

**dr Marta Sochacka-Piętal**

**Elementy transpozycyjne  
jako  
jeden z najbardziej rekombinogennych  
czynników genomów bakteryjnych**

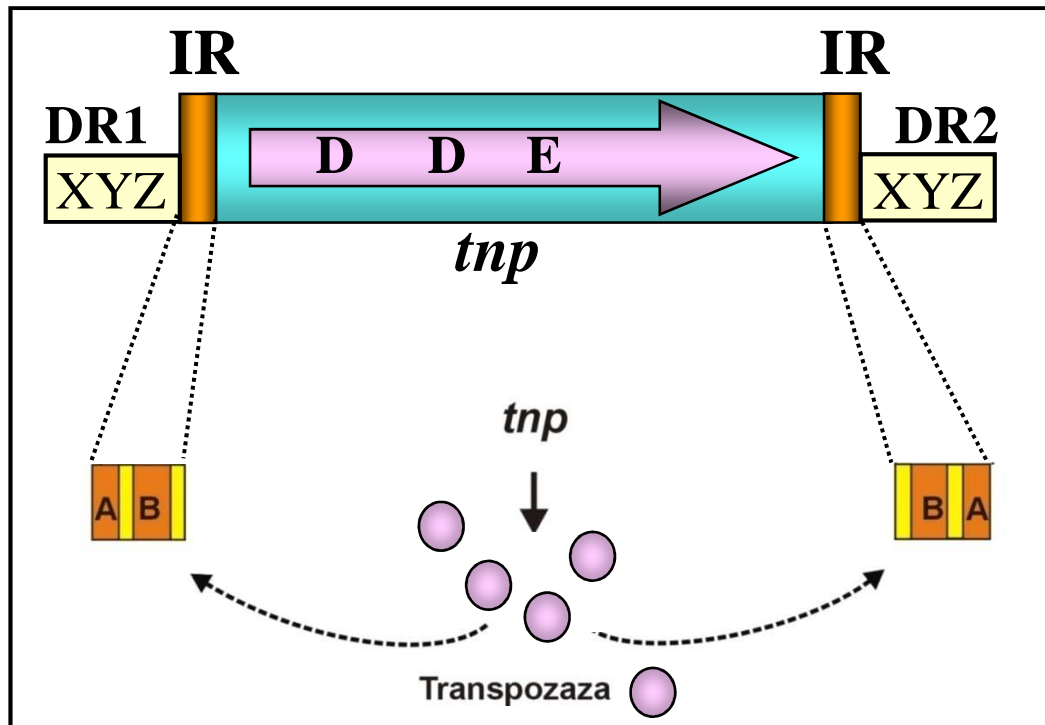
Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów  
Wydziału Rolnictwa i Biologii  
Szkoly Głównej Gospodarstwa Wiejskiego

## Elementy transpozycyjne (TE)

- sekwencje insercyjne (IS)
- transpozony (Tn)
  - transpozony złożone
  - transpozony niezłożone

**Elementy transpozycyjne mają zdolność przemieszczania się w różne miejsca w genomie, w wyniku procesu zwanego transpozycją**

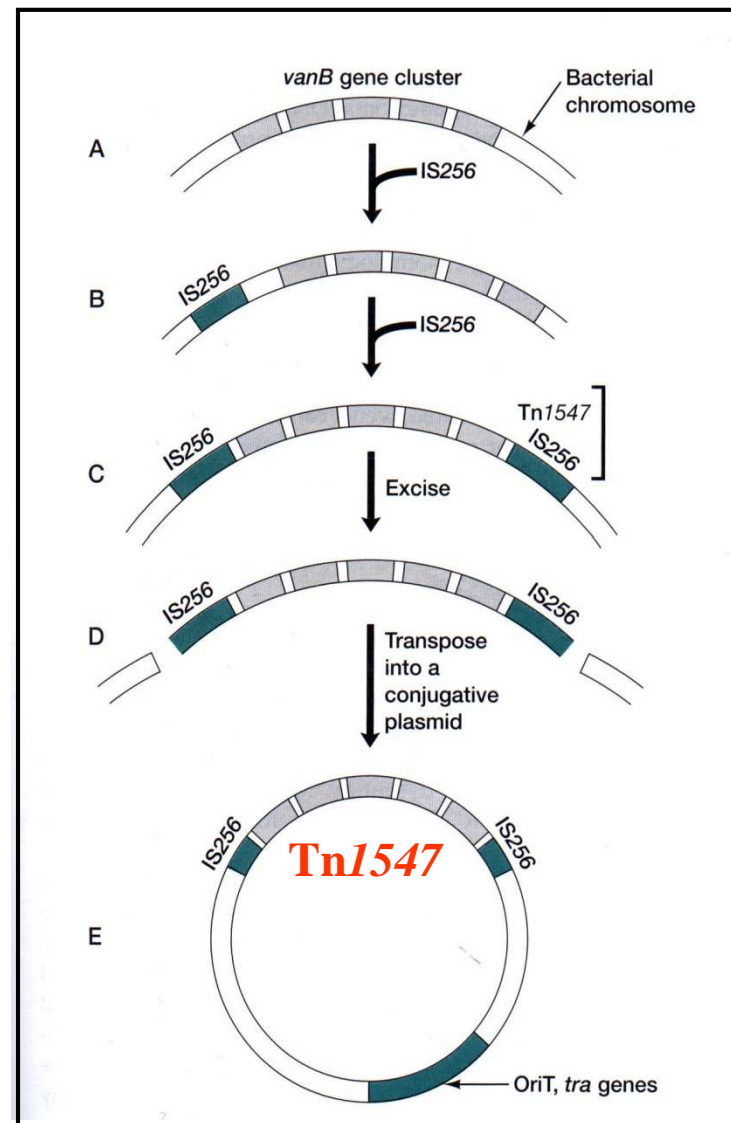
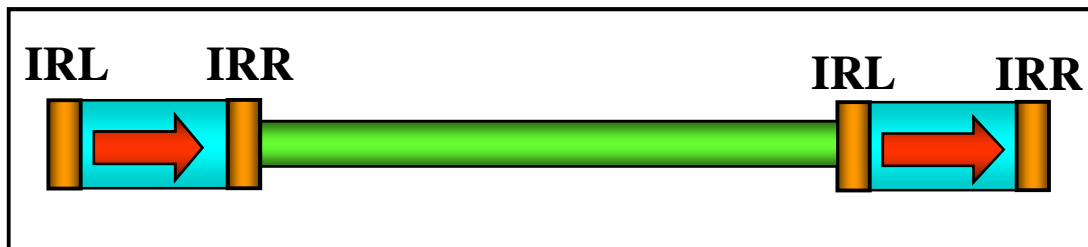
# Sekwencje insercyjne



Zidentyfikowano **ponad 2500** sekwencji insercyjnych w ok. **200 gatunkach bakterii i archeonów**.

