

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Speciální chemicko-biologické obory, bakalářské
Studijní obor:
Molekulární biologie a biochemie organizmů



Mgr. Jiří Zahradník

Y1 a Y2 transponázy, mechanismus transpozice, biologická funkce
Y1 and Y2 transposases, mechanisms of transposition, biological function

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 19.08.2013

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své školitelce RNDr. Ireně Liché, CSc. za cenné rady, trpělivost a ochotu při vedení mé práce.

Abstrakt

Transponázy jsou enzymy katalyzující štěpení, přenos a opětovné vložení mobilního genetického elementu do DNA. Tyrozinové transponázy zaujímají mezi těmito enzymy zcela unikátní postavení. Jejich výjimečnost je dána strukturou a odlišným mechanismem transpoziční reakce, v kterém vždy figuruje kovalentní fosfotyrozinový intermediát. Nezbytná přítomnost katalytického tyrozinu dala těmto enzymům jméno a zároveň je umožňuje dále členit na skupinu nesoucí pouze jeden katalytický tyrozin – Y1 transponázy a na skupinu se dvěma – Y2 transponázy.

Tato práce shrnuje současné poznatky o skupině tyrozinových transponáz. Zabývá se jejich výskytem, strukturou, reakčním mechanismem a biologickou funkcí. Detailně je popsán reakční mechanismus nejvíce prostudované Y1 transponázy asociované s IS608 elementem. Dále se práce zaměřuje na ostatní členy rodiny tyrozinových transponáz nesoucí charakteristický HUH motiv: Transponázy asociované s inzerčními sekvencemi rodiny IS200/IS605 (Y1), transponázy asociované s REP elementy (tzv. RAYT proteiny), transponázy asociované s IS91 (Y2), transponázy se společným regionem (ISCRs, Y1) a neobvyklé eukaryotní transponázy rodiny Helitron (Y2). Mezi tyrozinové transponázy patří dva jedinečné příklady domestikace těchto enzymů u prokaryot (RAYT, ISTRony). Charakterizace mechanismu a vlastností tyrozinových transponáz je nezbytný krok vedoucí k pochopení jejich biologické funkce a také k možnému využití v technikách genového inženýrství.

Klíčová slova: Y1, Y2 transponázy, mechanismus transpozice, IS200/IS605, IS91, ISCR1, RAYT, REP, REP elementy.

Abstract

Transposases are enzymes that catalyse cleavage, transmission and re-inserting of mobile genetic element into the DNA. Tyrosine transposase take between these enzymes completely independent status. Their uniqueness is determined by their structure and different mechanism of the transposition reaction, in which the covalent phosphotyrosine intermediate plays major role. Mandatory presence of the catalytic tyrosine gives name to these enzymes and it enables their further classification into a group that carries only a single catalytic tyrosine – Y1 transposases and a group carrying two tyrosines – Y2 transposases.

This thesis summarizes the current knowledge about tyrosine transposases. It covers their occurrence, structure, reaction mechanism and biological function. The reaction mechanism of the most studied Y1 transposase, associated with *IS608* element, is described in detail. The work also focuses on other members of the tyrosin transposases family which carry the characteristic HUH motive. These include transposases associated with the insertion sequence of *IS200/IS605* family (Y1), transposases associated with REP elements (so called RAYT proteins), transposases associated with *IS91* family (Y2), transposases of *ISCRs* family (Y1) and unusual eukaryotic transposases of the Helitron family (Y2). Among the tyrosine transposases there are two independent examples of domestication of these enzymes by prokaryotes (RAYT, IStrones). Characterization of the mechanism and the properties of tyrosin transposases is a necessary step towards understanding their biological function and for their potential application in techniques of genetic engineering.

Key words: Y1, Y2 transposase, transposition mechanism, *IS200/IS605*, *IS91*, *ISCR1*, RAYT, REP elements.

Obsah:

1. Úvod.....	1
2. Tyrozinové transponázy.....	2
2.1 Výskyt tyrozinových transponáz.....	3
2.2 Struktura tyrozinových transponáz.....	4
3. Reakční mechanismus tyrozinových transponáz.....	5
3.1 Rozpoznávání DNA.....	6
3.2 Mechanismus štěpení DNA.....	8
3.3 Změna konformace cis/trans.....	11
3.4 Vazba cílového místa a integrace.....	11
3.5 Souhrn mechanismu transpozice.....	13
4. Zástupci.....	14
4.1 Transponázy IS200/IS605 rodiny (Y1).....	15
4.2 RAYT proteiny.....	15
4.3 Transponázy IS 91 (Y2).....	17
4.4 Transponázy ISCRs (Y1).....	20
4.5 Transponázy rodiny Helitron.....	21
4.6 Rekombináza asociovaná s Tn916.....	21
5. Biologická funkce tyrozinových transponáz.....	22
5.1 Extrémní viabilita <i>D. radiodurans</i>	24
5.2 Strukturování bakteriálního genomu a domestikace transponáz.....	24
6. Závěr.....	26
7. Seznam použité literatury.....	28

Přílohy:

1. Struktura transponázy z elementu IS608 (<i>H. pylori</i>)	1
2. Struktura transponázy z elementu ISDra2 (<i>D. radiodurans</i>)	2
3. Struktura transponázy z elementu IS1476 (<i>S. solfataricus</i>)	3
4. Struktura transponázy z elementu ISSto1 (<i>S. tokodaii</i>)	4
5. Struktura REP asociované transponázy (<i>E. coli</i>)	5
6. Struktura tyrozinové rekombinázy z elementu Tn916 (<i>E. faecalis</i>)	6

Seznam použitých zkratk

BIME	Roztroušeně se vyskytující bakteriální mozaikovitě elementy, z angl.: "Bacterial interspersed mosaic element"
bp	Párů bazí, z angl.: "Base pair"
DDE	Katalytická triáda aspartát asparagová (D) asparagová (D) glutamová (E)
HUH	Histidin (H) hydrofóbní aminokyselina (U) histidin (H) motiv
IS	Inzerční sekvence, z angl.: "Insertion sequence"
LE	Levý konec, z angl.: "Left end"
PDB	Bioinformatický server struktur proteinů, z angl.: "Protein data bank"
RAYT	Tyrosinové transponázy asociované s REP elementy, z angl.: "REP associated tyrosine transposases"
RCR	Replikace mechanismem valivé kružnice, z angl.: "Rolling circle replication"
RE	Pravý konec, z angl.: "Right end"
REP	Repetitivní extragení palindromové sekvence, z angl.: "Repetitive extragenic palindrome"
REPIN	Dvojice REP sekvencí tvořící vlásenkovou strukturu, z angl.: "REP doublet forming hairpin"
ssDNA	Jednořetězcová DNA, z angl.: "Single strand DNA"

1 Úvod

Před více než 80-ti lety objevila Barbara McClintock v genomu kukuřice mobilní genetické elementy, tedy úseky DNA schopné měnit své umístění v genomu. Zbořila tak do té doby uznávanou představu o stálém uspořádání nukleotidů. Za svůj revoluční objev byla v roce 1983 oceněna Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu. Dnes je známo mnoho typů mobilních genetických elementů rozšířených napříč všemi doménami života. Počty jednotlivých druhů a jejich zástupců jdou do tisíců. Zvláště v posledních dvou desetiletích umožnilo sekvenování celých genomů rozvoj této problematiky (Craig, 2002). Její souhrn je nad rámec bakalářské práce a vydal by na několik obsáhlých svazků.

Prokaryotní genom je co do obsahu nekódující repetitivní DNA mnohem úspornější než eukaryotní. Většina bakterií obsahuje méně než 10% nekódující DNA. V této nekódující DNA nalezneme dlouhé repetitivní sekvence, jako strukturní RNA a krátké oligonukleotidové repetitivní sekvence, jako například GATC motivy, DUS sekvence (Frye, 2013), χ motivy (Halpern, 2007) a CRISPR sekvence (Jansen, 2002).

Mezi dlouhé repetitivní sekvence můžeme také zařadit velké množství různých typů mobilních genetických elementů. Jednou ze základních charakteristik mobilních elementů je mechanismus, kterým se v genomu pohybují. Transponázy (z angl. "transposase") jsou enzymy zodpovědné za štěpení cílových sekvencí, přenos a opětovné vložení mobilního genetického elementu. Obecně je možné tento proces nazvat transpozicí, i když v užším slova smyslu je tak nazýváno pouze přemístění transpozonu. Vzhledem k podobnosti reakčního mechanismu je možné říct, že se jedná o specifické rekombinázy (Barabas, 2012). První modely tohoto jevu byly publikovány v sedmdesátých letech, jako například práce J. A. Shapira (Shapiro, 1979). Dle chemismu reakce jsou rozlišovány zvláště tzv. DD(35)E transponázy a v poslední době objevené serinové (S) a tyrozinové (Y) transponázy. Za podobné reakce mohou být zodpovědné ale i další enzymy jako tzv. homing endonukleázy (*E. coli* td gene) (Chandler, 2008).

Transponovatelné úseky DNA jsou nesmírně atraktivní nástroj pro genové inženýrství. Schopnost specifického vkládání je zatím omezena na velmi málo vybraných systémů a náhodné vkládání představuje vysoké riziko vzniku genetických chorob (Chen, 2005). Z tohoto důvodu jsou zvláště transponázy perspektivním cílem mnoha výzkumů a jejich využití by mohlo přinést dosud netušené možnosti cílení.

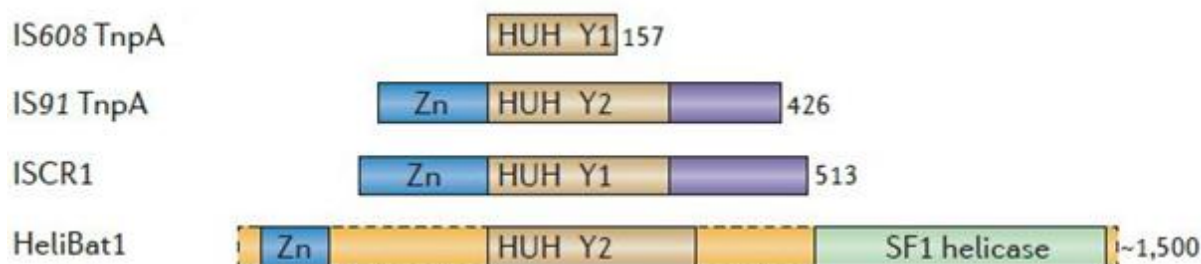
Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o tyrozinových transponázách. Hlavně se zaměřuji na molekulárně biologické, biochemické a biofyzikální aspekty tyrozinových transponáz a jejich biologickou funkci.

2 Tyrozinové transponázy

Tyrozinové transponázy jsou svojí strukturou, mechanismem reakce a specifitou rozpoznávání DNA unikátní enzymy zasluhující pozornost. Na rozdíl od ostatních typů transponáz byly tyto enzymy objeveny daleko později a jejich systematický výzkum je záležitostí až posledního desetiletí. Stejně jako ostatní transponázy, i tyrozinové se vyskytují v dimerní formě a k enzymové katalýze vyžadují dvojmocný kation kovu. Jejich zásadní odlišností je absence katalytické triády DDE. Místo ní mají znaky HUH endonukleázové rodiny (či "superrodiny"), která je charakteristická zvláště histidin-hydrofobní aminokyselina-histidin motivem (HUH). V této rodině se vyskytují společně s Rep proteiny, relaxázami, Mob proteiny a dalšími proteiny účastnícími se plazmidové replikace a konjugace. Společná všem těmto proteinům je aktivita na jednořetězcové DNA (ssDNA z angl.: "single strand").

DNA se v buňce běžně vyskytuje v dvouřetězcovém uspořádání, při buněčných procesech pak přechodně vzniká uspořádání jednořetězcové. Je tedy zřejmé, že členové HUH endonukleázové rodiny participují na procesech při kterých tento přechodný stav vzniká (Chandler, 2013). Uspořádání rozpoznávaných sekvencí se podřizuje tomuto faktu a tím se zásadně liší od jiných transponáz. Pro DDE transpoziční reakci vyžadované invertované repetice zde chybí a jsou nahrazeny jinou strukturou. Při vysoké negativní superhelicitě může také docházet k vytvoření DNA struktur vhodných pro tyrozinové transponázy, viz kapitola rozpoznávání DNA (Bikard, 2011).

Tyrozinové transponázy jsou kromě již zmíněného HUH motivu charakteristické jedním konzervativním katalytickým tyrozinem – Y1 rodina (Ronning, 2005) či více než jedním – Y2 rodina (Curcio, 2003), podle kterých dostaly své jméno. Velikostně jsou někteří zástupci nejmenšími dosud známými enzymy s danou funkcí. Jejich obvyklá velikost se pohybuje pod 200 aminokyselin. U některých typů mobilních elementů je organizace Y transponáz mnohem složitější, obsahují další katalytické či vazebné domény. Organizaci vybraných transponáz ukazuje obrázek č. 1.



Obrázek č. 1 | Organizace vybraných transponáz. Modré pole (Zn) značí zinek obsahující vaznou doménu. N terminální oligomerizační doména je vybarvena fialově. Zeleně je označena doména s aktivitou analogickou helikáze patřící k SF1 rodině. Žlutě vyznačeny části propojující domény. Převzato z (Chandler, 2013).

2.1 Výskyt tyrozinových transponáz

Katalytický tyrozin obsahující enzymy umožňují mobilitu značné škály mobilních genetických elementů a jsou všeobecně rozšířené. Krátký přehled těchto enzymů s příklady zástupců je ukázán v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 – Výskyt enzymů obsahujících katalytický Y odpovědných za mobilitu mobilních genetických elementů

Mobilní element	Název	Enzym (štěpné místo)	Reference
Transpozon Mobilisovatelný	Tn554	Yrec* (specifické)	(Murphy, 1983)
Transpozon (MTns) Konjugativní Transpozon (CTns)	Tn4555 Tn916	Yrec* (preferenční) Yrec* (nespecifické)	(Smith, 1993) (Franke, 1981)
	pSAM2	Yrec* (specifické)	(Boccard, 1989)
Mobilní genový ostrov	HPI_{yps} SGI1	Yint** (specifické) Yin** (specifické)	(Buchrieser, 1998) (Doublet, 2005)
Transponovatelný satelitní profág	P4	Yint** (specifické)	(Christie, 1990)
IStrom	CdiSt1	Y1 (nespecifické)	(Braun, 2000)
Inzerční sekvence	-	Y1 / Y2	viz níže

* tyrozinová rekombináza obsahuje ve své C terminální doméně katalytický tyrozin

** integráza obsahující katalytický tyrozin

Y1 / Y2 jsou označeny transponázy s jedním nebo dvěma katalytickými tyroziny

Většina mobilních genetických elementů zmíněných v tabulce č. 1 je mobilizována enzymy označovanými jako tyrozinové rekombinázy. Tyto enzymy jsou složeny ze dvou nebo více podjednotek, z nichž C terminální doména je zodpovědná za transpoziční reakci a druhá je DNA vazná doména (neobsahující zinek). Podobně je tomu i v případě enzymů označovaných jako integrázy, které taktéž obsahují katalytický tyrozin. Integrázy jsou proteiny charakteristické svým virovým původem. Přestože tyrozinové rekombinázy i integrázy obsahují katalytický tyrozin a mohou také katalyzovat transpozici, budou v této práci zmíněny pouze okrajově v kapitole 4.6. Hlavním

důvodem je absence standardního HUH motivu, který je společný všem zde diskutovaným zástupcům.

