

Het thema van mijn proefschrift is het transpositiemechanisme van bacteriofaag Mu en meer in het bijzonder haar regulatie. Deze regulatie door bij transpositie betrokken eiwitten kent twee aspecten. Ten eerste op het niveau van transcriptie/translatie van deze eiwitten en ten tweede op het mechanistisch niveau waarbij door interactie tussen de bij transpositie betrokken eiwitten de afzonderlijke functies van deze eiwitten beïnvloed worden. In het onderzoek op het gebied van transpositieregulatie stond men tot nu toe hoofdzakelijk stil bij het eerste aspect, terwijl in dit proefschrift juist het mechanistische aspect centraal staat.

Het vroege promotergebied van bacteriofaag Mu heeft twee divergente promoters; *Pe* welke *ner* met de transposases *A* en *B* afschrijft en *Pc* welke de repressor *c* afschrijft. Binding van *Ner* aan een specifieke plaats in het promotergebied verlaagt de expressie van *Pc*, terwijl binding van *c* in het promotergebied juist de expressie van *Pe* verlaagt. De uitkomst van de competitie tussen *Ner* en *c* is dus van invloed op de ontwikkeling van de Mu profaag. Opvallend genoeg heeft het vroege promotergebied van Mu naast zijn rol in transcriptieregulatie ook een rol in het transpositiemechanisme zelf. De repressorbindingsplaatsen O1 en O2 kunnen naast *c* ook het transposase binden en fungeren dan als een transpositie enhancer. Mijn onderzoek laat zien dat deze "Internal Activating Sequence" (IAS) niet alleen in staat is de efficiëntie van de transpositie-reactie te verhogen, maar tevens -onder bepaalde condities - om deze te verlagen.

Het transpositiemechanisme is erop gericht beide faaguiteinden (*attL* en *attR*) via het transposase op een geordende wijze bij elkaar te brengen. De vorming van dit "Cleaved Donor Complex" (CDC) wordt geacht door de IAS gestimuleerd te worden. In de hoofdstukken 3 en 4 wordt de rol van de diverse transposasebindingsplaatsen in *attL* en *attR* onderzocht in relatie tot de stimulerende werking van de IAS. Hiertoe heb ik systematisch de diverse bindingsplaatsen uit beide faaguiteinden gedeleteerd en gekeken of de IAS de transpositie-reactie van deze deletiemutanten nog kan stimuleren. Wanneer L3 of R3 ontbreken, stimuleert de IAS de transpositie-reactie nog volledig. Deze bindingsplaatsen zijn blijkbaar niet betrokken bij de stimulerende activiteit van de IAS. Deletie van L2 of R2 heeft echter wel een duidelijk effect. In beide gevallen is de IAS niet meer in staat de efficiëntie van de transpositie-reactie te verhogen. In het geval dat R2 gedeleteerd wordt, remt de IAS zelfs de reactie. De transpositiefrequentie komt nu zelfs onder het niveau van een construct zonder IAS te liggen. In de afwezigheid van de IAS hebben deze deleties echter geen effect, zodat de functie van L2 en R2 blijkbaar beperkt is, in relatie tot de stimulerende werking van de IAS. Plaatsgerichte mutagenese van L2, waarbij deze vervangen wordt door de overeenkomstige bindingsplaats uit de met Mu verwante faag D108, leidt eveneens tot het verliezen van de enhanceractiviteit van de IAS. Waarschijnlijk hebben beide fagen enhancers welke op een specifieke manier gekoppeld zijn met

de bindingsplaatsen voor hun eigen transposase in hun respectievelijke uiteinden.

Een verdere reductie in de transpositiefrequentie treedt op wanneer L1 of R1 gedeleteerd worden. Daar dit ook het geval is in de afwezigheid van de IAS, moet dit los gezien worden van de stimulerende activiteit van de IAS en aan het mechanisme van transpositie toe geschreven worden. Ik suggereer in dit hoofdstuk dat L2 en R2 betrokken zijn bij de vorming van een "three-site complex" tussen *attL*, *attR* en de IAS. Dit complex zou dan een intermediair zijn tijdens de vorming van het CDC waarbij de IAS *attL* en *attR* op de juiste wijze bijeen brengt. Daar bovendien deletie van R2 in de aanwezigheid van de IAS een extreme reductie van de transpositie tot gevolg heeft, verloopt de vorming van dit "three-site-complex" mogelijk geordend. In eerste instantie vormen *attL* en de IAS een binair complex waarna vervolgens *attR* de IAS uit dit binaire complex verdringt en samen met *attL* het CDC vormt.

Hoofdstuk 4 laat zien dat de rol welke aan de diverse transposasebindingsplaatsen kan worden toegeschreven, afhangt van het soort DNA molecule dat als target voor mini-Mu transpositie wordt gebruikt. Wanneer *F'pro-lac* de target is, blijkt deletie van de transposase bindingsplaatsen L2 en R2 in afwezigheid van de IAS een verlaging van de transpositiefrequentie te geven, terwijl wanneer een *pOX38* afgeleide de target is, dit alleen in aanwezigheid van de IAS het geval is. Op grond van deze resultaten

geef ik aan dat het verschil tussen beide targetmoleculen gezocht kan worden in het voorkomen van Mu-gerelateerde transposons op *F'pro-lac*. Deze kunnen mogelijk als hotspot voor Mu integratie of als een *in trans* werkende Mu transpositieenhancer werken.