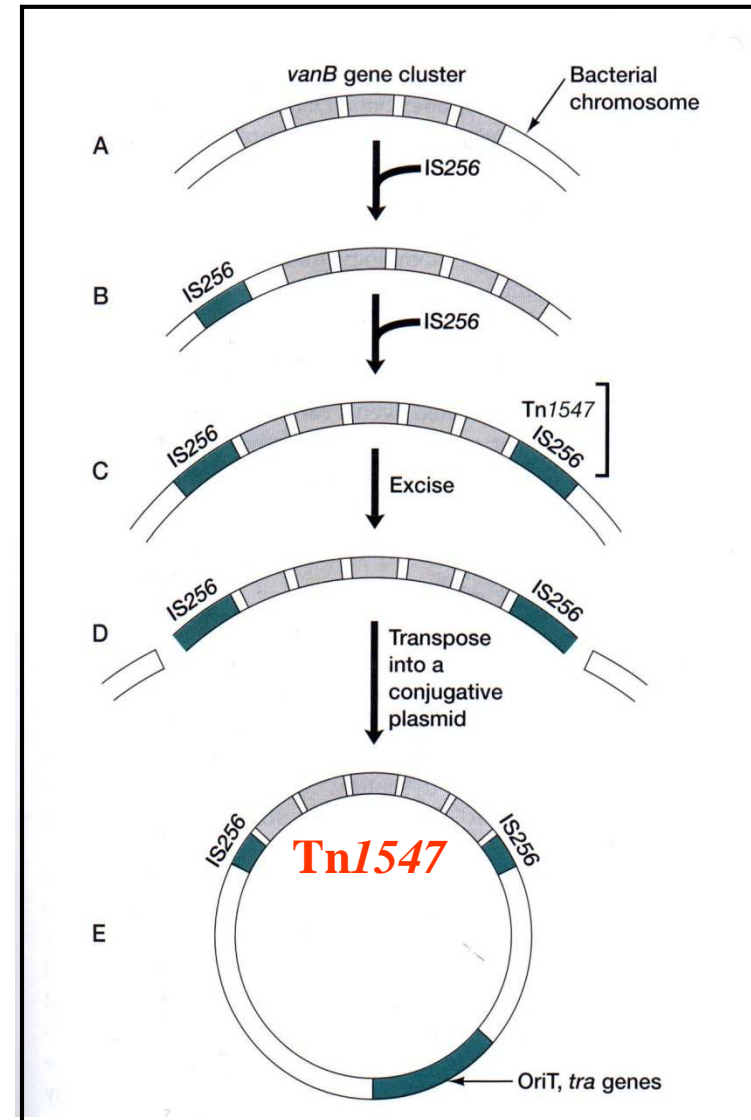
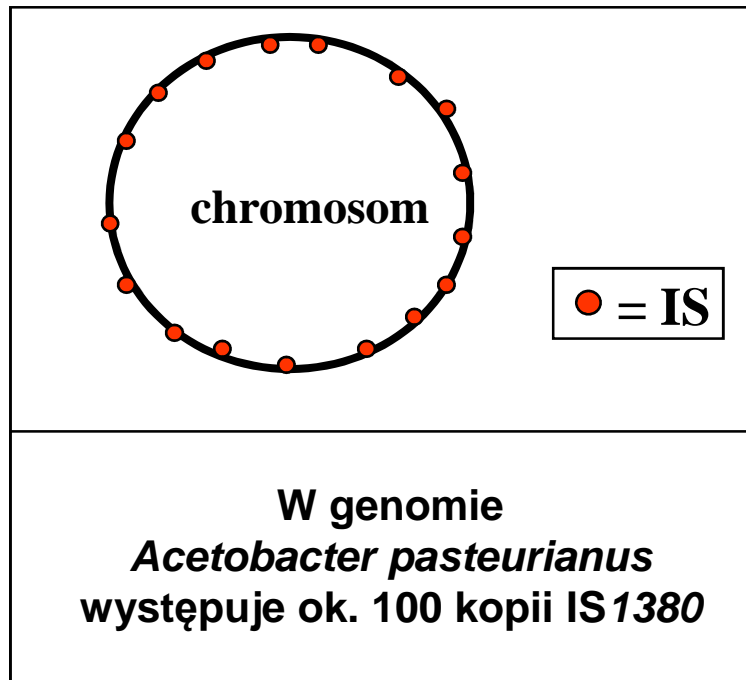
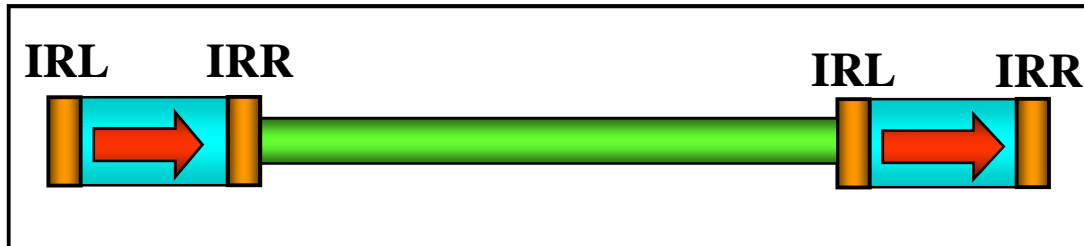
Na podstawie podobieństw strukturalnych wyróżniono **19 rodzin IS**.

# Transpozony złożone



*Bushman, Lateral gene transfer. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press*

# Transpozony złożone

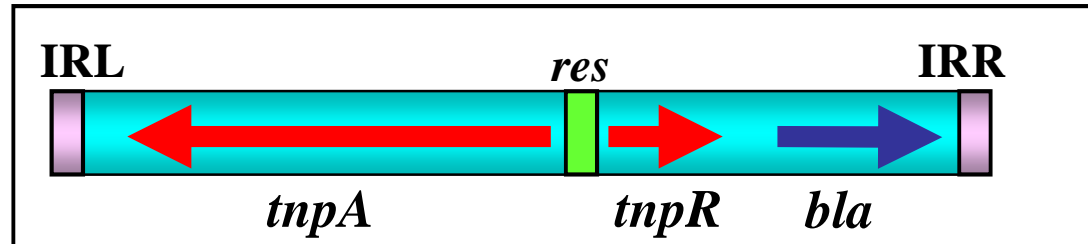


Bushman, Lateral gene transfer. 2001.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press

# Transpozony niezłożone – rodzina Tn3

## Tn3

(4 957 pz); rodzina Tn3



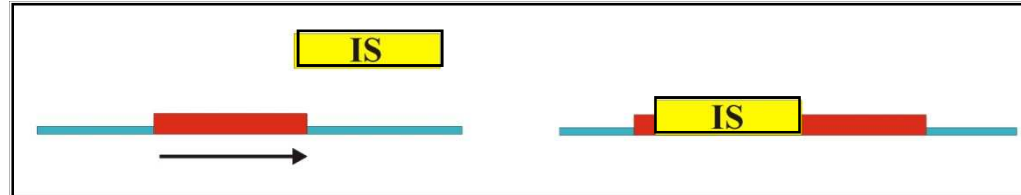
IR – 38 pz

- obecność genów kodujących duże, pokrewne transpozazy (ok. 1000 aa);
- podobieństwo sekwencji IR (ok. 40 pz);
- generowanie sekwencji DR o długości 5 pz;
- preferencje transpozycji do plazmidów;
- sekwencja docelowa – preferencyjnie bogata w pary AT;
- obecność systemu miejscowo-specyficznej rekombinacji;
- występowanie zjawiska odporności na kolejne transpozycje.

# Rodzaje zmian w DNA spowodowanych transpozycją

1. Insercje
2. Delecje
3. Translokacje
4. Duplikacje
5. Inwersje
6. Aktywacja transkrypcji
7. Powstawanie kointegratów

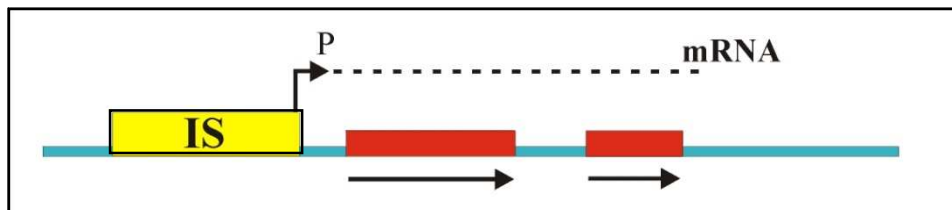
## Insercyjna inaktywacja genu



IS1301 – odwracalna inaktywacja *siaA* *Neisseria meningitidis* – utrata otoczki powoduje silniejsze przyleganie oraz łatwiejsze wnikanie bakterii do komórek nabłonkowych

IS3 – integracja do genu *finO* plazmidu F – ekspansywność plazmidu.

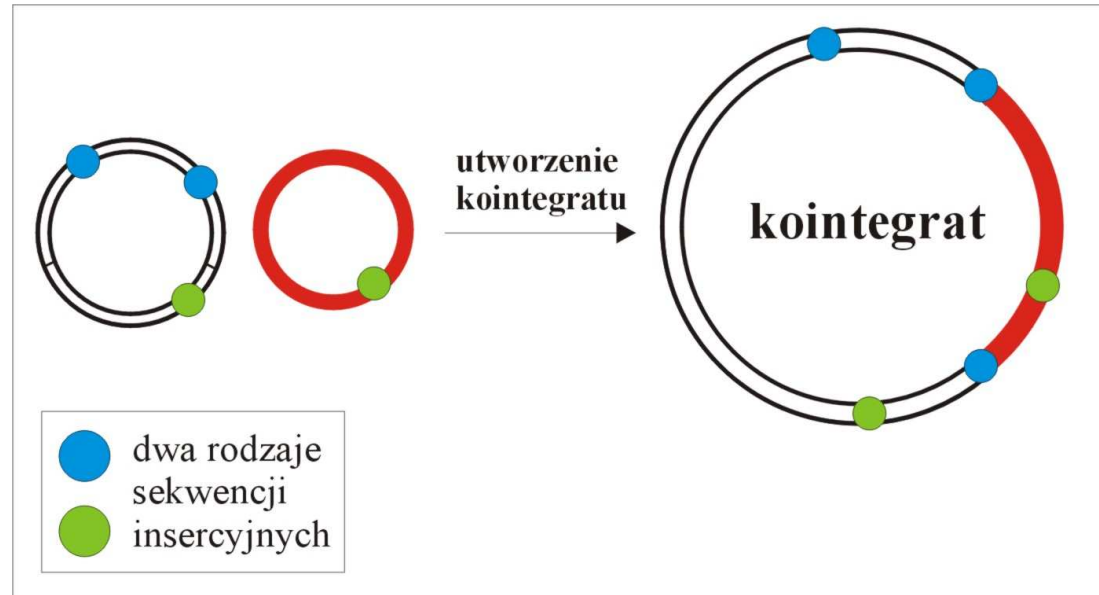
## Aktywacja sąsiednich genów



- *Pseudomonas putida* – insercja IS1411 powyżej genów *pheAB* – aktywacja ekspresji operonu, umożliwiająca degradację fenolu.
- *Burkholderia cepacia* AC1100 – insercja IS1490 – aktywacja operonu, warunkującego wykorzystywanie herbicydu (kwasu 2,4,5-trichlorofenoksyoctowego).