Jak je z tabulky č. 1 patrné, tyrozinové transponázy obsahující charakteristický HUH motiv zajišťují mobilitu pouze části mobilních genetických elementů. Mezi těmito elementy jsou nejvíce zastoupené inzerční sekvence.

Inzerční sekvence (IS, z angl.: "Insertion Sequences") jsou bakteriální mobilní genetické elementy s velmi jednoduchou stavbou. Jsou nejjednodušší autonomní strukturou a tedy samostatně schopné přesunu z místa na místo (Mahillon, 1998). Z biologického hlediska se vlastně jedná o parazity na úrovni DNA využívající funkce buňky. Ve většině případů jde pouze o gen transponázy ohraničený rozpoznatelnými sekvencemi. Výjimku tvoří některé vybrané IS, které obsahují ještě druhý gen (IS608) nebo dokonce třetí (IS66). Tyto dodatečné geny se většinou podílejí na transpozici či reakci regulují (Pasternak, 2013). Inzerční sekvence s tyrozinovými transponázami shrnuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2 – IS sekvence obsahující Y transponázu

Rodina Inzerčních sekvencí	Skupina	Typická velikost elementu	Počet ORF v elementu	transponáza
IS91		1500-2000	1	Y2
IS200/IS605	IS200	600-750	1	Y1
	IS605	1300-2000	2	Y1
	IS607	1200-1500	1	Y1

- data získána z <https://www-is.biotoul.fr/> (dne 29.7.2013) (Siguier, 2006)

Složitější strukturu mají transpozony. Hlavním rozdílem je akumulace dalších genů nesouvisajících s transpozicí. Zcela specifickou třídou eukaryotních transpozonů obsahujících tyrozinové transponázy jsou tzv. Helitrony jejich vlastnosti jsou popsány v kapitole 4.5. Dalšími typy mobilních genetických elementů bakterií obsahující tyrozinové transponázy (Y1) jsou s integrony asociované elementy ISCR. Popisem těchto transponáz se zabývá kapitola 4.4.

2.2 Struktura tyrozinových transponáz

Jak již bylo zmíněno, v této práci se zaměřím pouze na podrobněji charakterizované transponázy obsahující HUH motiv. Zvláště se pak jedná o Y2 transponázy rodiny IS 91 a Helitronů a Y1 transponázy rodiny IS200/IS605, ISCRs a Rep-asociované transponázy (tzv. RAYT proteiny či TnpA_(REP)).

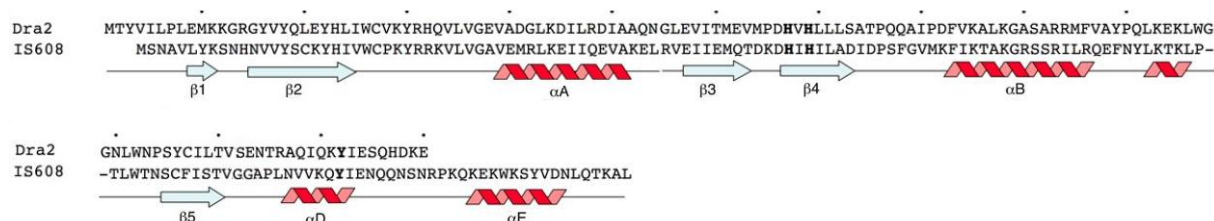
V databázi struktur proteinů – Protein Data Bank (PDB) je v současné době k dispozici pět vyřešených struktur těchto Y1 tyrozinových transponáz. Bohužel v PDB není dostupná žádná publikovaná struktura Y2 transponázy. Dostupnost struktur je naprosto klíčová pro relevantní biofyzikální popis enzymů a popis biochemie katalýzy. Jejich seznam je shrnut do tabulky č. 3 včetně jednoho příkladu Y rekombinázy a jednotlivé struktury jsou přiloženy jako přílohy 1 – 6.

Tabulka č. 3 – dostupné krystalové struktury Y transponáz

Název IS či Y transponázy, zdroj	Typ	PDB kód	Reference
IS608, <i>H. pylori</i>	Y1	2A6M	(Ronning, 2005)
ISDra2, <i>D. radiodurans</i>	Y1	2XQC	(Hickman, 2010)
IS1476 nekompletní, <i>S. solfataricus</i>	Y1	2F4F	(Lee, 2006)
ISSto1, <i>S. tokodaii</i>	Y1	2EC2	(Kawai, nedatováno)
RAYT, <i>E. coli</i>	Y1	4ER8	(Messing, 2012)
Tn916, <i>E. faecalis</i>	Y1*	1B69	(Wojciak, 1999)

* Protein zodpovědný za transpozici (rekombináza) obsahuje Y1 podobnou doménu. Zde pouze z ilustrativních důvodů. Dostupných struktur proteinů patřící mezi tyrozinové rekombinázy je mnoho.

Jednotlivé strukturální komponenty transponáz budou popisovány až v následujících kapitolách, přímo v souvislostech s reakčním mechanismem. Pro úplnost je uvedena na obrázku č. 2 aminokyselinová sekvence s vyznačením sekundárních struktur vybraných IS200/IS605 transponáz. Jejich popis ($\alpha A - E$, $\beta 1 - 5$) bude používán dále v textu.



Obrázek č. 2 | Sekvence a sekundární struktura vybraných IS200/IS605 transponáz. Tečky označují deset aminokyselin. Dra2 označuje transponázu ISDra2 z *D. radiodurans*. IS608 označuje stejnojmennou transponázu z *H. pylori*. Převzato a upraveno z (Hickman, 2010)

3 Reakční mechanismus tyrozinových transponáz

V této kapitole bude podrobně rozebrán reakční mechanismus tyrozinových transponáz. Dosud byly detailně studovány 2 zástupci Y1 tyrozinových transponáz a to IS608 a ISDra2. Jako modelový příklad pro tuto kapitolu byla zvolena Y1 transponáza elementu IS608, ke které je dostupné větší množství poznatků a referencí (Barabas, 2008) (Guynet, 2008) (Guynet, 2009) (He, 2011) (He, 2013). V samostatných kapitolách věnovaných dalším transponázám pak budou probrány odlišnosti ve struktuře a reakčním mechanismu. Zvláštní důraz bude kladen na Y transponázy asociované s REP

elementy tzv. RAYTy jejichž možný reakční mechanismus je zásadně odlišný (Nunvar, 2010) a Y2 transponázy s transpozicí mechanismem valivé kružnice.

3.1 Rozpoznávání DNA

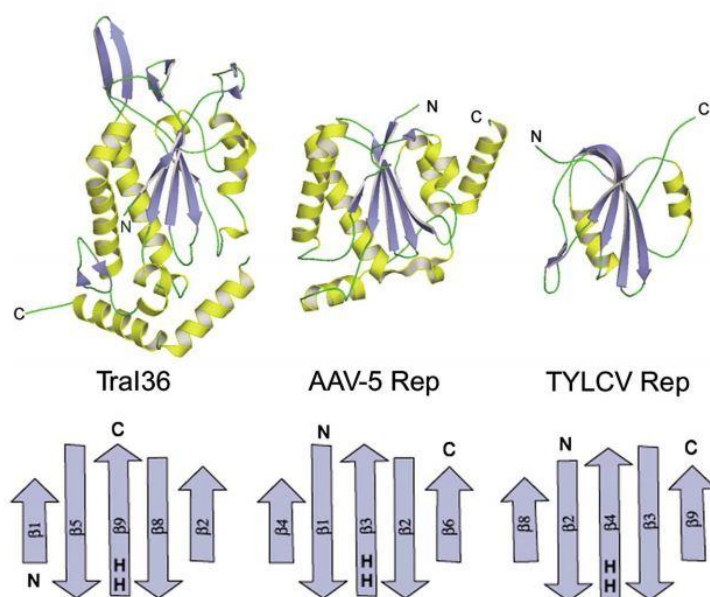
Jednou z hlavních výzev studia transponáz je popis, nalezení biofyzikální podstaty a cílená modifikace rozpoznávání DNA. Zároveň může být znalost rozpoznávání DNA vodítkem k exaktnímu popisu biologické funkce a klíčem pro využití v genovém inženýrství.

Esenciální rozpoznávanou strukturou pro tyrozinové ssDNA transponázy jsou takzvané neúplné palindromové sekvence (z angl.: "imperfect palindromic sequences"), které jsou identické pro oba konce. Jejich umístění od místa štěpení je ale odlišné a závislé na mobilním elementu a vlastním proteinu transponázy. Neúplné palindromové sekvence vytvářejí v nativních – *in vivo* podmínkách vlásenky, které jsou vlastní rozpoznávanou strukturou (Bikard, 2011). Rozpoznávání protein-DNA není sekvenčně specifické, ale strukturně specifické. Nicméně bylo ukázáno, že pro RAYT protein je zásadní 5'-konec vlásenkové struktury a dochází zde i k sekvenčně specifickému rozpoznávání (Messing, 2012). Rozpoznávání vlásenkové struktury tedy nelze generalizovat a podobně jako u jiných HUH endonukleáz k němu může docházet mnoha způsoby. Jako ve většině případů protein-DNA interakcí probíhá převážně přes deoxyribosa-fosfátovou kostru DNA (Dyda, 2012). Na obrázku č. 3 je schematicky ukázáno uspořádání a sekvence palindromu elementu IS608 se zvýrazněním popsaného strukturního fenoménu.

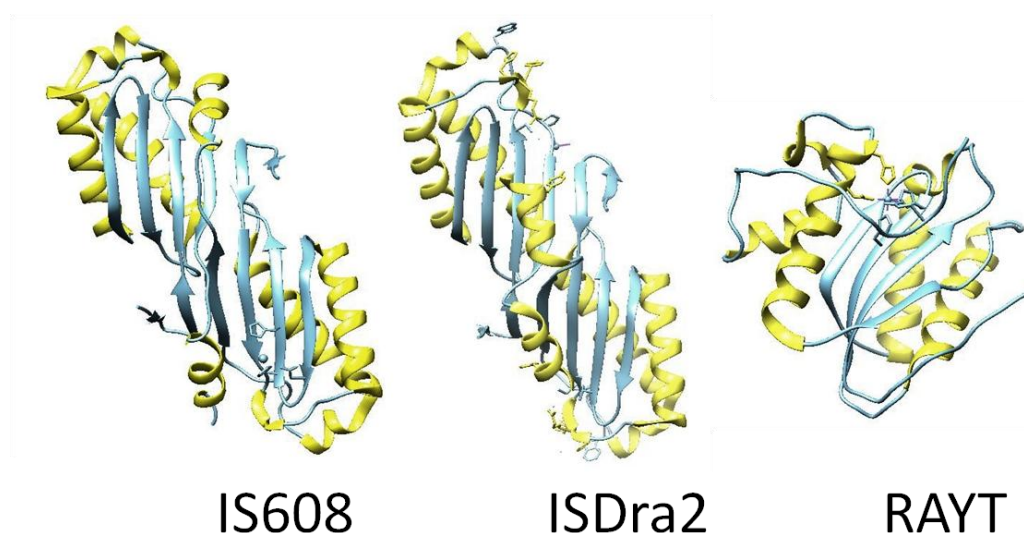


Obrázek č. 3 | Uspořádání a sekvence palindromu elementu IS608. Červeně a modře zvýrazněny neúplné palindromové sekvence - vlásenky rozpoznávané transponázou. Žlutě a světle modře tetranukleotidová vedoucí sekvence. LE - levý konec; RE - pravý konec; IP - neúplný palindrom. Převzato a upraveno z (Barabas, 2012).

Členové HUH endonukleázové rodiny mají ve své struktuře konzervativní β -strukturu složenou z 5 (4 pro RAYT) vláken β 1 – 5 lemovanou α -helixy. Zmíněné beta-listy vytváří prohlubeň (z angl.: "cleft") ohraničenou rezidui zodpovědnými za vazebnou specifitu (Datta, 2003). Nejinak je tomu i u tyrozinových transponáz patřících k této rodině. Porovnání strukturálních motivů členů HUH endonukleázové rodiny včetně schematického zobrazení jednotlivých beta-listů je ukázáno na obrázku č. 4 a pro vybrané Y transponázy patřící k této rodině na obrázku č. 5.



Obrázek č. 4 | Strukturální motiv členů HUH endonukleázové rodiny. Šipkami dole schematicky popsána konzervativní sekvence pěti β -listů podléjící se na rozpoznávání DNA. Převzato a upraveno z (Datta, 2003).

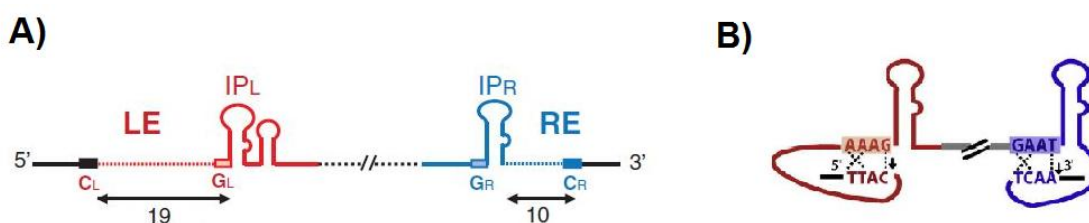


Obrázek č. 5 | Struktura vybraných Y transponáz. Struktury jsou získány z PDB (2XM3, 4ER8, 2VHG) zobrazeny a upraveny pomocí software Chimera 1.8rc.

Jak je patrné, členové IS200/IS605 rodiny transponáz jsou dimerní proteiny a na rozpoznávání DNA se podílejí obě podjednotky. Předpokladem je katalýza ve dvou funkčně odlišných konformacích. V konformaci *trans*, dostupné krystalograficky, se na vzniku aktivního místa podílí HUH motiv jedné podjednotky (umístěný v β -strukturu) a α D-helix s katalytickým tyrozinem podjednotky druhé. Konformace *cis* je charakteristická vznikem podobného uspořádání za účasti pouze jedné podjednotky (Chandler, 2013). Výjimkou z této představy je RAYT protein aktivní jako monomer.

Rozpoznávání štěpných míst je zajištěno specificky tetra- či pentanukleotidovou, tzv. vedoucí sekvencí (z angl.: "guide sequence") v blízkosti každé vlásenky. Na obrázku č. 3 jsou tyto sekvence zvýrazněny žlutě a světle modře.

Vazba cílového místa je na rozdíl od DDE transponáz sekvenčně specifická a je unikátním rysem tyrozinových transponáz. Sama transponáza nukleotidové motivy neváže, místo toho využívá 5'-tetranukleotidové motivy na konci inzerční sekvence. 5'-motiv TTAC je blíže paty vlásenky, 3'-motiv TCAA je vzdálenější. Prostorový rozdíl levého (LE) a pravého konce (RE) IS je esenciální pro umožnění konformačních změn a je ilustrován na obrázku č. 5 v části A. Dvojice tetranukleotidů, tedy vedoucí a štěpné sekvence spolu páruje kombinací Watson-Crickovského a Hoogstenova párování (Barabas, 2008). Následkem párování bází vzniká sekvenčně specifické rozpoznání umožňující specifické štěpení. Na úrovni sekvence se pak jedná o celou síť interakcí s bázemi DNA (Hickman, 2010) (He, 2011). Změny ve vedoucí sekvenci umožňují predikovatelné úpravy inzerční specifity (Guynet, 2009). Sekvenčně specifické párování určuje štěpná místa a je graficky naznačeno na obrázku č. 6.

