS30L (ii) primerpárok felhasználásával vizsgáltuk (bal oldali panel). Az injektálóoldat összetételét a panel felett ábrázoltuk. E-vel a PCR termék EcoRI hasítását jelöltük. A jobb oldali panel 1. csatornája az S3 (i) IS30L (ii), a 3. a cat5 (iii) 903KmR5 (iv), az 5. az S3 (i) ildi6 (v), a 7. az IS30seq261 (vi) 903KmR5 (iv) primerek PCR reakcióit, a 2. csatorna az 1. PCR temék, a 6. csatorna pedig az 5. PCR termék EcoRI hasítását mutatja. MW: 100 bp-os DNS molekulatömeg marker (Fermentase).

Amennyiben a transzpozáz katalizálja a donor plazmid integrációját a HS szekvenciába, a donorban található promóter nélküli *green fluorescent protein (gfp)* génről mRNS tud átíródni a target plazmidon elhelyezett *sonic hedgehog* gén (*shh*) szabályozó elemei révén. Mivel a *shh* az idegcsíra állapotú embriók notocord sejteiben expresszálódik, ezért azokban az embriókban melynek sejtjeiben sense irányú integráció játszódott le a notocord sejtjek zöld fényt bocsátanak ki (4.8. B ábra). Azért, hogy igazoljuk a rendszer működőképességét, *E. coliban* (TG2) is

végrehajtottuk a transzpozíciós kísérletet, és izoláltuk a fúziós plazmidokat. A sense irányú beépülést tartalmazó konstrukciót az 1-2 sejtes hal embriókba injektáltunk, s 24 óra elteltével vizsgáltuk a Gfp expresszióját. Az injektált embriók 27-40 %-ában a notocord sejteknek csak egy része világított, melynek feltehetőleg az lehetett az oka, hogy a bakteriális plazmid egyenlőtlenül szegregált az osztódó sejtekből. A notocord sejtek specifikus expressziója mellett helyenként az ektodermális sejtek is világítottak, amit a splice acceptor szekvenciával határos kriptikus szabályozó elem jelenlétével magyaráztunk. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy a géncsapda rendszer bár használható a transzpozíciós események kimutatására, a világító sejtek számán alapuló mennyiségi kiértékelés pontatlan lehet az egyenlőtlen DNS szegregáció miatt. Amíg transzpozáz mRNS hiányában 195 embrióból egyben sem találtunk zölden világító notocord sejteket, a transzpozáz jelenlétében az idegcsíra állapotú embriók 3,1 %-a expresszálta a Gfp fehérjét. Azért, hogy molekuláris szinten is igazoljuk az integrációt a donor és target plazmidok között, a bélcsíra állapotú embriók egy részéből DNS-t izoláltunk, és a fúziós plazmidok előfordulását PCR reakciókban vizsgáltuk (4.8. C ábra). Azokban az embriókban, melyekbe a szülői DNS-eket transzpozáz mRNS nélkül injektáltuk, nem tudtunk PCR terméket kimutatni, míg transzpozáz jelenlétében a transzpozondonor mindkét irányú beépülését azonosítottuk. A PCR termékek szekvenálásával bizonyítottuk, hogy a transzpozon a GOHS szekvencia közepébe integrálódott, miközben a HS központi két nukleotidja duplikálódott. A transzpozíciós termékek képződésének gyakoriságát az embriókból izolált DNS minták transzformálásával határoztuk meg. Mivel a Cm^R génnel jellemezhető gfp-donor önmagában nem képes replikálódni E. coliban (suicide), ezért a fúziós plazmidokat Cm szelekcióval választottuk el a target replikonoktól. Amíg transzpozáz mRNS jelenlétében a target plazmidok számához hasonlítva viszonylag kis gyakorisággal $(5,5\pm0,4\times10^{-5})$, de keletkeztek valódi fúziós replikonok, a transzpozáz mRNS hiányában nem tudtunk szabályos transzpozíciós termékeket izolálni (<1,4x10⁻⁵).

4.3.2. Célzott génbevitel zebrahalban fúziós transzpozáz felhasználásával

Mivel a prokarióta rendszerekben a fúziós IS30 transzpozáz felhasználásával sikereket értünk el, ezért zebrahalban is ezzel a módszerrel próbáltunk irányított beépüléseket létrehozni. A transzpozázt a humán Gli1 fehérje DNS-kötő motívumával fúzionáltattuk. A Gli1 a gerincesekben általánosan elterjedt transzkripciós regulátor fehérje, amely cink-finger motívumon keresztül köti a Gli1 kötőhelyként azonosított szekvenciákat (Kinzler *et al.*, 1988). A cink-finger motívumot Glu és Phe aminosavakon keresztül csatlakoztattuk a transzpozáz C-terminális részéhez, s a fúziós transzpozázt pCS2 expressziós vektorba klónoztuk. A transzpozíciós események kimutatására az előző fejezetben ismertetett géncsapda rendszert

használtuk. A fúziós transzpozázt szintetikus mRNS-ként injektáltuk az 1-2 sejtes embriókba a gfp-donor és a target plazmiddal együtt, amely a shh gén első intronjában hordozta a Gli1 kötőhelyek konszenzus szekvenciáját (Kinzler and Vogelstein, 1990). Az injektálást követő 24. órában in situ vizsgáltuk a Gfp expresszióját. A transzpozáz mRNS, vagy a gli-target hiányában nem találtunk zölden világító notocord sejteket egyetlen embrióban sem, míg a fúziós enzim és a Gli1 kötőhely együttes jelenlétében a notocord sejtek egy része expresszálta a Gfp fehérjét. Mindez arra utal, hogy a fúziós transzpozáz olyan inszerciókat okozott a shh génben, ami lehetővé tette *gfp* átírását. Következtetésünket nested PCR reakciókkal bizonyítottuk, amelyhez templátként a bélcsíra állapotú embriókból izolált DNS-eket, valamint S3-IS30L és S5-IS30L primer párokat használtunk (4.9. A ábra). Ezek a primerek olyan integrációs helyeket amplifikálnak, melyek az egyik irányban legfeljebb 686 bp-ra, míg a másik irányban maximum 2,5 kbp-ra találhatók a Gli1 kötőhelytől, tekintettel arra, hogy a Pfu polimeráz nem képes 3 kbpnál hosszabb DNS fragmenteket amplifikálni. A PCR fragmenteket TOPOII vektorba klónoztuk, majd szekvenáltuk. Összesen 12 független inszerciós helyet azonosítottunk, melyek közül 7 a Gli1 kötőhely 400 bp-os környezetében helyezkedett el (4.9. B ábra). Transzpozíciós fúziót viszont mindössze egyetlen esetben (#27) tudtuk kimutatni, melyben a gfp-donor LIR végét 39 bp-ra azonosítottuk a Gli1 kötőhelytől. Mivel a többi fúziós termék érintetlenül tartalmazta a donorból származó RIR-LIR kapcsolatot, ezért ezekben az esetekben nem transzpozíciós beépülés játszódott le. A transzpozáz mRNS vagy a Gli kötőhely hiányában azonban egyáltalán nem tudtunk PCR termékeket azonosítani, ami arra utal, hogy a fúziós fehérje jelenléte mindenképp elősegítette a Gli1 kötőhely közeli rekombinációt függetlenül attól, hogy a reakciót maga a transzpozáz vagy gazdaenzimek katalizálták.



4.9. ábra Irányított transzpozíció zebrahal embriókban. (**A**) A RIR-LIR kapcsolatot hordozó donor (vékony vonal) és Gli1 kötőhelyet (szürke négyzet) tartalmazó target (vastag vonal) plazmidok sematikus struktúrája. A fúziós transzpozáz generálta inszerciót nested PCR-ral vizsgáltuk IS30L-S3, majd IS30L-S5 primerpárok felhasználásával. A primerek csatolási helyét nyilakkal jelöltük. (**B**) A PCR termékek szekvenálásával azonosított izolátumok. Az ábrák feletti számok a target DNS-en mutatják az integrációk pozícióit.

4.4. Az IR végek szerepe az IS30 elem transzpozíciójában

4.4.1. Az IR mutánsok jellemzése in vivo transzpozíciós kísérletekben

Az IS30 26 bp hosszú IR végeiről már korábban kimutatták, hogy a transzpozáz Nterminális része köti, függetlenül a szekvenciák 3 bp-os eltérésétől (Stalder *et al.*, 1990). Mivel a footprint kísérletekben az egyik DNS szálon a 9-34, a másik szálon a 9-27 bp IR régió bizonyult fedettnek, így a transzpozáz kötésben fontos bázisokat nem lehetett pontosan behatárolni, mint ahogy a katalitikus reakcióhoz nélkülözhetetlen nukleotidokról sem lehet tudni semmit. Azért, hogy az egyes IR bázisok, illetve régiók szerepét részleteiben is megismerjük, mutációkat hoztunk létre az elem végeiben. Mivel több IS elemnél sem sikerült egyedi báziscserékkel fenotípussal rendelkező IR mutánsokat előállítani (pl. $\gamma\delta$, May and Grindley, 1995; IS*911*, Normand et al., 2001), ezért kísérleteinkben mindig két szomszédos bázist változtattunk. A mutációk minden pozícióban purin-pirimidin cserét eredményeztek. A RIR és LIR szekvenciákat mindig azonos pozíciókban és azonos módon változtattuk, megőrizve a végek palindrom szimmetriáját. Összességében 15 Ap^R markerrel ellátott transzpozont készítettünk, melyek végeit a Cm^R gén választotta el (4.10. ábra).



4.10. ábra Az IR végek báziscseréinek hatása a transzpozícióra.

(A) Az intermolekuláris kísérletben használt plazmidok, és transzpozíciós termékeik sematikus ábrázolása. A transzpozon integráció két lépésben történik. Előszőr a donor plazmidból helyspecifikus delécióval (SSD) körré zárt transzpozon képződik (①), amely a második lépésben (②) integrálódik a target replikonba. A transzpozondonort folytonos, a target replikont szaggatott vonallal jelöltük. A fekete kör a colE1 replikációs origót, míg a fehér a ts mutáns pSC101 origót mutatja. A téglalapba írt szám az IS30 végek hosszát, a csillag a mutáns IR-t jelöli. A báziscseréket az oszlopdiagram alatt ábrázoltuk. (B) Az oszlopdiagramon a mindkét IR végben mutációt hordozó transzpozonok fúziós gyakorisága látható. A gyakorisági adatokat a 42°C-on és 30°C-on meghatározott titerek hányadosaként számoltuk. Az adatok minden esetben 5 független mérésből származnak.

A transzpozonok aktivitását integrációs rendszerben vizsgáltuk, amelyhez az IR mutációkat hordozó donor, a GOHS szekvenciát tartalmazó target, és az IS30 transzpozázt expresszáló pazmidokat *S. typhimurium* MA1703 sejtekbe juttattuk (ld. 3.7. fejezet). Mivel a Sp/Sm^R

markerrel rendelkező target plazmid replikációja hőmérsékletfüggő, ezért 42 °C-on streptomycin szelekció mellett csak azok a sejtek tudtak kolóniává fejlődni, amelyekben fúzió alakult ki a transzpozondonor és target replikonok között. A fúziós termékek egyetlen esetben sem tartalmazták a transzpozonok végeit elválasztó Cm^R gént, így képződésük két egymást követő reakcióval magyarázható. Első lépésben a transzpozon helyspecifikus delécióval (SSD) kivágódott a donor DNS-ből, majd ezt követően integrálódott a GOHS szekvenciába (4.10. A ábra). Az IR mutációk többsége a wt konstrukcióhoz viszonyítva 1-3 nagyságrenddel csökkentette a fúzióképzés gyakoriságát (4.10. B ábra). A terminális IR mutációk (1-9 bp) sokkal jelentősebb gyakoriság csökkenést eredményeztek, mint a szubterminális régió (20-27 bp) báziscseréi. Tizenöt mutáció közül mindössze két bázispár (14-15 és 18-19) cseréjének nem volt kimutatható hatása a transzpozícióra. Ugyanakkor teljes funkcióvesztést is csak a 2-3 pozíciók báziscseréi okoztak, ami e pozíciók nélkülözhetetlen funkciójára utal.

Annak eldöntésére, hogy az egyes IR mutációk melyik transzpozíciós lépésben fejtették ki hatásukat, külön kísérletben kellett vizsgálnunk az IS30 transzpozíciójának két fő lépését. Először a cirkuláris transzpozonok képződését vizsgáltuk a mindkét IR végben mutáns (pMSZ537 származékok), valamint csak a RIR-ben mutáns (pMSZ358 származékok) transzpozondonor plazmidok felhasználásával (4.11. A ábra).



4.11. ábra Az IR mutációk hatása a cirkuláris transzpozonok képződésére.

(A) A cirkuláris transzpozonok képződése (①lépés, 4.10. A ábra). A mutáns IR-eket csillagal jelöltük, szekvenciájuk a 4.10. B ábrán látható. A wt/* jelzés arra utal, hogy a donor konstrukciók egyik csoportjában csak a RIR vég (RIR*-LIR), míg a másik csoportban mindkét IS*30* vég (RIR*-LIR*) hordozta a mutációt. X és Nc a transzpozon körök kimutatásához használt *XbaI* és *NcoI* hasítóhelyeket jelöli. (B) A cirkuláris transzpozonok kimutatása. A transzpozondonor plazmidokat tartalmazó TG2 sejtekből a transzpozáz indukciót követően DNS-t izoláltunk, amelyet *XbaI* + *NcoI* enzimekkel hasítottunk. A DNS mintákat 1% agaróz gélen választottuk el, majd gélt sybrgreen-nel festettük. A transzpozondonorból származó DNS szakaszokat fehér, a Tp-áz termelő plazmidot fekete nyílhegy jelzi. A cirkuláris transzpozonok képződésére a RIR-LIR kapcsolatotot tartalmazó 800 bp-os fragment jelenléte utal (csillag). A foto a wt és a RIR 1. pozícójában mutáns plazmidok reakcióit mutatja. MW: *PstI* hasított λ DNS marker. (C) Az oszlopdiagram a cirkuláris transzpozonok képződésének relatív gyakoriságát szemlélteti a különböző IR mutációk jelenlétében. Az adatok a sybrgreen-nel festett gél mennyiségi kiértékeléséből származnak, amelyhez a Storm840 phosphorimaging rendszerrel kapcsolt Image Quant programot használtuk. A RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó 800 bp-os DNS intenzitását hasonlítottuk a transzpozon donorból származó 3540 bp-os DNS intenzitásához. Minden mutánssal 3 független kísérletet végeztünk, melyek átlagát és szórását a wt konsrukció átlagához viszonyítva ábrázoltuk.

A transzpozáz indukciót követően DNS-t izoláltunk az IR mutáns plazmidokat hordozó TG2 sejtekből, amit restrikciós hasítással vizsgáltunk. Amennyiben a mutációk nem befolyásolják a transzpozíciós intermedier képződését, a *Xba*I + *Nco*I hasított plazmid populációban megjelenik

egy új, a RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó DNS darab (4.11. B ábra), melynek mennyisége a transzpozíciós rekció gyakoriságát jellemzi. A gyakorisági adatokat tekintve azt mondhatjuk, hogy a 4-7., 14-15. és 18-19. IR pozíciókban létrehozott mutációk nem, vagy csak csekély mértékben befolyásolták a cirkuláris intermedierek keletkezését (4. 11. C ábra). Az 1-3., 10-13. és 26-29. pozíciók mutációi csak abban az esetben gátolták a reakciót, ha azok mindkét IR végben jelen voltak, míg a 8-9., a 16-17. és a 20-25. pozíciók báziscseréi akkor is hatásosak voltak, ha azokat csak a RIR szekvencia tartalmazta. Amennyiben mindkét IR vég mutáns volt a 2-3., 8-9. és a 20-25. pozíciókban, a RIR-LIR képződés gyakorisága legalább két nagyságrenddel csökkent.

A cirkuláris intermedierek részletes vizsgálatához az IR mutációkat hordozó DNS mintákat *Eco*RI enzimmel hasítottuk majd TG2 sejtekbe transzformáltuk szelektálva a transzpozon Ap^R markerére. Mivel a transzpozondonor plazmidokban az *Eco*RI egyedül a Cm^R génben hasít, ezért transzformánsokat elsősorban a Cm^S cirkuláris transzpozonoktól vártunk. A Cm^S kolóniákból DNS-t izoláltunk, s a plazmidokat restrikciós hasítással illetve szekvenálással vizsgáltuk. A mutánsok többségénél *Pvu*II hasítással, míg a 1-3. IR mutánsoknál szekvenálással határoztuk meg a RIR-LIR kapcsolatban előforduló spacer szekvenciát (4.12. ábra). Amennyiben a transzpozon mindkét vége báziscserét tartalmazott a 20-25. IR pozíciókban, kizárólag olyan RIR-LIR kapcsolódást tudtunk azonosítani, melyben az IS*30* végeket 1 illetve 3 bp választotta el. A többi mutáns esetén a wt transzpozonhoz hasonlóan 2 bp spacer szekvenciával jellemezhető cirkuláris intermediereket izoláltunk.



4.12 ábra Az IR mutációk hatása a RIR-LIR kapcsolat szekvenciájára. A wt RIR-LIR kapcsolat 2 bp spacer szekvenciát tartalmaz, amely minden esetben az egyik IR véget határoló donor szekvenciából származik (Dalrymple, 1987; Olasz *et al.*, 1993). A kísérleteinkben használt transzpozon donor konstrukciókban a LIR és a RIR végeket azonos (GC) szekvencia határolta (fehér karikák), ezért szabályos transzpozíció esetén a cirkuláris transzpozonokban is egy *Pvu*II hasítóhely (szürke kiemelés) alakul ki. Ez alól kivételt egyedül az 1., 1-2. és a 2-3. IR mutánsok jelentenek, mivel 1. és 2. IR pozíciókban található bázisok részt vesznek a hasítóhely kialakításában. Nagy betűkkel az IS*30*, kis betűkkel a határoló szekvenciákat jelöltük.

Az IR mutációknak a transzpozon integrációra gyakorolt hatását a RIR-LIR kapcsolódást tartalmazó cirkuláris transzpozonok felhasználásával vizsgáltuk (4.13. A ábra). A mutációkat hordozó cirkuláris transzpozonokat a Tp-áz termelő és a GOHS szekvenciát tartalmazó target plazmidokkal együtt MA1703 sejtekbe jutattuk. A transzpozon integrációs gyakoriságát a

transzpozáz indukciót követően határoztuk meg (3.7. fejezet). Mivel a 20-21., a 22-23. és a 24-25. IR mutánsoknál nem tudtunk 2 bp spacerrel jellemezhető intermediert izolálni, ezért az AGC spacert tartalmazó transzpozonok integrációs gyakoriságát mértük, illetve hasonlítottuk az ugyanilyen, de wt IR végeket hordozó cirkuláris intermedierek aktivitásához. Az integrációra elsősorban a terminális IR mutációknak (2-11.), valamint a 16-17. pozíciók báziscseréinek volt hatása (4.13. B ábra). A legjelentősebben a 2-3. pozíciók mutációi gátolták az intermedier integrációját. Ha csak a RIR vég tartalmazott báziscserét 2-3. pozíciókban, közel két nagyságrenddel csökkent a transzpozon inszerció, míg ha mindkét IR mutáns volt, egyáltalán nem tudtunk integrációt kimutatni a GOHS szekvenciába (<10⁻⁷).



4.13. ábra Az IR mutációk hatása a cirkuláris transzpozonok integrációjára.
(A) A cirkuláris transzpozon integrációja GOHS hot spotba (② lépés, 4.10A ábra). A jelölések megegyeznek a 4.10. ábrán leírtakkal. (B) A diagram az egyik (RIR*-LIR) illetve mindkét IR végben (RIR*-LIR*) mutáns cirkuláris transzpozonok relatív integrációs gyakoriságát mutatja. A gyakorisági adatokat a 42°C-on és 30 °C-on meghatározott baktérium titerek hányadosaként számoltuk. Minden mutánssal 5 független kísérletet végeztünk, és a mért gyakorisági adatok átlagát és szórását a wt konstrukció átlagához viszonyítva adtuk meg.

4.4.2. A transzpozáz kötőhely azonosítása az IR végekben

A transzpozáz kötésében fontos IR bázisok meghatározásához gélretardációs kísérletet végeztünk a mutáns végek felhasználásával (3.11. fejezet). Mivel korábban már bizonyítottuk, hogy az IR végek szekvencia-specifikus felismeréséért a transzpozáz HTH2 motívuma felelős (ld. 4.1.2. fejezet), ezért az *in vitro* kötési kísérleteket a transzpozáz 134 aminosav hosszú N-terminális darabjával végeztük, melyről ismert, hogy sokkal stabilabb kötésre képes, mint a teljes fehérje (Nagy *et al.*, 2004). A tisztított transzpozázt 1 órán át inkubáltuk a báziscseréket hordozó 65 bp hosszú jobb IS*30* véggel. A DNS-fehérje komplexeket 5 % natív poliakrilamid gélen választottuk el (4.14. ábra). Amíg a 16-17. és a 20-27. IR pozíciók báziscseréi esetén nem tudtunk fehérje kötést kimutatni, az 1-15. és a 28-29. pozíciók mutációinál a transzpozáz a wt szekvenciához hasonlóan kötötte a mutáns végeket. A 18-19. pozíciók báziscseréinél három független kísérletből mindössze egyetlen esetben volt kimutatható egy gyenge kötés, ami arra utal, hogy valamilyen szinten ezek a bázisok is résztvesznek a transzpozáz kötésben, de a szerepük nem olyan jelentős, mint a 20-27. pozíciók bázisainak.



4.14. ábra A transzpozáz kötésben fontos IR pozíciók azonosítása. A kísérlethez a transzpozáz N-terminális fragmentjét (1-133 aa) és az IR mutációkat hordozó 65 bp-os jobb IS*30* véget használtuk (3.11. fejezet). A báziscseréket a gélkép alatt ábrázoltuk. A transzpozáz által nem kötött IS*30* véget fehér, a DNS-fehérje komplexet fekete nyílhegyek mutatják. A mínusszal (-) jelölt minta transzpozáz fehérjét nem tartalmaz. Szürke kiemeléssel a transzpozáz kötést megakadályozó báziscseréket jelöltük.

4.4.3. Az integrációhoz szükséges IR régiók meghatározása

Az IR mutációkat tartalmazó cirkuláris transzpozonok inszerciós gyakorisága alapján úgy tűnik, hogy a transzpozáz kötőhelyeként azonosított belső IR régió (20-27. pozíciók) nem szükséges az intermedier integrációjához (ld. 4.13. ábra). Ennek bizonyítására olyan körrézárt transzpozonokat állítottunk elő, amelyek egyre rövidebb darabokat tartalmaznak a RIR-LIR kapcsolatból (4.15. A ábra). A deléciók végpontjait a mutációs analízisben kapott eredmények figyelembevételével határoztuk meg, s így az IR végek 1-9, 1-11, 1-15, és 1-19 bp hosszú szakaszait használtuk a konstrukciók előállításához. A transzpozonok egy részénél csak a LIR szekvenciát rövidítettük a 26 bp RIR változtatása nélkül, míg a másik részénél mindkét IR véget szimmetrikusan szűkítettük. A cirkuláris transzpozonok integrációját az előzőekben ismertetett hőmérsékletérzékeny pZNA133 target felhasználásával vizsgáltuk (3.7. fejezet). Az eredményeket a 4.15. B ábra tartalmazza.





(A) A deléciós IR végeket tartalmazó cirkuláris transzpozonok és fúziós termékeik sematikus ábrázolása. A RIR-LIR kapcsolat hosszát minden esetben külön ábrázoltuk. A transzpozonok egyik csoportjában egyedül a LIR véget, míg a másik ban mindkét IR szekvenciát rövidítettük. A deléciók mindig az IR végek belső régiójából indulnak. Az ábrán alkalmazott jelölések megegyeznek az eddig használtakkal. (B) Az oszlopdiagram a transzpozíciós fúzió gyakoriságát mutatja a donor és target replikonok között. A grafikon 5 független mérés (ld. 4.10. ábra) átlagát és szórását ábrázolja.

Mivel a 20-26 bp IR régiók hiányában (19RIR-19LIR) meghatározott integrációs gyakoriság $(4,1\pm2,5x10^{-1})$ szignifikánsan nem különbözik a 26RIR-26LIR kapcsolódást tartalmazó transzpozonétól (7,7±1,4x10⁻¹), ezért azt mondhatjuk, hogy az IR végek 1-19 bp-os régiója valóban elegendő a körré zárt IS*30* intermedier integrációjához. A 15RIR-15LIR kapcsolódás esetén viszont már nem tudtunk integrációt kimutatni (<10⁻⁶), ami a 16-19. pozíciók bázisainak lényeges szerepére utal. Az ép 26 bp RIR szekvencia azonban képes volt szupresszálni a LIR vég delécióját, hiszen a 26RIR-15LIR, vagy a 26RIR-11LIR kapcsolódást tartalmazó transzpozonok integrációs gyakorisága (1,4±0,4x10⁻¹, illetve 1,7±0,5x10⁻¹) alig maradt el a wt transzpozonóki. A 10-26 bp régió deléciója (26RIR-9LIR) viszont több mint három nagyságrenddel csökkentette a transzpozon integrációs gyakoriságát (2,9±1,5x10⁻⁴), ami a 9-10. IR pozíciók lényeges szerepére utal. A LIR szekvencia teljes hiányában pedig csak 4,9±1,2x 10⁻⁶ gyakorissággal tudtunk fúziós plazmidokat izolálni, melyek azonban már strukturálisan különböztek a "valódi" transzpozíciós termékektől. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy a cirkuláris intermedierek integrációjához az IR végek 1-9 bp-os szakaszai feltétlenül szükségesek, míg a 10-19 bp-os régió jelenléte már az egyik végben elégséges.

4.4.4. Az IR mutációk hatása a spacer bázisok származására

Mivel a körré zárt IS elemekben az IR szekvenciák között található spacer nukleotidok mindig a targetként funkcionáló vég mellől származnak (Polard and Chandler, 1995; Lewis and Grindley, 1997), ezért egy olyan transzpozondonor konstrukcióban, amelyben a RIR és LIR végeket eltérő szekvenciák határolják, vizsgálni lehet a végek transzpozícióban betöltött szerepét. Annak megállapítására, hogy az egyes báziscserék mennyiben befolyásolják az IS30 végek donor illetve target aktivitását, a mutáns RIR szekvenciát GC, míg a wt LIR véget AT szekvencia környezetbe helyeztük (4.16. A ábra). Az ilyen felépítésű transzpozondonor konstrukciókból elméletileg kétféle cirkuláris transzpozon képződhet, melyek csupán a spacer bázisokban különböznek egymástól. A spacer szekvenciák eredete pedig egyértelmű bizonyíték arra, hogy a mutációkat hordozó vég donorként vagy targetként funkcionált a reakcióban. A transzpozíciós kísérleteket TG2 sejtekben végeztük az IS30 transzpozázt expresszáló pJKI324 plazmid jelenlétében. A transzpozáz indukciót követően DNS-t izoláltunk minden egyes mutánsból, s a spacer szekvenciák származását restrikciós hasítással vizsgáltuk. Amennyiben a mutációt hordozó RIR vég szerepelt targetként a reakcióban, a cirkuláris transzpozonokban GC bázisok találhatók, ami PvuII-vel hasítható, míg ha a wt LIR volt a target, a RIR-LIR kapcsolat AT bázisokat tartalmaz, ami nem hasítható az enzimmel. Ez alól kivételt az 1., 1-2. és a 2-3. IR mutánsok képeznek, mivel az IS30 végek 1-2. pozícióiban található bázisok részt vesznek a PvuII hasítóhely kialakításában (4.16. A ábra). Az 1-2. mutánsnál így Eco47III, a 2-3.-nál XhoI

enzimek felhasználásával, míg az 1. IR pozíció báziscseréjénél csak szekvenálással tudtuk meghatározni a spacer bázisok eredetét. Az 1-2. és a 2-3. mutáns kivételével minden konstrukcióból, beleértve a wt transzpozont is, 96-98 %-ban PvuII-vel hasítható, azaz AT bázisokat hordozó RIR-LIR kapcsolatot azonosítottunk (4.16. B ábra), ami arra utal, hogy a wt LIR szekvencia többnyire targetként, míg a mutációkat hordozó RIR vég donorként szerepelt a reakcióban. Az 1-2. mutáns esetén kb. 50-50 %-ban fordult elő a kétféle cirkuláris transzpozon, míg a 2-3. pozíciókban mutáns transzpozonból egyedül a GC bázisokat tartalmazó RIR-LIR kapcsolatot azonosítottuk. Ez utóbbi esetben 60 egyedi mintából sem tudtunk egyetlen olyan cirkuláris transzpozont sem izolálni, amely wt transzpozonra jellemzően AT bázisokat hordozott volna az IR végek között. Mindez arra utal, hogy a 2-3. pozíciók mutációja gátolta a RIR vég donor aktivitását, s így a mutáns vég csak targetként volt működőképes a transzpozícióban. Ennek ismeretében jól magyarázhatók a 2-3. mutáns transzpozonnal mért gyakorisági adatok is (ld. 4.11. B ábra). A mindkét végben mutáns transzpozonból csak kis gyakorisággal képződött (~10⁻⁵) RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó cirkuláris intermedier, mivel egyik IR vég sem működött donorként, míg az egyik végben mutáns transzpozonból viszonylag nagy gyakorisággal keletkezett $(2,5\pm0,8\times10^{-1})$, hiszen a wt LIR szekvencia tökéletesen szupresszálta a RIR vég mutációját.