# Rodzaje zmian w DNA spowodowanych transpozycją

## Tworzenie kointegratów

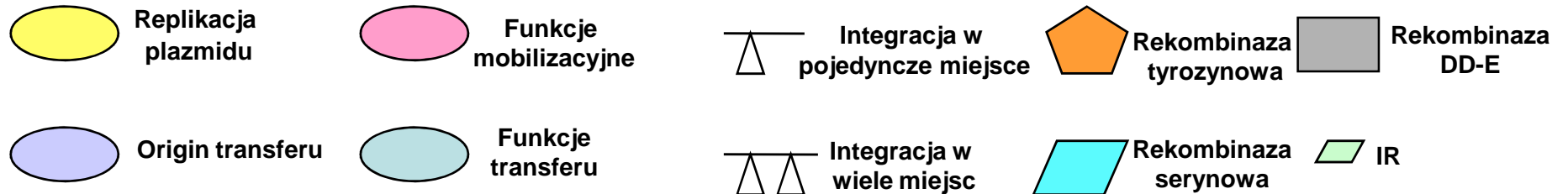
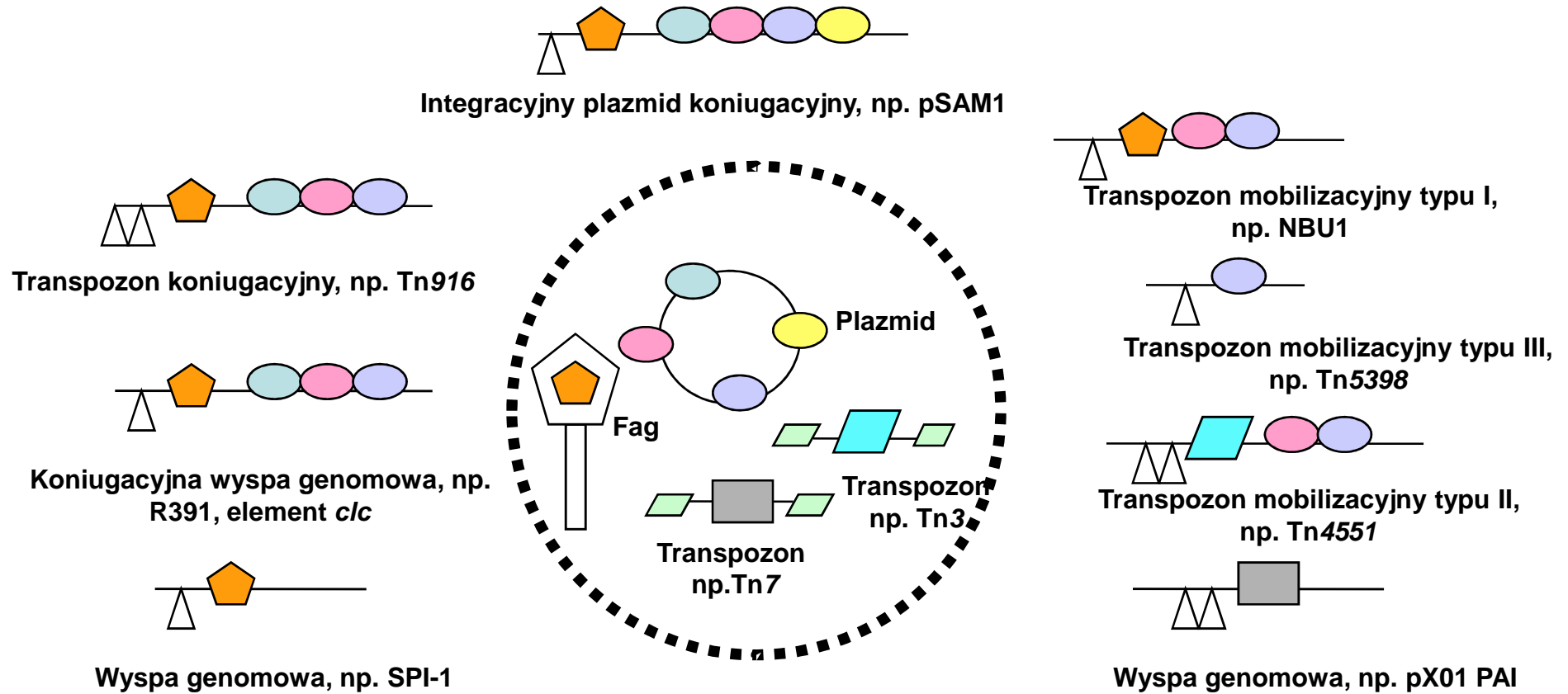


*Rhizobium* NGR234 (chromosom + plazmidy pNGR234a i pNGR234b) zaobserwowano tworzenie czterech typów kointegratów:

- (1) chromosom + pNGR234a, (2) chromosom + pNGR234b,
- (3) chromosom + pNGR234a + pNGR234b, (4) pNGR234a + pNGR234b.



# Modularna struktura ruchomych elementów genetycznych





**mgr Marta Sochacka-Piętal**

**Identyfikacja i charakterystyka  
elementów transpozycyjnych  
*Paracoccus pantotrophus***

**Rozprawa doktorska przygotowana w:**

**Zakładzie Genetyki Bakterii  
Instytutu Mikrobiologii  
Wydziału Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego**

**Promotor:**

**dr hab. Dariusz Bartosik**

**Recenzenci:**

**dr hab. Jacek Bielecki, prof. UW  
prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn**

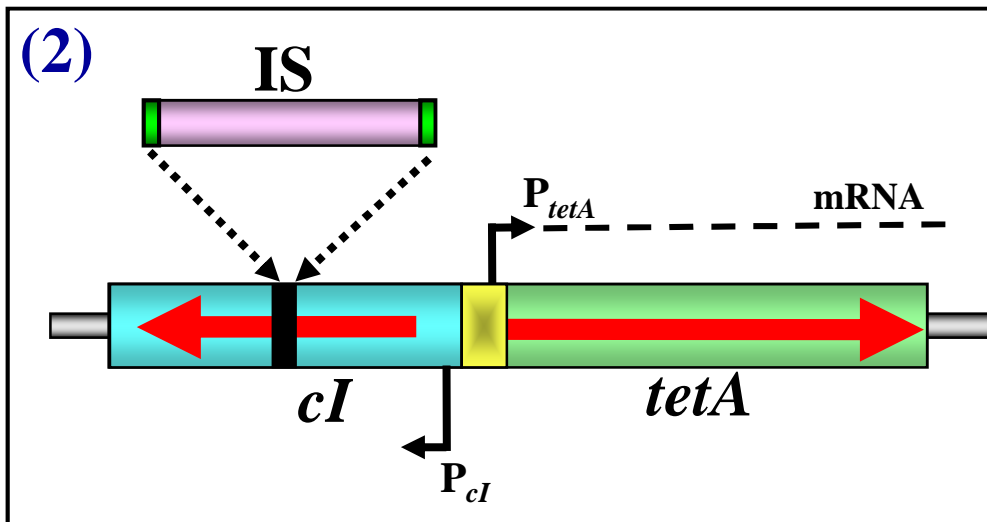
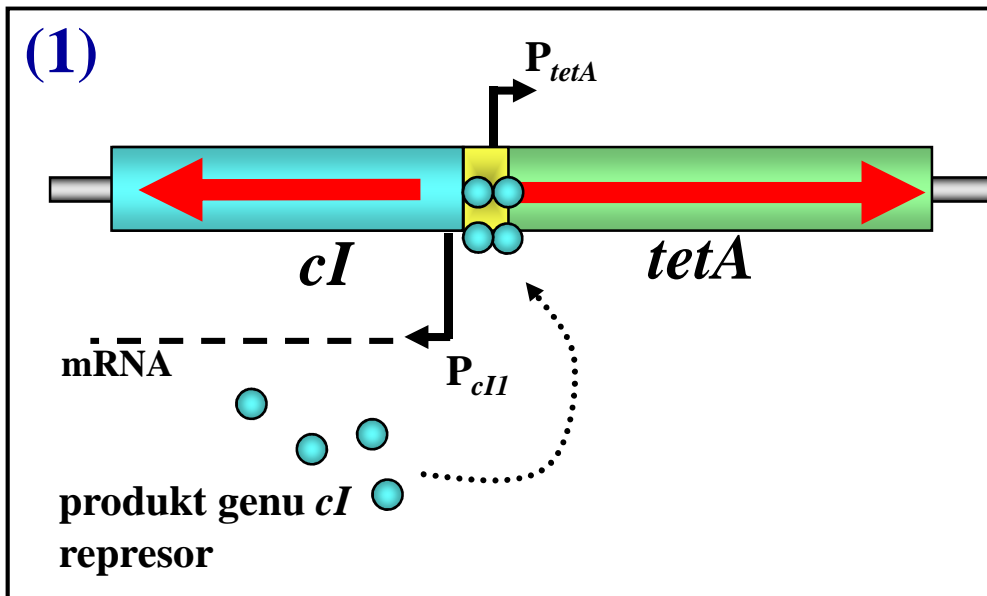
## Charakterystyka *Paracoccus pantotrophus*