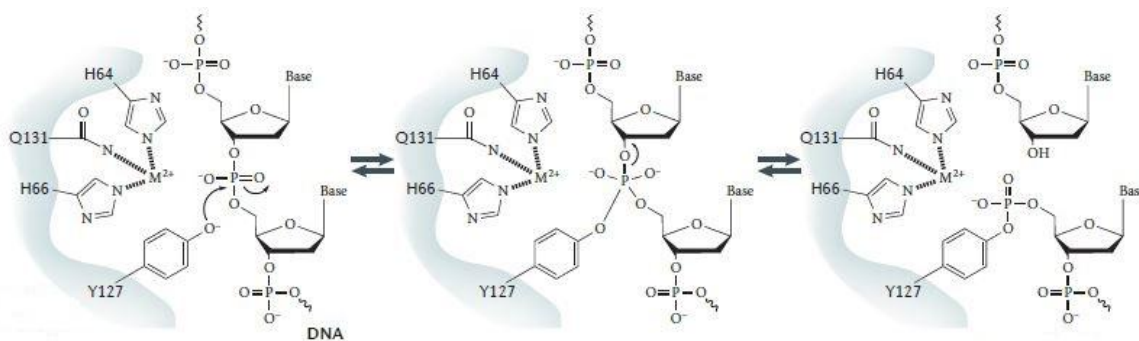


Obrázek č. 6 | Rozpoznání štěpných míst. A) Struktura IS608 - vedoucí sekvence je označena světlým obdélníkem; levé štěpné místo černým, pravé plně modrým; černými šipkami jsou vyznačeny vložené sekvence "spacery" mezi štěpným místem a vedoucí sekvencí, číslo označuje délku v nukleotidech (He, 2013); B) Štěpné místo je naznačeno svislými šipkami. Přerušovaně párování bází. Převzato a upraveno z (Guynet, 2009).

3.2 Mechanismus štěpení DNA

Štěpení DNA probíhá standardně jako transesterifikační reakce, a vyžaduje tedy atakující nukleofil. Pokud je nukleofilem voda, dochází k hydrolýze vazby. V případě \underline{Y} transponáz je nukleofilem hydroxylová skupina tyrozinu (Barabas, 2012). Samotný hydroxyl tyrozinu či serinu ani voda nejsou

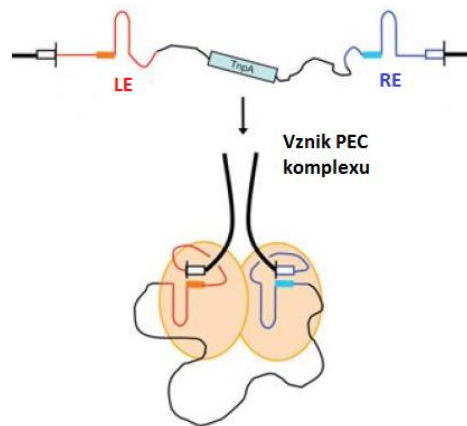
dostatečně účinným nukleofilem vhodným ke štěpení vazby. Je nutná přítomnost elektropozitivního dvojmocného atomu kovu (alkalických zemin, nejčastěji Mg^{2+} či Mn^{2+}), který stabilizuje disociované formy, a to jak kyseliny fosforečné, tak tyrozinového hydroxyly a orientuje je do vhodné polohy. Stericky je tak umožněn nukleofilní atak atomu fosforu za vzniku dočasného 5'-fosfotyrozinového intermediátu (Chandler, 2013). Koordinaci, nukleofilní atak a vznik kovalentního intermediátu přehledně ukazuje obrázek č. 7.



Obrázek č. 7 | Vznik 5'-fosfotyrozinového intermediátu. Převzato a upraveno z (Chandler, 2013)

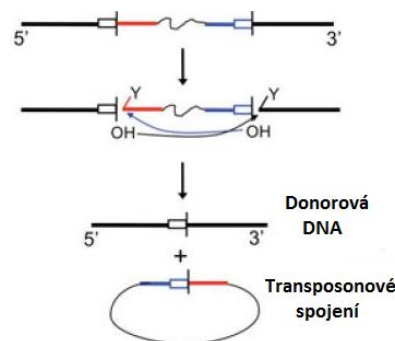
Jak je z obrázku č. 7 patrné, ke koordinaci bivalentního iontu kovu je kromě dvou histidinů zapotřebí třetího ligandu. Tomuto ligandu odpovídají svými polárními vlastnostmi Glu, Asp, His nebo Gln. Volný 3'-OH konec molekuly DNA může sloužit jako vhodný nukleofil pro další reakce, jako je replikace u RCR plazmidů (viz kap. 4.3). U transpoziciční reakce je použit tento konec až v terminačním kroku na opětovné rozrušení fosfotyrozinového intermediátu. Reakční sled je vlastně inverzní k výše popsanému. Na 5'-konci je fosfotyrozinový komplex štěpen a transesterifikován s uvolněnou 3'-OH skupinou. Výsledkem je vznik jednořetězcové cirkulární formy inzerční sekvence. Donorová DNA je stejným mechanismem spojena a je umožněna její disociace z enzymu (Guynet, 2008).

V případě IS200/IS605 transponáz dochází ke vzniku fosfotyrozinového intermediátu na jedné podjednotce dimeru, u druhé vzniká volný 3'-OH konec, a to vždy. Důvodem je rozdílná pozice štěpného místa u LE (na 5') a u RE (na 3'), zatímco způsob rozpoznávání DNA a štěpného místa podjednotkami enzymu je stejný. Vznikající takzvaný komplex spárovaných konců (z angl.: "paired-end complex") obsahuje obě rozpoznávané vlásenky ve stejném směru, i když skutečné prostorové uspořádání se liší (Dyda, 2012). Podjednotky mezi sebou svírají tupý úhel pouze blízky 180°. Vznik komplexu spárovaných konců ilustruje obrázek č. 8.



Obrázek č. 8 | Vznik komplexu spárovaných konců. Oranžově jsou vyznačeny jednotlivé podj. transponázy. Převzato a upraveno z (Dyda, 2012).

Po vzniku tohoto komplexu dochází ke vzniku transpozonového spojení (z angl.: "transposon junction"). Musí dojít ke štěpení fosfotyrozínového intermediátu na obou podj. transponázy a fyzické výměně štěpených konců z jednoho aktivního místa do druhého. Zároveň také dochází ke konformačním změnám obou podjednotek. Na začátku celého enzymatického cyklu je dimer transponáz v *trans* konfiguraci (na aktivním místě se podílejí obě podjednotky). Během štěpení DNA dochází ke konformační změně a α D-helix s γ residuem a navázanou DNA rotuje do konformace *cis*. V tomto strukturním uspořádání je transponáza schopná katalyzovat vznik cirkulárního jednořetězcového transpozonu. Po této výměně je možný atak 3'-OH skupinou vzniklou štěpením na opačném konci, která zůstává v místě svého vzniku. Velmi zjednodušeně lze tento krok ilustrovat obrázkem č. 9. Opětovnou konformační změnou na *trans*-konfiguraci dojde ke vzniku transpozonového spojení (transpozonu). Na donorové DNA, jak již bylo zmíněno, probíhá stejný reakční sled v inverzním uspořádání a výsledkem je spojení donorové DNA. Po konformační změně je umožněno její uvolnění.

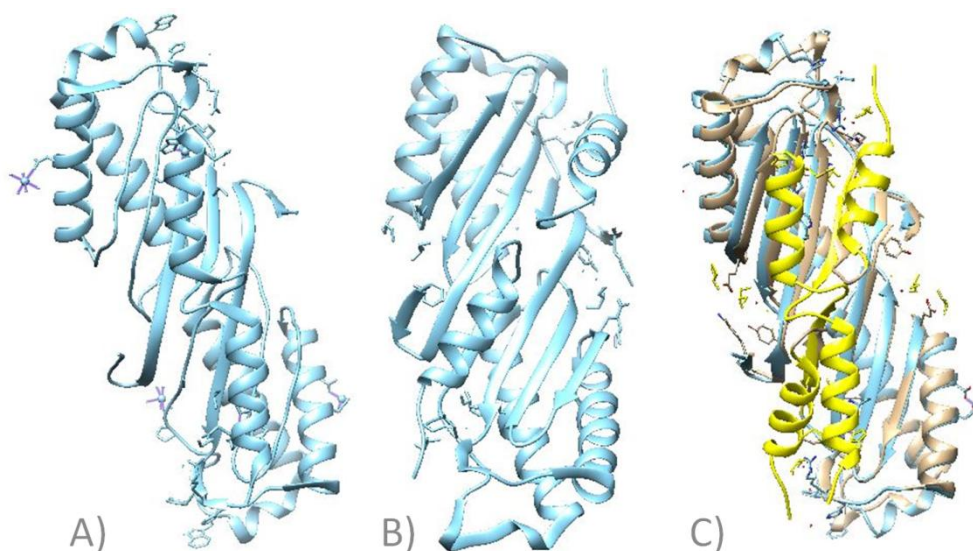


Obrázek č. 9 | Vznik transpozonového spojení. Červeně je vyznačen levý konec (5'); modře pravý (3'). Převzato a upraveno z (Dyda, 2012).

3.3 Změna konformace cis/ trans

Jednou z problematických otázek je potvrzení funkce a objasnění biofyzikální podstaty konformačních změn a jejich dopad na aktivitu transponázy. Důvod proč tyto otázky vyvstávají, se skrývá v trvalé nedostupnosti *cis* konfigurace pro rentgenostrukturní analýzu. Jak již bylo zmíněno v textu (viz výše) je hlavním dějištěm konformačních změn α D-helix nesoucí katalytický tyrozin, jehož mobilitu umožňuje dlouhá flexibilní smyčka. Konzervativní glycin na začátku flexibilní smyčky nejspíše poskytuje nejmenší omezení dihedrálních úhlů vzhledem k nutné pohyblivosti. Cílené mutace glycinu způsobují neschopnost konformačních změn a omezení enzymového cyklu.

Zpětnou analýzou dat bylo zjištěno, že neaktivní varianta transponázy z elementu ISDra2 pravděpodobně nabývá právě této konfigurace (PDB 2fyx) (He, 2013). Porovnání struktur s konformační změnou α D helixu je ukázáno na obrázku č. 10.



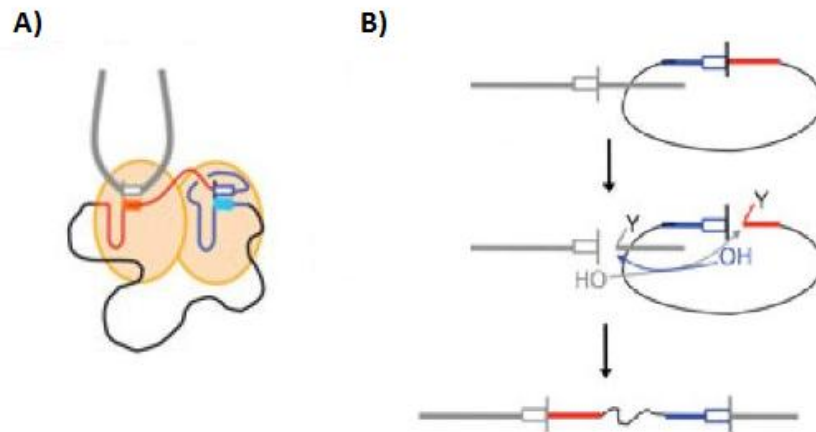
Obrázek č. 10 | Konformační změny ISDra2. A) *trans* konfigurace PDB 2XQC; B) předpokládaná *cis* konfigurace PDB 2FYX; C) porovnání struktur, žlutě zvýrazněny α D helixy + nejbližší rezidua, šedě zvýrazněna *trans* konfigurace, modře předpokládaná *cis*; struktury získány a upraveny pomocí software Chimera 1.8rc.

3.4 Vazba cílového místa a integrace

Vazba DNA probíhá na základě mechanismu již popsaného v kapitole 3.1 rozpoznávání DNA. Následkem specifického párování bází transpozonového spojení s tetranukleotidovým motivem v genomu – libovolným ze 4 bp dle (Guynet, 2009), primárně vedoucí sekvence s LE dle (Dyda, 2012) vzniká struktura rozpoznávaná transponázou (Guynet, 2009). Rozpoznání cílové sekvence (ad A) a integrace (ad B) je graficky ukázáno na obrázku č. 11. V tomto bodě je integrace zcela závislá na

dostupnosti vhodné ssDNA sekvence. Takto přístupná ssDNA se v buňce vyskytuje například jako opoždující se řetězec při replikaci, u kterého byly integrace i vyštěpení pro IS608 experimentálně prokázány (Ton-Hoang, 2010).

Po rozpoznání cílové sekvence dojde ke standardní *trans* reakci. Opětovnou rotací α D-helixů do polohy *cis* umožní výměnu řetězců. Reakce je analogií k vyštěpení transpozonového spojení.

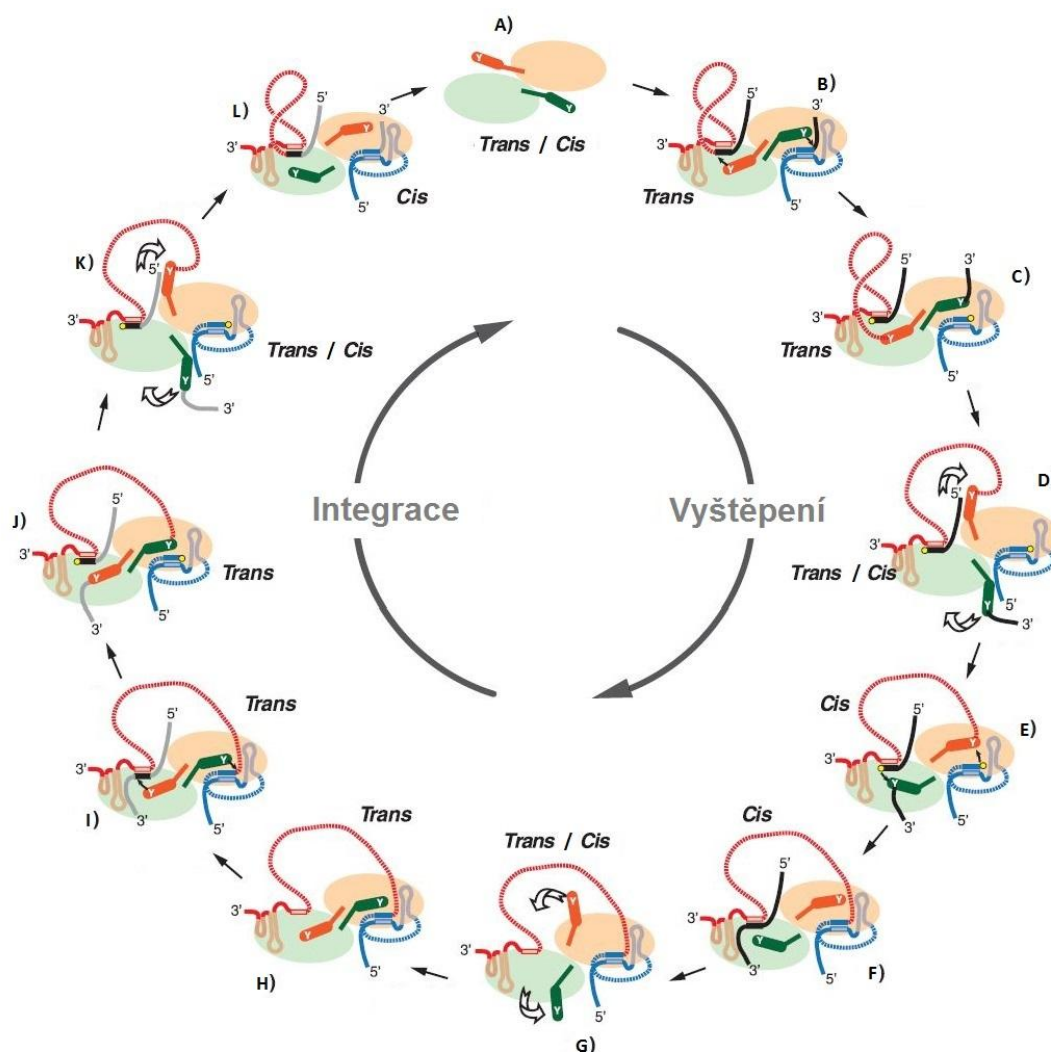


Obrázek č. 11 | Integrace. A) rozpoznávání cílové sekvence pomocí vedoucí sekvence, šedě genomová DNA, bíle vyplněný obdélník cílová sekvence, světle oranžový a světle modrý obdélník vedoucí sekvence; B) integrace, červeně levý konec (5'), modře pravý (3'); A a B převzato a upraveno z (Dyda, 2012);

Jelikož je transponována pouze ssDNA, vždy vzniká na místě vyštěpení a na místě integrace jednořetězcová smyčka. Její přítomnost může vést ke dvěma zcela zásadně odlišným procesům. V prvním případě je smyčka rozpoznána jako nežádoucí chyba v genomu a je buněčnými reparačními mechanismy opravena. Výsledkem je ztráta inzerční sekvence z genomu bakterie. Ke druhému zcela opačnému procesu dojde, pokud smyčka není rozpoznána jako chyba a dojde k replikaci druhého vlákna. Takováto inzerční sekvence je zachována v genomu a segreguje do dceřiné buňky.