Hoofdstuk 2 onderzoekt of het *Escherichia coli* eiwit Fis (Factor of inversion stimulation), naast zijn reeds bekende rol bij de inversie van het bacteriofaag Mu G-gebied, betrokken zou kunnen zijn bij de regulatie van Mu transpositie. Dit is ingegeven door het voorkomen van een sterke Fis bindingsplaats in het linker uiteinde van Mu, vlak naast de voor de werking van de IAS zo belangrijke transposasebindingsplaats L2. Ik toon aan dat Fis, samen met de Mu repressor (*c*), zelfs na inductie van transpositie nog instaat is te competieren met het transposase. Voor deze remming moet echter wel de IAS aanwezig zijn: zonder de IAS kunnen Fis en *c* de transpositie niet remmen. De repressor bindingsplaatsen O1 en O2 in de IAS binden naast repressor ook transposase *A*. Deze binding is noodzakelijk voor de stimulerende werking van de IAS tijdens transpositie, wat zou suggereren dat inactivatie van de IAS, door Fis gestimuleerde binding van repressor, een mogelijk mechanisme van inhibitie is. Dit blijkt niet het geval. Ook transpositie van een construct met een voor transpositie inactieve IAS, waarbij O1 en O2 intact blijven, wordt door Fis en *c* geremd. Een remmend complex tussen de IAS en *attL*, gemedieerd via de repressorbindingsplaatsen van de IAS en de Fis bindingsplaats in *attL*, lijkt een

interessant alternatief, maar deze rol van de Fis bindingsplaats kon niet worden aangetoond. Een construct waar deze bindingsplaats gemuteerd is zodat Fis *in vitro* niet meer kan binden, vertoont nog steeds transpositie inhibitie via coöperatie tussen Fis en c. Daar de werking van Fis blijkbaar onafhankelijk van zijn bindingsplaats is, lijkt de vorming van een remmend complex onwaarschijnlijk. Ik kan echter niet uitsluiten dat *in vivo* bij lage Fis concentraties de coöperatie nog wel via de Fis bindingsplaats verloopt.

In hoofdstuk 5 staat het eiwit Fis zelf centraal. In dit hoofdstuk heb ik gekeken bij welke bacteriesoorten dit eiwit of een homoloog van dit eiwit voorkomt. Na analyse op zowel DNA- als eiwitniveau kan ik alleen bij de leden van de Enterobacter groep een Fis-achtig eiwit aantonen. Dit voorkomen correleert opvallend genoeg met het gastheerbereik van bacteriofaag Mu wat de rol welke Fis in bacteriofaag Mu ontwikkeling speelt onderstreept.

Hoofdstuk 6 tenslotte probeert beide hoofdthemas van mijn proefschrift, de

stimulerende en remmende werking van de IAS te verenigen. Vanuit een evolutionair gezichtspunt kunnen de huidige interacties tussen *attL* en de IAS gezien worden als een rudimentaire interactie tussen beide sequenties toen zij mogelijk zelf de uiteinden van een primitief transposon vormden. Dit idee wordt mede ingegeven door de structuur van het linker uiteinde, dat grote overeenkomsten heeft met heden ten dage voorkomende IS elementen. Het oer-transposase zou zich tot repressor gespecialiseerd hebben, terwijl het de oorspronkelijke interactie plaatsen behouden heeft. Een tweede copie van het oer-transposase is verder ontwikkeld tot het transposase zoals we dat nu kennen, waarbij de affiniteit van A voor de repressorbindingsplaatsen in de IAS mogelijk zijn afkomst verraadt. Mocht dit idee juist zijn dan kan zowel de stimulerende werking van de IAS via A, als de remmende werking via c gezien worden als exponenten van een universeel mechanisme, dat zijn wortels vindt in de vroege evolutie van faag Mu.

Abbreviations

A	Adenosine
am	Amber mutation
attL	Left attachment site
attR	Right attachment site
bio	Biotin
bla	β -lactamase
C	Cytidine
cat	Chloramphenicoltransferase
CDC	Cleaved donor complex
DTT	Dithiothreitol
EDTA	(Ethylene-dinitrilo)tetraacetic acid
Fis	Factor of inversion stimulation
HEPES	(Hydroxyethylpiperazine)ethanesulphonic acid
G	Guanosine
IAS	Internal activating sequence
IHF	Integration host factor
lac	Lactose
Mu	Mutator
N	The bases G, A, T or C
PBS	Phosphate buffered saline
pro	Proline
R	The bases A or G
T	Thymidine
Y	The bases C or T
SDS	Sodium dodecylsulphate
STC	Strand transfer complex
sup	Suppressor
thi	Thiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
trp	Tryptophan