- gramujemne, tlenowe bakterie zaliczane do *Alphaproteobacteria*;
- fakultatywny chemolitoautotrof, zdolny do uzyskiwania energii z utleniania tiosiarczanu, siarczku i wodoru;
- niezwykle zróżnicowany metabolizm, m.in. zdolność do degradacji wielu związków organicznych, w tym mrówczanu i metanolu;
- poszczególne szczepy wyizolowano z różnych środowisk o bogatej florze bakteryjnej:
  - LMD 82.5 – ze ścieków przemysłowych,
  - DSM 65 – z gleby,
  - DSM 11072 – z ryzosfery dębu,
  - DSM 11073 – z liścia dębu;

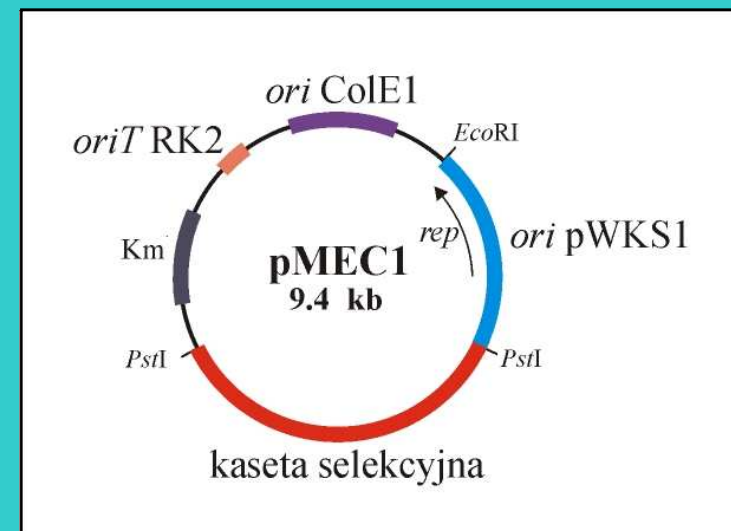
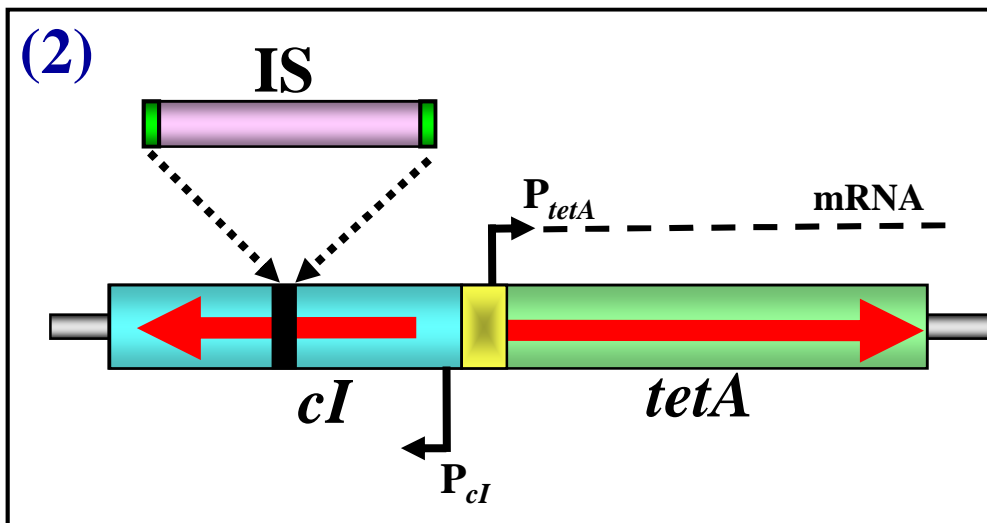
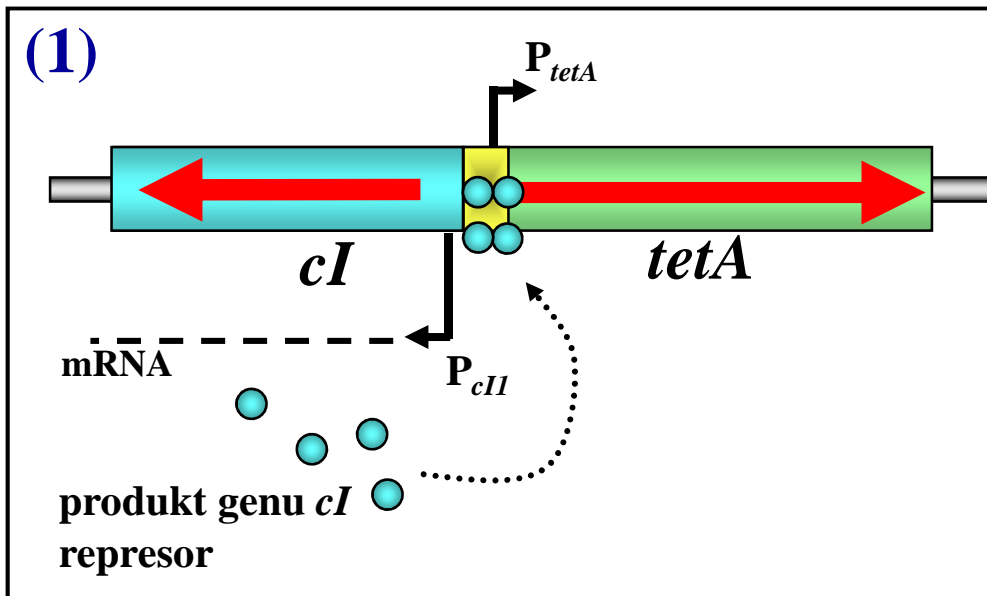
## Cel pracy:

1. Identyfikacja funkcjonalnych TE występujących w czterech szczepach *Paracoccus pantotrophus* (*Alphaproteobacteria*) z wykorzystaniem wektorów pułapkowych.
2. Przeprowadzenie szczegółowej analizy molekularnej wykrytych elementów, obejmującej m.in.:
  - (i) poznanie ich struktury genetycznej,
  - (ii) zbadanie ich rozpowszechnienia w różnych gatunkach bakterii.

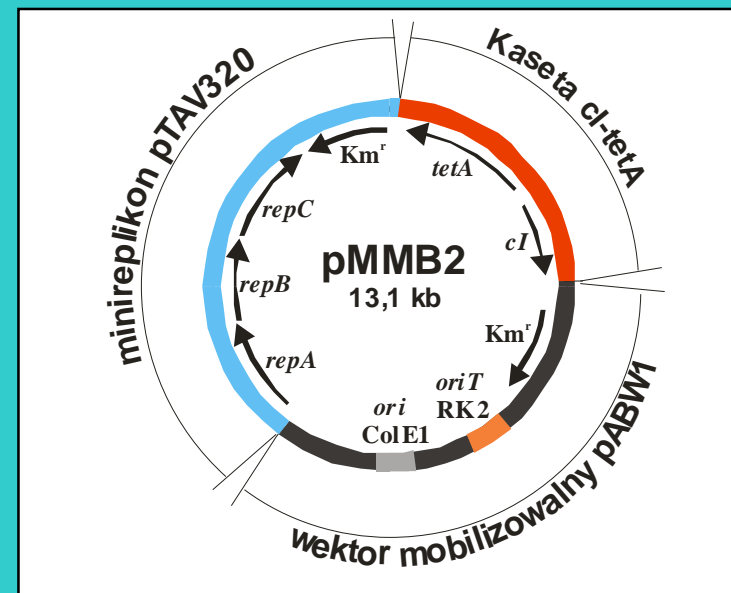
# Identyfikacja TE - kasety selekcyjnej (*cI-tetA*)



# Identyfikacja TE - kasetta selekcyjna (*cI-tetA*)



Struktura genetyczna plazmidu pMEC1

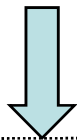
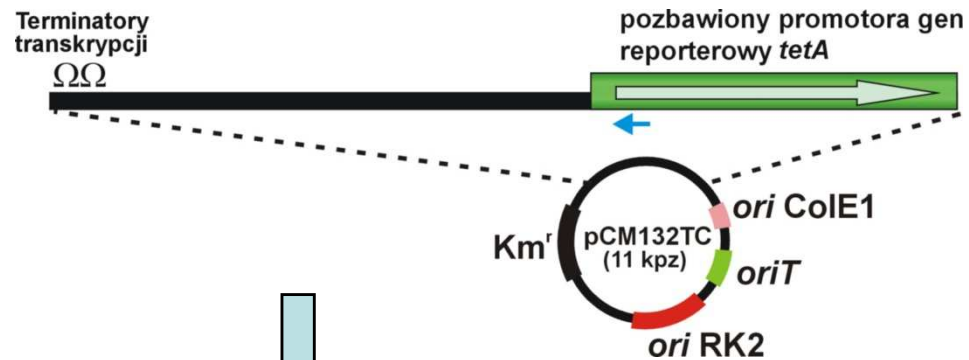