В



4.16. ábra Az IR mutációk hatása a spacer képződésre.

(A) Kétféle cirkuláris transzpozon keletkezése eltérő határoló szekvenciák jelenlétében. A transzpozonok wt bal végét mindig AT, míg a mutációkat (csillag) tartalmazó jobb véget GC bázisok határolják. Az IR mutációk a 4.10. ábrán láthatók. A nyilak restrikciós hasítóhelyeket jelölnek. A Pv *Pvu*II, az X mutációktól függően *Pvu*II, *Eco*47III, illetve *Xho*I hasítóhelyeket jelez. A táblázat a wt, az 1-2., illetve a 2-3. IR pozíciók mutációi esetén mutatja az X-szel jelölt hasítóhelyeket. Az IR bázisokat nagy, míg a többit kis betűkkel jelöltük. A restrikciós hasítóhelyeket aláhúzás, a mutációt csillag jelzi. (B) A RIR-LIR kapcsolatban található spacer szekvenciák származásának meghatározása. A transzpozondonor és a Tp-áz termelő plazmidokat tartalmazó TG2 sejtekből a transzpozáz indukciót követően DNS-t izoláltunk, amit Pv és X restrikciós enzimekkel hasítottunk. A DNS mintákat 1% agaróz gélen választottuk el, majd a gélt sybrgreen-nel festettünk. Az AT bázisokat tartalmazó I. RIR-LIR csatlakozást egy 820 bp, míg a GC bázisokat hordozó II. cirkuláris transzpozont egy 640 bp hosszú DNS darab megjelenése jelzi. A transzpozondonorból származó DNS-eket fehér, a Tp-áz termelő plazmidot fekete nyílhegy mutatja. MW: *Pst*I-hasított λ DNS marker.

4.4.5. A 2-3. IR pozíciók szerepe a DNS hasításban

A cirkuláris intermedierek képződése az eddig vizsgált transzpozonoknál két egymást követő lépésben alakult ki (Turlan *et al.*, 2000). Az első lépést mindig önmagában a transzpozáz katalizálja, miközben a donorként funkcionáló IR vég mellett hasítja a DNS egyik szálát, kialakítva egy 3' OH csoportot az elem végén (4.17. ábra). Ezt követően a szabad -OH csoport kapcsolódik az IS elem másik, azaz a targetként funkcionáló IR végéhez egy 8 formájú DNS struktúrát képezve (Polard and Chandler, 1995).



4.17. ábra A RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó cirkuláris transzpozon képződése. A transzpozáz az IS elem egyik IR vége mellett hasítja a DNS egyik szálát, ami 3' OH csoportot eredményez az elem végén (1. nyíl). A szabad 3' OH nukleofil támadást indít ugyanezen DNS szálon a másik IR vég közvetlen közelében (2. nyíl), létrehozva ezzel egy nyolcas alakú struktúrát, melyben a transzpozon egyik szála már körré zárt, míg a másik szálon még a donor DNS-hez kapcsolódik. A második lépésben a gazda replikációs és repair enzimeinek közreműködésével a "nyolcas forma"megoldódik és kialakul a RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó körré zárt IS elem.

Mivel a 8-as struktúrát a baktérium replikációs és repair rendszere alakítja kovalensen zárt IS körré (Turlan et al., 2000; Duval-Valentin et al., 2004), ezért egy sejtmentes transzpozíciós rendszerben a cirkuláris transzpozont nem lehet kimutatni, míg a 8-as struktúra felhalmozódik. Ebből kiindulva a 2-3. IR mutációk 8-as képzésre gyakorolt hatását in vitro kísérletekben vizsgáltuk (3.12. fejezet). A mindkét végben mutáns pMSZ522, valamint a RIR végben mutáns pMSZ416 transzpozondonor konstrukciókat a wt transzpozont tartalmazó pMSZ358 plazmidhoz (4. 18. A ábra) hasonlóan egy órán át inkubáltuk a tisztított IS30 transzpozázzal (3.12. fejezet), majd AlwNI enzimmel hasítottuk. Mivel az AlwNI-nek egyedül a transzpozonok belsejében van felismerőhelye, ezért a hipotetikus 8-formából a hasítást követően egy α-alakú struktúra képződik, amely agaróz gélben lassabban vándorol, mint a linearizált donor plazmid. Amíg a mindkét IR-ben mutáns pMSZ522 esetén nem tudtunk kimutatni az α-formának méretben megfelelő DNS darabot, a wt pMSZ358 és a RIR végben mutáns mintákban megjelent egy új, a linearizált transzpozontól nagyobb DNS fragment (4. 18. B ábra felső panel). A DNS szakaszok izolálását követően szekvenálással bizonyítottuk, hogy azok valóban tartalmazták az egyszálas RIR-LIR kapcsolatot. Mivel a pMSZ522 jelenlétében nem tudtuk igazolni a mutáns végek kapcsolódását, ezért azt mondhatjuk, hogy a 2-3 pozíciók mutációja vagy a transzpozíciós hasítást vagy az azt követő száltranszfer reakciót gátolta.

A hasítás vizsgálatára primer extenziós kísérletet végeztünk a plazmidok *in vitro* transzpozíciós reakcióinak felhasználásával (3.13. fejezet).



4.18. ábra A 2-3. IR pozíciók/bázisok szerepe a transzpozíciós hasításban.

(A) A pMSZ358 transzpozondonor és *in vitro* transzpozíciós termékei. Attól függően, hogy az IS30 transzpozáz melyik IR vég mellett hasít először, kétféle 8-as struktúra képződhet. **①** esetén a RIR, míg a **②**-nél a LIR vég mellett történt a számozott nyilakkal jelölt hasítás. A fekete és fehér nyílhegy a kísérletben használt *Bst*YI illetve *Alw*NI hasítóhelyeket jelöli. A primer extenzióhoz használt cat5 csatolási helyét, s a DNS szintézis irányát az ábrákhoz illesztett nyilak mutatják. (**B**) Primer extenziós kísérlet. A tisztított IS30 transzpozázt 1 órán át inkubáltuk a wt pMSZ358 valamint a 2-3. RIR és LIR pozíciókban (RIR* LIR*) illetve csak a RIR végekben (RIR* LIR) mutáns konstrukciókkal. A transzpozáz eltávolítását követően a DNS populációkat *Alw*NI, illetve *Bst*YI enzimekkel hasítottuk. Az *Alw*NI-gyel hasított mintákat 1% agaróz gélen választottuk el (felső panel). A 8-as struktúrát szürke nyíl jelzi. A *Bst*YI enzimmel hasított DNS-ek a primer extenziós reakció templátjaiként szolgáltak. A szintézist Pwo polimeráz és ³²P izotóppal jelölt cat5 primer felhasználásával végeztük (ld. 3.13. fejezet). A reakcióelegyet 6% poliakrilamid gélen választottuk el (alsó panel). A gélkép jobb oldalán a RIR mutáns transzpozodonor (pMSZ416) Sanger-féle szekvenáló reakciói láthatók. A szekvencián a RIR vég bázisait szürke kiemelés, a 2-3. pozíciók mutációit csillag jelzi. A *Bst*YI hasítást fekete nyílhegy, a transzpozodonor (pMSZ416)

Mivel a 2-3. pozíciókban mutáns IR végek kizárólag targetként funkcionáltak a transzpozíciós reakcióban (ld. 4.4.4. fejezet), ezért a RIR végben mutáns pMSZ416 plazmidból elméletileg csak egyféle, a 4.18. A ábrán @-sel jelölt 8-as képződhet, amelyhez a wt LIR szekvencia melletti hasítás vezet. Amennyiben a 2-3. mutáció csak a száltranszfer reakciót gátolja, akkor a transzpozáz a mutáns RIR 3' vége mellett is hasíthatja a donor plazmidot, miközben egy szabad 5' foszfát csoport keletkezik a RIR véget határoló szekvenciában. Ezen 5' láncvég jelenléte legegyszerűbben primer extenzióval vizsgálható (4. 18. A ábra). Mivel a reakcióban jelen lévő szülői replikonokról képződő eltérő hosszú DNS darabok zavarhatják a transzpozíciós hasításból származó DNS szakaszok kimutathatóságát (smear-es gélkép), ezért az *in vitro* reakciókat a szintézist megelőzően *Bst*YI enzimmel kezeltük. A *Bst*YI hasítás következtében a donor

plazmidból egy 157 bp-os DNS darabnak kell keletkezni, amely 6 % poliakrilamid gélen elválasztható a transzpozíciós hasítás következtében várt 91 bp hosszú termékektől. Transzpozíciós hasításra utaló DNS fragmentet kizárólag a wt IR végeket tartalmazó pMSZ358 *in vitro* reakciójából tudtunk kimutatni (4.18. B ábra alsó panel). Mivel a transzpozáz pontosan az IR szekvencia 3' vége mellett hasította a transzpozont, így csak egyetlen, azaz a várt 91 bp-os DNS fragmentet detektáltuk. Mindebből az következik, hogy az IS*30* transzpozáz az irodalomból ismert DDE transzpozázokhoz hasonlóan az IR szekvenciák 3' vége mellett hasított, s a 2-3. IR pozíciókban létrehozott báziscserék magát a hasítást gátolták.

4.5. A szubterminális IS30 szekvenciák szerepe a transzpozícióban

4.5.1. Az IR végekkel határos szekvenciák hatása a transzpozícióra

Az előző fejezetekben rámutattunk arra, hogy az IS30 IR végeiben alig van néhány nukleotid (14-15., 18-19. IR pozíciókban), melynek ne lenne lényeges szerepe a RIR-LIR képzésben, vagy annak integrációjában. Továbbra is kérdés maradt viszont, hogy a 26 bp IR szekvenciák jelenléte elegendő-e a hatékony transzpozícióhoz. Ennek eldöntésére olyan transzpozonok integrációs gyakoriságát vizsgáltuk, melyek eltérő hosszú végeket tartalmaznak az IS30 elemből. A kísérlethez a pMSZ85 és pMSZ88 plazmidokat használtuk. Amíg a pMSZ88 egyedül a 26 bp IR szekvenciákat, a pMSZ85 az 1-173 bp bal (173L), és a 965-1221 bp jobb (257R) IS30 végeket tartalmazza. Mindkét transzpozon replikációképes, Ap^R markerrel rendelkezik és IR végeit a Cm^R gén határolja. A transzpozonok integrációját az előzőekben már ismertett intermolekuláris kísérleti rendszerben vizsgáltuk (ld. 3.7. fejezet), amelyhez az IS30 transzpozázt expresszáló pJKI324, GOHS szekvenciát hordozó pZNA133 target és a transzpozondonor konstrukciókat S. typhimurium MA1703 sejtekbe juttattuk (4.19. A ábra). A fúziós plazmidok struktúráját kolónia PCR-ral és restrikciós hasítással vizsgáltuk. A transzpozíciós gyakoriságokat a 4.19. B ábra tartalmazza. A 26 bp IR végekből álló transzpozon integrációs gyakorisága (2,85±0,86x10⁻³) közel két nagyságrenddel volt kisebb, mint a pMSZ85 transzpozíciós gyakorisága (2,27±0,35x10⁻¹), ami arra utal, hogy a hosszabb IS30 végek jelenléte elősegítette a transzpozíciót.

Ahhoz, hogy eldöntsük melyik reakció hatékonyságát növelte az IR végeket határoló szekvenciák jelenléte, független kísérletekben kellett vizsgálnunk a transzpozíció két egymást követő lépését. Először a pMSZ88 és pMSZ85 plazmidokból származtatható cirkuláris transzpozonok (pMSZ88C és pMSZ85C) integrációját teszteltük. A kísérleteket az előzőekhez hasonlóan MA1703 sejtekben végeztük (ld. 3.7. fejezet), azzal a különbséggel, hogy az intermediereknek különböző target plazmidokkal való reakcióját is megvizsgáltuk. A GOHS

szekvenciát hordozózó pZNA133, valamint négy eltérő IS*30* véget (LIR, RIR, 464L, illetve 257R) tartalmazó plazmid target aktivitását mértük. A gyakoriságokat a 4.19. C ábra tartalmazza.



4.19. Ábra Az IR végeket határoló IS30 szekvenciák hatása a transzpozícióra.

(A) A cirkuláris transzpozonok képződése (①) és integrációja a különböző célszekvenciákat tartalmazó target replikonba (②). Az ábrán alkalmazott jelölések megegyeznek a korábban használtakkal. (B) Az oszlopdiagram a 26 bp IR szekvenciákat hordozó pMSZ88, valamint a 173L és 257R végeket hordozó pMSZ85 transzpozondonor plazmidok integrációs gyakoriságát mutatja a GOHS szekvenciát tartalmazó target plazmidba (①+②lépés). Mivel a target plazmid hőmérsékletérzékeny replikációs origót tartalmaz, ezért Ap + Sp/Sm szelekció mellett 42°C-on csak a fúziós plazmidokat tartalmazó baktériumok tudnak kolóniát képezni. A gyakorisági adatokat a 42°C-on és 30°C-on meghatározott titerek hányadosaként számoltuk. Az adatok 5 független mérésből származnak, melyek átlagát és szórását ábrázoltuk a grafikonon. (C) A különböző hosszú IS30 végeket tartalmazó cirkuláris transzpozonok integrációs gyakorisága a GOHS szekvenciát, valamint a 26 bp RIR, a 257R, a 26 bp LIR, és a 464L végeket hordozó target plazmidokba (②lépés). A fehér oszlopok a 26 bp IR végeket tartalmazó pMSZ88C, míg a szürke oszlopok a 173L és 257R végekből felépített pMSZ85C integrációs gyakoriságát mutatják. Minden konstrukcióval 5 független mérést végeztünk, és ezek átlagát és szórását ábrázoltuk a diagramon. (D) Cirkuláris transzpozonok képződésének gyakorisága a pMSZ88 és pMSZ85 donor plazmidokból (①lépés). Az adatok 5 párhuzamos mérésből származnak.

A GOHS szekvenciát tartalmazó pZNA133 vonzóbb target volt mindkét transzpozon számára, mint a jobb, vagy bal IS30 végeket hordozó plazmidok. A két intermedier inszerciós gyakoriságában azonban nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni sem a GOHS, sem a 26 bp IR végek jelenlétében. Ugyanakkor a 464L és a 257R végek 3-6-szor gyakrabban használódtak targetként, mint a 26 bp hosszú LIR vagy RIR szekvenciák. A pMSZ85C donor 2-3-szor nagyobb gyakorisággal integrálódott a hosszabb IS30 végek mellé, mint a csupasz RIR-LIR kapcsolatot hordozó pMSZ88C. Mindez arra utal, hogy cirkuláris transzpozonok HS integrációjához a 26 bp-os RIR-LIR kapcsolat jelenléte elegendő, de a lecsupaszított IR szekvenciák nem tartalmazzák a végek mellé történő beépüléshez szükséges összes információt. Mivel az IR-targeting során, csakúgy mint a cirkuláris transzpozonok képződésekor, kialakul egy transzpozíciósan aktív RIR-LIR kapcsolat, ezért valószínűsíthető, hogy a szubterminális szekvenciáknak a RIR-LIR képzésben van szerepe, s ez magyarázhatja a 26 bp IR szekvenciák gyengébb target aktivitását is.

Az IR végeket határoló IS30 szekvenciáknak a RIR-LIR képzésre gyakorolt hatását intramolekuláris kísérleti rendszerben vizsgáltuk a pMSZ85 és pMSZ88 transzpozondonor plazmidok felhasználásával (ld. 3.6. fejezet). A kísérletet TG2 sejtekben végeztük a transzpozáztermelő pJKI324 jelenlétében. Transzpozáz indukciót követően DNS-t izoláltunk a baktériumokból, amelyben transzformálás, majd replica-plating felhasználásával vizsgáltuk a Cm^S plazmidok előfordulását. Mivel a Cm^R gén vesztése az IR végek kapcsolódása során alakul ki (① reakció, 4.19. A ábra), ezért a Cm^S/Cm^R kolóniák aránya a cirkuláris transzpozonok képződését tükrözi. Amíg a szubterminális szekvenciákat hordozó pMSZ85 donorból közel 50 %, a csupasz IR végeket tartalmazó pMSZ88-ból mindössze 0,4 % gyakorisággal képződtek Cm^S termékek (4.19. D ábra). A Cm^S plazmidokról restrikciós hasítással, illetve szekvenálással igazoltuk, hogy azok mindegyike hordozza a RIR-LIR kapcsolatot. Mindebből az következik, hogy a szubterminális IS*30* szekvenciák az IR végek kapcsolódását, azaz ténylegesen a RIR-LIR képzést segítették.

4.5.2. A RIR-LIR kapcsolat kialakulásának in vivo vizsgálata

Az IR végek kapcsolódását tartalmazó cirkuláris transzpozonok keletkezése egy átmeneti 8-as formájú DNS struktúrán keresztül valósul meg (ld. 4.17. ábra). A 8-forma képződését önmagában a transzpozáz katalizálja, míg annak továbbalakulásához gazdaenzimek közreműködése is szükséges (4.4.5. fejezet). Azért, hogy megállapítsuk, vajon a szubterminális szekvenciák a 8-as képződését vagy azt követő repair folyamatot segítik, a pMSZ88, illetve a pMSZ85 plazmidokat hordozó TG2 sejtekből a transzpozáz indukciót követően DNS-t izoláltunk. Mivel a standard DNS tisztításnál használt alkalikus feltárás során a nickelt DNS sérülhet, ezért a 8-forma kinyeréséhez egy kevésbé agresszív DNS tisztítási eljárást, az úgynevezett cleared lysate módszert (Clewell and Helinski, 1969; Polard *et al.*, 1995) választottuk. A DNS preparátumokat *Alw*NI és *Xho*I enzimekkel hasítottuk. A *Xho*I-nek a transzpozondonor plazmidokban nincs, míg a transzpozáztermelő pJKI324, illetve a Tp-áz negatív pJKI88 plazmidokban egyetlen felismerőhelye van, s így linearizálja azokat. Az *Alw*NI egyedül a transzpozonok belsejében hasít, melynek következtében, a donor plazmidokat és a cirkuláris transzpozonokat lineárissá alakítja, míg a 8-formából egy α -alakú struktúra képződik, amely agaróz gélben lassabban vándorol, mint a többi DNS forma (4.20. ábra). Transzpozáz indukció hatására a pMSZ85 donor plazmidokat tartalmazó preparátumokban láthatóvá vált egy 4,42 kbp-os fragment, amely igazolta a pMSZ85C cirkuláris transzpozon képződését (ld. 1-4. minta). Amennyiben növeltük a gélbe felvitt DNS mennyiségét, egy újabb fragment is megjelent, amely méretben megfelelt a 8-formából képződő α alakú struktúrának (ld. 3. és 5. minta). A pMSZ85-tel ellentétben a 26 bp IR végeket tartalmazó pMSZ88 esetén nem tudtuk kimutatni sem a cirkuláris transzpozon, sem a 8-forma képződését (ld. 6-9. minta), ami arra utal, hogy a szubterminális szekvenciák inkább a 8-as képzést, mint annak megoldódását segítették.



4.20. ábra A "nyolcas-forma" in vivo kimutatása.

A sybrgreen-nel festett gél a pMSZ85 és pMSZ88 plazmidokból transzpozáz indukció hatására képződő DNS struktúrákat mutatja. A "cleared lysate" módszerrel készített DNS preparátumokat AlwNI és XhoI enzimekkel hasítottuk. A 2-3. és 7-8. minták a transzpozondonor mellett a pJKI324 Tp-áz termelő plazmidot is tartalmazzák. A 3. és 8. csatornákba kb. 20-szor több DNS-t juttattunk, mint a 2. és 7. csatornákba. Az 1. és 6. minták a Tp-áz termelő pJKI324 helyett a pJKI88 plazmidot tartalmazzák, amelyből hiányzik a Tp-áz gén. Az 5. és 10. minták a pMSZ85, illetve pMSZ88 plazmidok in vitro transzpozíciós reakcióiból származnak (lsd. 4.6.3. fejezet). A 4. és 9. csatornák a pMSZ85C és pMSZ88C cirkuláris transzpozonokat, míg a 11. és 12. csatornák a Tp-áz termelő pJKI324, illetve pJKI88 plazmidokat tartalmazzák. Mw: PstI-hasított λ DNS. A fehér nyílhegy a cirkuláris transzpozonok, míg a fekete nyílhegy a "nyolcasok" képződését mutatja.

4.5.3. A RIR-LIR képzés vizsgálata in vitro transzpozíciós rendszerben

Mivel a 8-as megoldódását a gazda replikációs és repair enzimei katalizáják (Duval-Valentin *et al.*, 2004), ezért egy sejtmentes transzpozíciós rendszer alkalmasabb lehet a 8-as képzés tanulmányozására, s bizonyíthatja a transzpozáz aktív szerepét a reakcióban. A standard reakció körülmények között (ld. 3.12. fejezet) azonban nem tudtunk különbséget kimutatni a 26 bp IR, illetve a hosszabb IS*30* végeket hordozó konstrukciók 8-as képzésében (ld. 4.20. ábra 5. és 10. minta), így az inkubációs idő, valamint a transzpozáz koncentráció változtatása mellett vizsgáltuk az intermedier kialakulásának kinetikáját. Az első kísérletben 1 órán át növekvő mennyiségű transzpozázzal (0-20 µl preparátumból), majd ezt követően adott mennyiségű transzpozázzal (20 µl a tisztított preparátumból), de eltérő ideig (0-1 h) inkubáltuk a pMSZ85 és pMSZ88 plazmidokat. A transzpozíciós reakció leállítását követően a DNS-eket *Alw*NI enzimmel hasítottuk, és a 8-as formát sybrgreennel festett agaróz gélen választottuk el (4.21. ábra). A transzpozáz koncentrációjának emelésével mindkét plazmidból egyre több 8-as keletkezett, de a telítési mennyiséget a pMSZ85 esetén alacsonyabb transzpozáz koncentrációnál értük el, mint a 26 bp IR végeket tartalmazó pMSZ88-nál (4.21. A ábra). A konstrukciók közötti különbség még jelentősebb volt, ha az inkubációs idő függvényében vizsgáltuk 8-as képződését (4.21. B ábra). Amíg a pMSZ85 *in vitro* reakcióiban már 5 perc elteltével maximális mennyiségben volt jelen az intermedier, a 26 bp IR végeket tartalmazó pMSZ88 jelenlétében csak a 45. percben érte el a telítési szintet. Mindez megerősíti korábbi feltevésünket, miszerint a szubterminális IS*30* végek magát a 8-as képzést segítik, s egyben bizonyítja, hogy a transzpozáznak valamilyen módon fel kell ismernie az IR végeket határoló szekvenciákat.



4.21. ábra Az IR végeket határoló IS*30* szekvenciák hatása az *in vitro* "nyolcas képzésre". A sybrgreen-nel festett gél a pMSZ85 és pMSZ88 transzpozondonor plazmidok *in vitro* transzpozíciós reakcióit mutatja. (**A**) A donor plazmidokat 1 órán át inkubáltuk a tisztított IS*30* transzpozáz preparátum különböző mennyiségeivel, (**B**) illetve különböző ideig inkubáltuk azonos mennyiségű (20 µl) transzpozázzal. A tisztított Tp-áz mennyiségét, és az inkubációs idő hosszát külön jeleztük. A transzpozáz kezelést követően a deproteinizált mintákat *Alw*NI enzimmel hasítottuk. A 8-formára nyílhegy mutat. Mw: *Pst*I-hasított λ DNS. A gélek alatti diagramok a "nyolcas-forma" mennyiségi viszonyait mutatják (**A**) a transzpozáz koncentráció (**B**) és az inkubációs idő függvényében. A mennyiségi értékeket az Image Quant program felhasználásával határoztuk meg a 8-formát tartalmazó sávok és a háttér intenzitásának hányadosaként. Az adatok 3 párhuzamos mérésből származnak.

4.5.4. A transzpozáz kötődésének vizsgálata a szubterminális szekvenciákhoz

Az *in vitro* transzpozíciós kísérletek eredményei felvetették annak a lehetőségét, hogy a szubterminális IS30 végek direkt, szekvencia-specifikus kapcsolatba lépnek a transzpozázzal. Ennek vizsgálatára gélretardációs kísérleteket végeztünk a 26 bp-os IR, és az IR szekvenciák nélküli IS30 végek (L₂₇₋₁₇₃: 27-173 bp bal és R₁₁₁₅₋₁₁₉₅: 1115-1195 bp jobb vég) felhasználásával. Az *in vitro* kötési kísérleteket a wt IS30 transzpozáz, valamint 134 aminosav hosszú N-terminális darabjával végeztük (3.11. fejezet). A DNS-fehérje komplexeket natív poliakrilamid gélen választottuk el a szabad végektől. Amíg a csupasz LIR és RIR végeket a wt és a csonka transzpozáz is kötötte, az IR nélküli szekvenciáknál különböző reakció körülmények ellenére sem tudtuk kimutatni szekvencia-specifikus kötést (4.22. ábra).



4.22. ábra A szubterminális IS*30* szekvenciák szerepe a transzpozáz kötésben. A gélretardációs kísérlet az IS*30* transzpozáz N-terminálisának (1-133 aa) felhasználásával végeztük. A LIR és RIR jelölt minták (1-4.) a 26 bp-os IR végeket, az L₂₇₋₁₇₃ és R₁₁₁₅₋₁₁₉₅ DNS-ek az IS*30* 27-173 és 1115-1195 bp-os régióit tartalmazzák. A + és - jelek a transzpozáz jelenlétét, illetve hiányát jelzik. A fehér nyílhegyek a szabad oligókat, a fekete nyílhegyek a DNS-fehérje komplexeket mutatják.

Meg kell azonban jegyezni, hogy a teljes IS30 transzpozáz magát az IR szekvenciákat is csak nagyon gyengén kötötte, s így nem biztos, hogy egy lazább kölcsönhatás kimutatására egyáltalán alkalmas lehet. Sőt az is elképzelhető, hogy a szubterminális szekvenciákhoz eleve csak akkor lehet kötést kimutatni, ha az IR végek már fedve vannak a transzpozáz által. A transzpozáz N-terminálisa azonban feltehetőleg nem lép kölcsönhatásba a szubterminális szekvenciákkal, hiszen a korábbi footprint kísérletekben sem tudták a csonka transzpozáz kötését kimutatni az IR végeken kívüli szekvenciákhoz (Stadler *et al.*, 1990).

4.5.5. Az IR végeket határoló régió deléciós analízise

Azért, hogy meghatározzuk, milyen hosszú régió szükséges az IS30 szekvenciából a hatékony RIR-LIR képzéshez, olyan transzpozonokat állítottunk elő, melyek különböző hosszú darabokat tartalmaznak a végekből. A transzpozonok egyik csoportja az IS30 bal végéből (LE), míg a másik fele a jobb végéből (RE) hordozott eltérő hosszú szakaszokat, miközben a transzpozon másik végét a wt 257R, illetve 464L végek határolták (4.23. ábra). Az IS30 végeket minden esetben a Cm^R gén választotta el, ahogy a pMSZ88 és pMSZ85 plazmidoknál. Minden konstrukcióval két in vivo transzpozíciós kísérletet végeztünk. Intramolekuláris kísérletben vizsgáltuk a Cm^R gén vesztését, azaz a cirkuláris transzpozonok képződését (ld. 4.19. A ábra ① reakció, 3.6. fejezet), míg intermolekuláris rendszerben a transzpozonok integrációját a GOHS szekvenciába (ld. 4.19. A ábra ① + ② reakció, 3.7. fejezet). Az IS30 szekvenciák hosszának növelésével mindkét reakció gyakorisága emelkedett (4.23. ábra). Mivel a transzpozon inszerciók gyakorisága alig volt kisebb a Cm^S cirkuláris transzpozonok előfordulásának gyakoriságától, ezért azt mondhatjuk, hogy a körré zárt intermedierek 60-80 %-os gyakorisággal integrálódtak a HS szekvenciába, ahogy azt a pMSZ85C, illetve pMSZ88C konstrukcióknál is tapasztaltuk (ld. 4.19. C ábra). Ebből adódóan mindkét reakció valójában az RIR-LIR képzés mértékét tükrözi. Az IS30 bal végét tekintve megállapíthatjuk, hogy a szekvencia rövidítése fokozatosan csökkentette a cirkuláris intermedier kialakulásának gyakoriságát (4.23. A ábra). A 68 és 77 bp hosszú végek között 4-5-szörös, míg a 35 és 45 bp-os végek összehasonlításában 2-3-szoros gyakoriság különbség volt kimutatható. Továbbá az 58L és 45L végek között is érzékelhető volt egy kb. 2-szeres különbség, ami azonban a szórások átfedése miatt nem tekinthető szignifikáns eltérésnek. A jobb vég esetén viszont csak a 26 bp-os RIR és 49R végek összehasonlításában tudtunk gyakoriság különbséget kimutatni (4.23. B ábra), ami arra utal, hogy az IS30 jobb végében csak egyetlen, míg a bal végben feltehetőleg több aktivátor elem is található.