3.5 Souhrn mechanismu transpozice

V této kapitole bude schematicky v krocích shrnut reakční mechanismus IS608 tyrozinové transponázy (zvolené jako model). Zde shrnutý mechanismus tedy platí absolutně pouze pro tuto transponázu. Nicméně vzhledem k analogii aktivních míst a podjednotkové struktury je možné jej zobecnit pro dimerní Y1 tyrozinové transponázy. Celkový reakční mechanismus je detailně popsán v práci (He, 2013), s důrazem na výměnu řetězců. Jednotlivé kroky jsou ukázány graficky na obrázku č. 12 a stručně popsány v textu pod obrázkem.



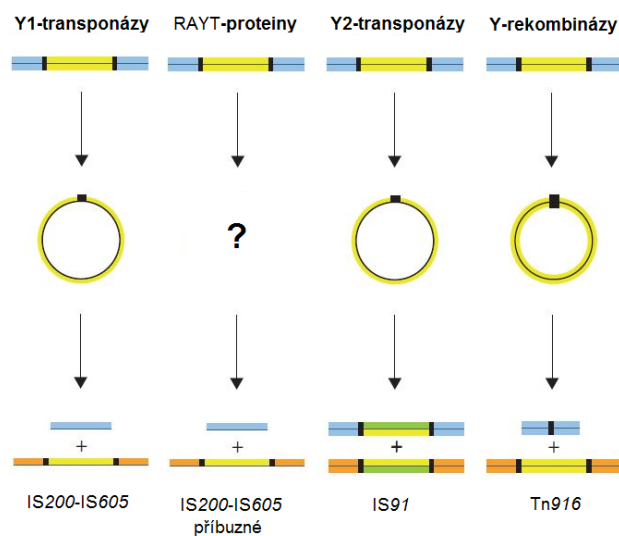
Obrázek č. 12 | Reakční mechanismus IS608. Světle zeleně a oranžově-monomery γ transponázy; Tmavě zeleně a oranžově α D-helix s vyznačeným katalytickým tyrozinem. Světle červeně levý, světle modře pravý konec IS. Přerušované linkery mezi vedoucí a rozpoznávanou sekvencí. Vedoucí a štěpné místo je vyznačeno stejně jako na obrázku č. 6. Jednotlivé reakční kroky A až L jsou popsány v textu. Převzato a upraveno z (He, 2013).

Na počátku katalytického cyklu je inaktivní transponáza připravena k rozpoznání a vazbě DNA (ad A). Po jejím navázání a specifickém párování s vedoucí sekvencí dojde ke konformační změně na *trans* konfiguraci a specifickému rozštěpení cílové sekvence (B a C). Vzniká 5'-fosfotyrosinový intermediát LE a 3'-OH RE transpozonu. U DNA, ze které je transpozon vyštěpován, vzniká uspořádání opačné. Rotace α D-helixů do konfigurace *cis* je provázána také pohybem navázané DNA (D). Dochází k nukleofilnímu ataku LE fosfotyrosinové vazby RE 3'-OH. U donorové DNA dochází k ataku RE fosfotyrosinové vazby LE 3'-OH (E). Vznik transpozonového spojení (E). Opětovná změna konfigurace umožňuje uvolnění donorové DNA (G). Dochází k návratu katalytického místa do základního stavu. Je předpokládáno, že nedochází k uvolnění transpozonového spojení (H). Pomocí párování bází je

zachycena cílová sekvence DNA (I). Navázaná cílová sekvence je standardním procesem v *trans* konfiguraci štěpena. Vzniká LE 5'-fosfotyrozinový intermediát a 3'-OH RE (J). Rotace α D-helixů do cis konformace a s ním spojený pohyb DNA umožní opětovný nukleofilní atak a definitivní integraci transpozonu do cílového místa (K a L). Uvolněním navázané DNA se uzavírá katalytický cyklus a enzym se navrácí do výchozí konfigurace (A).

4 Zástupci

V následujících řádcích budou diskutovány jednotlivé skupiny tyrozinových transponáz. Jejich výjimečné rysy a odlišnosti od ostatních. Nejprve dvě skupiny Y1 tyrozinových transponáz a to rodina IS200/IS605 jejíž reakční mechanismus byl již detailně probrán a RAYT proteiny této rodině blízké příbuzné. V kapitole 4.3 budou rozebrány charakteristiky transponáz spjatých s elementy IS91, které jsou charakteristické Y2 motivem a následně v kapitole 4.4 transponázy ISCRs, které s nimi mnoho sdílejí. Na závěr budou probrány eukaryotní transponázy rodiny Helitron a okrajově také Y-rekombinázy asociované s Tn916. Zásadní rozdíly v mechanismu transpozice přehledně a v zjednodušené formě ukazuje obrázek č. 13.



Obrázek č. 13 | Přehled různých typů transpozice. Donorová DNA je vyznačena světle modře. Transponovatelný element žlutě s černě vyznačenými koncovými sekvencemi. Oranžově cílová DNA. Zeleně replikované vlákno. Převzato a upraveno z (Barabas, 2012).

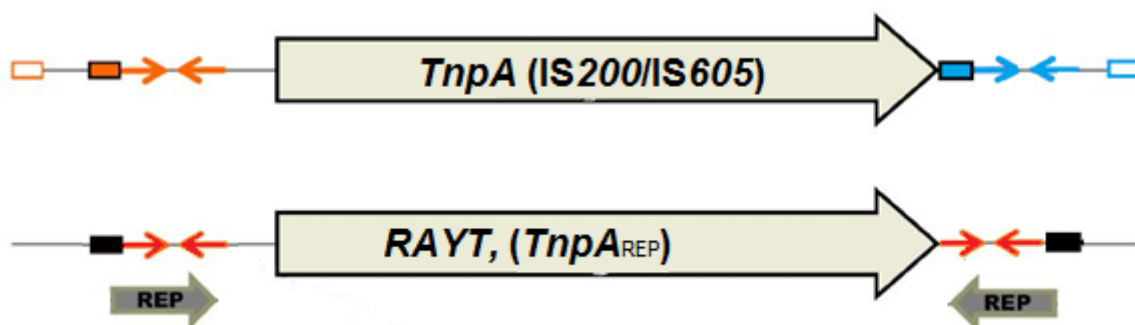
4.1 Transponázy IS200/IS605 rodiny

Inzerční sekvence IS200/IS605 rodiny jsou rozšířeny napříč všemi liniemi eubakterií a nalezneme je i v několika skupinách archea (Halobacteriales, Thermoproteales, atd.) (Sigquier, 2006). Velikost inzerční sekvence se pohybuje mezi 600 a 2000 bází. Jak již bylo zmíněno, obsahují jeden či dva geny. Inzerční sekvence IS200 obsahuje jeden gen (*TnpA*) a byla popsána jako charakteristická pro rod bakterií *Salmonella* (Lam, 1983). Nicméně pozornost vyvolalo až objevení vlastní tyrozinové transponázy elementu IS608 v roce 2002 u bakterie *H. pylori* peruánského pacienta s rakovinou žaludku (Kersulyte, 2002). Tato inzerční sekvence obsahuje dva geny *TnpA* (transponázu) a gen *TnpB* zodpovědný za regulaci transponázy (Pasternak, 2013). Druhá intenzivně studovaná transponáza z této rodiny ISDra2 je jedním z důvodů fascinující radiorezistence bakterie *Deinococcus radiodurans* (Mennecier, 2006).

Další známý člen IS200/IS605 rodiny je asociován s inzerční sekvencí IS1476. Inzerční sekvence IS1476 byla poprvé nalezena u bakterie *Enterococcus faecium*, v genu pro karboxypeptidázu zodpovědnou za vankomycinovou rezistenci. Tento mobilní genetický element a jeho transpozice u daného kmene mají přímý vliv na rezistenci vůči zmíněnému antibiotiku (Mackinnon, 1997). Později byla získána krystalová struktura transponázy asociované s touto inzerční sekvencí a to včetně vázaného iontu dvojmocného kovu a umožnila tak jeden z prvních pohledů na reakční mechanismus těchto transponáz (Lee, 2006).

4.2 RAYT proteiny

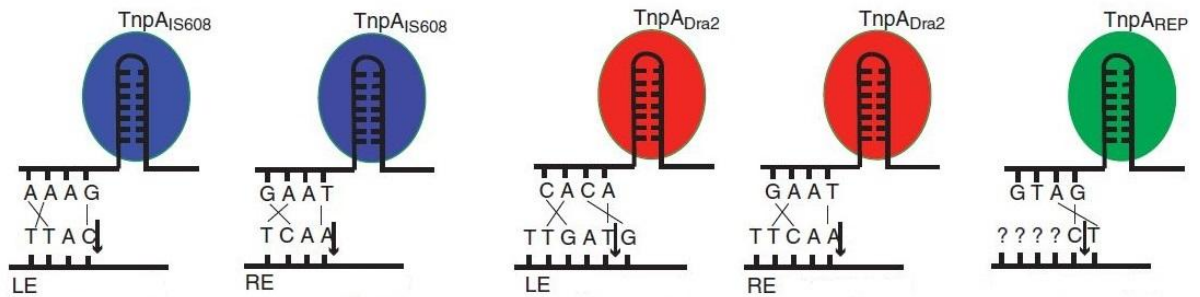
Zkratka RAYT (z angl.: "REP associated tyrosine transposases") odkazuje na původ těchto nedávno objevených Y1 tyrozinových transponáz. Jsou asociovány s bakteriálními REP (z angl.: "repetitive extragenic palindrome") elementy. Jedná se o proteiny příbuzné IS200/IS605 tyrozinovým transponázám a byly objeveny při analýze genomu *S. maltophilia* (Nunvar, 2010). Obě dvě skupiny transponáz sdílejí stejnou velikost, katalytický tyrozin, HUH motiv a ukončení transponovatelného elementu neúplnými palindromy. Srovnání struktury IS200/IS605 a RAYT je ukázáno na obrázku č. 14. Zásadní rozdíly mezi oběma proteiny jsou v celkové struktuře transponázy a mechanismu transpozice.



Obrázek č. 14 | Srovnání uspořádání genu transponáz IS200/IS605 a RAYT proteinů. Pro TnpA plné obdélníky značí levou a pravou vedoucí sekvenci a prázdné obdélníky rozpoznávané sekvence. Oranžové a modré šipky naznačují palindromovou sekvenci.

Spojitosť mezi RAYT a REP byla předpovězena (Nunvar, 2010) a následně potvrzena u transponázy z *E. coli* ($TnpA_{REP}$) *in vitro* pokusy (Ton-Hoang, 2012). Štěpnými pokusy byla také dokázána nutná přítomnost GTAG tetranukleotidu, který je součástí REP elementů, aby mohlo dojít k enzymové reakci (Ton-Hoang, 2012). Dá se říci, že GTAG je pro RAYT protein něco jako vedoucí sekvence pro IS200/IS605 transponázy.

Skupině vedené Dr. M. Chandlerem se podařilo získat strukturu RAYT proteinu z *E. coli* včetně vázané DNA a poodhalit tak odlišnosti v katalytické aktivitě proti transponázám IS200/IS605. Rozpoznávání DNA a její vazba podléhá stejným pravidlům pro obě skupiny. Zásadní rozdíl je ve štěpení DNA. Rozpoznávaná sekvence GTAG umožňuje pravděpodobně párování až posledních dvou nukleotidů, z nichž G vždy páruje s C, za kterým probíhá štěpení. Tento rozdíl oproti IS200/IS605 ilustruje obrázek č. 15. Po rozštěpení CT dinukleotidu podléhají zúčastněné řetězce výměně (mechanismem, který je známý například pro relaxázu TrwC). Jedná se vlastně o reakci analogickou jedné podjednotce IS200/IS605 transponázy. Vazba iREP (REP v obrácené orientaci) zatím nebyla experimentálně pozorována a tedy celá transpoziční reakce zatím zůstává nevyřešena. Ani po navázání REP vlásenky nebyla pozorována dimerní forma. Další zcela zásadně odlišnou vlastností $TnpA_{REP}$ proteinu je přítomnost C terminální auto-inhibiční domény (Messing, 2012).



Obrázek č. 15 | Srovnání rozpoznávání štěpných míst u různých transponáz. Modře, červeně a zeleně naznačen protein. Horní sekvence vedoucí, spodní rozpoznávaná/štěpená. Štěpné místo zvýrazněno šipkou. Párování nukleotidů naznačeno tenkými čárami. LE - levý konec; RE - pravý konec; Převzato a upraveno (Messing, 2012).