Struktura genetyczna plazmidu pMMB2

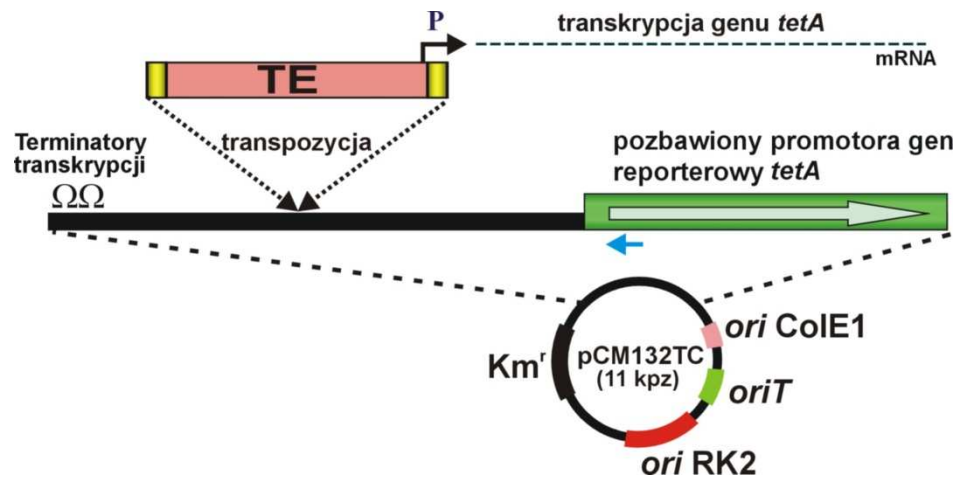
# Strategie identyfikacji TE

## Identyfikacja TE umożliwiających transkrypcję sąsiadujących genów

(1)



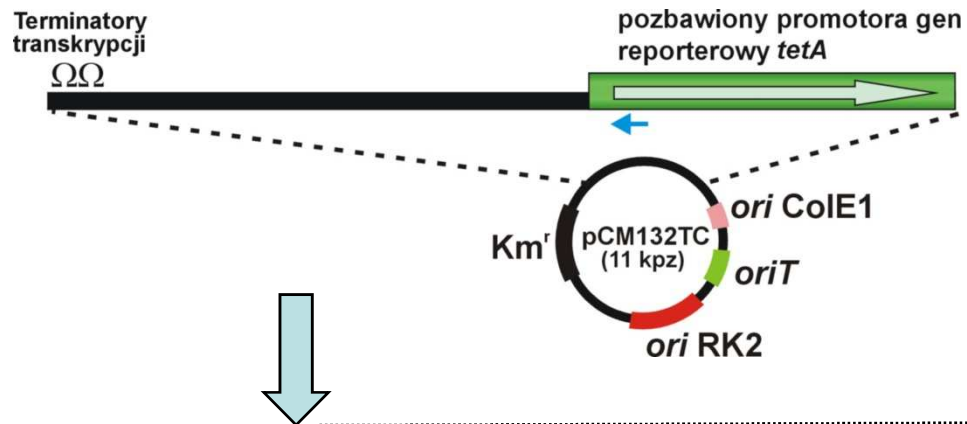
(2)



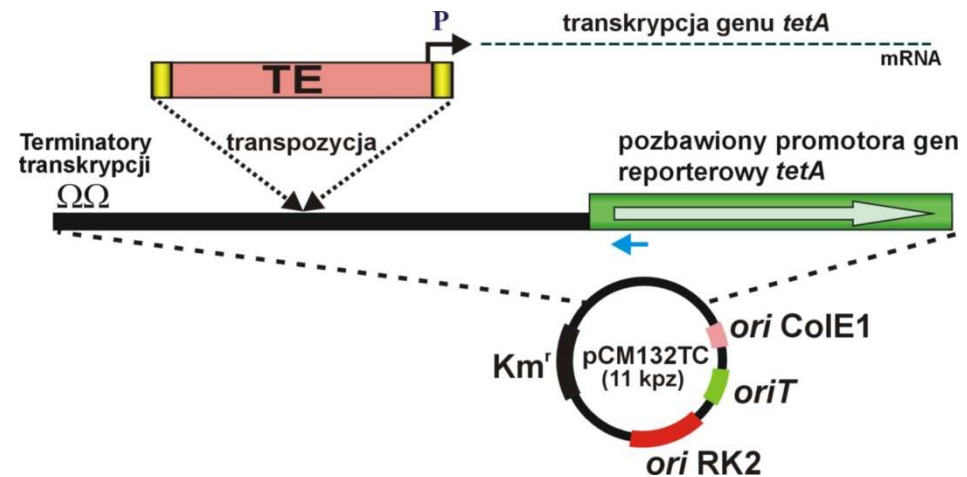
# Strategie identyfikacji TE

## Identyfikacja TE umożliwiających transkrypcję sąsiadujących genów

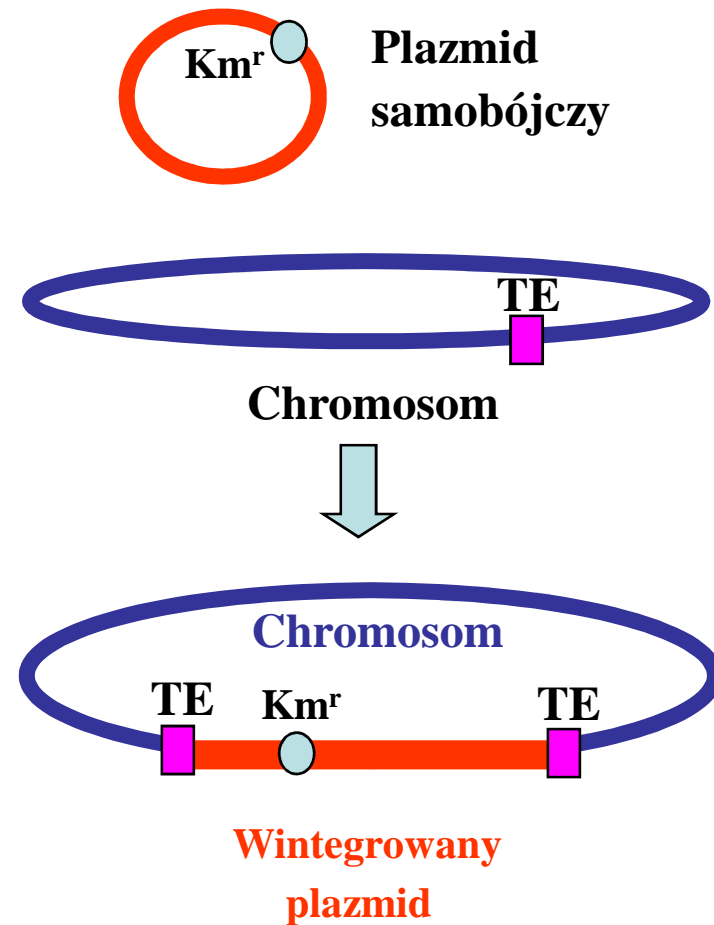
(1)



(2)



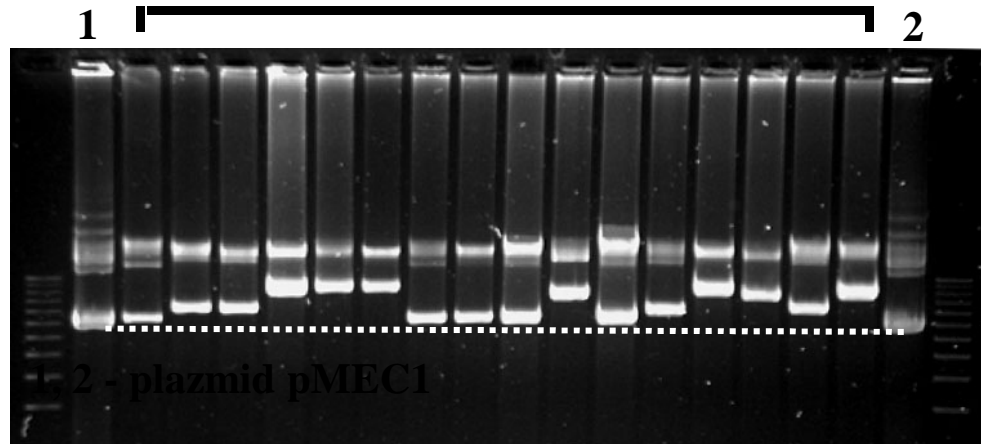
## Identyfikacja TE wytwarzających kointegraty podczas transpozycji replikacyjnej