^{4.23.} ábra Az IS30 végek deléciós analízise.

Az oszlopdiagramok (**A**) a fokozatosan rövidített bal (**B**) valamint a fokozatosan rövidített jobb IS30 végeket hordozó cirkuláris transzpozonok képződésének, illetve integrációjának gyakoriságát szemléltetik. A fehér oszlopok a Cm^s cirkuláris intermedierek képződésének, míg a szürke oszlopok a transzpozonok integrációjának gyakoriságát mutatják a GOHS szekvenciába. Az adatok 5 párhuzamos mérésből származnak. Az IS30 végek pontos hosszát a grafikon x tengelyén ábrázoltuk.

4.5.6. A szubterminális szekvenciák pontmutációs vizsgálata

Az aktivátor elemek pontos azonosítása érdekében olyan konstrukciókat is előállítottunk, melyek pontmutációkat tartalmaznak az IS30 végekben. Összesen 44 különböző transzpozon készült, amely közül 19 a jobb végben, 25 pedig a bal végben tartalmazott két-két szomszédos transzverziót (4.24. A, D ábra). A báziscseréket 66R és 122L végek hordozták, míg a transzpozon másik oldalát a wt 464L, illetve a 106R végek határolták. A transzpozonok IR végeit a Cm^R gén választotta el, ahogy a pMSZ88 vagy pMSZ85 konstrukcióknál. A mutációk hatását intramolekuláris transzpozíciós rendszerben vizsgáltuk, amelyhez a Tp-áz termelő és a transzpozondonor plazmidokat TG2 sejtekbe transzformáltuk. A transzpozáz indukciót követően minden mutánsból DNS-t izoláltunk, amit restrikciós hasítással vizsgáltunk. XbaI + NcoI hasítás következtében a RIR-LIR kapcsolatot hordozó cirkuláris transzpozonokból 1140 (a jobb vég mutációi esetén), illetve 833 bp-os (a bal vég mutációi esetén) DNS darabok keletkeznek, melyek mennyisége a transzpozíciós reakció gyakoriságát jellemzi (4.24. B ábra). A jobb vég mutációi közül az 1181-1186 bp régióban található báziscserék közel 75 %-kal, míg az 1179-1180. és 1187-1188. pozíciók mutációi 50 %-kal csökkentették a körré zárt intermedier képződését (4. 25. C ábra). Mindez azt jelzi, hogy a jobb végben az 1179-1188. pozíciókban található 5'-GAGATAATTG-3' szekvencia segítethette a cirkuláris intermedierek képződését.

Az IS30 bal végében létrehozott báziscseréknek kevésbé volt jelentős hatásuk, mint a jobb vég mutációinak. A 36-39, 66-69 és a 74-77 bp-os régiók mutációi 30-60 %-kal csökkentették, míg a 70-73. pozíciók báziscseréi valamelyest növelték a körrézárt transzpozonok képződését (4.24. E ábra). A 28-29. és az 56-57. pozíciók báziscseréi kb. 20 %-os gyakoriságcsökkenést

okoztak, amely azonban a szórások átfedése miatt nem tekinthető szignifikáns eltérésnek. A mutációs és a deléciós analízis eredményei viszont egymást erősítik, hiszen az enhancer elemek mindkét kísérlet sorozatban elsősorban a 35-45 és 68-77 bp-os régiókba térképeződtek.



4.24. ábra Az IR végeket határoló IS*30* szekvenciák mutációs analízise. A jobb (**A**), valamint a bal (**D**) vég vizsgálatához használt transzpozondonor plazmidok sematikus ábrázolása. A 66R vég az 1157-1194 bp-os régióban, míg a 122L vég a 28-77 bp-os régióban tartalmaz két szomszédos transzverziót. A mutációkat csillaggal jeleztük, a báziscserék pontos szekvenciáját a grafikonok x tengelyén ábrázoltuk. Az X a *XbaI*, az Nc az *NcoI* hasítóhelyeket jelöli a plazmidokon. (**B**) Transzpozáz indukciót követően DNS-t izoláltunk a mutáns plazmidokat hordozó TG2 sejtekből, amit *XbaI* + *NcoI* enzimekkel hasítottuk. A transzpozon donorból származó DNS darabokra fehér, a Tp-áz termelő plazmidból származó DNS-re szürke nyílhegy mutat. A csillag az 1140 bp hosszú, RIR-LIR kapcsolatot hordozó DNS darabot jelzi. A molekulatömeg marker mellett (MW: *PstI*-hasított λ DNS) a wt és a GA₁₁₈₁₋₁₁₈₂-TC cserét tartalmazó konstrukciók transzpozíciós reakciól láthatók. Az oszlopdiagramok a cirkuláris transzpozonok relatív előfordulási gyakoriságát mutatják a mutáns jobb (**C**) és bal (**E**) IS*30* végek jelenlétében. Az adatok a sybrgreen-nel festett gél mennyiségi kiértékeléséből származnak. A RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó DNS fragment mennyiségét minden esetben a transzpozon 3540 bp-os fragmentjének mennyiségéhez hasonlítottuk. Minden konstrukcióval 3 független mérést végeztünk, melyek átlagát és szórását a wt konstrukció átlagához viszonyítva ábrázoltuk. A szürke téglalapok azokat a bázisokat mutatják, melyek cseréje szignifikáns gyakoriság csökkenést okozott.

4.5.7. A RIR-LIR képzést segítő motívum azonosítása az IS30 jobb végében

Annak igazolására, hogy az 5'-GAGATAATTG-3' szekvencia aktivátorként működik a jobb IS30 végben, két új transzpozondonor konstrukciót készítettünk. A pMSZ589-ben olyan távolságba helyeztük az enhancer szekvenciát az IR végtől, ahogy a wt elemben is található, míg a pMSZ619 4 bp-ral távolabb tartalmazza azt. Az aktivátor és a RIR vég közötti szakaszt nem IS30 eredetű szekvenciával töltöttük ki (4.25. A ábra). A transzpozonok másik végét a 464L vég határolta, ahogy a pMSZ85 konstrukcióban is. Mindkét plazmiddal két *in vivo* mérést végeztünk. Intramolekuláris kísérletben vizsgáltuk a Cm^R gén delécióját (4.19. A ábra ① reakció, 3.6. fejezet), míg intermolekuláris rendszerben a transzpozonok integrációját a GOHS szekvenciába (ld. 4.19. A ábra ① + ② reakció, 3.7. fejezet). Valójában mindkét mérés a RIR-LIR képzés gyakoriságát tükrözi, hiszen a szubterminális szekvenciák hiánya a GOHS integrációt nem befolyásolta (ld. 4.19. C ábra). A pMSZ589 a 49R véget hordozó konstrukcióhoz hasonlóan

viszonylag magas gyakoriságokat eredményezett mindkét mérésben (4.25. B ábra), ami bizonyítja, hogy az 5'-GAGATAATTG-3' szekvencia valóban transzpozíciós aktivátorként funkcionált. Ezzel ellentétben a pMSZ619 esetén több mint egy nagyságrenddel alacsonyabb gyakoriságokat mértünk (3,5-8 x10⁻³), ahogy a 26 bp-os RIR vég jelenlétében is (7,9-12 x10⁻³). Mindez arra utal, hogy az aktivátor szekvenciának az IR véghez viszonyított pozíciója lényeges, azaz kizárólag abban az esetben segíti az IR végek kapcsolódását, ha a wt elemnek megfelelően 7 bp távolságban található a RIR belső végétől. Amennyiben ez a 10 bp-os szekvencia akár maga a transzpozáz, vagy egyéb gazdafehérje kötőhelye, mindenképp elmondható róla, hogy kommunikálnia kell a transzpozázzal, hiszen csak abban az esetben funkcionális, ha a RIR végtől megfelelő távolságban helyezkedik el.



4.25. ábra Az 5' GAGATAATTG motívum hatása az IS30-alapú transzpozonok képződésére. (A) A pMSZ589 és pMSZ619 transzpozon donor plazmidok sematikus struktúrája. A transzpozonok a feltételezett aktivátor elemet 7, illetve 11 bp-ra tartalmazzák a RIR belső végétől. Az IS30 szekvenciát nagy, a RIR véget kiemelt betűtípussal, az egyéb szekvenciákat kis betűkkel jelöltük. (B) Az oszlopdiagram a cirkuláris transzpozonok képződésének, illetve integrációjának gyakoriságát mutatja. Az adatok 6 párhuzamos mérésből származnak.

4.5.8. Aktivátor elemek meghatározása az IS30 bal végében

A végek mutációs analízise alapján úgy gondoljuk, hogy az IS*30* bal végének szerveződése lényegesen bonyolultabb, mint a jobb végé. Pontmutációkkal több olyan szekvencia részletet (28-29., 36-39., 66-69., 74-77. és 56-57. pozíciókban) is azonosítottunk, amelynek hatása volt a RIR-LIR képzésre, de az egyes mutációk önmagukban kevésbé csökkentették a transzpozíció gyakoriságát, mint a jobb vég esetén tapasztaltuk (ld. 4.6.6. fejezet). Ha ehhez hozzávesszük a

deléciós transzpozonokkal meghatározott adatokat, akkor azt mondhatjuk, hogy a 35-45 és 68-77 bp-os régiókban egyértelműen kell legyen, de nem kizárt, hogy a 45-58. pozíciókban is létezik olyan szekvencia, ami elősegíti az IR végek kapcsolódását (ld. 4.23. A ábra). A potenciális aktivátor elemek hatásának vizsgálatára hasonló megközelítést használtunk, mint a jobb végben található 10 bp-os motívum aktivitásának bizonyítására. A kiválasztott szekvencia motívumokat olyan távolságban helyeztük a LIR szekvencia mögé, ahogy a wt elemben található. A transzpozonok aktivitását intermolekuláris rendszerben teszteltük a GOHS szekvenciát tartalmazó target plazmid jelenlétében (ld. 4.19. A ábra $\mathbb{O} + \mathbb{O}$ reakció, 3.7 fejezet). Az egyes konstrukciók felépítését és a hozzájuk tartozó transzpozíciós gyakoriságokat a 4.26. ábra tartalmaza.



4.26. ábra Aktivátor elemek azonosítása az IS30 bal végében. A transzpozondonor plazmidok (c1-c4) a pMSZ85 mintájára készültek. A transzpozonok egyik végét a wt 257R, a másikat különböző szekvencia darabok határolták a bal végből. Vastag vonallal az IS30-ból származó, szaggatott vonallal a nem IS30 eredetű DNS szakaszokat jelöltük. A vonalakra írt szám az IS30 pozíciókat mutatja. A LIR szekvenciát keret, a transzpozáz kötőhely inverz ismétlődését folytonos, a 8 bp-os direkt ismétlődésű szekvenciát szaggatott nyíl jelzi. Azokat a bázisokat, melyek cseréje kimutatható hatással volt a RIR-LIR képzés gyakoriságára csillaggal (ld. 4.25. E ábra), a feltételezett aktivátor elemeket szürke téglalappal jelöltük. Az egyes szekvenciába. Az adatok 5 párhuzamos mérésből származnak.

Első közelítésben a 36-39 és a 66-77 bp-os szekvenciák szerepét vizsgáltuk (c1 konstrukció), hiszen ezek mutációi egyértelműen gátolták a cirkuláris intermedierek képződését (ld. 4.24. E ábra). A c1 konstrukció azonban ugyanolyan gyakorisággal integrálódott a target szekvenciába, mint a 27L vagy a 35L végeket tartalmazó transzpozonok, ami alapján további aktivátor elemeket feltételezünk a végben. Mivel a 28-29. pozíciókban létrehozott báziscserék kb. 25 %-kal csökkentették a transzpozíciós gyakoriságot (ld. 4.24. ábra), ezért meghosszabbítottuk az IR véget 43 bp-ra, amit a 66-77 bp-os aktivátor szekvenciával egészítettünk ki. A c2 transzpozon így tágabb szekvencia környezetben hordozza a hatásosnak tűnő 36-39 bp-os régiót, valamint tartalmazott egy direkt ismétlődésű motívumot is a 23-30. és a 71-78. pozíciókban. A transzpozon integrációs gyakorisága azonban nem haladta meg a 45L véget hordozó konstrukcióét, amely alapján úgy tűnhet, hogy a 66-77 bp-os régió nem szükséges a transzpozíciós hatékonyság növeléséhez. Ugyanakkor ez a látszólagos ellentmondás azonnal megszűnik, ha több olyan enhancer szekvenciát tételezünk fel a végben, melyek csak egymással

együttműködve fejtik ki hatásukat. A c3 konstrukcióval a 45-50. pozíciókban előforduló szekvencia hatását vizsgáltuk, mivel az IR végekben található transzpozáz kötőhely fordított irányban megismétlődik ebben a régióban. A LIR szekvencia kiterjesztése 51 bp-ra azonban csak kb. kétszeres növekedést eredményezett a transzpozon integrációs gyakoriságában a 43L vagy 45L végeket tartalmazó konstrukcióhoz hasonlítva. Mivel az 56-57. pozíciókban létrehozott báziscserék is befolyásolták valamelyest a transzpozon aktivitását (ld. 4.24. ábra), ezért a következő lépésben 58 bp-ra hosszabbítottuk a transzpozon bal végét. A c4 integrációs gyakorisága elérte, illetve valamelyest meg is haladta a wt transzpozont jellemző maximális gyakorisági értéket $(1,4\pm0,4x10^{-1})$, ami arra utal, hogy az 58L vég a 66-77 bp-os régió jelenlétében már tartalmazza az összes olyan szekvenciát, ami a hatékony transzpozíció feltétele. A 66-77 bp-os régió hiányában viszont harmadára csökkent a transzpozíciós gyakoriság (3,1±0,7x10⁻²), ami bizonyítja, hogy 66-77. pozíciókban található szekvencia csak akkor funkcionális, ha a LIR-hez közelebbi aktivátor elemek már mind jelen vannak a végben. Mindezek alapján az mondhatjuk, hogy a bal végben legalább 4 enhancer szekvencia található a 27-43, a 44-51, az 51-58 és a 66-77 bp-os régiókban, melyek szigorúan egymásra épülve fejtik ki hatásukat. Az IS30 bal végének részletes szekvencia vizsgálata továbbá rámutatott arra is, hogy a transzpozon aktivitását befolyásoló pontmutációk kivétel nélkül egy 4 bp-os, AAAC konszenzussal jellemezhető szekvencia motívumban helyzkednek el, s ez ismétlődik minden egyes régióban, melynek hozzáadásával a LIR vég transzpozíciós aktivitása növekedett. Így valószínűsíthető, hogy a bal végben talált enhancer szekvenciák inkább egyfajta térszerkezetet bizosítanak a DNS-nek, mint egyedi kötőhelyként funkcionálnak.

4.6. Az IS30 végek orientációs hatása

4.6.1. Az IR szekvenciák befolyása az IS30 végek kapcsolódására

Eddigi transzpozíciós kísérleteink mindegyikében azt tapasztaltuk, hogy a RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó cirkuláris intermedier olyan irányban épül be az IS30 végek mellé, hogy a targetként szolgáló IR szekvenciához mindig ellentétes végével csatlakozik (Olasz *et al.*, 1997a). Ez a szigorú orientációs hatás két elem dimerizációjában is megnyilvánul. Azok az IS30 alapú összetett transzpozonok, melyek inverz ismétlésben tartalmazzák a két elemet nem képesek inszercióra, mivel nem képződik belőlük transzpozíciósan aktív RIR-RIR vagy LIR-LIR kapcsolódást tartalmazó dimer (Stadler and Arber, 1989). Mindebből arra következtethetünk, hogy az IS30 elem képes saját végei között valamilyen módon különbséget tenni. A megkülönböztetés egyik oka az IR szekvenciák közötti 3 bp-os eltérés lehet (4.27. A. ábra), melynek vizsgálatára egyforma IR végeket tartalmazó transzpozonokat állítottunk elő.




■ cirkuláris intermedier integrációja a GOHS szekvenciába

A pMSZ105 kizárólag a 26 bp-os RIR, míg a pMSZ506 a LIR végeket tartalmazza az IS30 elemből. Mindkét transzpozondonorral három in vivo transzpozíciós kísérletet végeztünk. Intramolekuláris kísérletben vizsgáltuk a Cm^R gén vesztését, azaz a cirkuláris transzpozonok képződését (3.6. fejezet), míg intermolekuláris rendszerben (3.7. fejezet) a transzpozonok, valamint a körré zárt intermedierek integrációját (ld. 4.19. A ábra). Szignifikáns különbséget egyik kísérletben sem tudtunk kimutatni a három konstrukció között (4.27. B ábra). Az azonos IR végekből felépített transzpozonokból ugyanolyan gyakorisággal képződött a RIR-RIR $(4,4\pm2,8\times10^{-3})$ vagy a LIR-LIR $(9,2\pm4,9\times10^{-3})$ kapcsolatot hordozó körré zárt intermedier, mint a pMSZ88-ból a RIR-LIR kapcsolódást tartalmazó megfelelője (3,8±2,2x10⁻³). A GOHS integrációban szintén nem tudtunk különbséget detektálni. A transzpozonok és a körrézárt intermedierek azonos gyakorisággal integrálódtak a HS szekvenciába. Mindez arra utal, hogy az IS30 transzpozíciójában megfigyelt orientációs hatás önmagában nem magyarázhazó az IR végekben kimutatható szekvencia különbséggel. Ezt igazolják azok a kísérletek is, amelyekben olyan transzpozonok, illetve IS30 végek target aktivitását vizsgálták, ahol a két IR szekvenciát felcserélték, azaz a RIR véget a bal, a LIR-t pedig a jobb vég szekvencia környezetébe helyezték. A mutációk ellenére mindkét vég megtartotta a wt transzpozonra jellemző orientációs preferenciát. A LIR szekvenciát hordozó jobb vég mellé mindig bal, míg a RIR szekvenciát tartalmazó bal vég mellé jobb végével épül be az elem, és egyetlen esetben sem képződött jobbjobb, vagy bal-bal kapcsolatot tartalmazó transzpozíciós intermedier (Olasz, 1994). Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a végek megkülönböztetése az IR szekvenciákon kívüli régiókban kell történjen.

4.6.2. A szubterminális szekvenciák szerepe az orientációs hatás kialakításában

Annak tanulmányozására, hogy milyen szekvenciák határozzák meg az ellentétes IR végek kapcsolódását, intermolekuláris transzpozíciós kísérleteket végeztünk, amelyben különböző hosszú IS30 végek target aktivitását vizsgáltuk, tekintettel arra, hogy mely esetekben fordul elő téves jobb-jobb vagy bal-bal kapcsolódás. A transzpozáz expresszióját a dimer IS30 elemet tartalmazó pAW1039 donor biztosította, míg a targetként felkínált IS30 végeket pEMBL19alapú plazmidok hordozták (4.28. A ábra). Amennyiben a transzpozáz indukálja az integrációt az IS30 végek mellé, olyan fúziós replikonok képződnek, amelyek R408 transzdukcióval elválaszthatók a szülői plazmidoktól (3.9. fejezet). Az inszerciók pontos helyét, és irányát restrikciós enzimek felhasználásával vizsgáltuk (4.28. B ábra).



-	
	R

target régió	minták száma	LIR-RIR	LIR-LIR	LIR-RIR
⊑∑464	33	33	-	
⋿≥58	13	12	1	
⊑≥45	7	5	2	
⊑>35	8	2	6	
	6	-	6	
257	27	27		-
66	20	20		-
49	21	21		-
	37	35		2

4.28. ábra A különböző hosszú IS30 végek target aktivitása tekintettel az IR-IR kapcsolódásra. (A) Az intermolekuláris kísérletben használt plazmidok és transzpozíciós termékeik sematikus ábrázolása. Az Ap^R génnel jellemezhető target plazmidok (vastag vonal) különböző hosszú IS30 végeket tartalmaznak, melyet minden konstrukcióban a POHS szekvencia fele határol (csíkozott négyzet). A Km^R markerrel rendelkező pAW1039 donor plazmid (szagatott vonal) két, ellentétes végeivel kapcsolódó IS30 elemet hordoz. A transzpozáz expresszióját az IR végek kapcsoltatásával létrehozott p_{junc} promóter biztosítja. A replikáció irányát nyílhegyek jelzik. A transzpozíció két típusú fúziós termék képződéséhez vezet, melyekben vagy a szabályos RIR-LIR, vagy azonos végek kapcsolódása fordul elő. (B) A táblázat a szabályos, illetve a téves IR-IR kapcsolódást tartalmazó fúziós termékek eloszlását mutatja az különböző targetek estetén. A mintaszám a független transzpozíciós kísérletből származó fúziós termék mennyiségét mutatja.

Egy bizonyos hossz után sem a jobb, sem a bal IS30 végek jelenlétében nem találtunk hibás irányú beépülést, azaz RIR-RIR vagy LIR-LIR kapcsolódást, ami arra utal, hogy mindkét vég szerepet játszik a beépülések irányának meghatározásában. A két vég azonban különbözött abból a szempontból, hogy a jobb végnél csak a csupasz RIR jelenlétében fordult elő hibás irányú beépülés (2/37), míg a bal végnél 58 bp sem volt elegendő az azonos végek kapcsolódásának megakadályozására. Ha a helyes/hibás orientációban történt integrációk arányát vizsgáljuk, az is feltűnő, hogy minél rövidebb volt a bal vég, annál gyakrabban izoláltuk a hibás LIR-LIR kapcsolatot. Végül a szubterminális régiók hiányában a LIR mellé kizárólag bal végével épült be a transzpozon. A kétféle integráció egymáshoz viszonyított arányát azonban mindenképp fenntartásokkal kell kezeljük, mivel az inszerciók irányát a target és donor molekulán zajló replikáció vagy transzkripció iránya is befolyásolhatta. Erre utalnak azok a korábbi megfigyelések is, miszerint az IS30 beépülések iránya megfordul, ha a RIR-LIR, vagy a HS szekvenciák irányát változtatjuk a donor, illetve target plazmidokon (Kiss, 1999). Valószínűleg

ez lehet a magyarázata annak is, hogy a tökéletesen szimmetrikus GOHS vagy POHS szekvenciákba sem 1:1 arányban fordul elő a két beépülési irány. Azok az irányú integrációk mindig gyakrabban izolálhatók, melyek olyan fúziós plazmidok képződését eredményezik, ahol a két replikációs origóról induló DNS szintézis azonos irányba mutat. Bár a kísérleteinkben használt target plazmidok a vektor szekvenciához képest mind azonos irányban tartalmazták az IS30 végeket, a replikációk irányultsága miatt a jobb vég sorozatnál kivétel nélkül a helyes, míg a bal vég jelenlétében a hibás beépüléseknek kedveztünk. Ebből adódóan a jobb végnél mindössze azt állíthatjuk, hogy a 26 bp RIR jelenléte nem elegendő az orientációs gátlás kialakításához, míg a bal vég esetén ennél pontosabb meghatározásokat is tehetünk. Mivel a 35L és 58L végeket hasonlítva megfordult a helyes és hibás irányú beépülések egymáshoz viszonyított aránya, ezért azt mondhatjuk, hogy a 35-58 bp-os régióban kell legyen olyan szekvencia, amely gátolja az azonos végek kapcsolódását. Ugyanakkor azt is állíthatjuk, hogy az 58. pozíciót követően is kell tartalmaznia a végnek modulátor szekvenciákat, hiszen a 464L vég esetén már egyetlen hibás irányú beépülést sem izoláltunk.

4.6.3. Az orientációs hatás megnyilvánulása a cirkuláris transzpozonok keletkezésében

Azért, hogy pontosabban meghatározzuk, hol találhatók az IS30 végekben az orientációs hatás kialakításáért felelős DNS szakaszok, olyan transzpozonokat állítottunk elő, amelyeket azonos identitású, de eltérő hosszú végek határolnak. A konstrukciók egyik csoportja az IS30 jobb végéből (RE), míg a másik fele a bal végből (LE) hordozott különböző hosszú szakaszokat (4.29. A, illetve C ábrák). A transzpozonok másik oldalát a 464L illetve a 257R végek határolták. Az IR végeket minden esetben a Cm^R gén választotta el, ahogy a pMSZ85 és pMSZ88 plazmidoknál. A cirkuláris transzpozonok képződését intramolekuláris transzpozíciós kísérletben vizsgáltuk (3.6. fejezet). A transzpozáz indukciót követően DNS-t izoláltunk a donor plazmidokat tartalmazó TG2 sejtekből, majd pUCfor és pUCrev primerek jelenlétében vizsgáltuk a LE-464L illetve a RE-257R kapcsolódást tartalmazó cirkuláris intermedierek előfordulását. A PCR termékek mennyisége a végek hosszának növelésével fokozatosan csökkent. A jobb vég esetén az 56R-257R (4.29. B ábra), míg a bal végnél 58L-464L csatlakozásokat tudtuk utolsóként kimutatni (4.29. D ábra). Az intermedierek mennyiségi meghatározásához azonban más megközelítést kellett választanunk, mivel a 60 bp-nál hosszabb palindromákról kimutattuk, hogy önmagukban is gátolják a PCR amplifikációt. Az intermedierek képződésének gyakoriságát a transzpozondonor mennyiségéhez viszonyítva határoztuk meg (3.6. fejezet). A DNS populáció transzformálását követően a cirkuláris transzpozonokat PvuII hasítással válogattuk ki a Cm^S klónok közül. Mivel a transzpozonok IR végeit minden konstrukcióban GC bázisok határolták, ezért szabályos transzpozíció esetén az IR-IR kapcsolatban is GC bázisoknak kell szerepelni, ami

egy *Pvu*II hasítóhelyet alakít ki a transzpozíciós intermedierben (4.29. A, C ábra). A végek hosszának növelésével a RIR-RIR és a LIR-LIR képzés gyakorisága is fokozatosan csökkent (ld. 430. B, D ábra). A RIR vég lényegében LIR szekvenciaként működött, hiszen jelenlétében 0,78 % gyakorisággal fordult elő a RIR-257R kapcsolódást hordozó intermedier, ahogy a LIR-257R, vagy akár a RIR-464L kapcsolódású cirkuláris transzpozonok. Amíg a 49R és a 464L végek jelenlétében közel tízszeresére emelkedett a LIR-RIR képzés gyakorisága (10-40 %), a 49R-257R csatlakozást hordozó transzpozon előfordulása jelentősen csökkent (0,16 %). A 106R vagy 257R végek jelenlétében már egyáltalán nem tudtuk izolálni hibás kapcsolódású intermediert.

Α	В					
Ap ^R		RE		Cm ^s		
Cm ^R 257		hossza	PCR	termékek (%)	RE-257R (%)	RE-464L (%)
ACAge gettet			+	0,91	0,78	$2,4 \pm 0,6$
transzpozáz		49	+	0,94	0,16	$24,1 \pm 16,5$
▼		56	+	0,54	0,05	
$\left(Ap^{R} \right)$		66	NK	0,22	~1x10 ⁻³	$23,8 \pm 8,4$
257		106	NK	<0,09	-	
		257	NK	<0,08	-	29,1 ± 15,9

С	D				
- Ar ^R	LE		Cm ^s		
(Ap	hossza	PCR	termékek (%)	LE-464L (%)	LE-257R (%)
		+	2,13	0,58	$1,3 \pm 0,5$
ACAge getet	35<	+	1,31	0,56	$1,5 \pm 0,5$
transzpozáz	45<	+	2,05	1,99	$4,0 \pm 1,4$
	58<	+	1,03	0,91	$7,0 \pm 1,8$
$\begin{pmatrix} Ap^n \end{pmatrix}$	68	NK	0,25	~1x10 ⁻³	8,9 ± 3,8
i 464 < _{ii}	77	NK	0,44	-	34,0 ± 20,8
ACAgcTGT	173<	NK	0,62	-	$48,8 \pm 30,0$
	464<	NK	0,71	-	29,1 ± 15.9

4.29. ábra Cirkuláris transzpozonok képződése az azonos oldali, de eltérő hosszú IS*30* végeket tartalmazó transzpozondonor plazmidokból. (**A**) A 257R, illetve a különböző hosszú jobb (RE), (**C**) valamint a 464L és a különböző hosszú bal végekből (LE) felépített plazmidok és transzpozíciós termékeik sematikus ábrázolása. A változó hosszú IS*30* véget pontokkal jelöltük, melyek pontos hosszát az ábrák melletti táblázatok tartalmazzák. Az IR szekvenciákat nagy, az ezeket határoló bázisokat kis betűkkel jelöltük. A *Pvu*II hasítóhelyet szürke kiemelés jelzi. A nyilak a pUCfor (i) és pUCrev (ii) primerek csatolási helyét és irányát mutatják. (**B**, **D**) A táblázatok a hibás IR kapcsolódást hordozó cirkuláris transzpozonok képződésének gyakoriságát mutatják. A PCR reakciókat pUCfor és pUCrev primerek felhasználásával végeztük. NK-val a nem kimutatható IR-IR kapcsolatot jelöltük.