4.3 Transponázy IS91 (Y2)

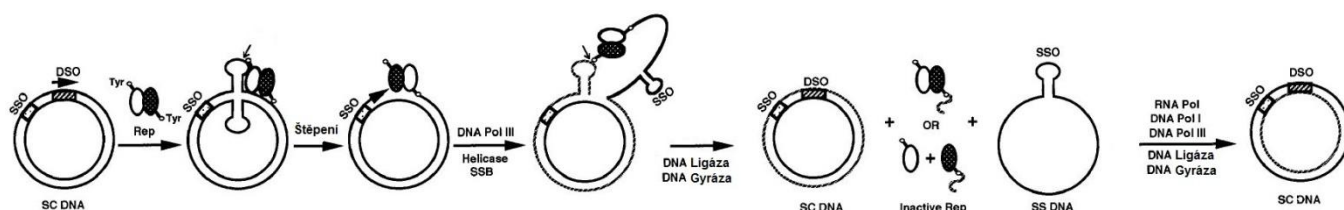
První vůbec identifikovaná tyrozinová transponáza nesoucí HUH endonukleázový motiv byla asociovaná s elementem IS91. Tato inzerční sekvence byla původně získána z hemolytického plazmidu *E. coli* (Díaz-Aroca, 1984). Podle dvou konzervativních tyrozinových zbytků v aminokyselinové sekvenci přítomné transponázy jsou tyto enzymy označovány jako Y2. Kromě přítomnosti druhého tyrozinu se oproti Y1 transponázám liší ve velké škále dalších aspektů. Schematický model Y2 transponázy IS91 na obrázku č. 1 ukazuje zásadní rozdíl ve velikosti a přítomnosti DNA vazebné domény obsahující zinek a domény s předpokládanou oligomerizační funkcí (na obrázku fialově). Podobné uspořádání mají transponázy zodpovědné za mobilitu ISCR (viz níže) s rozdílem v přítomnosti pouze jednoho katalytického tyrozinu. Specifickým rysem IS91 transponáz je integrace do specifické cílové sekvence CTTG nebo GTTC, a to ze strany pravého invertovaného opakování. Během inzerce nedochází k duplikaci cílových míst.

Uspořádání IS91 je charakteristické dvěma nehomologními konci lemujícími gen pro transponázu. Na obou koncích jsou také přítomné krátké invertované repetice. Není však zřejmé, jaká je jejich úloha a jestli jsou opravdu znakem těchto inzerčních sekvencí. Oba konce hrají jinou úlohu v mechanismu transpozice. Zatímco 82 bp dlouhé terminální opakování na pravém konci sousedící s cílovou sekvencí (CTTG,GTTC) je nezbytné pro transpoziční reakci, podobná struktura na levém konci je neesenciální (Mendiola, 1994), nezbytná je pouze koncová sekvence (Bernales, 1999).

Transpoziční mechanismus IS91 transponáz probíhá mechanismem valivé kružnice, který je spojován s replikací plazmidů mechanismem valivé kružnice (RCR, z angl.: Rolling circle replication") (Mahillon, 1998). Jak bylo zjištěno, oba dva tyroziny jsou katalyticky esenciální (Garcillán-Barcia,

2001). Transpozice začíná štěpením pravého IR za vzniku podobných meziproduktů jako u transpozice IS608. Volný 3'-OH konec z donorové molekuly nicméně dále slouží jako primer pro DNA replikaci. Stejně jako při RCR plazmidu také u transpoziční reakce vzniká 5'-fosfotyrozinový intermediát (Noirot-Gros, 1994). Výsledkem reakce je jednořetězcový zlom, který umožní odvíjení jednoho vlákna ssDNA a zároveň klasickou replikaci ve směru 5' na druhém vlákne (donorové molekule). Odvíjené vlákno je postupně uvolňováno (helikázou) a vytlačováno postupující replikací. Druhým reakčním krokem dojde k vyštěpení kruhové ssDNA molekuly. Na rozdíl od probírané transpozice elementu IS608 nedojde u donorového vlákna k vyštěpení ssDNA elementu a dochází k replikativní transpozici.

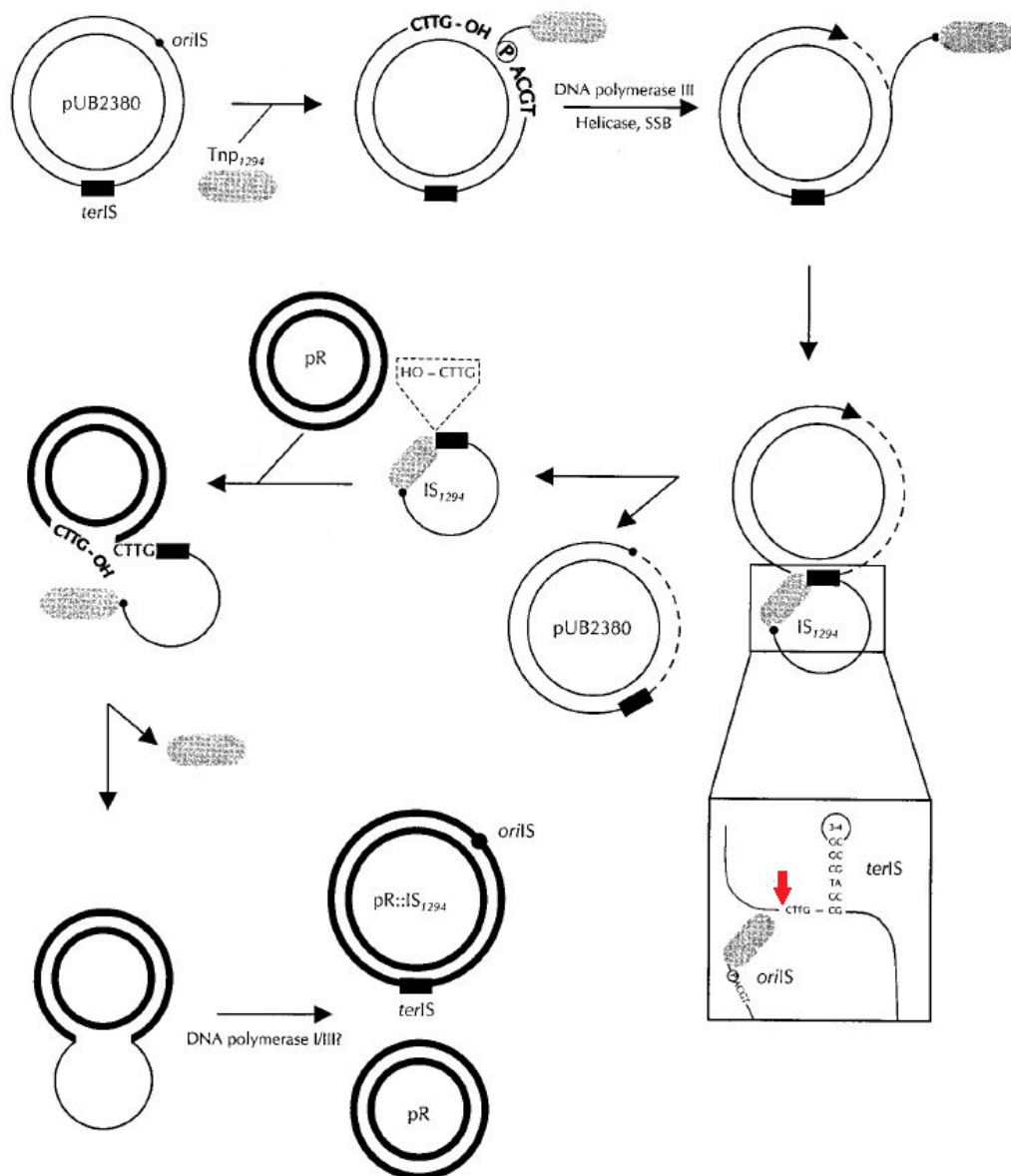
Právě detekcí vzniku kruhového ssDNA intermediátu byla potvrzena hypotéza o transpozici mechanismem RCR (Garcillán-Barcia, 2001). Na obrázku č. 16 je pro srovnání ukázáno zjednodušené schéma RCR replikace plazmid demonstrující vznik ssDNA intermediátu.



Obrázek č. 16 | Replikace plazmidu valivou kružnicí. SC DNA = superspiralizovaná DNA; DSO - počátek pro dsDNA, SSO = počátek pro jednořetězcovou DNA; Tyr - značí katalytický tyrozin. Převzato a upraveno (Khan, 1997).

Celý mechanismus je dobře zmapován pro transponázu, která je součástí elementu IS1294. Tato transponáza je vzhledem ke své blízké příbuznosti označována jako IS91 podobná (z angl.: "IS91-like"). Tento element byl nalezen na *E. coli* plazmidu pUB2380 nesoucí geny pro různé rezistence. Právě přítomnost elementu IS1294 na plazmidu a jeho transpozice do připravených cílových plazmidů (obsahujících cílovou sekvenci) umožnila hlubší popsání mechanismu transpozice. V místě zvaném *oriIS* končícím sekvencí CTTG je transponázou katalyzován (transesterifikace) jednořetězcový zlom za vzniku volné 3'-OH skupiny sloužící jako primer. Z tohoto konce začíná replikace donorové DNA buněčným aparátem. Na 5'-konci (transpozonu) vzniká kovalentní fosfotyrozinový intermediát analogicky reakci popsané u transponázy elementu IS608. K odvíjení ssDNA dochází, dokud nedojde k terminačnímu místu *terIS*. V tomto místě se na 3'-konci nalézá vlásenková struktura a cílová sekvence GTTC. Transponáza rozpoznává tuto strukturu a štěpí na 3'-konci zmíněného tetranukleotidu, čímž umožní vyštěpení transpozonu a zároveň obnovení donorové DNA. Transponáza zůstává kovalentně vázaná k 5'-konci transpozonu. Také druhý 3'-OH konec je pravděpodobně vázán (nekovalentně). V tomto okamžiku se úloha 3'-OH mění a slouží jako nukleofil

k ataku nového inzerčního místa. Výsledkem ataku a transesterifikace je navázání 3'-OH konce transpozonu na cílovou DNA a umožnění transesterifikace fosfotyrozínového intermediátu a nově vzniklým 3'-OH koncem na cílové DNA. Do jednoho řetězce DNA je tedy začleněn celý element IS1294. Vzniká heteroduplexní molekula, jejíž replikace vede k vzniku jedné původní sekvence a druhé nesoucí integrovaný element IS1294 (Tavakoli, 2000). Celý mechanismus shrnuje obrázek č. 17.



Obrázek č. 17 | Transpozice IS1294 elementu. Šedý ovál naznačuje transponázu asociovanou s elementem IS1294. Černá tečka označuje místo *oriS*. Černý obdélník označuje místo *terIS*. Cílový plazmid je označen pR. Plazmid pR::IS₁₂₉₄ obsahuje vloženou inzerční sekvenci. Červenou šipkou je zvýrazněno štěpné místo na 3'-konci *terIS*. Převzato a upraveno z (Tavakoli, 2000).

4.4 Transponázy ISCRs (Y1)

Mobilní genetické elementy označované jako ISCRs jsou neobvyklou skupinou inzerčních sekvencí obsahujících Y1 transponázy, strukturně a funkčně spojené s elementy IS91. Je známo nejméně 16 typů elementů spadajících do skupiny ISCRs. Všechny tyto elementy a jejich struktury jsou zaznamenány v blízkosti genů nesoucích povětšinou rezistenci na antibiotika a jsou odpovědné za jejich mobilizaci (Toleman, 2008). Hlavní součástí, která dala ISCRs jméno, je sekvence označovaná jako společný region (z angl.: "common region"). Právě tento region se podobá atypické inzerční sekvenci IS91 (často označován jako IS91-like) a nese transponázu zodpovědnou za přesun celého elementu. Další součástí ISCRs elementů je na 3'-straně, od společného regionu, konzervativní sekvence patřící 1. třídě integronů, tzv. *gac/sul* lokus. Tento lokus propůjčuje mikroorganismům rezistenci vůči kvartérním amoniovým sloučeninám a sulfonamidům a společně s dalšími součástmi integronu 1.třídy je zodpovědný za akumulaci genů pro rezistence (Sáenza, 2010). Struktura vybraného ISCR elementu a jeho okolí je ukázána na obrázku č. 18.



Obrázek č. 18 | ISCR1c element - schéma. Žlutým obdélníkem je zvýrazněn ISCR1 element. Šedé obdélníky *gac/sul* představují 3' konec komplexního integronu třídy 1. Modře je vyznačen gen integrázy reprezentující 5' konec integronu. Převzato a upraveno z (Toleman, 2006).

Sekvenčním porovnáváním transponáz ISCRs a IS91 bylo zjištěno, že zachovávají hlavní konzervativní motivy až na druhý katalytický tyrozin Y249, který je nahrazen argininem či lyzinem. Tento tyrozin je esenciální pro mechanismus valivé kružnice u IS91 (Garcillán-Barcia, 2001) nikoli však u transponáz ISCRs. U IS91 slouží první katalytický tyrozin jako nukleofil atakující oriIS a druhý atakuje cílové místo za vzniku fosfotyrozinových intermediátů na obou residuích. Mutace tyrozinů způsobují inaktivaci enzymu IS91, nicméně skutečný důvod inaktivace je neznámý. Je ovšem zřejmé, že u ISCRs musí existovat alternativní způsob umožňující replikaci předpokládaným mechanismem valivé kružnice, čemuž nasvědčuje strukturní uspořádání ISCR elementů. Úloha katalytických residuí Y2 transponáz tedy není vyřešena. Nápodvedou by mohly být některé příbuzné Rep proteiny, které zahrnují ve svém katalytickém cyklu glutamát (Noirot-Gros, 1994) a další záměny zodpovědné za alternativní způsob katalýzy. Mechanismus transpozice IS91 způsobem valivé kružnice je podrobně probrán v kapitole 4.3 věnující se právě transponázám spojeným s touto inzerční sekvencí.

4.5 Transponázy rodiny Helitron

Helitrony jsou hlavní třídou eukaryotických transpozonů. Jako vůbec první repetitivní DNA sekvence byly odhaleny pomocí *in silico* metod v genomu Huseníčku – *Arabidopsis thaliana* (Kapitonov, 2001). Jejich rozšíření je obrovské a tvoří 1 – 5 % genomové DNA *Drosofil* a až 3 % u savců (Kapitonov, 2007).

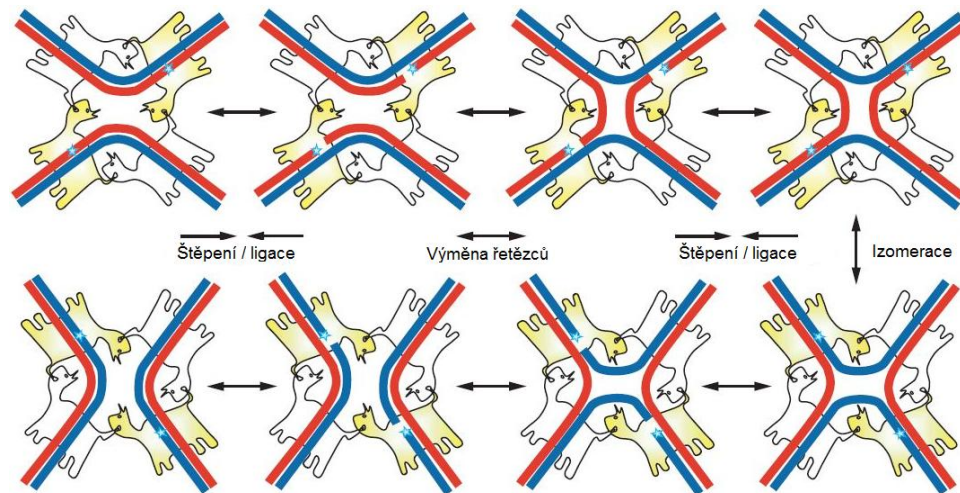
Hlavní enzymovou součástí helitronů zodpovědnou za jejich mobilitu je kompozitní tyrozinová transponáza v základním uspořádání ukázaná na obrázku č. 1. Je složena z DNA vazné domény (Zn) dále katalyticky aktivní domény Y2, helikázové domény a dále u některých z domény podobné replikačnímu proteinu A, apurinové endonukleázové domény a z cysteinové proteázové domény. V případě přítomnosti apurinové endonukleázové domény jsou tyto transpozony nazývány jako helentrony (Poulter, 2003).