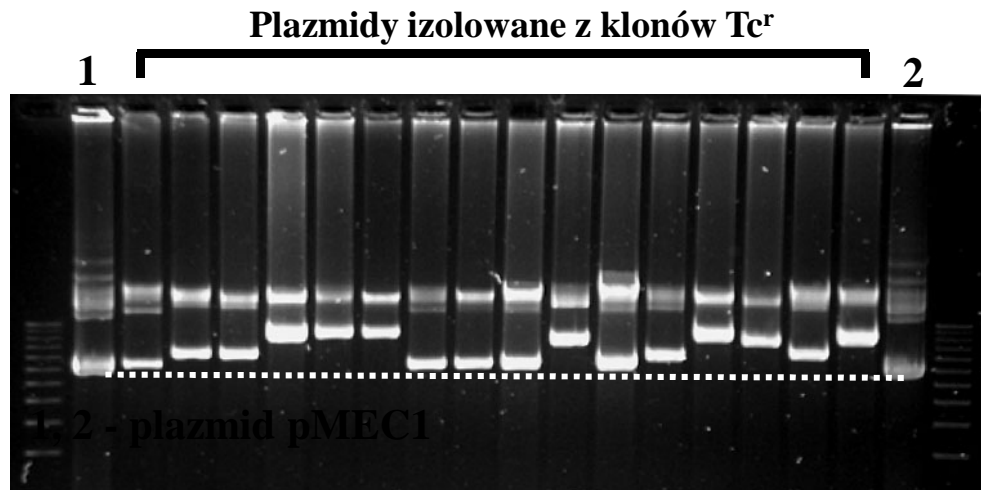
# Identyfikacja TE

Plazmidy izolowane z klonów Tc<sup>r</sup>



1, 2 - plazmid pMEC1

# Identyfikacja TE



1, 2 - plazmid pMEC1

Szczep <i>P.</i> <i>pantotrophus</i>	Częstość powstawania mutantów Tc <sup>r</sup>	Częstość transpozycji*	Częstość powstawania mutantów danej klasy [%]				
			MP	< 2 kpz	~3 kpz	~3,5 kpz	~5,5 kpz
DSM 11072R	$5,0 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-5}$	21	13	17	51	0
DSM 65R	$8,9 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-5}$	80	4	16	0	0
DSM 11073R	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	0	0	100	0	0
LMD 82.5R	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	0	0	0	0	100

\* w przeliczeniu na jedną komórkę w hodowli bakteryjnej; wyznaczona dla zastosowanego układu badawczego

MP – mutanty punktowe

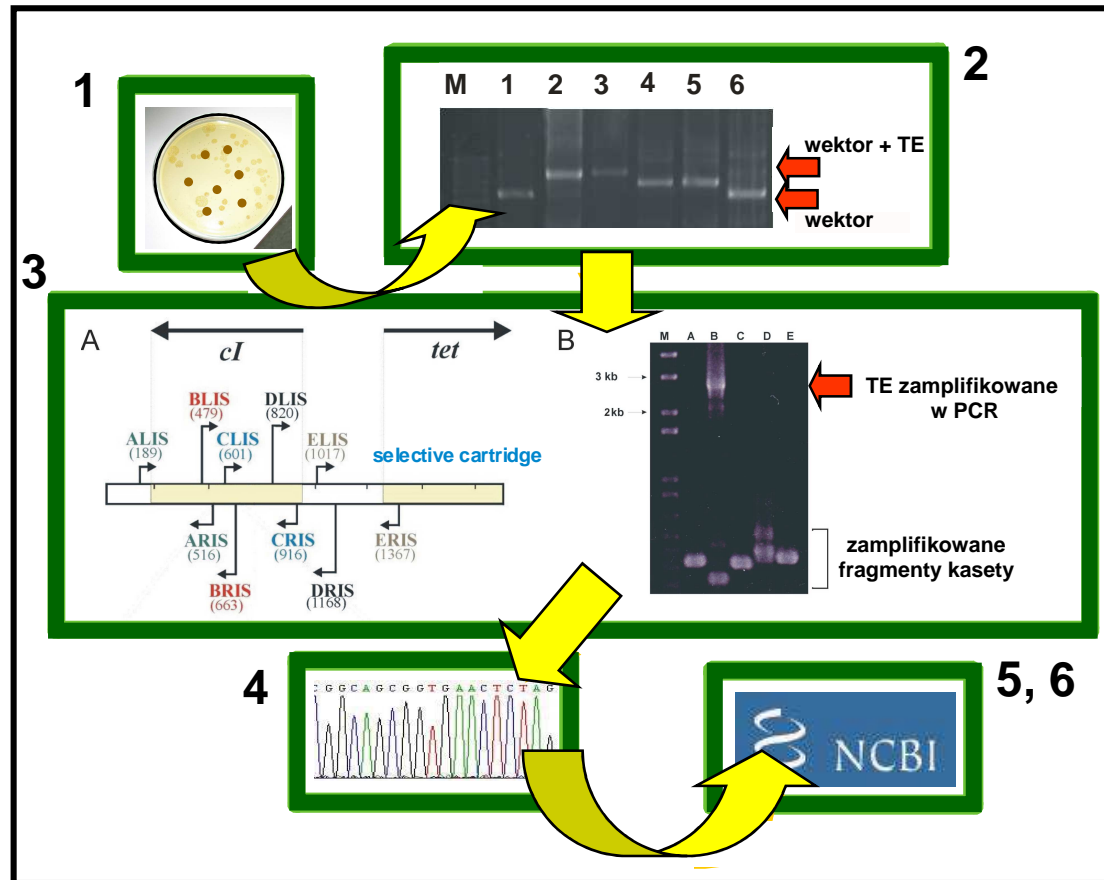
<2 kpz – mutanty z insertem o wielkości mniejszej niż ok. 2 kpz

~3 kpz – mutanty z insertem o wielkości około 3 kpz

~3,5 kpz - mutanty z insertem o wielkości około 3,5 kpz

~5,5 kpz - mutanty z insertem o wielkości około 5,5 kpz

# Identyfikacja i analiza IS – schemat eksperymentów



1. Selekcja puli potencjalnych mutantów transpozycyjnych.
2. Identyfikacja plazmidów insercyjnych.
3. Potwierdzenie integracji TE w kasecie selekcyjnej - analizy PCR.
4. Sekwencjonowanie DNA.
5. Porównawcze analizy bioinformatyczne.
6. Annotacja sekwencji; zdeponowanie w bazach danych NCBI (GenBank) i ISfinder.

# Analizy TE

## **Analizy bioinformatyczne sekwencji nukleotydowych:**

- określenie genu kodującego transpozazę;
- identyfikacja terminalnych powtórzonych sekwencji IR;
- analiza sekwencji aminokwasowej transpozazy;
- identyfikacja konserwowanych motywów transpozaz;
- analiza porównawcza w bazach danych;
- określenie powielonej sekwencji docelowej DR.

**Określenie przynależności TE do grupy / rodziny.**

**Przeprowadzenie analiz filogenetycznych.**

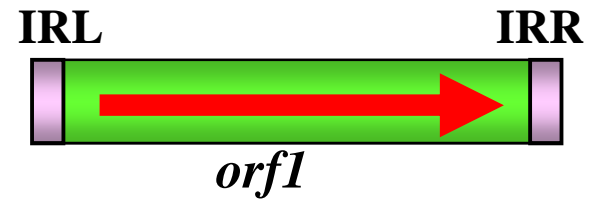
**Zdeponowanie sekwencji w bazach danych.**

**Wyodrębnienie w zdeponowanych sekwencjach genomów elementów pokrewnych zidentyfikowanym w tej pracy.**

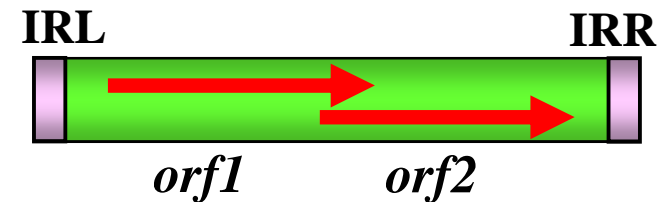
# IS *P. pantotrophus* – organizacja genetyczna

**ISPpa8** (1050 pz)  
DSM 65 i DSM 11073  
(grupa IS903 rodziny IS5)

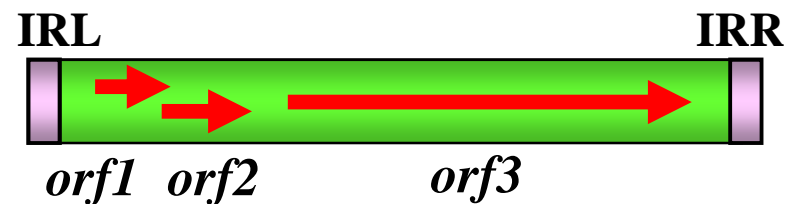
**ISPpa9** (812 pz)  
DSM 65  
(rodzina IS6)