A bal vég sorozatnál 45L-464L és a 45L-257R kapcsolódást tartalmazó transzpozonok képződése megegyezett (2 %, illetve 4±1,4 %), míg az 58 vagy 68 bp-os végek jelenlétében már kisebb gyakorisággal fordultak elő a hibás kapcsolódású intermedierek, mint a wt megfelelői. Mindebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a jobb végben a RIR szekvenciát, míg a bal

végben a 45. pozíciót követően találhatók azok a modifikáló elemek, amelyek megakadályozzák azonos IS*30* végek kapcsolódását. Bár a gátló szekvenciák és a szubterminális régiókban azonosított aktivátor elemek elhelyezkedése hasonlónak tűnik, az IS*30* végek megkülönböztetése mégsem magyarázható pusztán az egyik aktivátor elem hiányával, hiszen egy adott hossz után (66 illetve 68 bp) a cirkuláris intermediert egyáltalán nem tudtuk kimutatni az azonos végeket tartalmazó transzpozonokból.

4.6.4. Azonos végeket tartalmazó transzpozonok integrációja

Bár a 68 bp-nál hosszabb azonos végeket hordozó transzpozonokból nem tudtuk kimutatni sem a RIR-RIR, sem a LIR-LIR kapcsolatot hordozó cirkuláris intermediert, számos olyan Cm^S deléciós termékeket izoláltunk, melyek képződése azok intramolekuláris integrációjával magyarázható (ld. 4.29. C, D ábra). Annak eldöntésére, hogy az azonos végeket tartalmazó transzpozonok valóban képesek-e integrációra, intermolekuláris transzpozíciós kísérleteket végeztünk (ld. 4.19. A ábra, 3.7. fejezet). A transzpozondonor plazmidokat a GOHS szekvenciát tartalmazó pZNA133 target és a pJKI324 Tp-áz termelő plazmidokkal együtt MA1703 sejtekbe juttattuk, s a transzpozáz indukciót követően vizsgáltuk a fúziós plazmidok előfordulásának gyakoriságát (4.30. ábra).



4.30. ábra Az azonos oldali, de eltérő hosszú IS*30* végeket tartalmazó transzpozonok integrációja a GOHS targetbe. (A) Az oszlopdiagram a különböző hosszú jobb IS*30* végeket valamint a 257R (fekete oszlopok) vagy a 464L (fehér oszlopok) végeket hordozó transzpozondonorok integrációs gyakoriságát mutatja a GOHS szekvenciába. (B) Az oszlopdiagram fekete oszlopai a 464L véget és a fokozatosan hosszabb bal IS*30* végeket, míg a fehér oszlopok 257R és a különböző hosszú bal végeket tartalmazó plazmidok integrációs gyakoriságát mutatják. Az IS*30* végek változó hosszát a grafikonok x tengelyén ábrázoltuk. Az adatok minden esetben 5 párhuzamos mérésből származnak.

A transzpozonok integrációja az előző kísérletben meghatározott Cm^S deléciós termékek képződésével mutatott hasonlóságot, s így azok a transzpozonok is integrálódtak a GOHS szekvenciába, melyekből korábban nem sikerült izolálnunk a hibás IR-IR kapcsolódást tartalmazó intermediert. A jobb végeket tartalmazó transzpozonok integrációja az 56 bp-nál hosszabb szekvenciák esetén kb. egy nagyságrenddel csökkent (4.30. A ábra), míg a bal végeket tartalmazó transzpozonoknál mindössze a 45L és az 58L szekvenciákat hasonlítva tudtunk kb. 5-

szörös különbséget kimutatni (4.30. B ábra). Mindebből az következik, hogy a 68 bp-nál hosszabb végeket tartalmazó transzpozonokból is keletkezhetett RIR-RIR illetve LIR-LIR kapcsolódású cirkuláris intermedier, melyek inter- illetve intramolekuláris integrációja a fúziós plazmidok, illetve Cm^S deléciós termékek képződéséhez vezetett. A végek hosszával összefüggésbe hozható gyakoriság csökkenés pedig olyan funkcióra utal, amely megakadályozta az azonos végek kapcsolódását. A jobb végben az 56., a bal végben pedig a 45. pozíciót követő szekvenciák gátolták elsősorban a tranzpozonok integrációját. Mivel a 66R-257R és a 68L-464L cirkuláris transzpozonok ugyanolyan gyakorisággal integrálódtak a GOHS szekvenciába, mint a RIR-LIR kapcsolódást tartalmazók (nem publikált saját eredmény), így a fentebb említett szekvenciák inkább az intermedier képződést vagy annak fennmaradását akadályozhatták.

4.6.5. A hibás IR-IR kapcsolódás in vitro vizsgálata

Annak igazolására, hogy a 68 bp-nál hosszabb végek jelenlétében is képződik RIR-RIR, illetve LIR-LIR kapcsolódású intermedier, *in vitro* transzpozíciós kísérleteket végeztünk a 464L + 58L, a 464L + 122L, a 257R + 56R és a kétszer 257R végeket tartalmazó transzpozondonor plazmidok felhasználásával (ld. 3.11. fejezet). A transzpozáz kezelt minták mindegyikében megjelent egy új DNS darab, amely méretben megfelelt az *Alw*NI által felnyitott 8-formának (4.31. ábra).



4.31. ábra A LIR-LIR és a RIR-RIR kapcsolat *in vitro* kimutatása. Az azonos IS30 végeket tartalmazó transzpozondonor plazmidokat l órán át inkubáltuk a tisztított IS30 transzpozázzal, majd a fehérjementesített mintákat *Alw*NI enzimmel hasítottuk, és 1 %-os agaróz gélen választottuk el.

A DNS fragmenteket izoláltuk, s a LIR-LIR, illetve a RIR-RIR csatlakozást PCR reakciókban pUCfor és pUCrev primerek felhasználásával, és szekvenálással vizsgáltuk. Az IS30 végek kapcsolódását csak a 464L + 58L és a 257R + 56R végeket tartalmazó transzpozonok esetén sikerült igazolnunk. A 122L-464L vagy a 257R-257R kapcsolódást nem tudtuk sem amplifikálni, sem szekvenálni, melynek feltehetőleg az lehet az oka, hogy a hosszú palindromák kihurkolódtak a DNS-ből, megakadályozva ezzel a polimeráz működését.

4.6.6. Palindrom szekvenciák hatása a cirkuláris transzpozonok stabilitására

Mivel az egyszálas IR-IR kapcsolat azonos végek közt is kimutatható, függetlenül azok hosszától, így felmerült annak lehetősége, hogy a hosszú palindromák egyszerűen a cirkuláris transzpozonok fennmaradását hátráltatják, s nem képződésüket gátolják. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a palindrom szekvenciák hatását az intermedierek stabilitására, előállítottunk egy olyan transzpozondonor konstrukciót, amely a LIR szekvenciát egy 64 bp hosszú inverz ismétlődésű régióban tartalmazza, de minden más tekintetben azonos a 26 bp LIR végeket hordozó pMSZ506 donorral (4.32. A ábra).



4.32. ábra A palindromák hatása a cirkuláris transzpozonok képződésére, illetve fennmaradására. (**A**) A pMSZ96 és transzpozíciós termékeik sematikus ábrázolása. Fekete négyzettel egy 38 bp hosszú inverz ismétlődésű szekvenciát jelöltünk. A nyilak a pUCfor (i) és pUCrev (ii) primerek csatolási helyét és irányát mutatják. (**B**) A táblázat a LIR-LIR kapcsolódást hordozó intermedierek képződésének gyakoriságát tartalmazza. A PCR-t pUCfor és pUCrev primerek felhasználásával végeztük. A Cm^s termékekeket replica-plating felhasználásával válogattuk ki a donor plazmidok közül (ld. 3.6. fejezet), míg a LIR-LIR kapcsolat jelenlétét *Pvu*II hasítással vizsgáltuk.

A cirkuláris transzpozonok képződését intramolekuláris transzpozíciós kísérletben vizsgáltuk (3.6. fejezet). A transzpozondonor plazmidot tartalmazó TG2 sejtekből izolált DNS populációban PCR-ral, illetve a DNS transzformálását követően replica-plating felhasználásával vizsgáltuk az LIR-LIR kapcsolatot tartalmazó Cm^S plazmidok előfordulását. Bár a 64 bp-os inverz ismétlődést hordozó donor plazmidból is viszonylag gyakran képződtek Cm^S termékek, a LIR-LIR kapcsolatot tartalmazó intermediert csak a pMSZ506 konstrukcióból tudtuk izolálni (4.32. B ábra). Az izolált Cm^S termékek mindegyike a donor plazmid egy deléciós származékának felelt meg. A deléciók végpontját 16 szekvenált DNS-ben a transzpozon belsejébe térképeztük, melyet minden esetben a LIR szekvencia határolt. Mindez arra utal, hogy a cirkuláris intermedier a hosszú palindromák jelenlétében is kialakulhatott, csak a plazmid instabilitása miatt nem lehetett kimutatni. Mivel transzpozáz jelenlétében lehetőség volt az intermedier további transzpozíciós reakciójára, ezért tudtuk izolálni a sok Cm^S deléciós terméket, illetve a GOHS-integránst, de magát a cirkuláris transzpozon soha.

4.7. Génkonverzió az IS30 elem transzpozíciójában

4.7.1. Génkonverzió az IR-targeting során

Amíg a HS targeting során szinte soha nem fordult elő téves targetduplikáció, az IR végek mellé irányuló inszerciók gyakran olyan fúziós termékek kialakulását eredményezték, melyekben 2 bp hosszú, de szekvenciálisan hibás TD volt kimutatható. A TD mellett sok esetben az integrálódó elem szekvenciája is megváltozott. Amennyiben a target IS*30* vég mutációkat tartalmazott, a nukleotid eltérések gyakorta megjelentek a donor IS*30* szekvenciában is (Olasz *et al.*, 1997). A jelenség legegyszerűbben génkonverzióval magyarázható, de ahhoz hogy a

konverziós termékek képződését molekuláris szinten is megismerjük, még számos transzpozíciós terméket kellett analizálnunk. Az integránsok izolálásához a dimer IS30 elemet tartalmazó pAW1039 donort használtuk. A transzpozáz expresszióját a donor plazmid biztosította, míg a mutációkat hordozó target IS30 végeket pEMBL19-alapú plazmidok tartalmazták (4.33. A ábra).



4.33. ábra Integráció a mutáns IS30 végek mellé.

(A) Az intermolekuláris kísérletben használt plazmidok és transzpozíciós termékeik sematikus ábrázolása. A pAW1039 donort vékony, a target replikont vastag vonallal jelöltük. A targetként funkcionáló IS*30* végeket szürke téglalap, a mutációkat csillag jelzi (**B**, **C**) A fúziós termékek szekvenciái. A szám a mutánsok nevében a mutációk pozíciójára utal. A LIR_{13-14,20} esetén a 26 bp IR szekvencia tartalmazta a báziscseréket, míg a többi esetben hosszabb bal (LE) vagy jobb (RE) végek hordozták a mutációkat. Római számokkal a fúziós termékek különböző csoportjait jelöltük. A tört az adott terméktípus előfordulási gyakoriságát szemlélteti.

A fúziós termékeket R408 transzdukcióval választottuk el a szülői plazmidoktól (3.9. fejezet), s struktúrájukat restrikciós térképezéssel illetve szekvenálással vizsgáltuk.

Az első kísérletekben a mutációkat a target plazmidok IR végeiben helyeztük el. Az LE₁ az 1., az RE₁₋₅ az 1-5., míg a LIR_{13-14,20}, a LE_{13-14,20} és a RE_{13-14,20} targetek a 13-14. valamint a 20. IR pozíciókban tartalmaztak báziscseréket (4.33. B ábra). Amíg a LIR_{13-14,20} csak a 26 bp-os IR szekvenciát hordozta, a többi target hosszabb IS30 végeket tartalmazott. Az integrációt követően a fúziós termékek 78-100 %-ában a mutáns allél megjelent a donor IS30 végekben is, függetlenül a mutációk helyétől és típusától. 71 fúziós plazmidból mindössze 9 esetben történt konverzió nélküli integráció (II termék). A legtöbb esetben a mutációk egyszerűen megjelentek a fúziós termékek I csatlakozási régiójában is (I, IV, VI termékek). A pontmutációk független konverziója csupán egyetlen esetben fordult elő (VI termék), ahol a 13-14. IR pozíciókban található báziscserék átkerültek a donor végbe, míg a 20. pozíció mutációját továbbra is csak a target IR tartalmazta. A fúziós plazmidok egy részében a TD is hibásan képződött, hiszen az IR-IR kapcsolódásában található bázisok a donor plazmidból származtak (III, IV, V, VI termékek). Mivel a csupasz LIR vég (LIR_{13-14,20}) jelenlétében is izoláltunk konverziós termékeket, ezért azt mondhatjuk, hogy a 26 bp hosszú nem tökéletes homológia elég volt a konverzió kialakulásához. A RE₁₋₅ target esetén izolált integránsok pedig azt mutatják, hogy a génkonverzió akkor is előfordult, ha az IR szekvenciák elején egyáltalán nem volt azonosság. Az LE1 és az RE1-5 targetek jelenlétében egyetlen olyan fúziós terméket sem tudtunk azonosítani, amely ne tartalmazott volna konverziót, amiből arra következtetésre juthatunk, hogy a konverzió kezdőpontja az IS30 végek 1. pozíciója lehet.

A génkonverzió távolságfüggésének vizsgálatára olyan target plazmidokat állítottunk elő, melyek az 59. és/vagy a 175. IS*30* pozíciókban tartalmaztak mutációkat (4.33. C ábra). Mivel a báziscserék egy *Xba*I hasítóhelyet alakítottak ki az IS*30* végekben, így a konverzió előfordulását szekvenálás nélkül, restrikciós hasítással tudtuk ellenőrizni. Az IR mutánsokkal ellentétben csak az integránsok 20-50 %-ában fordult elő konverzió. Az LE₅₉ target jelenlétében a transzpozíciós termékek 47 %-a, míg az LE₁₇₅ targetnél 17 %-a tartalmazta a mutációt a donor végekben is. Az L_{59,175} targetnél az 59. pozícióban gyakrabban tudtunk konverziót kimutatni, mint az 59. és 175. pozíciókban egyszerre, s olyan fúziós terméket pedig egyáltalán nem izoláltunk, ahol a konverzió egyedül a 175. pozícióban fordult volna elő. Mindez arra utal, hogy a konverziónak határozott iránya van, melynek kiindulópontja az integrációs hely, s ettől távolodva csökken előfordulásának valószínűsége.

4.7.2. A donor és target szekvenciák felemás szerepe a konverzióban

Kísérleteinkben egyfajta aszimmetria volt kimutatható, mivel mindig az integrálódó elem szekvenciája konvertálódott a target szerint és soha nem fordítva. Annak bizonyítására, hogy az aszimmetrikusságot nem a target szekvenciában létrehozott báziscserék okozzák, megfordítottuk

a mutációk elhelyezkedését. A donor plazmid LIR, illetve RIR végeibe juttattuk a báziscseréket, míg targetként wt IS*30* szekvenciát használtuk (4.34. ábra). Mivel a báziscserék a RIR végben kialakítottak, a LIR végben pedig eltűntettek egy *Hin*cII hasítóhelyet, így a konverzió előfordulását szekvenálás nélkül, restrikciós hasítással ellenőriztük.

donor	target	csatlakozásI	csatlakozásII	konverzió	minták száma
	\geq		*	NO	20/20
R _{13-14,20}				∗≁wt	12/14
				wt≁∗	1/14
				NO	1/14
***				∗≁wt	19/20
L _{13-14,20}				NO	1/20
				NO	13/13

4.34. ábra A donor és target szekvenciák szerepe a konverziós termékek képződésében.

A konverziós markert csillaggal jelöltük. A * wt jelölés azt mutatja, hogy a mutációt hordozó IR szekvencia konvertálodott a wt IS30 alapján, míg wt * esetén a wt IR konvertálódott a mutáns szekvencia szerint.

Génkonverziót csak abban az esetben tudtunk kimutatni, ha a target szekvenciával azonos vég tartalmazta a mutációt. Amennyiben az IS30 bal vége szerepelt targetként, csak a LIR mutációja esetén tudtunk konverziót kimutatni, míg ha a jobb vég volt a target, akkor csak a RIR mutációja esetén fordult elő génkonverzió. Az esetek túlnyomó többségében a donor vég konvertálódott a wt target szekvencia alapján. Mindössze egyetlen olyan fúziós terméket izoláltunk, ahol a mutációk átkerültek a target szekvenciába is, azaz a donor konvertálódott a target szekvencia alapján. Mindez arra utal, hogy a génkonverzió aszimmetrikusan játszódik le, azaz a target szekvenciában található allélok gyakrabban másolódnak az integrálódó donor szekvenciába, mint fordítva.

4.7.3. Homológ szekvenciák jelentősége a konverzió kialakulásában

Az előző kísérletekben rámutattunk arra, hogy az integrációs helynek mindig csak azon az oldalán tapasztalható konverzió, amely a donor szekvenciával homológiát mutat. Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a konverzió az integrációs helytől mindig csak egy irányban figyelhető meg, vagy két irányban is kimutatható, létrehoztunk egy olyan target plazmidot, ami két összekapcsolódott IS30 véget tartalmaz, s így a konverzió az integrációs hely mindkét oldalán megtörténhet. A transzpozondonorként a wt pAW1039 donort használtuk, míg a mutációkat az összekapcsolódott IS30 végeket hordozó target plazmid tartalmazta (4.35. ábra). A mutáció a bal végben egy *Pst*I hasítóhelyet, míg a jobb végben egy *Pvu*II helyet alakított ki. A hasítóhelyek kialakulása miatt a konverzió előfordulását restrikciós hasítással vizsgáltuk. Mivel a mutációk elég messze helyezkedtek el az IS30 elem végeitől, ezért a fúziós termékek 73 %-ában nem tudtunk konverziót kimutatni. 118 termék közül mindössze 24 esetben fordult elő a *Pst*I marker konverziója, és 7 esetben *Pvu*II-é, ami bizonyította, hogy a konverzió az integrációs hely

mindkét oldalán lejátszódott. Nem tudtunk azonban egyetlen olyan fúziós terméket sem izolálni, amely mind a négy végben hordozott volna mutációt, ami arra utal, hogy a konverzió egyidejűleg csak egy irányban fordul elő.



4.35. ábra A génkonverzió irányának vizsgálata. Az IS*30* bal vége a 80. pozícióban, míg a jobb vége a 85. pozícióban tartalmaz egy-egy báziscserét. A mutációkat az eddigiekhez hasonlóan csillaggal jelöltük. A törtek a transzpozíciós termékek előfordulási gyakoriságát szemléltetik.

4.7.4. Génkonverzió intramolekuláris transzpozíció alkalmával

Mivel az IR-IR kapcsolatot tartalmazó cirkuláris transzpozonok képződése sok tekintetben hasonlít az IR végek mellé irányuló inszerciók kialakulásához, ezért megvizsgáltuk, hogy a cirkuláris intermedierek kialakulásakor képződnek-e konverziós termékek. A 13-14. és 20. IR pozíciók mutációit különböző kombinációkban beépítettük egy olyan összetett transzpozonba, melynek végeit a Cm^R gén választotta el (4.36. ábra).

transzpozon	$(IS3\theta)_2$	minták száma
		16/16
		17/17
		19/19
		13/13

4.36. ábra Génkonverzió előfordulása a cirkuláris transzpozonok képződésében.

Az összetett transzpozonok IR végeit a Cm[®] gén választotta el (szürke téglalap), amely a cirkuláris transzpozonok képződésekor deléciót szenved. A konverziós markerként szolgáló IR mutációkat csillaggal jelöltük.

A Cm^S cirkuláris transzpozonokat replica-plating felhasználásával választottuk el a transzpozondonor plazmidoktól, majd restrikciós hasítással vizsgáltuk a konverzió előfordulását. Mivel a báziscserék a RIR végben kialakítottak, a LIR végben pedig eltüntettek egy *Hin*cII hasítóhelyet, így restrikciós hasítással a mutációk hiányát illetve jelenlétét könnyen megállapíthattuk. A négy különböző transzpozonból összesen 65 cirkuláris intermediert izoláltunk, melyek közül azonban egy sem tartalmazott konverziót. Mindez megerősítette korábbi eredményeinket, miszerint a homológia nélkülözhetetlen feltétele a konverzióképzésnek.

Homológia jelenlétében azonban nem csak molekulák között, de intramolekuláris rendszerben is lehetőség van génkonverzió kialakulására. A pMSZ7 donor plazmidból az IS30 kivágódását követően kizárólag olyan deléciós plazmidokat sikerült izolálnunk, melyek képződése génkonverzióra utal (4.37. ábra). Mivel a transzpozíciós reakcióban a mutációt hordozó RIR vég szerepelt targetként, ezért a mutációk egyszerűen átkerültek a donor végbe is, ami a csonka véget hordozó deléciós termékek képződéséhez vezetett (①reakció). PCR reakciókkal ugyanakkor igazoltuk azt is, hogy génkonverzió akkor is előfordulhat, ha maga a transzpozíciós áthelyeződés nem következett be (②reakció).



4.37. ábra Konverzió az IS30 kivágódási reakciójában. A pMSZ7 plazmidól képződő konverziós termékek sematikus struktúrája. A IS30 elem jobb végében a mutációt rövid háromszög szemlélteti. Az IS30 szekvenciát nagy, az IR végeket határoló bázisokat kis betűkkel, a mutáns pozíciókat dőlt betűtípussal jelöltük. A PvuII (Pv) és az EcoRI (E) hasítóhelyeket aláhúzás jelzi. A pUCrev (a), az IS30nco (b) és az IS30seq261(c) primerek csatolási helyét és irányát rövid nyilak jelzik. Az IS30 kivágódása esetén (① reakció) kizárólag olyan deléciós plazmidokat izoláltunk, melyek a mutáns RIR véget tartalmazzák. (2) esetben a kivágódási reakció nem történt meg, de a donor RIR vég konvertálódott a mutációt hordozó target szekvencia szerint. A konverziós termékek kimutatásához az pUCrev és IS30nco primereket használtuk. A PCR termékeket PvuII-vel hasítottuk, amely a konverziót hordozó IR-IR kapcsolódást nem hasítja. A hasítatlan PCR terméket izoláltuk, és IS30se261 primer felhasználásával szekvenáltuk.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Az IS30 célszekvencia választását befolyásoló fehérje domének

Az IS30 családba tartozó elemek transzpozázainak szekvencia összehasonlítása egy konzervált hélix-turn-hélix motívumra hívta fel figyelmünket, amely közvetlen a fehérjék elején, a 115-150. aa régióban helyezkedik el. Négy elemnél (ISBlo4, ISCg2, IS1513, IS30) a konzervált HTH előtt azonban egy addicionális HTH is található, melyek viszont szekvenciálisan különböznek egymástól (ld. 7.2. függelék). Pont és deléciós mutáns transzpozázok felhasználásával bizonyítottuk, hogy az IS30 elején azonosított HTH motívumok a célszekvenciák felismeréséhez szükségesek. A rokon transzpozázokból hiányzó HTH1 a természetes target helyek, azaz a HS szekvenciák felismeréséhez, míg a HTH2 az IS30 végek mellé és a HS szekvenciákba irányuló inszerciókhoz is szükséges. Kimutattuk, hogy a két HTH motívumot elválasztó hélix mutációja (E66P), bár mindkét target esetén csökkentette az integrációs gyakoriságot, hatása közel sem volt olyan jelentős, mint a HTH2 mutációinak. Bandshift kísérletekkel igazoltuk, hogy a HTH2 az IR szekvenciák megkötésében vesz részt, s így mutációi az IR kötésen keresztül akadályozhatták a transzpozonok integrációját. Az E66P mutáns kötő aktivitása arra utal, hogy a közbülső hélix közvetlen nem vett részt az IR szekvenciák felismerésében, de jelenléte hozzájárul a transzpozáz és az IR végek kölcsönhatásához. A DNS-kötő fehérjék között azonban nem számít ritkaságnak, hogy a klasszikus HTH motívumot egy másik hélix is megelőzi, amely a szekvencia-specifikus kötésben ugyan nem vesz részt, de struktúrájánál fogya meghatározó szerepe van a DNS-fehérje komplex kialakításában. Különösen igaz ez a λ integráz család (Grishin, 2000), egyes bakteriális transzkipciós regulátorok, mint a LysR család (Muraoka et al., 2003), vagy a homeodomének (Wintjens and Rooman, 1996) fehérjéire. Az IS30 H-HTH2 szekvenciája leginkább a Sinorhizobium meliloti 1012 törzséből izolált FixJ (Barnett et al., 2001) H-HTH motívumához hasonlítható (Nagy et al., 2004), amely a sigma faktorhoz hasonlóan -35 promóter elemeket ismer fel (Kahn and Ditta, 1991; Birck et al., 2002). Az eredmény érdekessége, hogy az IS30 IR vége, melynek szubterminális régiójához (16-27 bp) a transzpozáz kötődik, szintén tartalmaz promóter szekvenciákat (Dalrymple, 1987), ami egyben transzkripciós szabályozásra is utal. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a H-HTH2 nemcsak az IR végek megkötéséért felelős, ami a transzpozíciós reakció kritériuma, hanem szabályozhatja a transzpozáz expresszióját is.

Amíg a HTH2 mutációi megszüntették az enzim transzpozíciós aktivitását, a HTH1 eltávolítása nem befolyásolta sem az IR kötést, sem az IR végek mellé történő beépülések gyakoriságát, ami arra utal, hogy a transzpozáz aktív maradt a katalitikus reakciókban. A

delHTH1 felhasználásával izolált integrációs helyek között viszont egyetlen módszerrel sem tudtunk azonosságot kimutatni, ami arra utal, hogy az enzim target választása randommá vált. A transzpozáz célszekvencia választását azonban nemcsak a HTH1 motívum deléciójával, hanem különböző DNS-kötő domének fúziójával is sikerült módosítanunk. A cI represszorhoz kapcsolt IS*30* transzpozáz a λ fágból izolált O_R1-3 szekvencia közelébe irányította az inszerciókat, míg a Gli1 cink-finger motívumával fúzionált enzim a Gli1 kötőhely környezetében generált inszerciókat. Ugyanakkor mind a plazmid-, mind a genomi integránsok között viszonylag kis gyakorisággal fordultak elő irányított transzpozícióra utaló beépülések, amely valószínűleg azzal magyarázható, hogy a transzpozáz HS-felismerése erősebb volt a represszor DNS-kötő aktivitásánál.

5.2. Az IR végek funkcionális felosztása

Az IR mutációkat hordozó transzpozonok képződésének és integrációjának gyakorisága arra utal, hogy az IS30 terminális végeiben a 14-15. és 18-19. pozíciókban található nukleotidokon kívül minden egyes bázisnak jelentős szerepe lehet a transzpozíció valamely lépésében (5.1. ábra).

LIR	т	GT	AG	AT	TC	AA	тт	GG	TC	AA	CG	CA	AC	A
RIR	т	GT	AG	AT	TC	AA	тс	TG	TC	AA	ΤG	CA	AC	Α
		:.		::	:.	.:			:	:	::	::	::	:
cons. 60%		GY	. R	AT	TS	WA	Α.	••	TA	Α.	ΤG	CA	AC	A
RIR-LIR képzés					-									
integráció														
donor aktivitás/hasítás	5													
Tp-áz kötés														

5.1. ábra Az IS*30* elem IR bázisainak konzerváltsága és funkciója a transzpozícióban. A konszenzus szekvenciát (cons. 60%) 32 IS*30* családtag IR szekvenciáinak összehasonlítása alapján készítettük. Szürkével a 90%-ban konzervált bázisokat, kerettel a konzervált szekvenciákat jelöltük. Két pont a tökéletes egyezést, egy pont az alternatív bázisok valamelyikével való egyezést jelzi. Fekete téglalapokkal azokat a szekvenciákat jelöltük, amelyek az egyes transzpozíciós lépésekben jelentős szerepet töltenek be. Szürkével azokat a bázisokat jelöltük, melyek báziscseréi csak akkor csökkentették a RIR-LIR képzés gyakoriságát, ha azok mindkét végben jelen voltak.

A báziscserék egy része a transzpozáz kötést és a RIR-LIR kapcsolat képződését, míg egy másik része a RIR-LIR kapcsolat integrációját befolyásolta. Azok a bázisok, melynek mutációi jelentősen csökkentették a transzpozíciós hatékonyságot, erősen konzerváltnak mutatkoztak az IS*30* családba tartozó elemek IR szekvenciáinak összehasonlításában is (7.3. függelék). Az IS*30* családtagok 25-30 bp-os IR végeiben 5 pozíciót 90 %-os és 11 pozíciót 60 %-os homológia jellemzett, és mindössze 6 pozícióban (1., 4., 13-15., 19.) lehet 60 %-nál kisebb azonosságot

megállapítani. Nem is meglepő ez a nagyfokú hasonlóság, hiszen maguk a transzpozázok strukturálisan mindenképp, míg helyenként aminosav szinten is erősen konzerváltak (ld. 7.2. függelék). Keresztreakciót azonban mégsem sikerült kimutatnunk az IS30 transzpozáz és egy közeli rokona, az IS1655 IR végei között, holott 26 bp-on belül 17 pozícióban megegyezik a két elem szekvenciája (nem publikált saját eredmény). Mindez arra utal, hogy a transzposzóma aktív térszerkezete, ami egy adott IS elemet jellemez, minden esetben a transzpozáz enzim és az IR végek sokrétű kölcsönhatásán kell alapuljon, s így az IR szekvenciák kisebb módosítása is teljes funkcióvesztést eredményezhet. Mivel az egyes transzpozíciós lépésekhez mindig több funkcionális domén (kötés+hasítás+száltranszfer) szükséges, így valószínűleg csak közel 100 %- os IR azonosság esetén alakulhat ki keresztreakció a különböző elemek és transzpozázaik között.