Zajímavé je, že helitrony negenerují duplikace cílových míst během transpozice, jak je obvyklé u jiných rodin transpozonů. Jejich uspořádání je poměrně konzervativní a odkazuje na spojitost s prokaryotními Y transponázami. Na 5'-konci se nachází vždy dinukleotid TC bez vlásenkového motivu, následovaný dlouhým čtecím rámcem (s více než deseti exony). Levý konec (3') je ukončen 16-20 bp dlouhou vlásenkovou strukturou začínající cca 10 až 12 bází od konce. Konec vždy obsahuje tetranukleotidový CTAG motiv. Právě této struktuře na 3'-konci je přisuzována terminační funkce u transpozonů s mechanismem valivé kružnice a je jedním z argumentů podporující hypotézu o transpozici právě tímto mechanismem. Nicméně podrobný mechanismus transpozice není znám.

4.6 Rekombináza asociovaná s Tn916

Enzym asociovaný s transpozonem Tn916 je označován jako tyrozinová rekombináza. Rekombinázy jsou enzymy, které katalyzují stejně jako transponázy vyštěpení, přenos a opětovné vložení sekvence mobilního genetického elementu do DNA. Mechanismus těchto enzymů je však naprosto odlišný a jak už z názvu vyplývá, hlavním reakčním krokem je místně cílená rekombinace (z angl.: "Site-specific". Rekombinázy se dělí na dvě rozsáhlé rodiny podle atakujícího nukleofilu, kterým může být serin či tyrozin. Analogicky tyrozinovým transponázám dochází k vytváření kovalentního protein-DNA intermediátu. Vlastní reakce Y a S rekombináz jsou ovšem odlišné. Enzymy s atakujícím tyrozinem katalyzují štěpení a opětovné spojení vždy jednoho řetězce za vytvoření charakteristické Holidayovi struktury (z angl.: Holiday junction"). Serinové rekombinázy oproti tomu katalyzují štěpení dvouřetězcové DNA (Grindley, 2006). Rekombinázou katalyzované štěpení, vznik

Holidayovi struktury a výměna řetězců, které jsou podstatou katalytického cyklu rekombinázy jsou ukázány na obrázku č. 19.



Obrázek č. 19 | Katalytický cyklus Y rekombinázy. Žlutě zvýrazněny aktivní podjednotky. Hvězdička vyznačuje místo štěpení. Převzato a upraveno z (Grindley, 2006).

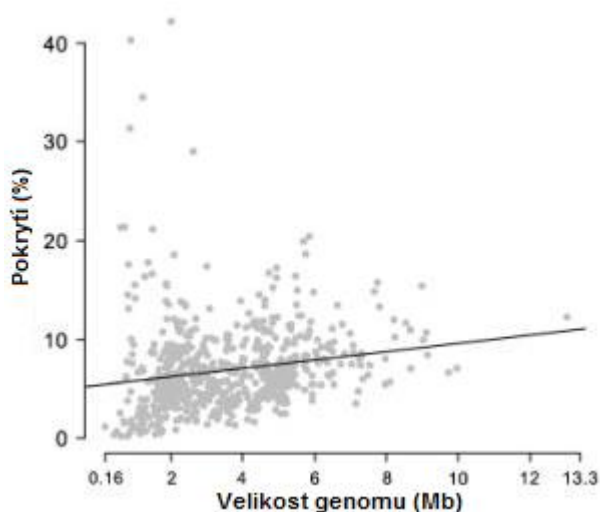
Konjugativní transposon Tn916 je 18 kbp velký a byl objeven v mikroorganismu *Enterococcus faecalis* (Franke, 1981). Tento element nese geny pro rezistenci na tetracyklin a je zodpovědný za jejich šíření. Vzhledem k širokému hostitelskému spektru se může vyskytovat a vyskytuje jak mezi gram-pozitivními tak mezi gram-negativními bakteriemi. Je známa také jeho ochota vytvářet s dalšími mobilními genetickými elementy větší celky zodpovědné za rezistenci na širokou škálu antibiotik. Z tohoto důvodu je jedním ze dvou nejlépe prostudovaných konjugativních transpozonů vůbec (Rice, 1998).

5 Biologická funkce tyrozinových transponáz

Úspěch prokaryotních organismů je založen na odlišných aspektech, než je tomu u organismů eukaryotních. Korelace mezi počtem genů a velikostí prokaryotního genomu je známkou jistého omezení přítomnosti nekódující DNA. Čím je tato vlastnost prokaryotních buněk způsobena, není známo vzhledem k nemožnosti simulovat dlouhodobé evoluční pochody. Je možné pouze hypotetizovat. Jde-li o následek vysoce kompetitivního prostředí a omezenosti energetického metabolismu, které znemožňují efektivně syntetizovat velké množství DNA bez vlivu na konkurenceschopnost takového mikroorganismu. Častým argumentem pro tuto hypotézu je fakt, že výrazně většího pokrytí genomu nekódující DNA a zvláště genetickými mobilními elementy je

dosaženo u intracelulárně parazitických bakterií, jako jsou například *Phytoplasma* (*Acholeplasmatales*), a to až kolem 50 %. Ve většině případů pak množství nekódující DNA nepřesahuje 10 % a je možné vysledovat slabou korelaci mezi velikostí genomu a tímto množstvím (Treangen, 2009). Zmíněná fakta ilustruje obrázek č. 20.

Druhým velmi specifickým rysem bakteriálních genomů jsou jejich variace. Genom *Escherichia coli* může být velký od 4,6 až po 5,7 Mb. Tyto variace poukazují na rychlou divergenci ve velmi krátkém čase (Rosario, 2012).



Obrázek č. 20 | Podíl nekódující DNA v prokaryotech. Přímkou je naznačena slabá korelace velikosti genomu a podílu nekódující DNA. Převzato a upraveno z (Treangen, 2009).

Bakteriální mobilní elementy jsou tedy nutně pod stálým selekčním tlakem. Kdyby nepřinášely svému hostiteli konkurenční výhodu, tak by byly z genomu odstraněny. Opak je pravdou, a tak jsou mobilní elementy společně s plazmidy a bakteriofágy hlavními nástroji horizontálního transferu genů a pravděpodobně také zcela zásadním hybatelem bakteriální evoluce (Frost, 2005). Není tedy žádným překvapením, že mobilní genetické elementy hrají roli v bakteriální adaptaci na xenobiotika (Top, 2003), virulenci (Hacker, 1997), přežití v podmínkách s vysokou koncentrací kovů a antibiotik (Wright, 2008), atd. Ze stejného důvodu jsou cílem mnoha studií snažících se o vyhodnocení jejich potenciálu například v bioaugmentaci (Top, 2002) nebo naopak jakožto rizikový faktor v šíření rezistence na antibiotika, například známou SCCmec kazetou (Baba, 2002).

Tyrozínové transponázy a jimi mobilizovatelné genetické elementy mají s ohledem na biologickou funkci zcela svébytné postavení. Toto postavení je následkem aktivity na jednořetězcové DNA a s tím spojenou limitací transpozicičních událostí na vybrané děje. Jedním z klasických dějů, kdy může v buňce dojít přechodně k nárůstu množství jednořetězcové DNA, jsou opravy zlomů (Narumi, 2003).

5.1 Extrémní viabilita *D. radiodurans*

Deinococcus radiodurans je bakterie známá svojí obrovskou schopností radiorezistence. Tato vlastnost je založena na rekonstrukci bakteriálního chromosomu z fragmentů pomocí rekombinačních procesů, bez toho, že by docházelo k mutacím (Daly, 1996). Genom *D. radiodurans* je charakteristický velkým množstvím inzerčních sekvencí rozmístěných po genomu (Makarova, 2001). Konkrétně se jedná o přes 50 IS ve 12 rodinách.

Bylo ukázáno, že specifickým stresem dochází k nárůstu aktivity transponáz jednotlivých IS. Jedná se vlastně o určitý typ adaptivní mutagenese. Nicméně mezi všemi jasně vyniká ISDra2 (člen IS200/IS605) s nárůstem aktivity při ozáření γ zářením až 100 \times a při ozáření UV 50 \times (Mennecier, 2006). Záhy bylo prokázáno, že při reparacích dochází přechodně k vytvoření velkého množství jednořetězcové DNA (Zahradka, 2006) a majoritní podíl na transpozičních událostech má právě ISDra2 (mutace sledovaného genu *thyA*) (Pasternak, 2010). Tento příklad ukazuje, že tyrozinové transponázy mohou být zapojeny i do jiných dějů než je všeobecně známá akumulace a šíření genů pro rezistence. Přítomnost transponázy ISDra2 v tomto případě přímo zvyšuje radiorezistenci a tím viabilitu hostitele v daném prostředí.

5.2 Strukturování bakteriálního genomu a domestikace transponáz

Transponázy odpovědné za mobilitu genetických elementů mohou nést aktivity pro buňku vysoce přínosné. Většinou je přínosem celkové zvýšení dynamiky hostitelského genomu. V takovém případě je zájmem hostitelské buňky aktivitu transponázy udržet a ideálně modifikovat, tak aby její funkce byla co největším přínosem. Tento evoluční fenomén se označuje jako domestikace transponáz a je dobře znám u eukaryotních organismů (Volff, 2006). Nejznámějším eukaryotickým příkladem domestikace transponáz je tzv. V(D)J rekombinace umožňující dech beroucí variabilitu protilátek a antigenních receptorů.

U prokaryotních organismů je tento fenomén potlačený vzhledem k již diskutovanému selekčnímu tlaku. U tyrozinových transponáz jsou známy dva unikátní příklady domestikace transponáz. Prvním z nich jsou REP sekvence a jejich mobilizující enzymy RAYTy (Chandler, 2013).

Rep sekvence jsou známé jako vysoce abundantní nekódující opakování již více než 30 let (Higgins, 1982). Jsou jednou z nejznámějších a nejcharakterizovanějších repetitivních sekvencí v bakteriích vůbec. Jejich rozšíření zahrnuje převážně gammaproteobakterie s *Escherichia coli* jako modelovým

organizmem (Gilson, 1990). Co do počtu se v hostitelských organizmech pohybují v řádu cca 600 kopií u *E. coli* K12 a více než 1600 kopií v genomu *Stenotrophomonas maltophilia*. Velmi často se organizují do vyšších strukturních celků, jako jsou BIME (z angl.: "bacterial interspersed mosaic element") a REPINs (z angl.: "REP doublet forming hairpin"). Bylo prokázáno, že tyto struktury vznikly za účasti RAYT proteinů. Jejich rozložení v genomu umožňuje mnoho fyziologických funkcí zahrnujících hlavně organizaci a strukturování genomu, ale také třeba regulaci exprese vybraných genů. Jedním ze zodpovědných procesů je RAYT katalyzovaná BIME rekombinace (Ton-Hoang, 2012). BIME se za určitých podmínek také může stát mobilizovatelný genetický element, což dále prohlubuje možnost strukturování (Bertel, 2011). Přesný mechanismus zajišťující rozmach REP sekvencí a jejich udržení v genomu hostitelského organismu v tak vysokém množství není dosud zcela objasněn. Hypotéza o možných způsobech byla publikována J. Nunvářem (Nunvar, 2013).

Druhým příkladem domestikace tyrozinových transponáz jsou tzv. IStrony (Chandler, 2013). Tyto mobilní genetické elementy sestávají ze zbytku IS605 podobného inzerčního elementu a části patřící intronům první skupiny. Jeden ze dvou kódovaných proteinů je blízký TnpA ISDra2. Inserce tohoto mobilního elementu je specifická a to na 3'-konec sekvence TTGAT totožně s ISDra2. Tento pentanukleotid je komplementární k vedoucí sekvenci intronu a je pravděpodobně nutný k jeho vyštěpení. Přítomnost těchto sekvencí umožňuje naprosto unikátní sloučení funkcí. Transponáza dává tomuto genetickému elementu schopnost pohybovat se v bakteriálním genomu a intronová část umožní vyštěpení celé sekvence na úrovni RNA. Nedochozí tedy k narušení funkce genu, do kterého byl IStron integrován. Tento rys je nejsilnějším argumentem ukazujícím na domestikaci tohoto typu mobilních genetických elementů a s nimi spjatých transponáz (Braun, 2000).

6 Závěr

O bakteriích je známo, že ve svých genomech netolerují velké množství nekódující DNA. I přes toto omezení si zvláště oblast repetitivních sekvencí DNA zaslouží naši pozornost. Mezi ně patřící bakteriální mobilní elementy jsou zcela svébytnou oblastí bakteriální genetiky. Transponázy, integrázy a místně specifické rekombinázy jsou enzymy zodpovědné za mobilitu mobilních genetických elementů. Všechny tyto enzymy využívají jako nukleofil, atakující fosfor, tyrozinový hydroxyl. Jejich struktura a reakční mechanismus těchto enzymů se výrazně liší. Tyrozinové transponázy jsou charakteristické přítomností HUH motivu. Přítomnost jednoho nebo dvou katalytických tyrozinů a dalších charakteristických domén umožňuje tyrozinové transponázy dále dělit na transponázy Y1 typu katalyzující transpoziční reakci na jednořetězcové DNA, REP asociované transponázy (tzv. RAYT proteiny) nebo transponázy Y2 typu transponující mechanismem valivé kružnice. Každý z těchto typů má charakteristický transpoziční rys. Y1 transponázy jsou aktivní pouze na ssDNA z které se vyštěpují a specificky integrují do specifické cílové sekvence. Tyrozinové transponázy Y2 jsou charakteristické pouze jedním štěpením ssDNA v jednom reakčním kroku. O reakčním mechanismu RAYT proteinů toho není zatím mnoho známo. Bylo nalezeno a charakterizováno štěpné místo, které ukazuje na příbuznost s transponázami IS200/IS605 rodiny. Nicméně se nepodařilo prokázat vazbu inverzního REP elementu a případnou výměnu řetězců. Druhá část katalytického cyklu tedy zůstává neobjasněna.

Tyrozinové transponázy jsou zodpovědné za mobilitu různých elementů. Nejčastěji se však jedná o inzerční sekvence. Dosud nejvíce prostudovaný zástupce Y1 tyrozinových transponáz je z mikroorganismu *Helicobacter pylori* asociovaný s inzerční sekvencí IS608 patřící do rodiny IS200/IS605. Nejprozkoumanější Y2 tyrozinovou transponáza je z mikroorganismu *Escherichia coli* asociována s elementem IS1294.

Biologická funkce tyrozinových transponáz je částečně analogická ostatním transponázám a lze hovořit o odpovědnosti za horizontální přenos vybraných genů. Zvláště se jedná o geny umožňující rezistence nebo utilizace pestré škály látek vedoucí ke zvýšení viability hostitele v daném prostředí. Kromě těchto rysů společných například s DDE transponázami je u tyrozinových transponáz popsáno několik unikátních vlastností. Jedna z nich byla pozorována jako obrovský nárůst transpozičních událostí u bakterie *D. radiodurans* asociované s tyrozinovou transponázou elementu ISDra2. Zmíněná transponáza má pravděpodobně vliv na rekonstituci chromosomu a podílí se tak na vysoké radiorezistenci tohoto mikroorganismu.