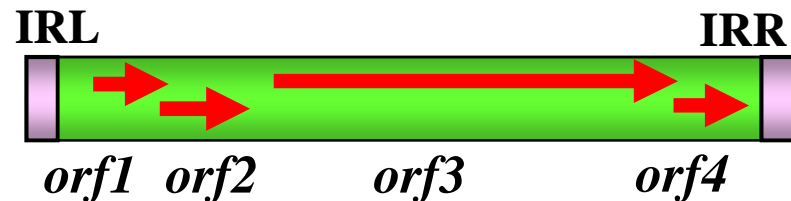
**ISPpa6** (850 pz)  
DSM 11073  
(grupa IS427 rodziny IS5)



**ISPpa7** (2731 pz)  
DSM 65  
(rodzina IS66)



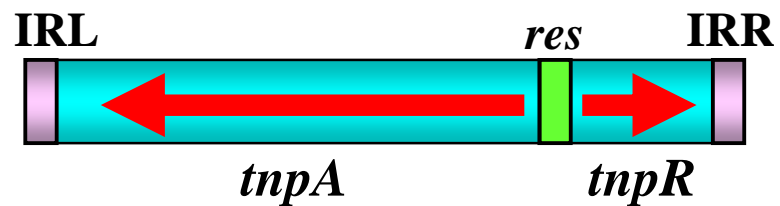
**ISPpa5** (2829 pz)  
DSM 11072  
(rodzina IS66)



# Transpozony niezłożone – rodzina Tn3

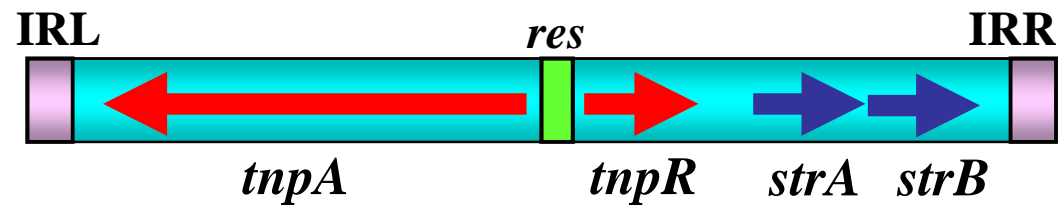
## Tn3434

*P. pantotrophus* DSM 11072  
(3 700 pz); rodzina Tn3



## Tn5393

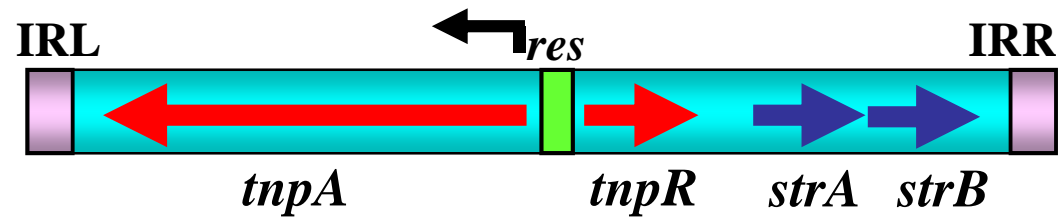
*P. pantotrophus* LMD 82.5  
(5 500 pz); rodzina Tn3



# Elementy warunkujące transkrypcję sąsiednich genów

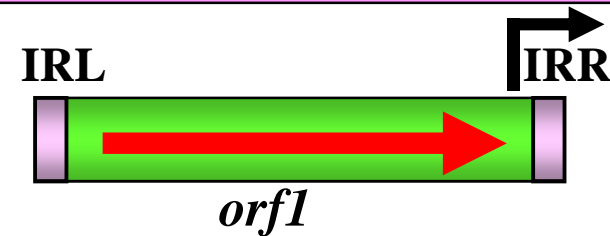
## Tn5393

*P. pantotrophus* LMD 82.5  
(5 500 pz); rodzina Tn3



## ISPpa8

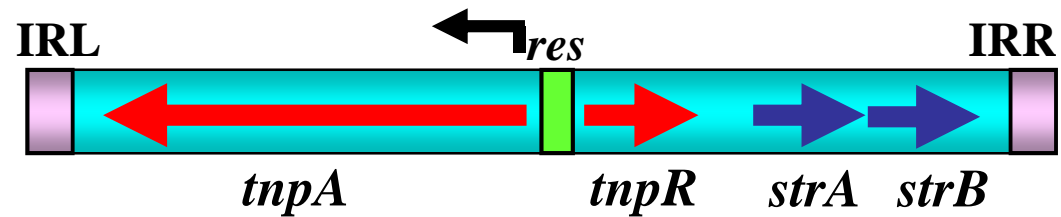
DSM 65 i DSM 11073  
(1050 pz)  
(grupa IS903 rodziny IS5)



# Elementy warunkujące transkrypcję sąsiednich genów

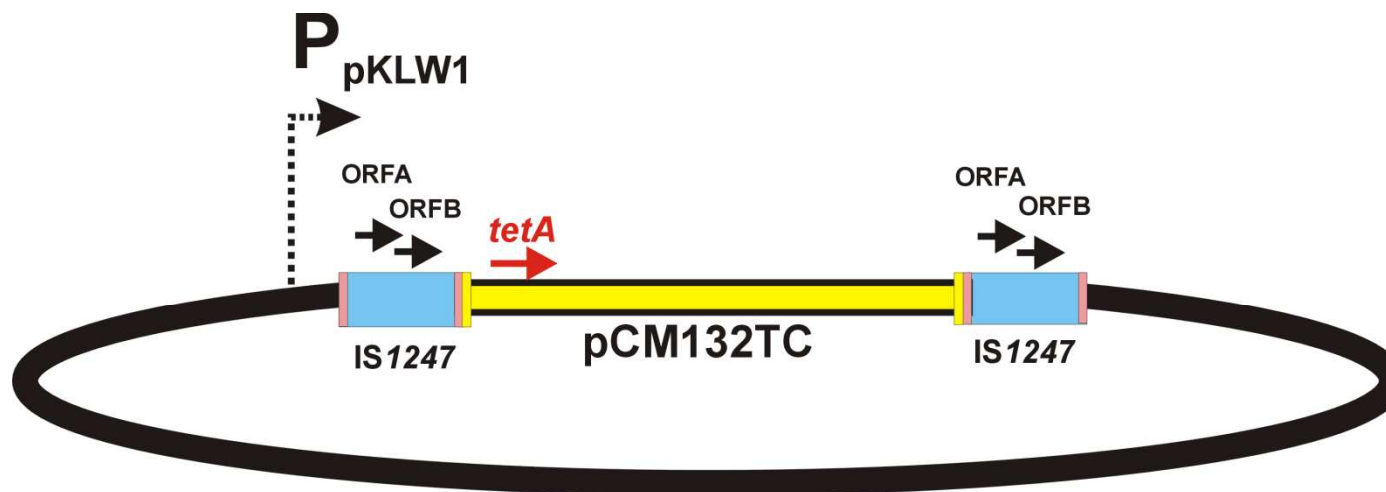
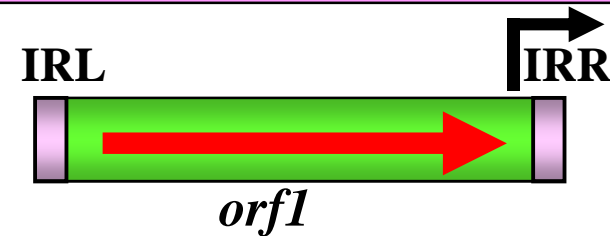
## Tn5393