Az IS30 transzpozáz elsődleges kötőhelyét az IR szekvenciák szubterminális régiójában (16-26 bp) azonosítottuk. A kötőhely mutációi a transzpozáz kötésen kívül az IR-IR kapcsolat képződését is gátolták, de nem csökkentették a körré zárt transzpozonok integrációját. Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy a RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó intermediert egy másik kötőhelyen (5-12 bp régió) keresztül kell felismernie a transzpozáznak. A terminális IR régió mutációi azonban nem gátolták a transzpozáz N-terminálisának kötését, így a kötő motívumnak vagy a transzpozáz középső részén (100-200. aa) vagy annak végén kell elhelyezkednie (ld. 7.1. függelék). Ennek bizonyítására további kísérleteket tervezünk a transzpozáz különböző hosszú darabjainak felhasználásával. A transzpozonok képződéséhez, illetve integrációjához a szubterminális (20-26 bp), valamint a feltételezett terminális (5-12 bp) kőtő régiókon kívül a 16-17. pozíciókban található TC bázisok jelenléte is szükséges, amely az előző szekvenciákhoz hasonlóan erősen konzervált az IS30 családon belül. A 16-18. IR pozíciók bázisai valószínűleg a transzpozáz kötés stabilizálásában játszhatnak szerepet. A transzpozáz ezen rövid szekvencián keresztül kerülhet az IR végek külső részéről a terminális szekvenciák irányába, ahol maga a katalitikus reakció végbemegy. Ezt igazolja az is, hogy a 16-17., illetve a 18-19. pozíciók mutációja gátolta, illetve csökkentette a transzpozáz kötését a szubterminális régiókhoz. Primer extenziós kísérletekkel bizonyítottuk azt is, hogy a transzpozíciós hasításban a 2-3. pozíciókban található 5' GT bázisok játsszanak meghatározó szerepet. Az IR végek 2-3. pozícióiban létrehozott báziscserék a cirkuláris intermedierek képződését és integrációját is gátolták, mivel a transzpozáz nem tudta hasítani az IR szekvenciák 3' végét. Amíg az IS3 családtagok (Polar and Chandler, 1995; Lewis and Grindley, 1997; Sekine et al., 1999) és a HIV (Vink, et al., 1991) esetén a hasításért a terminális 5'TG/CA bázisok tehetők felelőssé, az IS30-nál a 3. pozícióban található 5' T/A szerepe meghatározóbb lehet, hiszen a terminális mutációk nem, a 2-3. pozíciók báziscseréi viszont megakadályozták a mutáns vég hasítását. A 3. pozíció kiemelkedő szerepét az is alátámaszthatja, hogy az IS*30* családtagok IR végeiben ezen a helyen kizárólag pirimidin bázisok találhatók, míg az 1. pozícióban található bázis egyáltalán nem konzervált.

5.3. A szubterminális szekvenciák hatása az IS30 transzpozíciójára

A 26 bp-os IR és a hosszabb IS30 végeket tartalmazó transzpozonok aktivitásának összehasonlítása során kiderült, hogy az IR végeken kívüli IS30 szekvenciák jelenléte közel két nagyságrenddel növelte a transzpozíció hatékonyságát. A transzpozíciós lépések egymást követő vizsgálata bizonyította, hogy az IR végeket határoló szubterminális szekvenciák elsősorban a cirkuláris transzpozonok képződését, valamint az IR végek mellé irányuló inszerciókat segítették. Mivel IR-IR kapcsolatot tartalmazó cirkuláris transzpozonok képződése mindig két lépésben valósul meg, ezért a szubterminális szekvenciák aktiválhatják magát a transzpozáz katalizálta lépést, azaz az egyszálas IR-IR kapcsolat (8-as képzés) kialakulását, valamint annak transzpozáztól független megoldódását. A szubterminális szekvenciák hiányában a 8-as formájú intermediert azonban nem tudtuk *in vivo* kimutatni, ami inkább annak csökkentett képződésére, mint gyors továbbalakulására utal. Az *in vitro* transzpozíciós kísérletek eredményei szintén azt mutatják, hogy a szubterminális szekvenciák inkább az IR-IR képzést segíthetik, hiszen a 26 bp IR végeket tartalmazó minimál transzpozon esetén kisebb ütemben emelkedett a 8-as forma képződése, mint a 173L és 257R végek jelenlétében.

Az IS30 végek deléciós és pontmutációs vizsgálatával sikerült több olyan szekvenciát is találnunk, melyek hiánya gátolta a transzpozíciót. A jobb végben azonban kizárólag az 1179-1188. pozíciók mutációi csökkentették az IR-IR képzés gyakoriságát. Amennyiben az itt található 5'-GAGATAATTG-3' szekvenciát visszahelyeztük a RIR mögé, a transzpozon visszanyerte wt aktivitását. A 10 bp-os szekvencia viszont csak abban az esetben növelte a transzpozíció hatékonyságát, ha pontosan 7 bp-ra helyezkedett el a RIR belső végétől, ami az aktivátor elem pozíciójának lényeges szerepére utal. A bal vég szerveződése lényegesen bonyolultabb képet mutatott, mint a jobb végé. A 27-77 bp-os régióban hat AAAC konszenzussal jellemezhető aktivátor elemet is azonosítottunk, melynek hozzáadásával a LIR vég transzpozíciós aktivitása növekedett. Az aktivátor szekvenciák azonban csak egymásra épülve fejtették ki hatásukat. Az utolsó, azaz a LIR végtől legtávolabb található AAAC motívum csak akkor segítette az IR-IR képzést, ha az előtte lévőket már tartalmazta a vég.

Bár a transzpozáz kötését nem sikerült kimutatnunk sem a jobb, sem a bal szubterminális régiókhoz, az *in vitro* transzpozíciós kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a transzpozáznak kölcsönhatásba kell kerülnie az IR végeket határoló szekvenciákkal is. A szubterminális régiók jelenlétében ugyanolyan transzpozáz koncentrációnál vagy ugyanannyi idő alatt több 8-as

képződött, mint annak hiányában. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a szubterminális szekvenciák a transzposzóma komplex stabilizálásában játszhatnak szerepet. Amíg a jobb végben azonosított 10 bp-os aktivátor szekvencia akár maga a transzpozáz vagy egyéb fehérjék kötőhelye is lehet, a bal végben talált AAAC motívumok inkább egyfajta térszerkezetet biztosíthatnak a végnek, mint egyedi kötőhelyként funkcionálnak. Az elképzelt modellt az IS*30* végek háromdimenziós DNS szerkezete is támogatja (5.2. ábra).



5.2. ábra A IS*30* jobb és bal végeinek háromdimenziós térszerkezete. Az előrejelzéshez a modell.it programot használtuk (http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna/model_it.html) Feketével az IR végek 1 pozícióját, sötét szürkével a 16-26 bp-os transzpozáz kötő domént, míg világos szürkével az aktivátor elemeket jelöltük.

Amíg a jobb IS30 szekvenciában nem tudtunk görbületet kimutatni, a bal vég erősen hajlott struktúrát vesz fel. Az aktivátorként azonosított AAAC szekvenciák a B-formájú hélix ugyanazon felszínén helyezkednek el, ami valószínűleg annyira meghajlítja a véget, hogy az körülölelheti az IR szekvenciához kötött transzpozázt. Ez egyfajta magyarázat lehet a szinaptikus komplex stabilizálására, ami a wt transzpozonok megnövekedett aktivitását okozza.

A transzpozíció hatékonyságának növeléséhez a bal és jobb végekben található aktivátor szekvenciákra egyaránt szükség van, s így az ellentétes IS30 végek kapcsolódása jelentősen gyakoribb, mint az azonosaké. Mindebből az következik, hogy a szubterminális szekvenciákban található aktivátor elemek hiánya szerepet játszhat az orientációs hatás kialakításában is. Az IS30 végek mellé többnyire ellentétes végével épült be egy másik elem, illetve az inverz transzpozonok integrációja is lényegesen kisebb gyakorisággal játszódik le, mint amelyek azonos irányba tartalmazzák a két elemet. A 68 bp-nál hosszabb azonos végeket tartalmazó transzpozonokból azonban egyáltalán nem lehet kimutatni a cirkuláris intermediert, képződésére csak a transzpozonok integrációja utal. Tehát a fej-fej vagy a láb-láb kapcsolódású cirkuláris transzpozonok képződését vagy fennmaradását a szubterminális szekvenciák hiánya mellett további tényezők is gátolhatták. Deléciós transzpozonok felhasználásával bizonyítottuk, hogy a 60 bp környékén találhatók azok a szekvenciák mindkét végben, melyek megakadályozzák az azonos végeket tartalmazó cirkuláris transzpozonok képződését illetve integrációját. A 8-as formát azonban a 68 bp-nál hosszabb azonos végeket tartalmazó transzpozonokból is kimutattuk, ezért az inhibitor szekvenciák inkább a 8-as forma transzpozáztól független megoldódását vagy a cirkuláris transzpozonok replikációját befolyásolhatták, mint annak képződését. Mivel a 100-120

bp-os palindromák a plazmid replikáció alatt különböző deléciós termékek képződését eredményezik (Weston-Haffer and Berg, 1991), ezért felmerült annak lehetősége, hogy az azonos végeket tartalmazó cirkuláris intermedierek fennmaradását egyszerűen a hosszú inverz ismétlődések jelenléte akadályozta. Az intermedier integrációja viszont lehetőséget nyújt a palindrom szekvenciák kiküszöbölésére, így a 68 bp-nál hosszabb azonos végeket tartalmazó transzpozonok esetén csak a transzpozíciós végtermékeket tudtuk izolálni, s magát az intermediert soha. Ugyanakkor nem zárhatjuk ki azt sem, hogy a hosszú palindromák a 8-as megoldódását is akadályozták. Ennek vizsgálatára további kísérleteket tervezünk.

5.4. Az IS30 transzpozíciójának molekuláris modellje

A mutáns IS30 végek mellé irányuló inszerciók gyakran olyan fúziós termékek képződését eredményezték, amelyekben génkonverziót lehetett kimutatni az IR szekvenciák között. A HStargeting során viszont több száz esetből egyetlen egyszer sem izoláltunk konverziós termékeket, ami arra utal, hogy a donor és target szekvenciák között kimutatható szekvenciaegyezés feltétele lehet a konverzió kialakulásának. Kimutattuk, hogy a nem tökéletesen azonos IR szekvenciák már önmagukban is elegendő homológiát biztosítanak a konverziós termékek kialakulásához, valamint bizonyítottuk, hogy a konverzió kiindulási pontja maga az integrációs hely. Különböző mutációk felhasználásával igazoltuk, hogy a konverzióképzés fordítottan arányos a távolsággal, azaz minél messzebb helyeztük a mutációt az IR végek 1. pozíciójától, annál ritkábban tudtuk kimutatni konverziójukat. A konverziós termékek szekvencia analízise arra is rámutatott, hogy többnyire a donor IS30 szekvencia konvertálódott a target DNS szerint, azaz a mutációk egyszerűen átmásolódtak a target IS30 végből a donor szekvenciába is. A konverziónak mindig határozott iránya volt, tehát egyszerre több marker konverzióját is megfigyeltük, ha azok az integrációs hely azonos oldalán helyezkedtek el. Bizonyos esetekben a donor plazmidban is konverziót lehet kimutatni, transzpozíciós termék keletkezése nélkül. Ezeket a megfigyeléseket, valamint az IS30 transzpozíciós mechanizmusát alapul véve megalkottunk egy molekuláris modellt, amely részleteiben magyarázza a génkonverziós termékek képződését (5.3. ábra).

Az első lépésben az IS30 transzpozáz hasítja a donor IR-IR kapcsolatot, amely egy 3' OH csoportot eredményez a transzpozon egyik végén (a ábra). A felszabaduló -OH csoport kapcsolódik a target IS30 véghez, kialakítva egy egyszálas DNS hidat a szülői molekulák között (b ábra). A donor és a target szekvenciák között kimutatható homológia lehetőséget nyújt a DNS híd elmozdulására, ami a konverziós termékek képződését eredményezi. Ha a DNS híd nem mozdul el, bekövetkezik a második transzpozíciós szálátvitel, ahogy azt a HS szekvenciákba történő inszerciók esetén is tapasztalhatjuk (Kiss and Olasz, 1999). A Holliday híd elmozdulását

feltehetőleg a target DNS 3' végéről induló repair szintézis indukálja (c ábra). A DNS szintézis, valamint a donor DNS 5' végének degradációja elősegíti a mutáns szál átkerülését a donor molekulába, miközben a target végben is konzerválja a mutációkat (d). A repair enzimek működése valószínűleg gátolja a második transzpozíciós hasítást, melynek következtében a DNS helyreállítását, azaz a szabad láncvégek ligálását is gazdafaktorok katalizálhatják.



5.3. ábra Molekuláris modell a konverziós termékek képződésére. Az első lépésben a transzpozáz hasítja az IR-IR kapcsolatot, felszabadítva egy 3' OH csoportot a transzpozon egyik végén (a). A szabad 3' OH csoport támadja a target IS*30* véget, s így kialakul egy egyszálas összeköttettés a donor és target molekulák közt (b). Az IS*30* végek homológiája lehetőséget teremt a DNS híd elmozdulására, amit valószínűleg a target DNS szabad 3' végéről induló repair szintézis indukál (c). A szabad láncvégek ligálása kialakít egy teljes Holliday keresztet (d), amit a gazda enzimek 2 féle hasítással oldhatnak meg (e). A Holliday kereszt① irányú hasítása olyan fúziós molekulák kialakulásához vezet, melyek szabad láncvégeket tartalmaznak a DNS egyik szálán (f). A 3' végekről meginduló repair szintézis g, h és i termékek képződését eredményezi a DNS szintézis hosszától, illetve a ligálás idejétől függően. A h és i molekulákból a mismatch szekvenciák jelenléte miatt a DNS repair, vagy a plazmid replikáció 2 különböző transzpozíciós terméket is kialakít. A ② hasítás esetén transzpozíciós termékek nem képződnek, de a donor szekvenciában konverzió figyelhető meg (j). A hasítás helyét rövid nyilak, a konverziós markert csillag mutatja. A repair szintézist szaggatott, a DNS degradációt áthúzott vonallal jeleztük. Az újonnan szintetizált DNS szakaszt vastag vonal jelzi.

A repair enzimek hasonló indukcióját a homológ rekombinációs, illetve az SOS repair rendszerek működésében írták le korábban (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Pham *et al.*, 2001). Mivel az egyszálas DNS híd spontán elmozdulását már egyetlen nukleotid különbség is megakadályozza (Panyutin and Hsieh, 1993, 1994), ezért az IS*30* inszerciók következtében izolált konverziós termékek képződése pusztán az IR-ek szekvencia eltérése miatt is aktív, enzimatikus folyamatot feltételez. A Holliday kereszt vándorlását nagy valószínűséggel a homológ rekombinációs rendszerekből ismert helikázok (recG), illetve a RuvAB enzimek, míg annak megoldódását a RuvABC enzim komplex katalizálhatta (West, 1992; 1997), ahogy azok szerepét az IS*911* transzpozíciójában kísérletesen is igazolták (Loot *et al.*, 2004; Turlan *et al.*, 2004).

A Holliday kereszt hasítására, s így a megoldódásra is elméletileg két egyenértékű lehetőség van (e). Az egyik irányú hasításnál (1) lépés az e ábrán) rekombináns termékek, jelen esetben fúziós replikonok képződnek, míg a másik irányú hasítás esetén (2 lépés az e ábrán) az eredeti molekulákat kaphatjuk vissza. A Holliday kereszt ① irányú hasítása először egy olyan molekula kialakulásához vezet, amelyben szabad láncvégek vannak az egyik DNS szálon (f ábra). A mutációk, illetve a hasítás helyétől függően a molekula szekvencia eltéréseket tartalmazhat az IS30 végekben, melyet a 3' végről induló DNS szintézis helyreállít, s konverziós termékek képződéséhez vezethet. Ha a repair szintézis túlhalad az IR-IR kapcsolaton, s a láncvégek ligálása csak ezt követően játszódik le (g ábra), olyan transzpozíciós termékek képződnek, melyekben a mutáció megjelenik a donor IS30 végben is (ld. I termék 4.33. B ábra). Amennyiben a ligálás az IR-IR kapcsolatban található spacer szekvenciák előtt játszódik le, a mutáció ugyan átmásolódik a donor IS30 szekvenciában, de a spacer bázisok eltérően alakulnak a DNS két szálában (h ábra). A mismatch repair, illetve a DNS replikáció ebben az esetben két különböző transzpozíciós termék kialakulását eredményezi. Az egyik lényegében megegyezik az előzőekben ismertetett I termékkel, míg a másik annyiban különbözik tőle, hogy az IR-IR kapcsolatban található spacer bázisok a donor szekvenciából származnak, azaz hibás TD-t tartalmaz (ld. 4.33. B ábra IV és VI termékek). Ha a ligálás közvetlen a hasítást követően megtörténik, a fúziós plazmid szekvenciaeltéréseket fog tartalmazni a spacer szekvenciában és a mutáció helyén is (i ábra). A plazmid replikációja vagy a mismatch repair ebben az esetben olyan transzpozíciós termékeket is kialakíthat, melyekben a mutáció egyszerűen átkerül a target végből a donor IS30 végbe (ld. 4.33. B ábra III termék). Az I termék azonban mindhárom megoldódási úton kialakulhat, így elméletileg nagyobb valószínűséggel várjuk előfordulását, ahogy azt a kísérletes adatok igazolták is (ld. 4.33. B ábra). A modell magyarázza azoknak a fúziós termékeknek a képződését is, melyek hibás TD-t tartalmaznak az IR-IR kapcsolatban. Ebben az esetben a Holliday kereszt elmozdulása nem jut el a konverziós markerig, viszont mismatch-eket generál a spacer szekvenciában. A Holliday kereszt hasítását követően a plazmidok replikációja illetve a repair szintézis olyan fúziós termékek kialakulásához vezet, melyek csak a TD-ban különböznek egymástól (ld. 4.33. B ábra II és V termékek). A modell jól magyarázza a konverziós termékek képződésében megfigyelt aszimmetrikusságot, miszerint többnyire az integrálódó elem szekvenciája konvertálódik a target szerint és soha nem fordítva. Továbbá igazolja a konverzió irányultságát és távolságfüggését, hiszen minél távolabb helyezkedik el a mutáció az IR végtől, annál kisebb a valószínűsége, hogy a repair szintézis eljut odáig.

Amennyiben a Holliday kereszt a @-sel jelölt módon hasítódik, a mutáns allél transzpozíciós termékek képződése nélkül is átmásolódhat a donor végbe (j ábra), miközben a

target szekvenciája változatlan marad (k ábra). Mindezek alapján azt állíthatjuk, hogy a modell magyarázza az IS30 vagy más transzpozonok, pl. IS911 (Loot *et al.*, 2004; Turlan *et al.*, 2004), IS1397 (Wilde *et al.*, 2002) transzpozíciójában megfigyelhető konverziós termékek kialakulását. Egyedül a VII termék képződésére nem ad kielégítő magyarázatot a modell, amelyben a konverzió fordított irányban játszódott le, azaz a target vég konvertálódott az integrálódó elem szekvenciája alapján (ld. 4.33. B ábra). Ez a fúziós plazmid valószínűleg többszörös transzpozíciós átrendeződés következtében alakulhatott ki (Kiss and Olasz, 1999).

Mivel az IR végek mellé történő integráció, illetve az IS dimerek kialakulása gyakori az IS elemek körében (IS2, IS3, IS21, IS30, IS150, IS911 és IS186), így génkonverzióra is van lehetőség. A génkonverzió növelheti a variabilitást az IS populációkban (mint pl. IS1), s így evolúciós előnyhöz juttathatja a transzpozonokat. Azok a csonka IS elemek, melyek integrációra nem képesek, de célszekvenciái lehetnek az aktív kópiáknak (pl. IS30, IS1655, IS911 vagy IS1397 csonka elemek), a mutációk gyűjtőhelyévé válhatnak, s bizonyos körülmények között elszaporodhatnak az IS populációkban.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az Escherichia coliból származó IS30 inszerciós szekvencia tanulmányozása során az elem transzpozíciós mechanizmusának molekuláris szintű megismerését, célszekvencia választásának megértését, és ezek alapján a specificitás módosítását céloztuk meg. Kimutattuk, hogy a prokarióta eredetű IS30 transzpozáz képes katalizálni az elem kivágódását és integrációját zebrahal embriókban. Idegen DNS-kötő domének fúzionálásával sikerült módosítanunk a transzpozáz eredeti targetspecificitását mind az eredeti gazdaszervezetben, mind zebrahalban. A cI represszorhoz kapcsolt IS30 transzpozáz a λ fágból származó O_R1-3 operátor szekvenciák környezetében generált inszerciókat, míg a Gli1 transzkripciós szabályozó fehérje DNS-kötő motívumával fúzionált enzim a Gli1 kötőhely közelébe irányította az inszerciókat zebrahalban. Mindez bizonyítja, hogy DNS-kötő fehérjék fúziójával az IS30 transzpozáznak új specificitás adható, amely alapja lehet irányított transzpozíciós rendszerek felépítésének, s ezzel a funkcionális genomika és alkalmazott biotechnológia hasznos eszközévé válhat.

Térképeztük a transzpozáz targetspecificitását meghatározó DNS-kötő motívumokat, amelyek meghatározzák az IR végek, illetve az IS30 hot spotok (HS) felismerését. Az IS30 családba tartozó transzpozázok számítógépes összehasonlításával egy konzervált hélix-turn-hélix struktúrát (H-HTH2) azonosítottunk a fehérjék N-terminális részén, amelyet IS30 esetén egy másik HTH motívum is megelőz. Deléciós- és pontmutánsokkal bizonyítottuk, hogy a rokon transzpozázokból hiányzó HTH1 a HS felismeréséhez, míg a H-HTH2 az IR szekvenciák megkötéséhez, s ezáltal IS30 végek mellé és a HS szekvenciákba irányuló inszerciókhoz is szükséges. Igazoltuk, hogy a HTH1 eltávolítása kizárólag a HS-specificitást szünteti meg, de az IR végek targetként való felismerését nem.

A transzpozíciót befolyásoló régiókat azonosítottunk az elem IR végeiben és azok környezetében is. Bandshift kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az IR végek belső régiója (16-26 bp) tartalmazza az IS30 transzpozáz kötőhelyét, amely elengedhetetlen a transzpozíció első lépéséhez, azaz az elem IR végeinek összekapcsolásához, de nincs szerepe a RIR-LIR kapcsolatot tartalmazó cirkuláris intermedierek integrációjában. Igazoltuk, hogy az integrációs reakcióhoz elegendő az IR szekvenciák terminális része (1-20. bp). Létrehoztunk egy sejtmentes transzpozíciós rendszert, mellyel kimutattuk, hogy a tisztított transzpozáz egyetlen száltranszfert hajt végre az elem két IR vége között. Az IS elemet hordozó donor replikonból így egy nyolcas alakú struktúra képződik, melyben az elem egyik szála kovalensen zárt. In vitro bizonyítottuk, hogy az IR szekvenciák 2-3. pozícióiban található 5' GT nukleotidok feltétlenül szükségesek a száltranszfert megelőző DNS-hasításhoz.

Kimutattuk, hogy az IR végek környezetében olyan szekvencia motívumok találhatók, melyek elősegítik az IR végek kapcsolódását. A végek deléciós analízise igazolta, hogy a LIR véget követően 51 bp, a RIR véget megelőzően pedig 24 bp hosszú szekvenciák szükségesek a transzpozon wt aktivitásához. Pontmutánsok felhasználásával aktivátor szekvenciákat azonosítottunk mindkét végben. Bizonyítottuk, hogy a RIR vég aktivitását az 5'-GAGATAATTG-3' szekvencia jelenléte növeli. A 27-77 bp-os bal végben több AAAC konszenzussal jellemezhető aktivátor elemet is azonosítottunk, melynek hozzáadásával a LIR vég transzpozíciós aktivitása növekedett. Bár a transzpozáz direkt kötését nem tudtuk kimutatni az aktivátor szekvenciákhoz, kísérleteink transzpozázfüggő folyamatra utalnak, mivel a szubterminális szekvenciák jelenléte elősegítette az IR végek közötti száltranszfert, azaz a nyolcas struktúra *in vitro* kialakulását.

Az IS30 végek deléciós analízise arra is rávilágított, hogy az enhancer szekvenciák jelenléte lehet az elsődleges oka az elem transzpozíciójában megfigyelhető orientációs hatásnak, amely szerint két IS30 kópia mindig különböző végével csatlakozik transzpozíciós reakciókban ("fej-láb" csatlakozás). Kimutattuk, hogy a szubterminális szekvenciák hiányában az azonos IR-ek kapcsolódása is bekövetkezik, amit a 68 bp-nál hosszabb végek jelenlétében egyetlen módszerrel sem tudtunk kimutatni. Ugyanezen transzpozonok integrációja viszont feltételezi az azonos végek kapcsolódását, melyet *in vitro* kísérletekben a nyolcas-forma kimutatásával is megerősítettünk. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy az azonos IS30 végek csatlakozása a másik végben található aktivátor elemek hiánya miatt jelentősen, de nem teljesen gátolt. Kimutattuk, hogy az azonos végek csatlakozásával kialakuló palindrom szekvenciák akadályozzák a plazmid replikációt, s ezáltal tovább csökkentik az azonos végeket tartalmazó transzpozonok integrációját.

In vivo transzpozíciós kísérleteinkben gyakran tapasztaltuk, hogy IS30 végek mellé irányuló inszerciók génkonverziót eredményeztek, amely HS-targeting esetén soha nem fordul elő. Bizonyítottuk, hogy a konverzióhoz szükségszerű a donor és target szekvenciák közötti homológia. Kimutattuk, hogy a konverzió kiindulási pontja az integrációs helyként szolgáló IS elem vége, s ettől távolodva csökken előfordulásának valószínűsége. Többnyire a donor szekvencia konvertálódik a target DNS szerint, és nem fordítva. A konverzió mindig csak egy irányban volt kimutatható még akkor is, ha a homológia ezt a másik irányban is megengedte volna. Kísérleti eredményeinkre támaszkodva megalkottunk egy molekuláris modellt, amely a konverziós termékek képződését egy Holliday struktúra vándorlásával és megoldódásával magyarázza. A Holliday kereszt képződését maga a transzpozáz, míg annak vándorlását és megoldódását feltételezéseink szerint a baktérium DNS-repair apparátusa hajtja végre.

92

SUMMARY

The aim of our studies on the *Escherichia coli* insertion element IS*30* was to understand the molecular mechanism of its transposition and target site selection (target specificity). It has been shown that the prokaryotic transposase (Tp-ase) catalyses both excision and integration of the element in zebrafish embryos. Moreover the target specificity of the Tp-ase can be modified by the fusion to heterologous DNA-binding domains both in pro- and eukaryotic organisms. Joining the Tp-ase to the cI repressor of phage λ causes transposition into the vicinity of the O_R1-3 operator sequences in *E. coli*, while Tp-ase linked to the DNA-binding domain of Gli1 transcription regulator protein directs the insertions near to the Gli1 binding site located on a tester plasmid in zebrafish. These results may serve as a basis for the development of directed transposition systems that might become useful tools in functional genomics and applied biotechnology.

We have determined the DNA-binding motif of IS*30* Tp-ase responsible for the hot spot (HS) recognition. Secondary structure predictions of IS*30* family members revealed the presence of a conserved helix-turn-helix motif (H-HTH2) in the N-terminal part of the proteins, which is preceded by an additional HTH in the case of IS*30*. It has been verified by point and deletion mutants of IS*30* Tp-ase that the unique HTH1 is responsible for the HS recognition, while the well conserved H-HTH2 is required for both the IR-binding and HS-targeting. Deletion of HTH1 destroys the HS specificity, but does not affect the targeting of IRs.

We have also studied the effects of IRs and the subterminal IS30 sequences on the transposition events. The bandsift assays proved that the internal regions of IRs (positions 16-17. and 20-26.) are necessary for binding the Tp-ase. These regions are indispensable for the formation of IR-IR junction, but are not required for the integration into HS sequences. Deletion analyses of IR-IR junction show that the terminal part of IRs (positions 1-20.) is enough for the integration. We have demonstrated in a cell-free transposition system that the purified Tp-ase carries out a single DNA strand transfer between two IRs of the element yielding a figure-of-eight structure from the donor plasmid. Using the *in vitro* transposition assay we have proved that the 5'-GT-3' bases in the 2-3. positions of the IRs are required for cleavage at the tip of the element, which is the first step in figure-of-eight production.