Samostatnou kapitolu tvoří využití tyrozinových transponáz hostitelským organizmem. Ačkoli bylo u eukaryotních transponáz popsáno již mnoho případů ukazujících na domestikaci či získání nové funkce

(neofunkcionalizaci) je tento jev u prokaryot vzácný a dosud se spekuluje pouze o dvou případech. V obou dvou případech se jedná o tyrozinové transponázy. Prvním a dosud nejvýznamnějším příkladem jsou RAYT proteiny a s nimi asociované REP sekvence. Argumenty o domestikaci těchto transponáz jsou velmi silné a to i přes dosavadní neznalost jejich reakčního mechanismu. Druhým příkladem jsou transponázy asociované s elementy označovanými jako IStrony. Oba dva příklady poukazují na možnost, že tyrozinové transponázy nám mohou do budoucna poskytnout mnoho dalších fascinujících objevů v oblasti bakteriální genetiky. Jako enzymy katalyzující transesterifikační reakce za vzniku charakteristického kovalentního fosfotyrozinového intermediátu se mohou také stát významným nástrojem genového inženýrství.

7 Seznam použité literatury

- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, M., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., and Hiramatsu, K. (2002). "Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA." Lancet **359**, 1819-1827.
- Barabas, O. *Mechanism of Single-Stranded DNA Transposition: A Structural Perspective*. eLS. New York: John Wiley & Sons, 2012.
- Barabas, O., Ronning, D.R., Guynet, C., Hickman, A.B., Ton-Hoang B., Chandler M., and Dyda F. (2008). "Mechanism of IS200/IS605 Family DNA Transposases: Activation and Transposon-Directed Target Site Selection." Cell **132**(2): 208-220.
- Bernales, I., Mendiola, M., and de la Cruz, F. (1999). „Intramolecular transposition of insertion sequence IS91 results in second-site simple insertions.“ Mol. Microbiol. **33**: 223-234.
- Bertel, F., and Rainey, B.P. (2011). „Within-Genome Evolution of REPINs: a New Family of Miniature Mobile DNA in Bacteria.“ PLOS Genet. **7**(6): 1-13.
- Bikard, D., Loot, C., Baharoglu, Z., and Mazel, D. (2011). „Folded DNA in action: hairpin formation and biological functions in prokaryotes.“ Microbiol. Mol. Biol. Rev. **74**: 570-588.
- Boccard, F., Smokvina, T., Pernodet, J.L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1989). „Structural analysis of loci involved in pSAM2 site-specific integration in Streptomyces.“ Plasmid **21**: 59-70.
- Braun, V., Mehlig, M., Moos, M., Rupnik, M., Kalt, B., Mahony, D.E., and von Eichel-Streiber, C. (2000). „A chimeric ribozyme in Clostridium difficile combines features of group I introns and insertion elements.“ Mol. Microbiol. **36**: 1447–1459.
- Buchrieser, C., Brosch, R., Bach, S., Guiyoule, A., and Carniel, E. (1998). „ The highpathogenicity island of Yersinia pseudotuberculosis can be inserted into any of the three chromosomal asn tRNA genes.“ Mol. Microbiol. **30**: 965–978.
- Craig, N.L., Gellert, M., Craigie, R., Lambowitz, A.M. *Mobile DNA II*. Washington, DC.: ASM press, 2002.
- Curcio, M. J., and Derbyshire, K. M. (2003). „The outs and ins of transposition: from Mu to Kangaroo.“ Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **4**(11): 865-877.
- Daly, M.J., and Minton, K.W. (1996). „An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes recA-dependent recombination in the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans.“ J. Bacteriol. **178**: 4461–4471.
- Datta, S., Larkin, C., and Schildbach, J.F. (2003). „Structural Insights into Single-Stranded DNA Binding and Cleavage by F Factor Tral.“ Structure **11**: 1369–1379.
- Díaz-Aroca, E., de la Cruz, F., Zabala, J.C., and Ortiz, J.M. (1984). „Characterization of the new insertion sequence IS91 from an alpha-hemolysin plasmid of Escherichia coli.“ Mol. Gen. Genet. **193**: 493-499.

- Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M.R., and Cloeckart, A. (2005). „The Salmonella genomic island 1 is an integrative mobilizable element.“ Mol. Microbiol. 55: 1911–1924.
- Dyda, F., Chandler, M., and Hickman, A.B. (2012). „The emerging diversity of transposome architectures.“ Quart. Rev. Biophys. 45(4): 493-521.
- Franke, A.E., and Clewell, D.B. (1981). „ Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in Streptococcus faecalis that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid.“ J. Bacteriol. 145: 494–502.
- Frost, S.L., Lepiae, R., Summers, A.O., and Toussaint, A. (2005). „Mobile genetic elements: the agents of open source evolution.“ Nat. Rev. Microbiol. 3: 722-732.
- Frye, S.A., Nilsen, M., Tønjum, T., and Ambur, O.H. (2013). „Dialects of the DNA Uptake Sequence in Neisseriaceae.“ PLOS Genet. 9(4): 1-13.
- Garcillán-Barcia, M.P., Bernales, I., Mendiola, V.M., and de la Cruz, F. (2001). „Single-stranded DNA intermediates in IS91 rolling-circle transposition.“ Mol. Microbiol. 39(2): 494-501.
- Gilson, E., Bachellier, S., Perrin, S., Perrin, D., Grimont, P.A., Grimont, F., and Hofnung, M. (1990). „Palindromic unit highly repetitive DNA sequences exhibit species specificity within Enterobacteriaceae.“ Res. Microbiol. 141(9): 1103–1116.
- Grindley, N.D.F., Whiteson, K.L., and Rice, P.A. (2006). „Mechanisms of Site-Specific Recombination.“ Annu. Rev. Biochem. 75: 567-605.
- Guynet, C., Achard, A., Hoang, B.T., Barabas, O., Hickman, A.B., Dyda, F., and Chandler, M. (2009). „Resetting the Site: Redirecting Integration of an Insertion Sequence in a Predictable Way.“ Mol. Cell 34(5): 612-619.
- Guynet, C., Hickman, A.B., Barbaras, O., Dyda, F., Chandler, M., and Ton-Hoang, B. (2008). „In Vitro Reconstitution of a Single-Stranded Transposition Mechanism of IS608.“ Cell 29(3): 302–312.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., and Tschape, H. (1997). „Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution.“ Mol. Microbiol. 23(6): 1089-1097.
- Halpern, D., Chiapello, H., Schbath, S., Robin, S., Hennequet-Antier, C., Alexandra Gruss, A., and El Karoui, M. (2007). „Identification of DNA Motifs Implicated in Maintenance of Bacterial Core Genomes by Predictive Modeling, Meriem El Karoui.“ PLOS Genet. 3(9): 1614-1621.
- He, S., Guynet, C., Siguier, P., Hickman, A.B., Dyda, F., Chandler, M., Ton-Hoang, B. (2013). „IS200/IS605 family single-strand transposition: mechanism of IS608 strand transfer.“ Nucl. Ac. Res. 41(5): 3302-3313.
- He, S., Hickman A.B., Dyda, F., Chandler, M., and Ton-Hoang, T. (2011). „Reconstitution of a functional IS608 single-strand transpososome: role of non-canonical base pairing.“ Nucl. Ac. Res. 39(19): 8503-8512.

- Hickman, A.B., James, J.A., Barabas, O., Pasternak, C., Ton-Hoang, B., Chandler, M., Sommer, S., and Dyda, F. (2010). „DNA recognition and the precleavage state during single-stranded DNA transposition in *D. radiodurans*.“ EMBO J. **29**: 3840-3852.
- Higgins, C.F., Ames, G.F., Barnes, W.M., Clement, J.M., and Hofnung, M. (1982). „A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons.“ Nature **298**: 760–762.
- Chandler, M., de la Cruz, F., Dyda, F., Hickman, B.A., Moncalian, G., and Ton-Hoang, B. (2013). „Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily.“ Nat. Rev. Microbiol. **11**: 525–538.
- Chandler, M.B., Courvalin P.C., Guédon, G.D., Mullany, P.A., Pembroke, T.E., Rood, J.I.F., Smith C.J.G., Summers, A.O.H., Tsuda, M.I., and Berg, D.E. (2008) „Revised nomenclature for transposable genetic elements.“ Plasmid **60**: 167-173.
- Chen, J.M., Stenson, P.D., Cooper, D.N., and Ferec, C. (2005). „A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease.“ Human genet. **117**(5): 411–427.
- Christie, G.E., and Calendar, R. (1990). „Interactions between satellite bacteriophage P4 and its helpers.“ Annu. Rev. Genet. **24**: 465–490.
- Jansen, R., Embden, J.D.A., Gastra, W., and Schouls, L.M. (2002). „Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.“ Mol. Microbiol. **43**(6): 1565–1575.
- Kapitonov, and V.V. Jurka, J. (2001). „Rolling-circle transposons in eukaryotes.“ Proc. Nat. Acad. Sci. USA **98**: 8714-8719.
- Kapitonov, V.V., and Jurka, J. (2007). „Helitrons in fruit flies.“ Rebase Reports **7**: 127-132.
- Kawai, K., Suzuki, A., Kuramitsu, S., Masui, R., and Yamane, T. „Bude publikováno.“
- Kersulyte, D., Velepato, B., and Dailide, G. (2002). „Transposable element ISHp608 of *Helicobacter pylori*: nonrandom geographic distribution, functional organisation, and insertion specificity.“ J. Bacteriol. **184**(4): 992-1002.
- Khan, S.A. (1997). „Rolling-Circle Replication of Bacterial Plasmids.“ Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**(4): 442–455.
- Lam, S., and Roth, J.R. (1983). „IS200: A salmonella-specific insertion sequence.“ Cell **34**(3): 951–960.
- 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 .
- Mackinnon, G.M., Drebot, A.M., and Tyrrell, J.G. (1997). „Identification and Characterization of IS1476, an Insertion Sequence-Like Element That Disrupts VanY Function in a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Strain.“ Antimicrob. Agent. Chemother. **41**(8): 1805–1807.

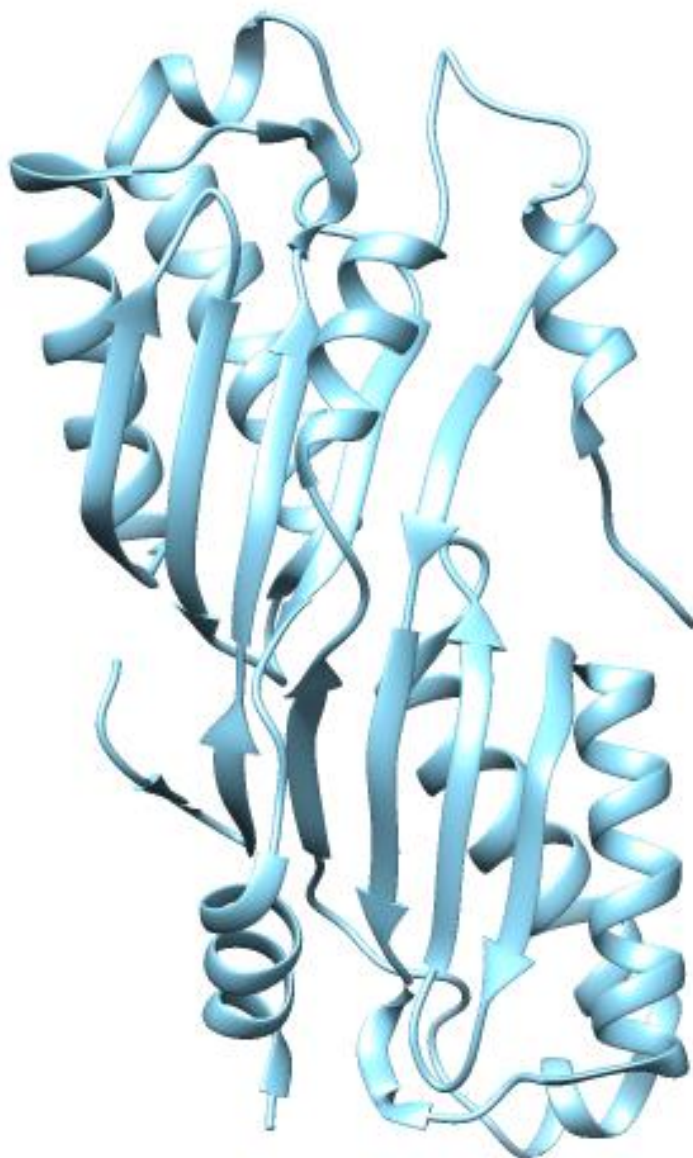
- Mahillon, J., and Chandler, M. (1998). „Insertion Sequences.“ Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**(3): 725–774.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y., Tatusov, R.L., Minton, K.W., Koonin, E.V., and Daly M.J. (2001). „Genome of the Extremely Radiation-Resistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* Viewed from the Perspective of Comparative Genomics.“ Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**: 44–79.
- Mendiola, M.V., Bernales, I., and de la Cruz, F. (1994). „Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition.“ Proc. Nac. Acad. Sci. USA **91**: 1922-1926.
- Menecier, S., Servant, P., Coste, G., Bailone, A., Sommer, S. (2006). „Mutagenesis via IS transposition in *Deinococcus radiodurans*.“ Mol. Microbiol. **59**(1): 317-325.
- Messing, A.J., Ton-Hoang, B., Hickman, B.A., McCubbin, J.A., Peaslee, G.F., Ghirlando, R., Chandler, M., and Dyda, F. (2012). „The processing of repetitive extragenic palindromes: the structure of a repetitive extragenic palindrome bound to its associated nuclease.“ Nucl. Ac. Res. **40**(19): 9964-9975.
- Murphy, E. (1983). „Inhibition of Tn554 transposition: deletion analysis.“ Plasmid **10**: 260–269.
- Narumi, I. (2003). „Unlocking radiation resistance mechanisms: still a long way to go.“ Trends Microbiol. **11**: 422–425.
- Noirot-Gros, M. F., Bidnenko, V., and Erlich, S.D. (1994). „Active site of the replication protein of the rolling circle plasmid pC194.“ EMBO J. **13**: 4412-4420.
- Nunvar, J., Huckova, T., and Licha, I. (2010). „Identification and characterization of repetitive extragenic palindromes (REP)-associated tyrosine transposases: implications for REP evolution and dynamics in bacterial genomes.“ BMC Gen. **11**(44): 1-13.
- Pasternak, C., Dulermo, R., Ton-Hoang, B., Debuchy, R., Siguier, P., Coste, G., Chandler, M., and Somme, S. (2013). „ISDra2 transposition in *Deinococcus radiodurans* is downregulated by TnpB.“ Mol. Microbiol. **88**(2): 443-455.
- Pasternak, C., Ton-Hoang, B., Coste, G., Bailone, A., Chandler, M., and Sommer, S. (2010). „Irradiation-Induced *Deinococcus radiodurans* Genome Fragmentation Triggers Transposition of a Single Resident Insertion Sequence.“ PLOS Genet. **6**(1): 1-10.
- Poulter, R., Goodwin, T.J.D., and Butler M.I. (2003). „Vertebrate helitrons and other novel Helitrons.“ Gene **313**: 201-2012.
- Rice, L.B. (1998). „Tn916 Family Conjugative Transposons and Dissemination of Antimicrobial Resistance Determinants.“ Antimicrob. Agents Chemother. **42**(8): 1871–1877.
- Ronning, D. R., and Guynet, C. (2005). „Active site sharing and subterminal hairpin recognition in a new class of DNA transposases.“ Mol. Cell **20**(1): 143-154.
- Rosario, G., and Latorre, A. (2012). „Factors Behind Junk DNA in Bacteria.“ Genes **3**: 634-650.