Deletion analyses of IS*30* ends show that the presence of 51 bp region following the LIR, and 24 bp preceding the RIR is necessary for the full activity of the element. Futhermore, we prove that the 5'-GAGATAATTG-3' sequence motif separated by 7 bp from the inner end of RIR is required for the high activity of the right end. According to the analysis of point and deletion mutants we presume more than one enhancer element in the left end between 27-77 bp

positions, which are located in similar sequence motifs, for which a consensus AAAC can be deduced. Since the presence of the subterminal sequences increased the figure-of-eight production *in vitro* we suppose a transposase-dependent process even though we could not detect direct binding of the protein to the enhancer sequences.

The deletion analyses of IS30 ends suggest that these enhancer sequences are the main cause of orientation effect in IR-targeting events, where the targeted end determines the direction of the insertion. The target and the integrating IS30 copies are always attached by their left and right ends leading to a head-to-tail orientation. In the absence of the subterminal enhancer sequences we could isolate junctions of two left or two right ends, while it was never detected when the two left ends were longer than 68 bp, or the right ends were at least 51 bp. At the same time the transposons with identical ends integrate into the GOHS hot spot indicating the incorrect junction formation. This was supported by the *in vitro* detection of figure-of-eight structures *in vitro* that were derived from transposons assembled with identical ends. Thus we suppose that the connection of identical IS30 ends is significantly inhibited by the lack of the enhancer element(s) located in the other end. Moreover the incorrect junction provides 100-120 bp palindromic sequence that disturbs the replication and survival of the plasmid harbouring it. Thus the joining of long identical ends not only occurs at a reduced frequency, but causes serious replication/stability defect.

Integrations next to an IS30 end frequently lead to conversion products never occurring in HS-targeting. We have proved that homology between the donor and target sequences is required for conversion and the starting point of the process is the site of integration. Generally the donor sequence undergoes conversion according to the target DNA, and the frequency of conversion depends on the distance of mutations from the point of insertion. Conversion takes place only in one direction even if homology is present on both sides of the insertion and can occur without formation of transposition products. Based on these data we have established a molecular model for IR-targeting events that can explain the conversion products by the formation, migration and resolution of a Holliday-like cruciform structure.

7. MELLÉKLETEK

M1 Irodalomjegyzék

Alber, T. (1992) Structure of the leucine zipper. Curr. Opin. Genet. Dev. 2: 205-210.

- Andrake, M.D. and Skalka, A.M. (1996) Retroviral integrase, putting the pieces together. J. Biol. Chem. 271: 19633-19636.
- Arini, A., Keller, M.P. and Arber, W. (1997) An antisense RNA in IS30 regulates the translational expression of the transposase. *Biol. Chem.* 378: 1421-1431.
- Barnett, M.J. *et al.* (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9883-9888.
- Bhasin, A., Goryshin, I.Y. and Reznikoff, W.S. (1999) Hairpin formation in Tn5 transposition. J. Biol. Chem. 274: 37021-37029.
- Bhasin, A., Goryshin, I.Y., Steiniger-White, M., York, D. and Reznikoff, W.S. (2000) Characterization of a Tn5 pre-cleavage synaptic complex. *J. Mol. Biol.* **302**: 49-63.
- Bender, J. and Kleckner, N. (1986) Genetic evidence that Tn10 transposes by a nonreplicative mechanism. *Cell.* **45**: 801-815.
- Berg, D.E. (1983) Structural requirement for IS50-mediated gene transposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3628-3632.
- Berg, D.E. (1989) Transposon Tn5. In Mobile DNA (ed. Berg, D. E. and Howe, M. M.) pp. 185-210. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Berger, B. and Haas, D. (2001) Transposase and cointegrase: specialized transposition proteins of the bacterial insertion sequence IS21 and related elements. *Cell. Mol. Life. Sci.* 58: 403-419.
- Birck, C., Malfois, M., Svergun, D. and Samama, J. (2002) Insights into signal transduction revealed by the low resolution structure of the FixJ response regulator. *J. Mol. Biol.* **321**: 447-457.
- Bolland, S. and Kleckner, N. (1996) The three chemical steps of Tn10/IS10 transposition involve repeated utilization of a single active site. *Cell.* 84: 223-233.
- Boyer, H. and Roulland-Dussoix, J. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli. J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.
- Brosius, J.and Holy, A. (1984) Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic *lac* operator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6929-6933.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. and Guedon, G. (2002) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mo.l Microbiol.* **46**: 601-610.
- Casadesus, J., Naas, T., Garzon, A., Arini, A., Torreblanca, J. and Arber, W. (1999) Lack of hotspot targets: a constraint for IS30 transposition in Salmonella. *Gene.* 238: 231-239.
- Caspers, P., Dalrymple, B., Iida, S. and Arber, W. (1984) IS30, a new insertion sequence of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 68-73.
- Castilho, B.A. and Casadaban, M.J. (1991) Specificity of mini-Mu bacteriophage insertions in a small plasmid. J. Bacteriol. 173: 1339-1343.
- Chaconas, G. and Harshey R.M. (2002) Transposition of phage Mu DNA. In Mobile DNAII. (ed. Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A. M.). pp. 384-402. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Chandler, M. and Galas, D.J. (1983) Cointegrate formation mediated by Tn9. II. Activity of IS1 is modulated by external DNA sequences. J. Mol. Biol. 170: 61-91.
- Chandler, M., Mahillon, J. (2002) Insertion sequences revisited. In Mobile DNAII. (ed. Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A. M.). pp. 305-366. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Chang, A.C. and Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**: 1141-1156.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991-1995.
- Churchward, G., Belin, D. and Nagamine, Y. (1984) A pSC101-derived plasmid which shows no sequence homology to other commonly used cloning vectors. *Gene.* **31**:165-171.
- Churchward, G. (2002) Conjugative transposons and related mobile elements. In Mobile DNAII. (ed. Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A. M.). pp. 177-191. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Clewell, D.B. and Helinski, D.R. (1969) Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an opern circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**: 1159-1166.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids Res. 16: 10881-10890.
- Craig, N.L. (1989) Transposon Tn7. In Mobile DNA (ed. Berg, D. E. and Howe, M. M.) pp. 211-225. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Craig, N.L. (1991) Tn7: a target site-specific transposon. Mol. Microbiol. 5: 2569-2573.
- Craig, N.L. (1996) Transposon Tn7. Curr Top Microbiol Immunol 204: 27-48.

- Craigie, R., Mizuuchi, M. and Mizuuchi, K. (1984) Site-specific recognition of the bacteriophage Mu ends by the Mu A protein. *Cell.* **39**: 387-394.
- Craigie, R. and Mizuuchi, K. (1985) Mechanism of transposition of bacteriophage Mu: structure of a transposition intermediate. *Cell.* **41**: 867-876.
- Craigie, R., Arndt-Jovin, D.J. and Mizuuchi, K. (1985) A defined system for the DNA strand-transfer reaction at the initiation of bacteriophage Mu transposition: protein and DNA substrate requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 82:7570-7574.
- Craigie, R. and Mizuuchi, K. (1987) Transposition of Mu DNA: joining of Mu to target DNA can be uncoupled from cleavage at the ends of Mu. *Cell.* **51**: 493-501.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M. and Brenner, S.E. (2004) WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*. 14: 1188-1190.
- Cui, Z., Geurts, A.M., Liu, G., Kaufman, C.D. and Hackett, P.B. (2002) Structure-function analysis of the inverted terminal repeats of the sleeping beauty transposon. *J. Mol. Biol.* **318**: 1221-1235.
- Curcio, M.J. and Derbyshire, K.M. (2003) The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**:865-877.
- Dalrymple, B., Caspers, P. and Arber, W. (1984) Nucleotide sequence of the prokaryotic mobile genetic element IS30. *EMBO J.* **3**: 2145-2149.
- Dalrymple, B. and Arber, W. (1985) Promotion of RNA transcription on the insertion element IS30 of *E. coli* K12. *EMBO J.* **4**: 2687-2693.
- Dalrymple, B. and Arber, W. (1986) The characterization of terminators of RNA transcription on IS30 and an analysis of their role in IS element-mediated polarity. *Gene.* 44: 1-10.
- Dalrymple, B. (1987) Novel rearrangements of IS30 carrying plasmids leading to the reactivation of gene expression. *Mol. Gen. Genet.* 207: 413-420.
- Davies, D.R., Goryshin, I.Y., Reznikoff, W.S. and Rayment, I. (2000) Three-dimensional structure of the Tn5 synaptic complex transposition intermediate. *Science*. **289**: 77-85.
- Dente, L., Cesareni, G. and Cortese, R. (1983) pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucl. Acids Res.* **11**: 1645-1655.
- Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12:** 387-395.
- Duval-Valentin, G., Normand, C., Khemici, V., Marty, B. and Chandler, M. (2001) Transient promoter formation: a new feedback mechanism for regulation of IS911 transposition. *EMBO J.* 20: 5802-5811.
- Duval-Valentin, G., Marty-Cointin, B. and Chandler, M. (2004) Requirement of IS911 replication before integration defines a new bacterial transposition pathway. *EMBO J.* 23: 3897-3906.
- Engler, J.A. and van Bree, M.P. (1981) The nucleotide sequence and protein coding capability of the transposable element IS5. *Gene.* 14: 155-163.
- Fadool, J.M., Hartl, D.L. and Dowling, J.E. (1998) Transposition of the mariner element from *Drosophila* mauritiana in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5182-5186.
- Farkas, T., Kiss, J. and Olasz, F. (1996) The construction and characterization of an effective transpositional system based on IS*30. FEBS Letters.* **390**: 53-58.
- Fischer, S.E., van Luenen, H.G. and Plasterk, R.H. (1999) Cis requirements for transposition of Tc1-like transposons in *C. elegans. Mol.Gen. Genet.* 262: 268-274.
- Frederico, J.G. and Stephen, M.B. (1997) Trans-kingdom transposition of the *Drosophila* element *mariner* within the protozoan *Leishmania*. *Science*. **276**: 1716-1719.
- Galas, D.J., Calos, M.P. and Miller, J.H. (1980) Sequence analysis of Tn9 insertions in the lacZ gene. J. Mol. Biol. 144: 19-41.
- Garcillan-Barcia, M.P., Bernales, I., Mendiola, M. and de la Cruz, F. (2002) IS91 Rolling circle transposition. In Mobile DNAII. (ed. Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A.M.) pp. 891-904. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Goff, S.A. et al. (2002) A draft sequence of rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica). Science. 296: 92-100.
- Goryshin, I.Y., Miller, J.A., Kil, Y.V., Lanzov, V.A. and Reznikoff, W.S. (1998) Tn5/IS50 target recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10716-10721.
- Gough, J. and Murray, N. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. J. Mol. Biol. 166: 1-19.
- Grishin, N.V. (2000) Two tricks in one bundle: hélix-turn-hélix gains enzymatic activity. *Nucl. Acids Res.* 28: 2229-2233.
- Hallet, B., Rezsőházy, R., Mahillon, J. and Delcour, J. (1994) IS231A insertion specificity: consensus sequence and DNA bending at the target site. *Mol. Microbiol.* 14: 131-139.
- Halling, S.M. and Kleckner, N. (1982) A symmetrical six-base-pair target site sequence determines Tn10 insertion specificity. *Cell.* 28: 155-163.
- Hames, B.D. and Rickwood, D. (1990) Gel Electrophoresis of Proteins.
- Haren, L., Polard, P., Ton-Hoang, B. and Chandler, M. (1998) Multiple oligomerisation domains in the IS911 transposase: a leucine zipper motif is essential for activity. J. Mol. Biol. 283: 29-41.

- Haren, L., Ton-Hoang, B. and Chandler, M. (1999) Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. Annu. Rev. Microbiol. 53: 245-281.
- Harrison, S.C. and Aggarwal, A.K. (1990) DNA recognition by proteins with the hélix-turn-hélix motif. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 933-969.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. and Timmis, K.M. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 172: 6557-6567.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 77: 51-59.
- Imre., A., Olasz, F. és Nagy, B. (2004) Salmonella enteritidis flagellin-szintézisének gátlása irányított mutagenezissel. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 9. Munkaértekezlete, Sopron, *poszter*
- Izsvák, Z., Khare, D., Behlke, J., Heinemann, U., Plasterk, R.H., and Ivics, Z. (2002) Involvement of a bifunctional, paired-like DNA-binding domain and a transpositional enhancer in Sleeping Beauty transposition. *J. Biol. Chem.* **277**: 34581-34588.
- Jin, Q., Yuan, Z., Xu, J., Wang, Y., Shen, Y., Lu, W., Wang, J., Liu, H., Yang, J., Yang, F., Zhang, X., Zhang, J., Yang, G., Wu, H., Qu, D., Dong, J., Sun, L., Xue, Y., Zhao, A., Gao, Y., Zhu, J., Kan, B., Ding, K., Chen, S., Cheng, H., Yao, Z., He, B., Chen, R., Ma, D., Qiang, B., Wen, Y., Hou, Y., Yu, J. (2002) Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucl. Acids Res.* **30**: 4432-4441.
- Jordan, S.R. and Pabo, C.O. (1988) Structure of the lambda complex at 2.5 A resolution: details of the repressoroperator interactions. *Science*. **242**: 893-899.
- Kahn, D. and Ditta, G. (1991) Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the 35 binding domain of sigma factors. *Mol. Microbiol.* **5**: 987-997.
- Kapitonov, V.V. and Jurka, J. (2001) Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 8714-8719.
- Kennedy, A.K., Guhathakurta, A., Kleckner, N. and Haniford, D.B. (1998) Tn10 transposition via a DNA hairpin intermediate. Cell. 95: 125-134.
- Kersulyte, D., Akopyants, N.S., Clifton, S.W., Roe, B.A. and Berg, D.E. (1998) Novel sequence organization and insertion specificity of IS605 and IS606: chimaeric transposable elements of *Helicobacter pylori*. Gene. 223:175-186.
- Kinzler, K.W., Ruppert, J.M., Bigner, S.H. and Vogelstein, B. (1988) The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature*. **332**: 371-374.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1990) The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 634-642.
- Kiss, J. (1999) Az IS30 inszerciós szekvencia transzpozíciója és szerepe a bakteriális genom plaszticitásában. *Ph.D.* értekezés
- Kiss, J. and Olasz, F. (1999) Formation and transposition of the covalently closed IS30 circle: the relation between tandem dimers and monomeric circles. *Mol. Microbiol.* **34**: 37-52.
- Kleckner, N., Chan, R.K., Tye, B.K. and Botstein, D. (1975) Mutagenesis by insertion of a drug-resistance element carrying an inverted repetition. *J. Mol. Biol.* **97**: 561-575.
- Kleckner, N. (1989) Transposon Tn10. In Mobile DNA (ed. Berg, D. E. and Howe, M. M.) pp. 227-268. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Kolb, A.F., Coates, C.J., Kaminski, J.M., Summers, J.B., Miller, A.D. and Segal, D.J. (2005) Site-directed genome modification: nucleicacid and protein modules for targeted integration and gene correction. *Trends Biotechnol.* 23: 399-406.
- Kolisnyichenko, V., Plunkett, G. 3rd. Herring, C.D., Fehér, T., Posfai, J., Blattner, F.R. and Posfai, G. (2002) Engineering a reduced *Escherichia coli* genome.*Genome Res.* **12**: 640-647.
- Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D. and Rehrauer, W.M. (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**: 401-465.
- Lander, E.S. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 409: 860-921.
- Lavoie, B.D., Chan, B.S., Allison, R.G. and Chaconas, G. (1991) Structural aspects of a higher order nucleoprotein complex: induction of an altered DNA structure at the Mu-host junction of the Mu type 1 transpososome. *EMBO J.* 10: 3051-3059.
- Lee, C.C., Mul, Y.M., and Rio, D.C. (1996) The Drosophila P-element KP repressor protein dimerizes and interacts with multiple sites on P-element DNA. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5616-5622.
- Lee, H.H., Yoon, J.Y., Kim, H.S., Kang, J.Y., Kim, K.H., Kim, D.J., Ha, J.Y., Mikami, B., Yoon, H.J., and Suh, S.W. (2006) Crystal structure of a metal ion-bound IS200 transposase. *J. Biol. Chem.* **281**: 4261-4266.
- Lewis, L.A. and Grindley, N.D. (1997) Two abundant intramolecular transposition products, resulting from reactions initiated at a single end, suggest that IS2 transposes by an unconventional pathway. *Mol. Microbiol.* 25: 517-529.

- Lewis, L.A., Cylin, E., Lee, H.K., Saby, R., Wong, W. and Grindley, N.D. (2004) The left end of IS2: a compromise between transpositional activity and an essential promoter function that regulates the transposition pathway. *J. Bacteriol.* 186: 858-865.
- Lichens-Park, A. and Syvanen, M. (1988) Cointegrate formation by IS50 requires multiple donor molecules. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 244-251.
- Lichtenstein, C. and Brenner, S. (1981) Site-specific properties of Tn7 transposition into the *E. coli* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **183**: 380-387.
- Loot, C., Turlan, C. and Chandler, M. (2004) Host processing of branched DNA intermediates is involved in targeted transposition of IS911. Mol. Microbiol. **51**: 385-393.
- Lopilato, J., Bortner, S. and Beckwith, J. (1986) Mutations in a new chromosomal gene of *Escherichia coli* K-12, *pcnB*, reduce plasmid copy number of pBR322 and its derivatives. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 285-90.
- Lovell, S., Goryshin, I.Y., Reznikoff, W.R., and Rayment, I. (2002) Two-metal active site binding of a Tn5 transposase synaptic complex. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 278-281.
- Mahillon, J., and Chandler, M. (1998) Insertion sequences. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 725-774.
- May, E.W. and Grindley, N.D. (1995) A functional analysis of the inverted repeat of the gamma delta transposable element. *J. Mol. Biol.* **247**: 578-587.
- Mayaux, J.F., Springer, M., Graffe, M., Fromant, M. and Fayat, G. (1984) IS4 transposition in the attenuator region of the *Escherichia coli pheS*, T operon. *Gene.* **30**: 137-146.
- McClintock, B. (1948) Mutable loci in maize. In Carnegie Institute Washington Yearbook. vol. 47, pp. 155-169.
- McGuffin, L.J., Bryson, K. and Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*. 16: 404-405.
- Mendiola, M.V. and de la Cruz, F. (1989) Specificity of insertion of IS91, an insertion sequence present in alphahaemolysin plasmids of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. **3**: 979-984.
- Mendiola, M.V., Bernales, I. and de la Cruz, F. (1994) Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 1922-1926.
- Muller, H.P. and Varmus, H.E. (1994) DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes. *EMBO J.* **13**: 4704-4714.
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K., and Senda, T. (2003) Crystal structure of a fulllength LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. J. Mol. Biol. 328: 555-566.
- Murphy, E., Reinheimer, E. and Huwyler, L. (1991) Mutational analysis of *att*554, the target of the site-specific transposon Tn554. *Plasmid.* **26**: 20-29
- Nagy, Z. (2004) Possible ways of regulating IS element transposition: target specificity and the formation of active intermediate structures. *Ph.D. Thesis*
- Naumann, T.A. and Reznikoff, W.S. (2002) Tn5 transposase with an altered specificity for transposon ends. J. Bacteriol. 184: 233-240.
- Normand, C., Duval-Valentin, G., Haren, L. and Chandler, M. (2001) The terminal inverted repeats of IS911: requirements for synaptic complex assembly and activity. J. Mol. Biol. 308: 853-871.
- Ohta, S., Tsuchida, K., Choi, S., Sekine, Y., Shiga, Y. and Ohtsubo, E. (2002) Presence of a charasteristic D-D-E motif in IS1 transposase. J. Bacteriol. 184: 6146-6154.
- Ohta, S., Yoshimura, E., and Ohtsubo, E. (2004) Involvement of two domains with hélix-turn-hélix and zinc finger motifs in the binding of IS1 transposase to terminal inverted repeats. *Mol. Microbiol.* **53**: 193-202.
- Olasz, F., Stalder, R. and Arber, W. (1993) Formation of the tandem repeat (IS30)₂ and its role in IS30-mediated transpositional DNA rearrangements. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 177-187.
- Olasz, F. (1994) A genetikai anyag újrarendeződése *Escherichia coli* és *Rhizobium meliloti* rendszerekben. *Kandidátusi értekezés*
- Olasz, F., Farkas, T., Stalder, R. and Arber, W. (1997a) Mutations in the carboxy-terminal part of IS30 transposase gene affect the formation and dissolution of (IS30)₂ dimer. *FEBS Letters*. **413**: 453-461.
- Olasz, F., Farkas, T., Kiss, J., Arini, A. and Arber, W. (1997b) Terminal inverted repeats of insertion sequence IS30 serve as targets for transposition. *J. Bacteriol.* **179**: 7551-7558.
- Olasz, F., Kiss, J., König, P., Búzás, Z., Stalder, R. and Arber, W. (1998) Target specificity of insertion element IS30. Mol. Microbiol. 28: 691-704.
- Pabo, C.O. and Lewis, M. (1982) The operator-binding domain of lambda repressor: structure and DNA recognition. *Nature*. **298**: 443-447.
- Panyutin, I.G. and Hsieh, P. (1993). Formation of a single base mismatch impedes spontaneous DNA branch migration. J. Mol. Biol. 230: 413–424.
- Panyutin, I.G. and Hsieh, P. (1994). The kinetics of spontaneous DNA branch migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **91**: 2021–2025.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebaihia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M.,

Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G. (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*. **413**: 523-527.

- Pato, M.L. (1989) Bacteriophage Mu. In Mobile DNA (ed. Berg, D. E. and Howe, M. M.) pp. 24-52. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Pham, P., Rangarajan, S., Woodgate, R. and Goodman, M.F. (2001) Roles of DNA polymerases V and II in SOSinduced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**: 8350-8354.
- Polard, P. and Chandler, M. (1995) An in vivo transposase-catalyzed single-stranded DNA circularization reaction. *Genes. Dev.* **9**: 2846-2858.
- Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., Carlier, C. and Courvalin, P. (1989) Molecular characterization of two proteins involved in the excision of the conjugative transposon Tn1545: homologies with other site-specific recombinases. *EMBO J.* 8: 2425-2433.
- Pruss, D., Reeves, R., Bushman, F.D. and Wolffe, A.P. (1994) The influence of DNA and nucleosome structure on integration events directed by HIV integrase. *J. Biol. Chem.* **269**:25031-25041.
- Reznikoff, W.S. (2003) Tn5 as a model for understanding DNA transposition. Mol. Microbiol. 47: 1199-1206.
- Rice, P. and Mizuuchi, K. (1995) Structure of the bacteriophage Mu transposase core: a common structural motif for DNA transposition and retroviral integration. *Cell.* **82**: 209-220.
- Roberts, D., Hoopes, B.C., McClure, W.R. and Kleckner, N. (1985) IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. Cell. 43: 117-130.
- Ronning, D.R., Guynet, C., Ton-Hoang, B., Perez, Z.N., Ghirlando, R., Chandler, M. and Dyda, F. (2005) Active site sharing and subterminal hairpin recognition in a new class of DNA transposases. *Mol. Cell.* 20: 143-154.
- Rousseau, P., Normand, C., Loot, C., Turlan, C., Alazard, R., Duval-Valentin, G. and Chandler, M. (2002) Transposition of IS911. In Mobile DNAII. (ed. Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A. M.) pp. 367-383. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Rousseau, P., Gueguen, E., Duval-Valentin, G. and Chandler, M. (2004) The hélix-turn-hélix motif of bacterial insertion sequence IS911 transposase is required for DNA binding. *Nucl. Acids Res.* **32**: 1335-1344.
- Rowland, S.J., Sherratt, D.J., Stark, W.M. and Boocock, M.R. (1995) Tn552 transposase purification and in vitro activities. *EMBO J.* 14: 196-205.
- Russel, M., Kidd, S. and Kelley, M.R. (1986). An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene* 45: 333-338.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sakai, J. and Kleckner, N. (1997) The Tn10 synaptic complex can capture a target DNA only after transposon excision. *Cell.* **89**: 205-214.
- Sarkar, G. and Sommer, S.S. (1990) The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques*. **4**: 404-740.
- Sarnovsky, R.J., May, E.W. and Craig, N.L. (1996) The Tn7 transposase is a heteromeric complex in which DNA breakage and joining activities are distributed between different gene products. *EMBO J.* **15**: 6348-6361.
- Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M. and Li, L.Y. (1995) Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol Rev.* **59**: 579-590.
- Shapiro, J.A. (1969) Mutation caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **40**: 93-105.
- Sherratt, D. (1989) Tn3 and related transposable elements: site-specific recombination and transposition. In Mobile DNA (ed. Berg, D. E. and Howe, M. M.) pp. 163-184. American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. and Huse, W.D. (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* **16**: 7583-7600.
- Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- Sekine, Y., Aihara, K. and Ohtsubo, E. (1999) Linearization and transposition of circular molecules of insertion sequence IS3. J. Mol. Biol. 294: 21-34.
- Sengstag, C. and Arber, W. (1983) IS2 insertion is a major cause of spontaneous mutagenesis of the bacteriophage P1: non-random distribution of target sites. *EMBO J.* **2**: 1777-1781.
- Stalder, R. and Arber, W. (1989) Characterization of *in vitro* constructed IS30-flanked transposons. *Gene* **76**: 187-193.
- Stalder, R., Caspers, P., Olasz, F. and Arber, W. (1990) The N-terminal domain of the insertion sequence 30 transposase interacts specifically with the terminal inverted repeats of the element. J. Biol. Chem. 265: 3757-3762.
- Steiniger-White, M. and Reznikoff, W.S. (2000) The C-terminal alpha hélix of Tn5 transposase is required for synaptic complex formation. J. Biol. Chem. 275: 23127-23133.
- Steiniger-White, M., Rayment, I. and Reznikoff, W.S., (2004) Structure/function insights into Tn5 transposition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:50-57.
- Summers, M.F., South, T.L., Kim, B. and Hare, D.R. (1990) High-resolution structure of an HIV zinc fingerlike domain via a new NMR-based distance geometry approach. *Biochemistry* **29**: 329-340.

- Surette, M.G., Buch, S.J. and Chaconas, G. (1987) Transpososomes: stable protein-DNA complexes involved in the in vitro transposition of bacteriophage Mu DNA. *Cell.* **49**: 253-262.
- Szeverényi, I., Bodoky, T. and Olasz, F. (1996). Isolation, characterisation and transposition of an (IS2)₂ intermediate. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 281-289.
- Tavakoli, N.P. and Derbyshire, K.M. (1999) IS903 transposase mutants that suppress defective inverted repeats. *Mol. Microbiol.* **31**: 1183-1195.
- Ton-Hoang, B., Betermier, M., Polard, P. and Chandler, M. (1997) Assembly of a strong promoter following IS911 circularization and the role of circles in transposition. *EMBO J.* **16**: 3357-3371.
- Ton-Hoang, B., Turlan, C. and Chandler, M. (2004) Functional domains of the IS1 transposase: analysis in vivo and in vitro. *Mol. Microbiol.* **53**: 1529-1543.
- Ton-Hoang, B., Guynet, C., Ronning, D.R., Cointin-Marty, B., Dyda, F. and Chandler, M. (2005) Transposition of ISHp608, member of an unusual family of bacterial insertion sequences. *EMBO J.* **24**: 3325-3338.
- Turlan, C., Ton-Hoang, B. and Chandler, M. (2000) The role of tandem IS dimers in IS911 transposition. Mol. Microbiol. 35: 1312-1325.
- Turlan, C., Loot, C. and Chandler, M. (2004) IS911 partial transposition products and their processing by the *Escherichia coli* RecG helicase. *Mol. Microbiol.* **53**: 1021-1033.
- Turner, D.L. and Weintraub, H. (1994) Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev.* 8: 1434-1447.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yu, J. et al. (2002) A draft sequence of rice genome (Oryza sativa L. ssp. indica). Science. 296: 79-92.
- van Gent, D.C., Groeneger, A.A. and Plasterk, R.H. (1992) Mutational analysisof the integrase protein of human immunodeficiency virus type 2. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **89**:9598-9602.
- Venkatesan, M.M., Goldberg, M.B., Rose, D.J., Grotbeck, E.J., Burland, V. and Blattner, F.R. (2001) Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 69: 3271-3285.
- Vink C, van Gent DC, Elgersma Y. and Plasterk RH (1991) Human immunodeficiency virus integrase protein requires a subterminal position of its viral DNA recognition sequence for efficient cleavage. J. Virol. 65: 4636-4644.
- Vlahovicek, K., Kajan, L. and Pongor, S. (2003) DNA analysis servers: plot.it, bend.it, model.it and IS. Nucl. Acids Res. 31:3686-3687.
- Waterston, R.H. *et al.* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. **420**: 520-562.
- West, S.C. (1992) Enzymes and molecular mechanisms of homologous recombination. Annu. Rev. Biochem. 61: 603–640.
- West, S.C. (1997) Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 213-244.
- Westerfield, M. (1993) The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of Zebrafish (*Brachydanio rerio*). Eugene, O.R.: University of Oregon Press
- Weston-Hafer, K. and Berg, D.E. (1991). Deletions in plasmid pBR322: Rreplication slippage involving leading and lagging strands. *Genetics*. **127**: 649-655.
- Wilde, C., Bachellier, S., Hofnung, M., Carniel, E. and Clement, J.M. (2002) Palindromic unit-independent transposition of IS1397 in Yersinia pestis. J. Bacteriol. 184: 4739-4746.
- Wintjens, R. and Rooman, M. (1996) Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. J. Mol. Biol. 262: 294-313.
- Wu, Z. and Chaconas, G. (1994) Characterization of a region in phage Mu transposase that is involved in interaction with the Mu B protein. *J. Bio. Chem.* **269**:28829-28833.
- Zerbib, D., Gamas, P., Chandler, M., Prentki, P., Bass, S. and Galas, D.J. (1985) Specificity of insertion of IS1. J. Mol. Biol. 185: 517-524.
- Zerbib, D., Prentki, P., Gamas, P., Freund, E., Galas, D.J. and Chandler, M. (1990) Functional organization of the ends of IS1: specific binding site for an IS1-encoded protein. *Mol. Microbiol.* **4**: 1477-1486.
- Zou, A.H., Leung, P.C. and Harshey, R.M. (1991) Transposase contacts with Mu DNA ends. J. Biol. Chem. 266: 20476-20482.

M2 Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

Nemzetközi publikációk:

- Szabó, M., Müller, F., Kiss, J., Balduf, C., Strähle, U. and Olasz, F. (2003) Transposition and targeting of the prokaryotic mobile element IS30 in zebrafish. *FEBS Letters* **550**: 46-50.
- Olasz, F., Fischer, T., Szabó, M., Nagy, Z. and Kiss, J. (2003) Gene conversion in transposition of *Escherichia coli* element IS*30. J. Mol. Biol.* **334**: 967-978.
- Nagy, Z., Szabó, M., Chandler, M. and Olasz, F. (2004) Analysis of the N-terminal DNA binding domain of the IS30 transposase. *Mol. Microbiol.* **54**: 478-488.
- Kiss, J., Szabó, M., Chandler, M. and Olasz, F. Cis-acting element in IS30 transposition the functional analysis of the terminal sequences. Oxford Workshop on Site-specific Recombination, Transposition and DNA Dynamics. St Catherine's College, Oxford, September 19-24. 2006. (poster)
- Szabó, M., Kiss, J., Nagy, Z., Chandler, M. and Olasz, F. Sub-terminal sequences modulating IS30 transposition *in vivo* and *in vitro*. (előkészületben)

Hazai publikációk:

- Szabó Mónika, Nagy Zita, Kiss János, Olasz Ferenc: IR végek és a határoló szekvenciák szerepe az IS*30* transzpozíciójában. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete. Sopron, 2004. május 10-13. (poszter)
- Kohut Gábor, Szabó Mónika, Olasz Ferenc: Kiméra IS30 inszerciós elemek targetspecificitásának vizsgálata. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete. Sopron, 2004. május 10-13. (poszter)
- Nagy Zita, Szabó Mónika, Michael Chandler, Olasz Ferenc: Az IS30 transzpozáz fehérje Nterminális régiójának funkcionális analízise. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete. Sopron, 2004. május 10-13. (előadás)

Egyéb közlemények

Nemzetközi publikációk:

- Szabó, M., Kiss, J., Kótány, G. and Olasz, F. (1999) Importance of illegitimate recombination and transposition in IS30-associated excision events. *Plasmid* **42**: 192-209.
- Kiss, J., Szabó, M., Olasz, F. (2003) Site-specific recombination by the DDE family member mobile element IS30 transposase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:15000-15005.

Hazai publikációk:

- Szabó Mónika, Kiss János, Olasz Ferenc: Az illegitim rekombináció és a transzpozíció szerepe IS30 kivágódásában. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, 1999. április 11-14. (poszter)
- Kiss János, Szabó Mónika, Nagy Zita, Olasz Ferenc: Helyspecifikus és transzpozíciós rekombináció IS30 mobilis elemnél. GE1 A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete. Sopron, 2004. május 10-13. (előadás)





7.1. függelék Az IS*30* transzpozáz másodlagos szerkezete. A predikcióhoz a PSIPRED programot használtuk (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk//psipred)

	1				50					100
ISSaul										MSYN
IS658										MSYS
ISLc1										MSYK
ISPlu17										MTTHYR
ISPlu1										MAYT
IS1655										MSYT
IS4351										MSK
IS1112										MSSS
ISAs2										MSYQ
IS18				<u></u>			· · · <mark>· ·</mark> · · · · ·		· · · <mark>· · · · · ·</mark> · ·	MKKYT
ISLxx5		<mark></mark>	MQGRV	PG <mark>AAEQ</mark> RALA	PRSGGTSRNQ	PEHGIPLGQS	NGR <mark>RI</mark> YPDGR	VVDYKDRVPV	VVD <mark>PVQRA</mark> SM	RSLEAALHPR
ISBlo4	MTRSHRNEDR	GGEH <mark>RWTF</mark> NG	VEYP <mark>TRKLMC</mark>	EARRAEYVRL	LDE EGMN FTQ	AAHAVGVSKR	TGKA.WRNGR	TRATGRNEKP	LVDWYRST	MDKPKTLHPR
ISCg2			MGPY	YG <mark>PRTLH.QV</mark>	LREDYTTLFD	ELSAL <mark>GL</mark> PAQ	VCGALL HLAP	PPSL <mark>RFSY</mark> MS	CVVPLFA	DEIKVVGQGT
IS1513				M	RSYAG <mark>SDIVE</mark>	RLMRRWCLCQ	IQARSWGKDS	VMPAP <mark>MKTQ</mark> A	.VDGFPS <mark>GVF</mark>	DKH <mark>AL</mark> VGRG <mark>R</mark>
IS30					MRRTFT <mark>A</mark>	EEKASVFELW	KNGTG <mark>FSEIA</mark>	NILGSKPGTI	FTMLRD TGGI	KPHERKRAVA
IS30H					MRRTFT <mark>A</mark>	KEKTSVFELW	KNGKG <mark>FSEIA</mark>	NILGSKP <mark>GTI</mark>	FTMLRD TGGI	KHNERKRAVA
IS1088										MTKKNYQ
IS1086										MTRTKYQ
IS1394										MSY <mark>H</mark>
ISPst1										MSY <mark>T</mark>
ISPfl2										MSYS
IST3091										MGTRYQ
IS1382										MTTHYT
ISBlo7										MGQQYS
IS1070										MT
ISPpl										\dots LLS
IS1062likeint										MTYT
IS1062										MTYT
IS1252										MTYT
IS6770										MTYK
ISLjo1									MDSLH	STMNQHVKGK
ISL7									MDHSY	SNTKPHQKGK
IS1470									MDYQN	HNTESR.KNK
IS1139									MNMST	NYSTTNQ <mark>SYK</mark>
IS1161									MNMST	NYSTTNQ <mark>SYK</mark>
IS1239										MQDYYTPKGK
IS1630										MQK
ISC1041										
ISMag1							MKT <mark>VSN</mark>	IVGFKSRSIY	NLFDR <mark>IKIET</mark>	KRGY <mark>AKYQKK</mark>
ISMbov1							MKT <mark>VSN</mark>	IVGFKSRSIY	NLFDRITIET	KRGYAKYQKK
ISScl								· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		MYSHLS <mark>FMDK</mark>
Consensus										y.

7.2. függelék Az IS30 család transzpozázainak szekvencia illesztése és másodlagos térszerkezete.

A szekvencia illesztéshez a MultAlin (http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html), míg a másodlagos szerkezet predikciójához a PSIPRED programokat használtuk (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk//psipred). A szekvencia illesztések alapján 50%-os konszenzust készítettünk. A DDE aminosavakat aláhúzással jelöltük. !: I vagy V aminosavak; \$: L vagy M aminosavak; %: F vagy Y aminosavak; #: N, D, Q, E, B, Z aminosavak; piros α-hélixek; kék β-lemezek.

1	01			150					200
ISSaul	HLT <mark>LTERAR</mark> I	E.VLRQENYS	LRSIARKLKR SVS <mark>T.IS</mark>	REI SRNNL		NQS	YQ <mark>AETAQKNY</mark>	ETKRK LCGRP	TRFT <mark>PEL.</mark>
IS658	HLTTFERGRI	L E.TLQKLGWS	TRQIAKELNR HHST.IAF	REL KRNRT		KE.	YVS <mark>EVAHERY</mark>	VERRKGCKPK	GKWS <mark>PEL.</mark>
ISLc1	HLT <mark>IKEREII</mark>	L M.FLRAKGLS	IRAVALRMGR NPST.ISF	REL KRCAG		N	YS <mark>PSKADNDY</mark>	HQKRQ <mark>NCHKK</mark>	RLLDS <mark>HPQLW</mark>
ISPlu17	QLT <mark>QGQRYQ</mark> I	E E.AGLSAAES	QASIAKRVGV HPST.ISF	REV R <mark>R</mark> NST		QNI	YK <mark>AVSAAHES</mark>	DARRA <mark>GARKF</mark>	CKPATWL
ISPlu1	QLT <mark>ETERYQ</mark> I	S.SLREAGFS	QLFIAKSLKR SPST.ISF	REL KR <mark>N.Q.E</mark>		VQT	YC <mark>PEQAHLKV</mark>	LARRH <mark>FAKKA</mark>	VKIT <mark>PEV</mark>
IS1655	QLT <mark>QGERYH</mark> I	[Q.YLSRH.CT	VTEIAKQL <mark>NR H</mark> KST.ISF	REI R <mark>R</mark> H.RTQ		GQQ	YSA <mark>EKAQRQS</mark>	RTIK <mark>Q</mark> RKRQP	YKLD <mark>SQL</mark>
IS4351	HIT <mark>EEQRYA</mark> I	S.MMLQIPMS	KKAIAEAI <mark>GV DKS</mark> T.VYF	REI KR <mark>NCDAR</mark>		SGS	YS <mark>MELAQRKA</mark>	DRRKQQKHRK	EVLTPAM
IS1112	RLD <mark>LSERYRI</mark>	L H.ALYETGMS	MRAIADAVAR A <mark>PS</mark> T.ISF	REL RRNRH		AAK	YR <mark>PDHAQRIS</mark>	EHRR <mark>AQASRR</mark>	PRID <mark>AER</mark>
ISAs2	QLT <mark>EGQRYQ</mark> I	S.VLRAQGMS	ILATARAI <mark>GV HRS</mark> T.LYF	REL RRNAG		PQG	YQ <mark>PDNAHQHA</mark>	THRRASAAKS	.RLSADV
IS18	QLS <mark>QDERYE</mark> I	I Y.ATLK <mark>SKGS</mark>	IASLVRELGR SRST.IYF	REL KRNTG		QRG	YR <mark>AQQAAKFA</mark>	SQRRYRPSSS	M <mark>T</mark> <mark>AFA</mark>
ISLxx5	FLS <mark>LQEREL</mark> I	R.DLTRAGLS	LCRVAAKLGR SVST.ISF	REI RRNQLPG	EG		.GYH <mark>PYVAHR</mark>	KAASRRPR _{PK}	ATRLVRN <mark>PQL</mark>
ISBlo4	YLSQEERIQI	A.DRLRLGDS	IRAIARLLGR DPGT.VSF	REV ERNRNPE	SG		.GYE <mark>PYRAQQ</mark>	KAADRLKRPK	PRKAAEG <mark>TRL</mark>
ISCg2	RLSLEEKMMI	Q.RFHDTGVS	AAEIGRRLGR CRQT.ISF	REL RR <mark>GQDD</mark>	DG		.RYR <mark>ARDSYE</mark>	GAIRKLARPK	TPKLDAN <mark>RRL</mark>
IS1513	RLT VEDRVA	E E AGCRVGDS	ARAIAQKINR HHS <mark>V.VA</mark> F	REI TRNG <mark>WKI</mark> VDE	DG	TEQ	LRYN <mark>AHNAAV</mark>	STAGRMVRPK	LRKLDESPTL
IS30	HLTLSEREE	R.AGLSAKMS	IRAIATALNR SPST.ISF	REV QRNRGR			RYYK <mark>AVDANN</mark>	RANRMAKRPK	PCLLDQNLPL
IS30H	HLTLSEREE	R. AGLSAKMS	IRAIATMLNR SPST.ISF	REV QRNRGR			RYYKAVDANN	RANRMAQRPK	PCLLDQNMPL
IS1088	QLS <mark>ETERHAI</mark>	L A.LGLQQKQS	LSAIARALGR DKST.ISF	REC NRNA	GG	KG.	YASKFAQQRS	DNRKRQARPS	PKLHRQGPLF
IS1086	QLQPEERMRI	E E.IWKAEDVS	LRAMARRLGR APST.LMF	REL RRNA	ΤΑ	RGG	YGAMSAQACR	TQRLKASRPV	AKLAPDGVLW
IS1394	ELSATERVTI	Q.IGLCNGFS	QRRLARLMNR SPST.VSF	REI RRNR	NA	QGE	YVADDAQRLM	HTRRVVCRPA	KRLVPGNELF
ISPst1	ELSVEERATI	C Q.IGQAQGFS	LRRIARLIHR SP <mark>S</mark> T.ISF	REV RRNR	DV	RGG	YSAHVAQQQM	RASRRVCRPM	RKLLPGSERF
ISPf12	ELS <mark>VEERAAI</mark>	C Q.LGQAQGFS	LRGIARLINR SPST.ISF	REL RRNQ	DG	IGA	YAGPVAQQQM	RIRRQACRPK	RKLLPGSERF
IST3091	QLQSEQRNQI	Q.RGLNEGLS	MRAVAKQIGR SPST.VSF	REV RRGL	VG	E	.TYDAIQGRE	EAQRRLRKGV	RKLVGGAPLT
IS1382	HLTIEEGVTI	M.IMRMQGAS	LRAIAQVLGR QPST.LSF	REV RRQS	Q	PGH	YDASTAGARA	RALRHVPRRS	KLLAPGSELF
ISBIO7	HLSSEERIL	EKLHCEQHLS	IRRTAERIGR DKST.VSF	REL RRGLWFASNE	NGSYRPYRPK	RLKTGPWTSG	PFYSALAAQR	KADLRRRGSR	KPRRMDSDRL
IS1070	SLSSQERTV.	Q.TLLELNYS	VRAIARFIKR SPST.VSI		• • • • • • • • • • •	TP	YKAELAHALA	LKKRHLRGRH	DTLTPAIA
ISPpl	SITYSERIK	E TFCELGLS	NIQMGVRLNR SPST.IS	YEL SRC	• • • • • • • • • • •	QP	YQAELAQTDA	EYKRSQCGRK	TKLS. DELK
ISI06211Keint	HLTTDELVM	L E.SYFKINQS	VAKTAHFLNR SROT.IH		• • • • • • • • • • •	FTKQG	KSALEYYQQY	KKNKSNCGRR	PLVLPEEQ
IS1062	HLTSNELAM	E AYYNNHQS	VAKTAVLLNR SRQT.IH	CVY QFF	• • • • • • • • • • •	KTG	HNALDYFNQY	KKNKTRCGRR	PIVLSDEQ
IS1252	HLITDELVM	E SYTHQNIK	IVKIAEYLKR SRTP.IYI	NVL NFL	• • • • • • • • • • •	KEG	HTALEYYQQY	KENKKRCGRR	NIVL. PKKQ
156770		L L.SIILQHNK	PVETANKIGK ALQI.III	NVV NRF		KQG			VIQLPAHE
ISLJOI	HLSFELRVII		LEALARELING SPSI.151	TEV KRGIVKLI	HGK	VKKIKAI	QGHDAYKAHR		RKAQF
15L/ TC1470		L QELH. SKGIS	AVENTRELING SPSI.VG	ILL KRGIVSLI	IGN	VKRIKAV	EGUSIYELHR	SECGRESLFL	RKQAF
IS1470 TC1120		EIRL.RDGFS	DIFINICE NECT TH	NET REGILCO.IK	VGRE		YVADAAU ND	VDUADEACVV	
TC1161	HLSEALKGEI	EATL.SVGLK	DAFTARRIGE NEST. TT	NET NECSTTO VK			I I CDCCCTTV	TRHAREASII	LKLDS <mark>VSDDF</mark>
TC1220		CONK LECR	NETABLICK ADOT IN	VET KRGSTIQ.VK		ENUVERO	UNOT WYOFIND		
TG1620			TTKIAKII GV SPTT IN	NET KUNGUVRQVR	WCVF		TTTPFKWK	RELINNI NEV	
TSC1041	VTO WINTER I VI	MLESBREGE	APKFAFLIKP HDSTVIVI	RET. KENST	MOIL		VLARVA SDMT	FARLDCCTEN	SKSTOSSCHI
ISMag1	CKTCGMDLK	C KTTYVISALK	FLNLIETRND SKRIFNN			итн	FEKEYOOLLY	FYLKNRNS	TENKAVKOSU
TSMbow1	CKTCCMDTK	S KTIYVISALK	FINITETRHD SKRIENN			VTD	TEKEVKOLLY	FYLKNRNSFN	LDSKAVKOSV
ISSc1	VKLEOLLIS	TELKKN GEON	ISAIAKYLNR HRSTILRI	TK RFK			EYSAYKSDKM	YYEKRKKN	KRFKFTFEOL
Consensus	l er i	as	ia l r sT i r	r r			v a		

20)1				250					300
ISSaul	GNIIKYYLKC	HWS <mark>PEQIVGR</mark>	LLQNQ.	IC <mark>FKTIY</mark>	RWINSNMINF	E <mark>LIS</mark> C	LRQKG	KR.QKPKE	TRGKFNIGR.	P <mark>ISQ</mark> RPK <mark>E</mark>
IS658	ATIIEEKLQ <mark>L</mark>	TWS <mark>PEQIIGR</mark>	LSELN.	LS <mark>FKTIY</mark>	RWLYLGLVNK	SDLSV	<mark>LR</mark> HKG	KR.QKPME	TRGRFNIGT.	S <mark>ID</mark> QRPK <mark>E</mark>
ISLc1	RQIVHYILDP	• HWS <mark>PEQITAR</mark>	FNKEHQ	W.CV <mark>SYNTIY</mark>	RHIYQHNLGE	KYSSRGDT	GI <mark>QRHL</mark> RHKH	RT.RHSKN	TRRHREVQTD	YISIHERPGF
ISPlu17	SHHLPVWLK <mark>H</mark>	I GMS <mark>PEQIAQR</mark>	LKQEQP	SR <mark>AVS</mark> HEWIY	RFIA <mark>AEQRAG</mark>	G <mark>ELYT</mark>	YLRHRR	<mark>K</mark> RYRKRYG	SHDRRGQLRN	RVSISER <mark>PAE</mark>
ISPlu1	KRWIKRLIWK	DLS <mark>PEQVADY</mark>	LKQHKG	I.SLH <mark>HETIY</mark>	RLIYQDKREG	G <mark>DLWQ</mark>	<mark>HLRIAR</mark>	<mark>K</mark> PYRKRYG	RYERRGKIKN	RVS <mark>IDE</mark> RPEI
IS1655	IQHIDTLIRR	KLS <mark>PEQVCAY</mark>	LCKHHR	I.TLH <mark>HSTIY</mark>	RYLR <mark>QDKSNG</mark>	STLWQ	HLRICS	KPYRKRYG	STWTRGKVPN	RVGIENRPAI
IS4351	RKRIIKLLK <mark>K</mark>	GFS <mark>PEQ<mark>IVG</mark>R</mark>	SRLEGI	A.MVSHETIY	RWIWEDKRRG	GKL <mark>HK</mark>	<mark>YLRRQ</mark> G	RRYAKRGS	KNAGRGFIPG	RVDIDERPEI
IS1112	IRQIEVLLRE	DFS <mark>PEQIAG</mark> .	<mark>R</mark> <mark>TGL</mark>	ASHAWIY	RHIDADQKR <mark>G</mark>	GQLFM	<mark>HLR.K</mark> R	RRKRRRRG	VRDGRGQLTH	RRS <mark>WTQ</mark> RPS <mark>V</mark>
ISAs2	IQFLELTLAW	WWSP <mark>EQISAV</mark>	GKQIGL	MVS <mark>HEWIY</mark>	RHVA <mark>ADKAR</mark> G	GQLYR	<mark>HLR.Q</mark> G	H.KRYRKG	ASSLRSPIKE	ARS <mark>ID</mark> ERPAI
IS18	FAYIDYLIG <mark>L</mark>	」DWS <mark>PEQISGA</mark>	LTQRGW	LDV <mark>PSHEWIY</mark>	QYIYQDKSKG	GKLHL	HLRHQK	KYRKRGYK	NTDRRGQIID	KTS <mark>IHC</mark> R <mark>DQV</mark>
ISLxx5	<mark>RSYVQRKLT</mark> L	RWS <mark>PEQISRS</mark>	LIRE <mark>F.</mark> PGDA	EMR <mark>VAHETIY</mark>	QAFY <mark>V</mark> QGRGQ	L <mark>RRELTM</mark> .	<mark>VLRT</mark> GR	A.KRKPHRSG	AARRHRFADP	MV <mark>MISD</mark> RPA <mark>E</mark>
ISBlo4	WDEIAAGLRR	HWSPE <mark>QIANR</mark>	LRLDF.PDNG	DMHASVETIY	QAIYLQARGE	l <mark>kQelkr</mark> .	<mark>AMRQ</mark> GR	T.ARRP.QGG	QGRKPRFREP	MAMISERPPE
ISCg2	RAVVVEALN <mark>N</mark>	I KLS <mark>PEQISGL</mark>	LATEH.ANDS	SMQIS <mark>HETIY</mark>	QALY <mark>V</mark> QGKGA	lr <mark>delkvek</mark> .	<mark>FLRT</mark> GR	K.GRKPQSKL	PSRGKPWVEG	.AL <mark>ISQ</mark> RPA <mark>E</mark>
IS1513	RGVVVDCLAR	RWS <mark>PGRI</mark> SA <mark>W</mark>	LEHAF.SDDE	SMRISHEAIY	SALY <mark>I</mark> QGKGS	LRA <mark>ELEEV</mark> MK	TKDVLIRGGS	TRKRRARNAG	VLTGRPWIKG	.AEITHRSPE
IS30	RKLVLEKLE <mark>M</mark>	I KWS <mark>PEQISGW</mark>	LRRT <mark>K.PRQ</mark> K	TLRIS <mark>PETI</mark> Y	KTLY FRSREA	L <mark>H.HLNIQHL</mark>	RRSHSLRHGR	RHTRKGERGT	INIVN	GT <mark>PIHE</mark> RSRN
IS30H	RELVLEKLEM	KWSP <mark>EQISGW</mark>	LRRTK.PRQK	TLRISPETIY	KTLYFR SREA	LH.HLNVQHL	RRSHSLRHGR	RHTRKGERGT	INIVN	GTP <mark>IHE</mark> RSR <mark>H</mark>
IS1088	PLVCD.YLRH	I KWSPQQIANE	LQRLH.PQDR	RLQASHESIY	TCIYAQPRGE	L <mark>K.KELVS</mark>	CLRMAH	A.KRWPRSRG	KDRRKE.TQD	LLSIHVRAPE
IS1086	GVVRH.FLDQ) KWS <mark>PQEISGT</mark>	LKRAF.PDQP	DLNVSHETIY	NAIYAYPRGE	LR.R <mark>QLIA</mark>	CL <mark>RQAR</mark>	T.KRLPRSRG	TDRRGQ.IPD	MVSIHVRPPE
IS1394	ELVAH.LLRQ	? RFSPEQIAGK	LRTMKSPSFE	DAYVCRETIY	NAIYALPVGE	LR.K <mark>ELII</mark>	CLRQGK	T.TRRPRSGG	VDRRGQ.IPD	MVSIHVRPPE
ISPst1	ELVAH.MLR <mark>E</mark>	RLSPEQIAGK	LRSMNIPSLR	EA <mark>YVC</mark> RETIY	NAIYALPVGE	LR.K <mark>ELII</mark>	CLRQSK	T.TRRPRSGG	VDRRGQ.IPE	MVSIHVRPPE
ISPf12	ELVVH.MLRE	RLSPEQIAGK	LRSMNIPSLR	DAYVCRETIY	NAIYALPVGE	L <mark>R.KELII</mark>	CLRQGK	T.ARRPRSGG	VDRRGQ.IPE	MVSIHVRPPE
IST3091	NAVTHAILQR	KWSPEQVAGR	LR.MDYPEDK	QW <mark>RVS</mark> HETIY	QFIYAHPAGE	LR.KALIA	ALRQGH	A.KRKPRTRG	KDRRGQ.LRN	MRSIGERPLE
ISI382	QVV.HSMLAK	GWSPQQIAAR	LKD. YWPDNP	ERHVSHETVY	LTIYAYPRGE	LK <mark>YRQLIG</mark>		S.KRRTRSST	GHVGER.YPA	EQNIRYRPEE
ISB107	RAWVLDSLRR	GWSPELIEGR	LKARY.AGDP	SMRISHECLY	QWIYAKPQRA	LDLRQ	YLARGR	KRRTRKKG	RKAKGPRIPM	RAPIADRPEA
IS1070	VFLNHHIGIL	KWSPETAAHV	LG	LPFKTIY	NWLNAGRLKL	S	LADLP	DKGIRQKRQS	DGRRQVFVH.	GRSIETRPES
ISPpl	QKILNHLR.L	SWSPGMIAHE	FK	LATKSIY	NWLNQGRIGF	S	LNDLP	EHGVRQRRNV	DQRSKYNQSL	GRSIEQRPMM
ISI06211Keint	SEYIQRKVVQ	GWTPDV <mark>IVGR</mark>	AAFPI	RCSFTARTTY	RMFKKGLFNP	SDLPM	• • • • • • • • • • •	KGKRKPNG	HQERRGKQAF	RRSTHEREKD
IS1062 T01050	TEYIQKRVVQ	GWIPDVIVGR	AEFSI	SCSM. RTLY	RMFKQGVFEV		• • • • • • • • • • •	KGKRKANG	HKETRGKQSF	RRSLRDRGND
151252	UDVIKEKIAU	GWTPDVIIGR		SCSVRILI			• • • • • • • • • • •	GKRKPNG	HQERRGRQAF	ARNIVEREID
130770	MDYNIKIERVII				NUT		DEKI		NULLING	
ISLJUI Tet 7	TDYVEUCEUN		VALAKCIEOK		NYUDI CI MDI		DEKU	KRNIKLARIR	WINKELG	RSIEERPRE
1317 Te1470	TEXTOPETER		FALACGIFOR					UDNERGTDUD	MNKKILG	TOTODDNO
TC1130					NYTHOCLLET			DIDKKETKDD	STRKHLC	KGTEFDDFF
TS1155	MRAFTDAMRE	KDRVHSVDIF			NYTHOGLIET			RIRKKFTKRD	STRKIILG	KOLLEGULE
TC1230		ONVSDEMMUK	VIII IICE QIIVE		VWTUUCKI.SI.	CKEAM		KYKUYDKRYG	DVEKDAC	KGI <mark>FO</mark> PDDG
IS1630	SSLEKKEVDG				NWIKSCYWII.	NWKGL	LPKUY	KCCKBEKOS	AARRINGARY	VRDEWSRDAN
TSC1041	LITKATPMEM	GLSGNTETLI.	TSR	VHVTKEW	EPLKKDLLSC		••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	KAVKENWK	NI'KKII'AAKI	NNYFRCDGPG
ISMag1	SSTIFKYIRE	LEAOGKLHNS	Υ	TPSVONEY	RILAKHSAFG		I.PYK	SNGKYGSRTT	VKHETKKKTT	GKLITERPES
ISMbov1	ASTIFKYTRE	LEAOGKLONS	Y	VPSVONEY	RILAKHSAFG			SNGKYGSRTT	VKHETKKKTT	GKLITERPES
ISSc1	NFIHLRFNVY	HDSPSELIYR	Y	FLKFKVKF	PVCVK.TLYK	IRLGF	YGFL	KONLRHHGKK	YKRKGKSDNR	GKLTDFKSTD
Consensus		.wspi		s <mark>tiY</mark>			lr			siRp
3	01				350				400	
---------------	----------------------------	-------------------------	--------------------------	----------------------------------	------------	--------------------------	---------------------------	---	---------------------------------------	
ISSaul	IKK.RNT <mark>FGH</mark>	WE <mark>ADTIV</mark> S	SRGKSK <mark>GCIA</mark>	TFAERKSRY <mark>Y</mark>	YCVLMPD	RS <mark>SNSMETAI</mark>	NNLIKHLPKG	A <mark>VKTIT</mark> VD RGKEFSC <mark>YQN</mark>	IENQFNINVY	
IS658	VKK.RTTFGH	WEL <mark>DTMV</mark> S	SRGKSKGCLA	TFAERKTR <mark>M</mark> Y	LAVKMDN	RT <mark>SSSMETAI</mark>	LRMVNK _{YPLG}	VFKTSTVD RGKEFACYSN	I EEQVDMAVY	
ISLcl	INQ.RQRIGD	WEIDT <mark>VIG</mark>	RTGH <mark>SILL</mark>	TVVDRLSRLT	LIKKVVQ	KD <mark>SQEINKGL</mark>	VELLGAI PKE	FVHSITPD HGTEFLHLDE	ISERLGVTVY	
ISPlu17	VES.RERLGD	WE <mark>GDTVH</mark> G	LGG <mark>NLV</mark>	TLVDRKSGYL	SAYPVKR	RT <mark>RRQVTRAI</mark>	NLMLQGH.A.	.AHTLTLD NGREFAGHER	IALRSQCQVF	
ISPlu1	VDK.KERIGD	WEGD <mark>TIIG</mark>	KDKK <mark>SVLL</mark>	TLVDRKTLYT	IIVKLDS	KQ <mark>ASEVAKAA</mark>	VKVLYPL.KQ	KV <mark>KTITF</mark> D NGLEFAD <mark>HEI</mark>	IGEELETQIY	
IS1655	V <mark>DQ.K</mark> SRIGD	WEAD <mark>TIVG</mark>	KGQK <mark>SALL</mark>	TLVE RVTR YT	IICKLDS	LK <mark>AEDTARAA</mark>	VRALKAH.KD	RVH <mark>TITM</mark> D NG <mark>KEFYQ</mark> HTK	ITKALKA <mark>ETY</mark>	
IS4351	<mark>vel.k</mark> erfgd	LEI <mark>DTIIG</mark>	KNHKGAIL	TINDRATSRV	WIRKLSG	KE <mark>AIPVAKIA</mark>	VWALRK <mark>V.</mark> KN	L <mark>IHTITA</mark> D NGK <mark>EFAKHEE</mark>	IAQKL <mark>EI<mark>KFY</mark></mark>	
IS1112	<mark>VEQ.RS</mark> RIGD	W <mark>ELETIRA</mark>	SHGK <mark>GVVV</mark>	SMTERRSRLH	LLAYSPD	GT <mark>AENVRNAI</mark>	VQRLGGL.RH	AV <mark>HTLTA</mark> D NGKEFAD <mark>HRL</mark>	IAACLQS <mark>DFY</mark>	
ISAs2	VDS.RERLGD	WEA <mark>DTVLG</mark>	KQGT <mark>GALV</mark>	TLVERKSRLY	LVKRVAN	KQ <mark>AGVVRDAI</mark>	IEMLTPY.IE	Q <mark>VHTITF</mark> D NGGE <mark>FAEHKA</mark>	IEEALGAETY	
IS18	<mark>IDQ.RQR</mark> LGD	FEGD <mark>TVI</mark> G	KHHK <mark>GALL</mark>	TLVDRKSLYV	HIVHLGS	TRASSQTITC	ALDRLRM.SH	.A <mark>YSVTF</mark> D NGKEFSE <mark>HKR</mark>	ITDA.GIETY	
ISLxx5	<mark>IED.RA</mark> VPGH	WEG <mark>DLIIG</mark>	GHRN <mark>SAIG</mark>	TLVERSTRFV	MLIHLPID	RTAESVRDGL	ISAVKTLPRE	LRRSITWD QGSEMAAHKS	FTIATDIPVY	
ISBlo4	IED.RAVPGH	WE <mark>GDLIT</mark> G	SRNK <mark>SAIG</mark>	TLVE RTTRFT	ILLHLPDG	HD <mark>AEHVQQAI</mark>	IDKMQHLPKL	LRNSLTWD QGAELALHKR	IGAS LDMAVY	
ISCg2	<mark>VAD.RAV</mark> PGH	WE <mark>GDLVIG</mark>	GENQA <mark>T.ALV</mark>	TLVERTSRLT	LIKRLGVN	HE <mark>ASTVTDAL</mark>	VEMMGDL PQA	LR <mark>RSLTW</mark> D QGV <mark>EM</mark> AE <mark>HAR</mark>	FSVVTKCPVF	
IS1513	ADD.RAIPGH	WEGD <mark>LVIG</mark>	KGG <mark>KSALI</mark>	TLVERTSRYT	LLGHLPDE	HS <mark>SHTVVATL</mark>	QDMVKDLNTE	Q <mark>lktitw</mark> d QGA <mark>EM</mark> AV <mark>TAQ</mark>	VQIKDGCQVF	
IS30	IDN.RRS <mark>LGH</mark>	WEGDLVSG	TKNS <mark>HIA</mark>	TLVD RKSR YT	IILRLR.G	KD <mark>SVSVNQAL</mark>	TDKFLSLPSE	LRKSLTWD RGMELARHLE	FTVSTGVKVY	
IS30H	IDN.RRS <mark>LGH</mark>	WEGDLVSG	TKNS <mark>HIA</mark>	TLVDRKSRYT	IILRLR.G.	KD <mark>ALSVNQAL</mark>	TDKFLSLPPE	LRRSLTWD RGMELARHLE	FTGSTGVKVY	
IS1088	IED.RQLPGH	WEGDL <mark>IK</mark> G	KANA <mark>SAIG</mark>	TLVE RTTRL V	VLVKLPHPNP	ATAAHVLQAF	SDKLKTI AQP	MRQTLTYD RGSEMAEHRQ	LSENT _{GMKVY}	
IS1086	VND.RLMPGH	WEGDL <mark>IKG</mark>	AGNQ <mark>SAVG</mark>	VLVE RMSRA <mark>V</mark>	LLVKMPD	ATAASALAGF	TGKLQSLVAP	L <mark>RQTLTY</mark> D QGR <mark>EMARHAE</mark>	LSAATGVRVY	
IS1394	IED.RLMPGH	WEGDLIKG	KANA <mark>SAVA</mark>	TLVERTSGYL	ILAKMND	ATATSAVEGF	SAALNR MPLA	VRKSMTYD QGREMARHAE	ITQKTGVAIY	
ISPst1	IED.RLMPGH	WEGD <mark>LIKG</mark>	KANA <mark>SSVG</mark>	TLVERTSGYL	MLVKMND	ATATSAMEGF	SAALNGMPLA	MRKSMTYD QGREMARHAE	ITQRTGVAIF	
ISPfl2	IED.RLMPGH	WEGD <mark>LIK</mark> G	KANA <mark>SSVG</mark>	TLVERTSGYL	ILVKMND	ATATSAMEGF	SAALNRMPLA	MRKSMTYD QGREMARHAE	ITQKTGVAIY	
IST3091	AQD.REIPGH	WEGDF <mark>IKG</mark>	AFNG <mark>SAIG</mark>	TLVERSSRFV	LLVRMEG	TDADAALEGF	TRRMRTLPKS	ILRTLTYD QGKEMARHEE	LERKVGIRIY	
IS1382	VEG.RQVPGH	WESD <mark>LIMG</mark>	ANNR <mark>SAVA</mark>	TMVERTSRFC	ILAKLDA	PTADAALEGM	TRELSRMAPA	LLKTMTHD QGSEMAKHQE	LSSRTGMKIY	
ISBlo7	<mark>VRS.RK</mark> GFGH	FESDT <mark>VV</mark> G	AAPSR <mark>R.CMN</mark>	TQVERRSRRL	FARLVDD	KSASATARAE	YEIFKDIPPA	ARVDRTWD NGTEASLHML	VDEALGMLTY	
IS1070	<mark>VKA . R</mark> RTFGH	FEVD <mark>TMQ</mark> S	GKRRGD.VLV	TITERLSRQH	SVRQVTG	RNSQAVTPVL	IRFFQGI.NA	KSITVD RGREFARYNE	IEQKLGIPVY	
ISPpl	FNQ.RNRIGD	FELDTVVG	PRGHSK <mark>AVLL</mark>	TLIDRKSRFL	WAYRLKD	RTTATVNEAL	TKFLTTF.NG	PVHSFTVD RGTEFSGLVS	LESQYGIKTY	
IS1062Likeint	YSQFSNEFGH	LFTEGDTIVG	LKHKSAVI	TLVERLSKVI	ITLKPCG	RQAIDIENKL	NHWFESVPKN	LFKSITFFTD CGKEFSNWKQ	ISNANDIAIY	
IS1062	YSKFNQEFGH	LEGDTIVG	KKHKSAVI	TLVERLSKVI	ITLQPEG	RRAIDIENRL	NQWMQSVPKH	LFKSMTFD CGKEFSNWKS	ISNINDIDIY	
IS1252	YPTFKEEFGH	IEGDTIVG	IHHKSAVI	TLVERLSKII	ITLKPEG	RKAIDIENTL	NHWFGSIPRH	LFKSITFD CGKEFSNWKA	LSNQHDIAIY	
156770	YPDFNSEFGH	LEGDTIVG	IHHKSAVI	TLVERLSKVI	ITIKPNG	RKALDIETAL	NQWFSRFPKN	FFKSITFD CGREFSNWKA	ISNQHDIDIY	
ISLJOI	INK.RNEFGH	W. ECDLVLG	HKSKDDEVLL	TLSERMSREF	LILRIPDKTS	VSVMQAFKEL	QRQYSEHWND	IFKTITTD NGSEFADLSN	LEKVSNTLVY	
ISL7	IES.RKDFGH	W. ECDLVLG	HKTKDDDVLL	TLCERKTRQF	FMIKIEDKTS	ASVMKAFDKL	REYYGSKWNQ	IFKSITTD NGSEFADLSN	LEQVSKTLVY	
IS1470	LEN.REEFGH	WEIDCVLG	EKSNKDKVLL	TLVERKTRYA	TISEMSSHST	ISVTKALDKI	KEFLGSKFSE	VFKSITAD NGSEFADLSE	FELKTKTKVY	
IS1139	INN. RSRFGD	W. EIDSVLG	GKTIGEPSIL	TLVERQTRYA	VTKKLVEKKA	EYVNQAVLEC	MKLYP	.IKSITAD NGNEFSSLSK	IEGLDVY	
151161	INN.RSRFGD	WEIDSVLG	GKTIGEPSIL	TLVERQTRYA	VIKKLVEKKA	EYVNQAVLEC	MKLYP	.IKSITAD NGNEFSSLSK		
151239	INQ.RLEAGH	Y. EIDTVIL	TRAKNQ.CLL	TLTDRK TRHQ	LIRLIPDKSA	QAVNKALTGI		.VNSITAD NGIEFSRLSD	VFPASDIY	
IS1630	INE.RKEFGH	W. ELDLIIG	KSKGTHCHLL	SFTERVSRYG	FLVKIPNKNP	WINLNLYLWNL	IWKHKLN	VKSITQD NGLEFSTLFF	I HUDI GIDIN	
ISCIU41	KSSKKKNTGH	W. ERDLIKW	KUNKSSIR	IFIDLKIHGS	VSSEHYLM	AKGRIRGRGL	TEALKY LPAE	KAKILTYD KGREMAEHKI	LEEDLGIDVY	
ISMag1		EMDTVIG	LKSUN. YCI	LILINKKSRM	FICTLSRRNA	KAIKENLEKL		IDILTID NGSENYK.LP	. EIEYIKEIF	
			LKSUNYCI	LILINKKSRM	FICTLSRRNA	RAIKENLEKL		INCLUT D DRAFECH DE	. EIESIKEIF	
LSSCI			ADRAS. ALL	VLVEQUSKKY	FAIKLENHTA	REVERIFRDI	TIRININLIGK.	.INGIIID KKKEFSK.RE	THE TPAE IQVY	
CONSENSIS	r (+r)	10/ P. L/ ()	S							