- Sáenza, Y., Vinuéa, L., Ruiza, E., Somaloa, S., Martíneza, S., Rojo-Bezaresa, B., Zarazagaa, M., and Torresa, C. „Class 1 integrons lacking qacEΔ1 and sul1 genes in Escherichia coli isolates of food, animal and human origins.“ Veter. Microbiol. **144**(3): 493-497.
- Shapiro, J.A. (1979). „Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements.“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**(4): 1933-1937.
- Siguier, P. (2006). „ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences.“ Nucl. Ac. Res. **34**: D32-D36.
- Siguier, P., File, J., and Chandler, M. (2006). „Insertion sequences in prokaryotic genomes.“ Curr. Opp. Microbiol. **9**: 526–531.
- Smith, C.J., and Parker, A.C. (1993). „Identification of a circular intermediate in the transfer and transposition of Tn4555, a mobilizable transposon from Bacteroides spp.“ J. Bacteriol. **175**: 2682–2691.
- Tavakoli, N., Comanducci, A., Dodd, H.M., Lett, M., Albiger, B., and Bennett, P. (2000) „IS1294, a DNA Element That Transposes by RC Transposition.“ Plasmid **44**: 66-84.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., and Walsh, R.T. (2006). „ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century?“ Microbio. Mol. Biol. Rev. **70**(2): 296-316.
- Toleman, M.A., and Walsh T.R. (2008). „Evolution of the ISCR3 Group of ISCR Elements.“ J. Antimicrob. Chemother. **52**(10): 3789-3791.
- Ton-Hoang, B., Siguier, P., Quentin, Y., Onillon, S., Marty, B., Fichant, G., and Chandler, M. (2012). „Structuring the bacterial genome: Y1-transposases associated with REP-BIME sequences.“ Nucl. Ac. Res. **40**(8): 3596-3610.
- Ton-Hoang, B., Pasternak, C., Siguier, P., Guynet, C., Hickman, A.B., Dyda, F., Sommer, S., and Chandler, M. (2010). „Single-Stranded DNA Transposition Is Coupled to Host Replication.“ Cell **142**(3): 398-408.
- Top, E.M., and Springael, D. (2003). „The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds.“ Curr. Opp. Biotechnol. **14**(3): 262-269.
- Top, E.M., Springael, D., and Boon, N. „Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters.“ FEMS Microbiol. Ecol. **42**(2): 199-208.
- Treangen, T.J., Abraham, A., Touchon, M., and Rocha, E.P.C. (2009). „Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes.“ FEMS Microbiol. Rev. **33**(3): 539-571.
- Volff, J.N. (2006). „Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes.“ Bio Essays **28**(9): 913-922.
- Wojciak, J.M., Connolly, K.M., and Clubb, T.R. (1999) „NMR structure of the Tn916 integrase–DNA complex.“ Nature Struc. Bio. **6**(4): 366-373.

- Wright, M.S. , Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, W.H., and McArthur, J.V. (2008). „Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities.“ ISME J. **2**: 417-428.
- Zahradka, K., Slade, D., Bailone, A., Sommer, S., Averbeck, D., and Petranovic, M. (2006). „Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*.“ Nature **443**(7111): 569–573.

Přílohy

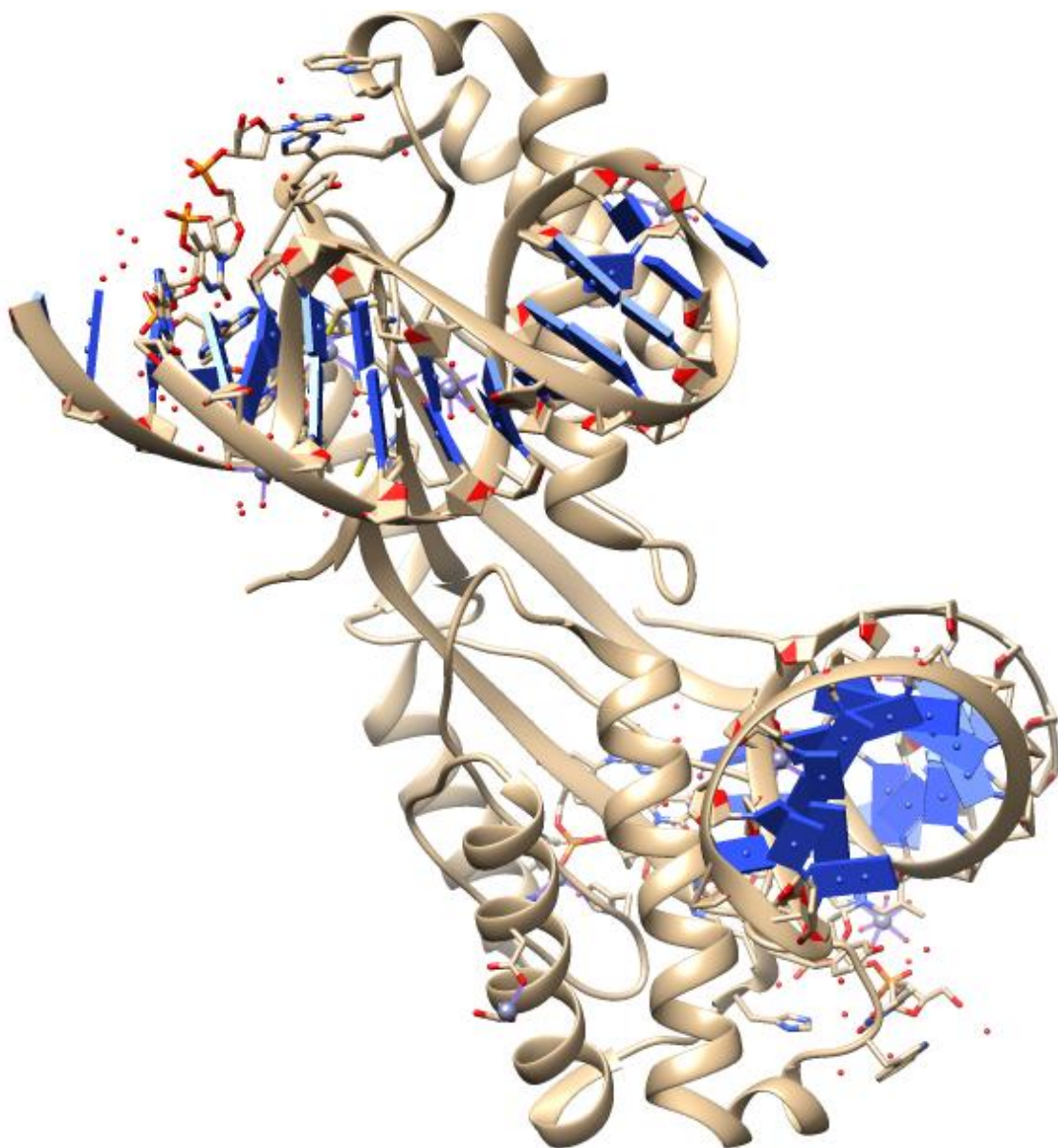
1 Struktura transponázy z elementu IS608 (*H. pylori*)



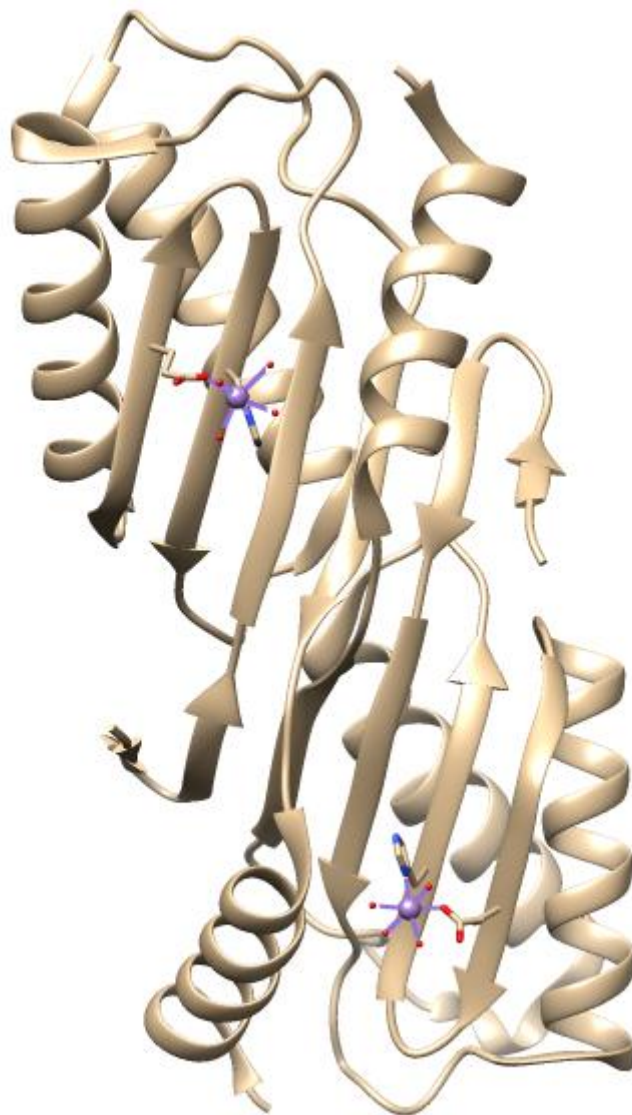
Pozn.: Všechny v přílohách zobrazené struktury byly získány pomocí programu Chimera 1.8rc v základním nastavení.

2 Struktura transponázy z elementu ISDra2 (*D.radiodurans*)

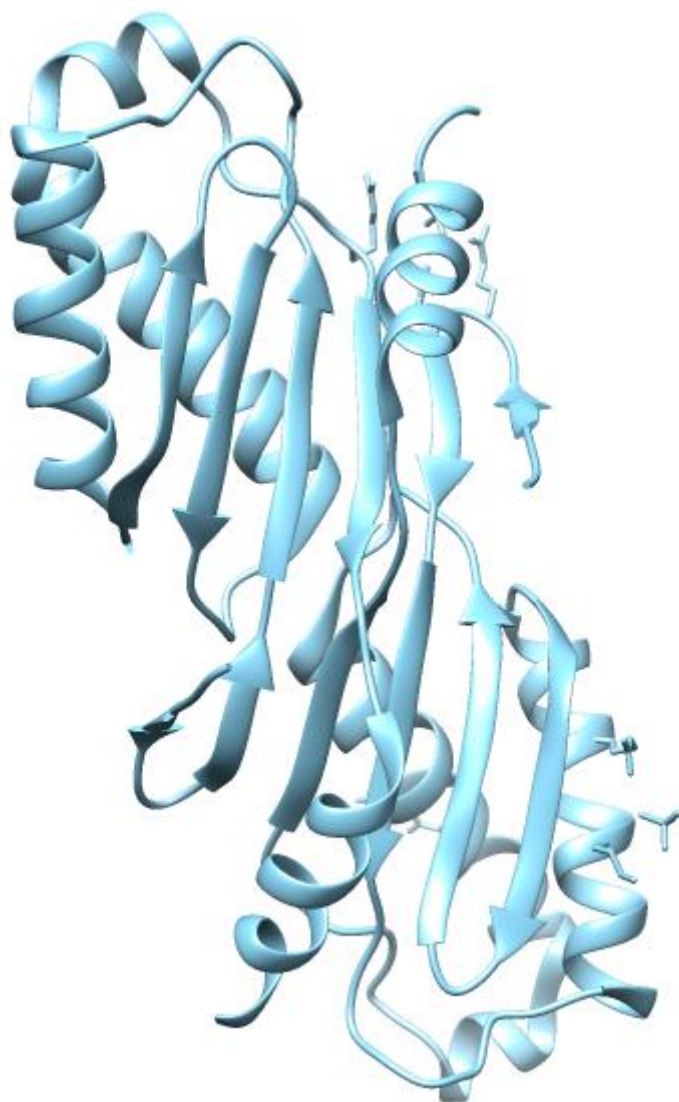
- Struktura je zobrazena včetně vázané DNA.



3 Struktura transponázy z elementu IS1476 (*S. solfataricus*)

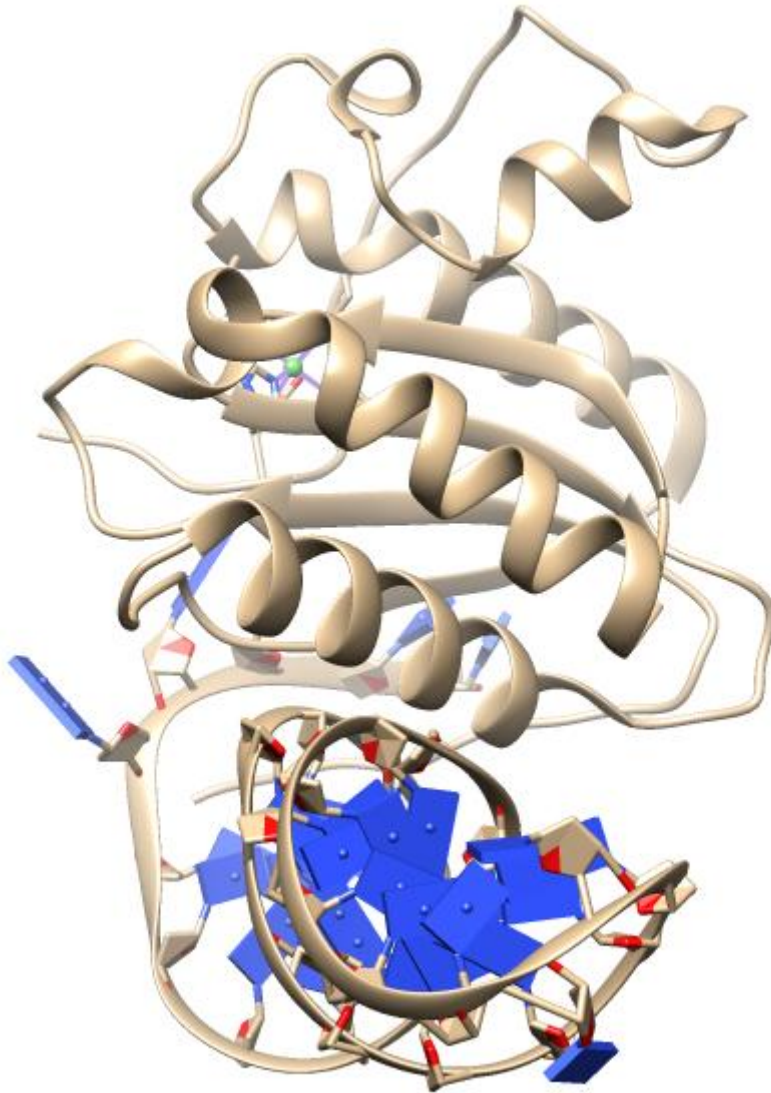


4 Struktura transponázy z elementu ISSto1 (*S. tokodaii*)



5 Struktura REP asociované transponázy (*E. coli*)

- Struktura je zobrazena včetně vázané DNA.



6 Struktura tyrozinové rekombinázy z elementu Tn916 (*E. faecalis*)

- Je zobrazena pouze struktura jedné podjednotky včetně vázané DNA.