508		450				01	4
IL HLN	PRKCLNWKF PYEVLCDELL	<mark>JDSIN</mark> Y RE	AK <mark>VN</mark> QEQ LNYALC	.FPKK TD	. GT <mark>NENTNGLL REF.F</mark>	<mark>FA</mark> DPYSA <mark>WQ</mark> R	ISSaul
EVS QLD	P <mark>RKCL</mark> GWKT SYEAFWEEVS	<mark>.HLIN</mark> H RF	ALIT <mark>EEE LELAL</mark> H	.FPKK TD	G <mark>TNENANGLL REF.</mark>	<mark>FA</mark> DPYASWQR	IS658
(PL HLV	P <mark>RKVL</mark> NYET <mark>PYEVFFDKP</mark> L	<mark>)KQLN</mark> Q RF	ON <mark>YT</mark> EQD VEHCQK	.IPKR TD	. GTNE <mark>NTNGLI REI.</mark>	<mark>WP</mark> DPYSPEQR	ISLc1
/S <mark>V A</mark> LMC	P <mark>RKRL</mark> GWKT <mark>PYEVH</mark> TGVS <mark>V</mark>	<mark>/ARIN</mark> L RE	S <mark>KLT<mark>VEA VNRTVA</mark></mark>	.FPKG SD	. G <mark>TNENTNGLL RQY.</mark> I	<mark>FA</mark> DPYSSWQR	ISPlu17
IRT CLLPD	P <mark>RKTR</mark> GGKT <mark>PNELFKGIRT</mark>	<mark>/NRLN</mark> N RF	N <mark>EIS</mark> DQE INFVVN	.FPKG TN	. G <mark>INENINGLI RQY.</mark> F	<mark>FA</mark> HPYSPWER	ISPlu1
FQ PLIH	P <mark>RKTL</mark> GYET <mark>PSVLFLNL</mark> FQ	<mark>)deln</mark> h rf	RN <mark>IS</mark> DRE IRRVQD	.FP <mark>KQ</mark> TD	. GLNENTNGLI RQY.I	<mark>FC</mark> RPYHSWEK	IS1655
IN QNSVAFAS	P <mark>RKRL</mark> GYLT <mark>PNEKFKQI</mark> IN	<mark>enkln</mark> n re	SE <mark>VT</mark> NKQ IKWIEN	.IPK <mark>G</mark> KD	. GA <mark>NE</mark> NTNGLI RQY.I	<mark>FC</mark> KPYHSWER	IS4351
GVL K <mark>SVAN</mark> QS	P <mark>RKIL</mark> GFKT <mark>PLEVFSEEVL</mark>	<mark>eqrly</mark> n rf	S <mark>TIT<mark>DAH LRWIE</mark>Q</mark>	.LPRQ TD	. G <mark>SNE</mark> NANGLT RQY.I	<mark>FA</mark> DPYCPWQR	IS1112
/RQ_A <mark>A.</mark>	P <mark>RKCL</mark> GFRQ PVKVFEEYRQ	<mark>CQWLN</mark> L RF	revt <mark>ded vrrae</mark> ç	.IPK <mark>G</mark> TD	. GLNENSNGLL RQF. 1	<mark>FA</mark> HPYSSWE <mark>R</mark>	ISAs2
YT VALAA	P <mark>RKTL</mark> GWYT PSEVMAGFYT	<mark>FALN</mark> H RF	OGVSNEQ IEQIEF	.L <mark>PKS</mark> SS	. A <mark>RNENTNGLI RQY.I</mark>	<mark>FA</mark> DPYKSIQR	IS18
LA S	P <mark>RKTL</mark> GWET PAERLAKLLA	<mark>HELN</mark> T RF	ARFTATD LTNVAH	.FPKGKG TD	. GS <mark>NENTNGLL RQY.</mark> E	<mark>FC</mark> DPASP <mark>WQ</mark> R	ISLxx5
LD AA	P <mark>RKTL</mark> GFMK <mark>PSEKIIELL</mark> D	<mark>eeln</mark> d rf	SVYP <mark>EDY LDAVAE</mark>	.FPKG TD	. GT <mark>NENTNGLL RQY.</mark> F	FCDPHSPWQR	ISBlo4
IVV GASTD	P <mark>RKMH</mark> GFKS <mark>ATQVYEKIVV</mark>	OLLNY RF	AKVS <mark>DEE VQRAQ</mark> D	.FPKG TN	. GS <mark>NENTNGLV RDF.</mark> F	FCDPHSPWQR	ISCg2
LFK RGASTA	P <mark>RQIL</mark> GGAT PREILNELFK	O <mark>neln</mark> e te	ATVTPEH VAWVQN	.FYK <mark>K.G T</mark> D	. PT <mark>NE</mark> NTN <mark>GEI RRR.F</mark>	FCEPHSPWQR	IS1513
VA LTD	P <mark>RKTL</mark> KFKT <mark>PKEIIERG</mark> VA	A <mark>AQLN</mark> N RF	AQYT <mark>QHE LDLVAA</mark>	.FPKK TC	. GT <mark>NE</mark> NTN <mark>GLI RQY.</mark> F	FCDPQSPWQR	IS30
VA LTD	P <mark>RKTL</mark> KFKT <mark>PKEIIERG</mark> VA	AQLNN RF	AQ <mark>YT</mark> QYE LDQVAA	.FPKK TC	. G <mark>TN</mark> ENTNGLI RQY.E	FCDPQSPWQR	IS30H
ILARLAQQP DLVH	PRMTLGWRK PIEVYAEHL.	ADELN <mark>G RE</mark>	SGYS <mark>QEQ LDAVAD</mark>	.FPKG TD	. GS <mark>NENTNGLL RQY.</mark>	FCDPYSPWQR	IS1088
/LANPTDRL PVQ	PRKTLNWHS PLQVLAQVL.	ADSLNG RF	S <mark>VYS</mark> QEE LDAIAC	.LPKG TD	. GTCENTNGLL RQY.I	FCDPHSPWQR	IS1086
/VALQHDAP ASIQ	PRKRFNWKC PIEVMTEVV.	YELNI RF	SV <mark>YS</mark> QEQ LDAIAY	.LPKG TD	. GS <mark>NE</mark> NINGLI RQY.I	FCDPHSPWQR	IS1394
MQ KAMAMRHDAP TPIQ	PRNRFDFKC PIEVMGKVMQ	ALQLN <mark>M RF</mark>	SVHSQEE LNAIAL	.LPKG TD	. GS <mark>NE</mark> NINGLI RQY.I	FCDPHSPWQR	ISPst1
/MQ EAMAMRHDAP ASIQ	PRKRFDFKC PIEVMSEVMQ	ALQLN <mark>M RF</mark>	SVHSQEE LDAIAL	.LPKG TD	. G <mark>SNENINGLI RQY.</mark> I	FCDPHSPWQR	ISPfl2
QIM QLNSGVALQI	PRKSLGFRT PAEVIAQQIM	AEELNN RF	SGYS <mark>QRR LTQVAE</mark>	.FPKG TD	. PT <mark>NE</mark> NTNGLL RQY.F	FA DPHSPWQR	IST3091
ILQ LLATNRLNII N	PRQTLGWKF PVEVLTDHLQ	DLLNT RE	SLVSQER LDEIAD	.LPKG TV	. GSNENTNGLL RQY.I	VA DPHSPWQR	IS1382
CIA KLQSKAASPN TSVALTN	PMKLLGYKT PNEVWDEEIA	GEIND TF	GDLAQED LDAIVG	LPKG TG	. GSNENRNGRI RRY.I	FADPYSSWQR	ISB107
TV FG	2MKTLNWQS PRKFFQQFTV	IHWINA RE	TVSAKE LDQINH	.IPKE RK	. GS <mark>NE</mark> ILNRYV RRF.I	FAHPYSPEER	IS1070
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	2 LKIL D	LQINQ RF	EH <mark>IS</mark> TQD LTTTLL	.YPKG TR	. GSNERFNRNL RCF.	YCHAYTPADR	ISPpl
rvs iddlsnLi	PRKSLNYRT PLEVFLSYVS	ASKRNN IF	VDESFFT IQSVAS	GLLKSMD FN	. GLNENSNGLL RRDGI	FADPGTPSQR	IS1062Likeint
HIC KEELSNLI	PRKSLNYKT PIEVFLSHIC	ISKRNN IF	VDESF IQSIAS	GLPKQMD FN	. GL <mark>NE</mark> NSNGLL RKDGI	FADPGTPSQR	IS1062
(MN EDILSSLI	PRKSLDYQT PLEVFMSYMN	NKRNN IF	VDQAF ISSVAN	GLPKNMD FN	. AL <mark>NE</mark> NSNGLL RKDGL	FADPGTPTQR	IS1252
	PRKSLNYRT PIEIFLSYVQ	SNQRNH IF	VNQTF ISSVSN	GLPKSMD FR	PLNENSNGIL RRNGL	FADPGTPSQR	156770
SLD LIYQAA	PRKILAYHT PDEIFERELD	STWCNS LF	ANYSLQD IINIET	. IPKG EA	GTVERHNGLI RRF.I	YAHPYTSCDK	ISLJOI
SLD RIYRRR	PRKILNYKT PEEYFDTELD	EVWCNS LF	DRYSVED IAKIEV	. IPKG DR	GSVERHNGLI RRY.I	YAHPYTSCDK	ISL7
TTA KTIRTATION	PRELEDYKT PEELFEIHLD	INWMIN'T' LE	SDYSLET ISFIEN	TPKG. KR	GINERHNGLI RRF.	FTHPISSFER	IS1470
	PREINGIQS AKKLFELTOT	KAINE RE	KELNQNL LEDYTK	TPKG CS	GINENFNGLL REF. I	FAHAYSSYER	ISII39
QT A	PRRINGIOS ARKLFELIOT	KAINE RE	KELNQNL LEDYTK	. IPKG CS	GINENFNGLL REF.I	FAHAYSSYER	IS1161 TG1020
INF NUMPARK.	CARLENYKS PVEMLKLANF	NETNH YE	I IPKE VAALEH	TERKG TK	GINENHNRLI RRC.I	TAHPIASWER	ISI239
INA TIDI EKI CUL ME	CREIFGILS ALEMIEKLINA	MOLNIN RE	NOVDOIN INCLAN	IDVC ID	CTOTINENTIQUY RRF. F	RADPIASFQR	LSL03U
ייייייייייייייייייייייייייייייייייייי	PRIVERIA EKCAROMO	DETNC II	DADOHY LINOVAM	UPKG ID	COTENNIDIT PDV	TOUPHSPWQK	ISCIU41
	PRINCISC FROMU.	DETNO UT	OKIVGQD IKPIAL	TDYC VO	COTENAREL RRY.	UCUDVCCOPY	ISMAGI
ζ	PREINGVSG FRCARUMQ	ADFINS HE	NE VEOR OTDIAN	DVC TT	DITEVMNCEL DUE	ECDACEDOOV	TOCAL
L			NR.VSQR QIDVVN	DKa +	a pEn Nal P	FCDAGSPQQK	LSSCI
	CLARKE D.C.	. r		KQ. T.	G. HEILNGL, R.V.	1 dubysbw#r	CONSENSUS

	1	10	20	30 40
is1062.2left	.GTACGCCGAT	TGTAAAATTAA	GCTAGAC	АСТААА
is1062left	CGCCGAT	TGTAAAATTAA	GCTAGAC	АААТАААААА
is1252left	CGCCGAT	TGTAAAATTAA	GCTAGAC	АААТАААТААGCCАТА.
is6770left	CCCGAAT	TGTAAAATTAA	GTTAGAZ	AAATAAAAAGGCATTTA
isI.7left	CCCCAT	TGTAAAATTAA	ACTGAAC	ACTGTTCCGATC
icI7richt	CCCCAAT	TCCAACAATAA	ATTCAAC	
isl062 Oright		TCTCAAGAATAA	CTTACAC	ACTIACCATAAC
ISIU62.2right	. TACTOTTAAT	IGICAAAIIAA	GTTAGAC	
isl062right	TATTAAT	IGTCAAATTAA	GTTAGAC	AATTCCTCTT
isl252right	TTTGATT	TGTCAAATTAA	GCTAGAC	AAAATATCTTCATTCA.
is6770right	TATGATT	TGTCAAATTAA	GTTAGAA	TAAAATGCTTCTTGTAC
is1139left	TTTGCCCTA.T	TGTAAAATGAA	GTGCAAC	ACAAAAGAC
is1139right	TTTGCCCTAAT	TGTCAAGTCAA	GTGCAAC	AAGATGT
is1470left	GCTTAAT	TGTAAAATGAA	ATTGAAC	ТАААТААААА
is1470right	TCTAAAT	TGCAATATCAA	ATTGAAC	ТАСТССТТАА
is1630left	GCTACAT	TGTAATCTGAA	ACTTTAC	АСАТТТТАСА
is1630right	CCTACAT	TGTAATCTGTA	ACTTTAC	АССТАСАААТ
is10701sft	COTAGAT		AGITIAC	
ISIU/UIEIL	GGIAGAI	IGIAAAAIIAA	ACCGAAC	ACTIGAATAA
isl0/0right	GGATGAT	TGCAAGAATTA	ACCGAAC	ACTTAAACTG
ispplright	GGTA <mark>GAT</mark>	TGCAAATTTAA	TCCGAAI	TTTTGGACA
ispplleft	GGTA <mark>GAT</mark>	TGTAAAATTAA	TCCGACC	CTGTTCGGA
is1161left	TTTAAC	AAAAAAATAG <mark>T</mark>	TTTTGCC	СТАТТСТАААА
is1161right	TTTTTG	TAAAAAACTAT	TTTTCCC	ТААТТСТСАА
isMag1left	TATTCAT	TAACGAAGTAA	AAAGCAC	САСААСТТАА
isMbow1left	ͲϪͲͲϚϪͲ	TAACAAAGCAA	AAAGCAC	САСААСТТАА
isMag1right	TATAAT		AAACCAC	Стттттсас
i aMb avr1 wi abt			AAAGCAC	
ismboviright	····TATAAAT		AAAGCAC	
ispstlleft	GGCGGCC	GCGGAAACTGA	GTGCAAC	ACCAGACC'I'
isl394left	GG <mark>C</mark> G <mark>GCC</mark>	GCAAAAACTGA	GTGCAAC	ACCCGACCAT
is1086left	GG <mark>C</mark> G <mark>GC</mark> C	TCAAA TCTGAA	GTGCAAC	ACCTTGCCAT
is1088left	GG <mark>C</mark> G <mark>GC</mark> C	TCAATTCCGAA	GTGCAAC	ACCGAGAATT
is1382left	GGCGGTC	TCAGTGACCA	GTGCAAC	ACCCAGGTAA
is1382right	GGCGGCC	TCAGGTTCCAA	GTGCAAC	AGTCAGTTGA
ispst1right	GGCGGTT	GCAGGAGCTGA	GTGCAAC	ACGGTCATT
is1394right	CCCCTT	CACAACCTCA	CTCCAAC	ACCCTTACTC
io10loft	CCACAT	TCADATCCCA	CTCCAAC	
islotett	GCAGAT		GIGCAAC	ACATITGIAGI
islussright	GGCGGTT	TCAAGTCC. AF	GTGCAAC	АААААСТСААТ
isl086right	GGCGGTT	TCAAGTGCGAA	GCGCAAC	ACCCCTTGGT
is1655left	GGCGGAT	TCGCATTTGAA	GTGCAAC	TTTCCCTAAC
is1112left	GG <mark>C</mark> GGCT	TCAACTCTGG <mark>A</mark>	TCGCAAC	ACCAACGGTT
is1112right	GGCAAAT	TCAACTCTGAT	TCGCAAC	GCTTTTGAGG
isAs2left	CGGGAAT	TCAGATAATAA	GTGCGAC	ACTCATGGATGA
isAs2right	CGCGAAT	TCAACTTCGAA	GTGCGAC	ACTCGCCTATGC
is1655right	CTTGGAT	TCGGATTTCAA	GTGCAAC	ACTAGTGTAT
isBlo7left	CCCGGGT	TCTAAATAGAA	GTGCAAC	ACCTTGTCTAA
isBlo7right	CCCGATC	TCTATTACAC	CTCCAAC	ACCCCCTCTTC
ic1513loft	ССТССТС	TCAACCCCTCA	ATCCCCC	
isiJiJiJieit	CGIGCIG		AIGCGCC	ACTICGACCG
isijijit	GGCGGAA	TCAAGCGGIGG	AIGCGCC	ACGCIIGAAI
isCgZright	GGCGAAT	TCAAGCGGTGC	ATGCACC	AACTACGATT
isCg2left	CGG <mark>C</mark> G <mark>G</mark> GT	TCAGGGGGTGA	ATGCACC	ACGAGCAACC
is18right	GG <mark>C</mark> G <mark>GA</mark> T	TCAAGCGGCAA	GTGCAAC	AGTATAAAAA
isBlo4left	GG <mark>C</mark> GGGT	TCTAGTGATCC	TTGCAAC	ACCTGA
isBlo4right	GGCAGAT	TCTAGTGGTGC	TTGCAAC	ACCTGA
is30left	TGTAGAT	TCAATTGGTC <mark>A</mark>	ACGCAAC	AGTTATGTGA
is30right	TGTAGAT	TCAATCTGTCA	ATGCAAC	ACCCCTTTCA
is4351right	GCTGAAT	TCAACTTGCAA	ATGCAAC	AGAATTCTGA
is43511oft	СТТСАСТ	ТСААСТТАТА	ATGCAAC	TTTTTGGGCTG
10T300110f+	TIGUGI	TCTACAATCAA	CTCCARC	TETECCECTCC
1010001	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••		CCCCARC	
isi3091right		ICAAATTIGAA	GUGCAA	ACCACTGTTTA
18658left	TGACGAAT	TGTAATATTAA	GTGCGAC	AC
is658right	ACGGTT	TGTCAATCTAA	CTGCGAC	AC
isLclleft	AC <mark>GA</mark> G	TTTTCATTTC	ACGCGGC	GAATTTACAATT
isLclright		GCCTTTTTTCT	TTGCGGC	GAATTGTCAAACTA
isC1041left		. AAAACTTGAA	GTGCGAC	ATAAACCACC
isC1041right		. AAAACATGAC	GTGCGAC	AGTTTGAAAA
2				
Consensus 60%	gy.raT	Tswaata <mark>A</mark>	.tgcaAC	a

7.3. függelék Az IS30 család IR végeinek konszenzus szekvenciája.

A szekvencia illesztéshez a MultAlin (http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) programot használtuk. A kiemelés a 80%-ban konzervált bázisokat, az Y : C + T; az S: G + C, a W: A + T, az R: G+A bázisok alternatív jelenlétét jelzi.