*P. pantotrophus* LMD 82.5  
(5 500 pz); rodzina Tn3



## ISPpa8

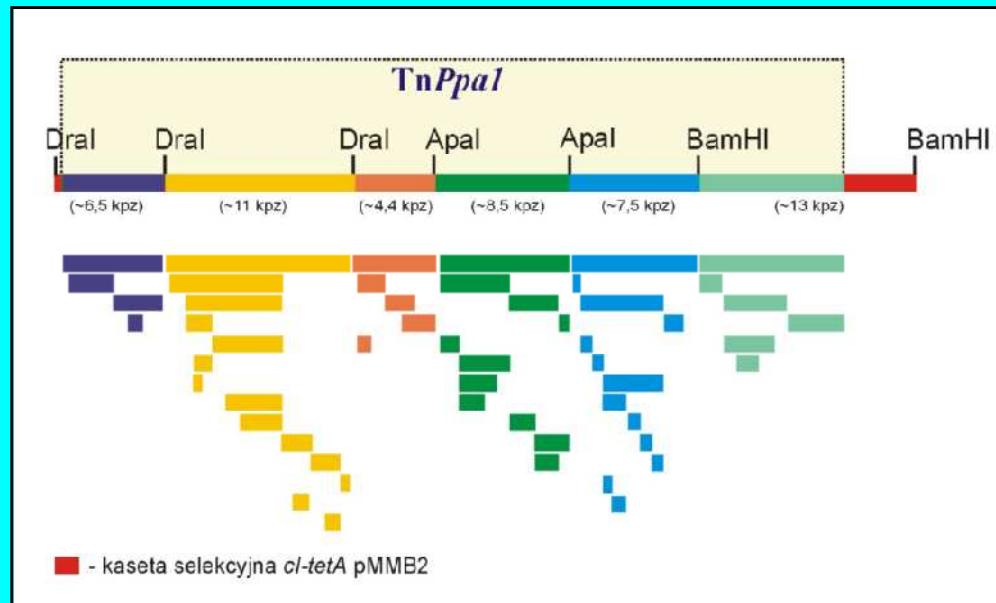
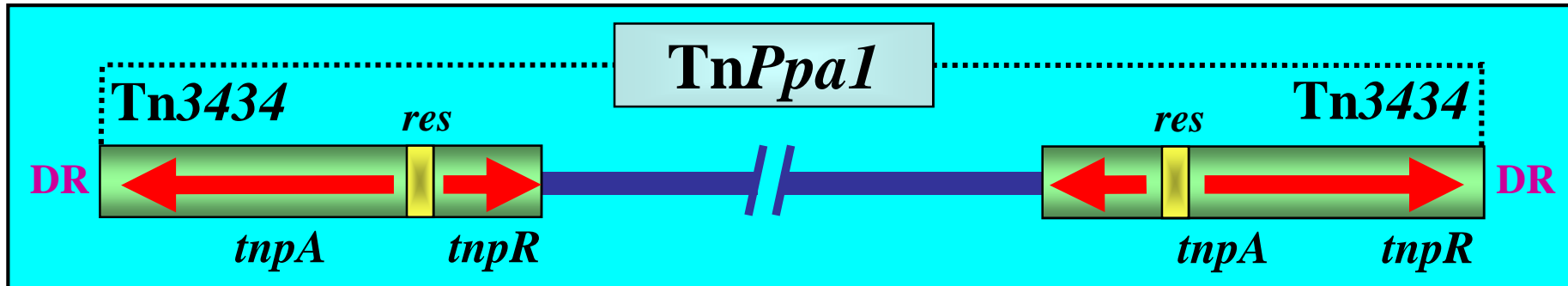
DSM 65 i DSM 11073  
(1050 pz)  
(grupa IS903 rodziny IS5)



Naturalny plazmid pKWLW1 (ok 100 kpz)  
z *P. pantotrophus* DSM 11073

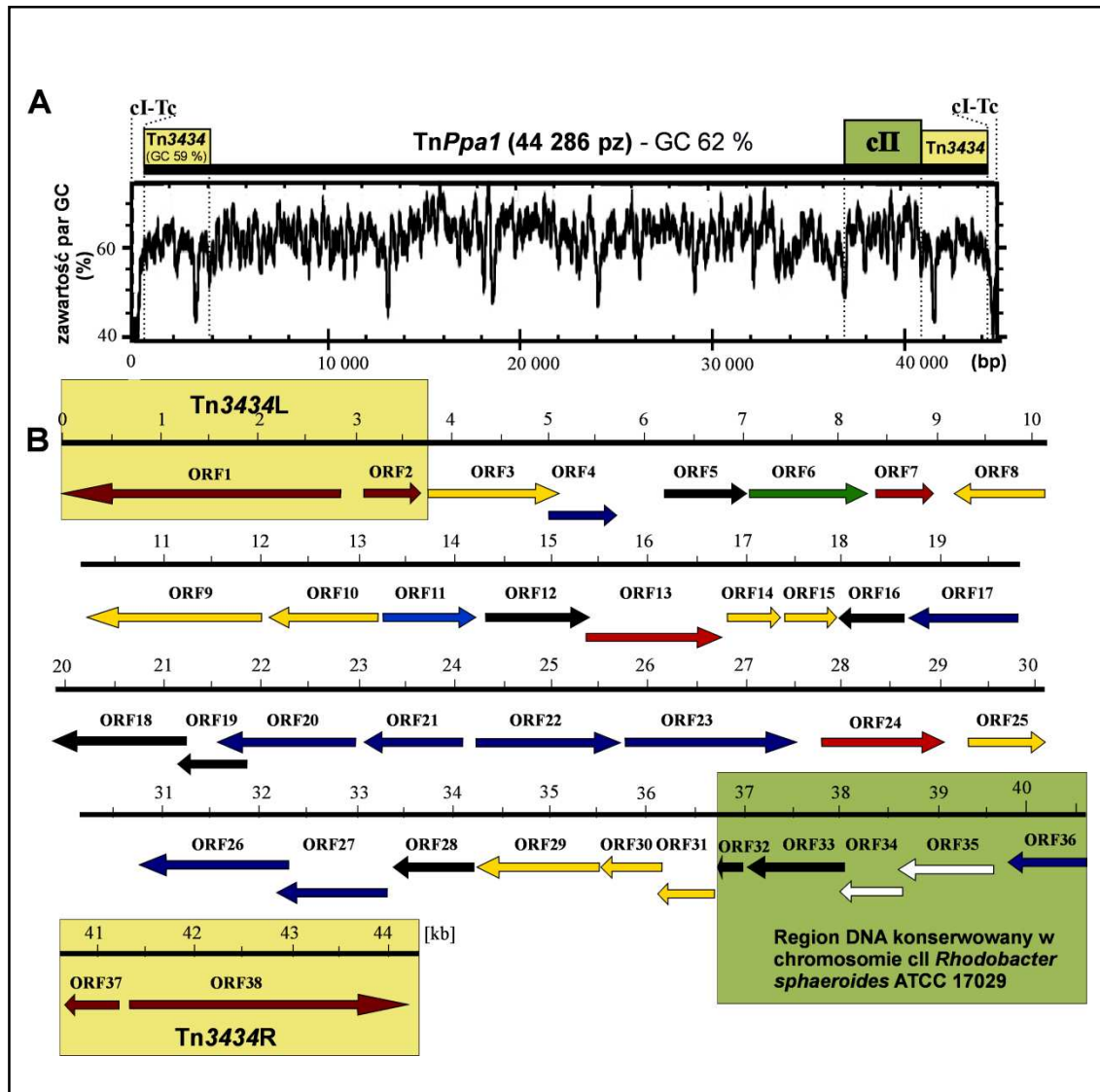


# Transpozycyjna wyspa genomowa *TnPpa1*



***TnPpa1* (44,5 kbp)**  
***P. pantotrophus* DSM 11072**

# Transpozycyjna wyspa genomowa Tn*Ppa1*

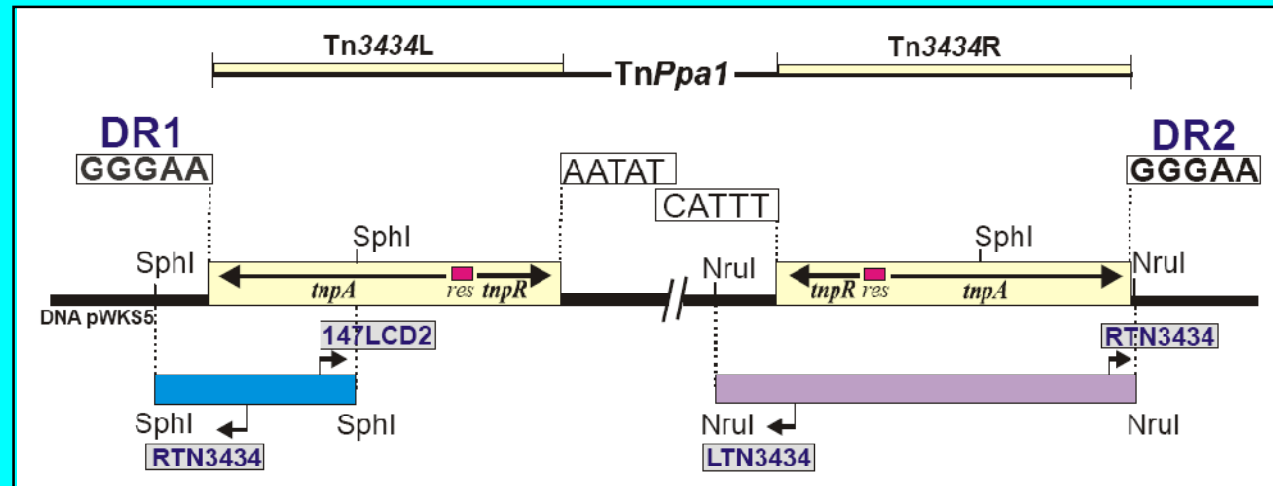


- mozaikowa struktura
- obecność genów metabolizmu podstawowego
- system transportu żelaza typu ABC
- geny kodujące konserwowane białka o nieznannej funkcji

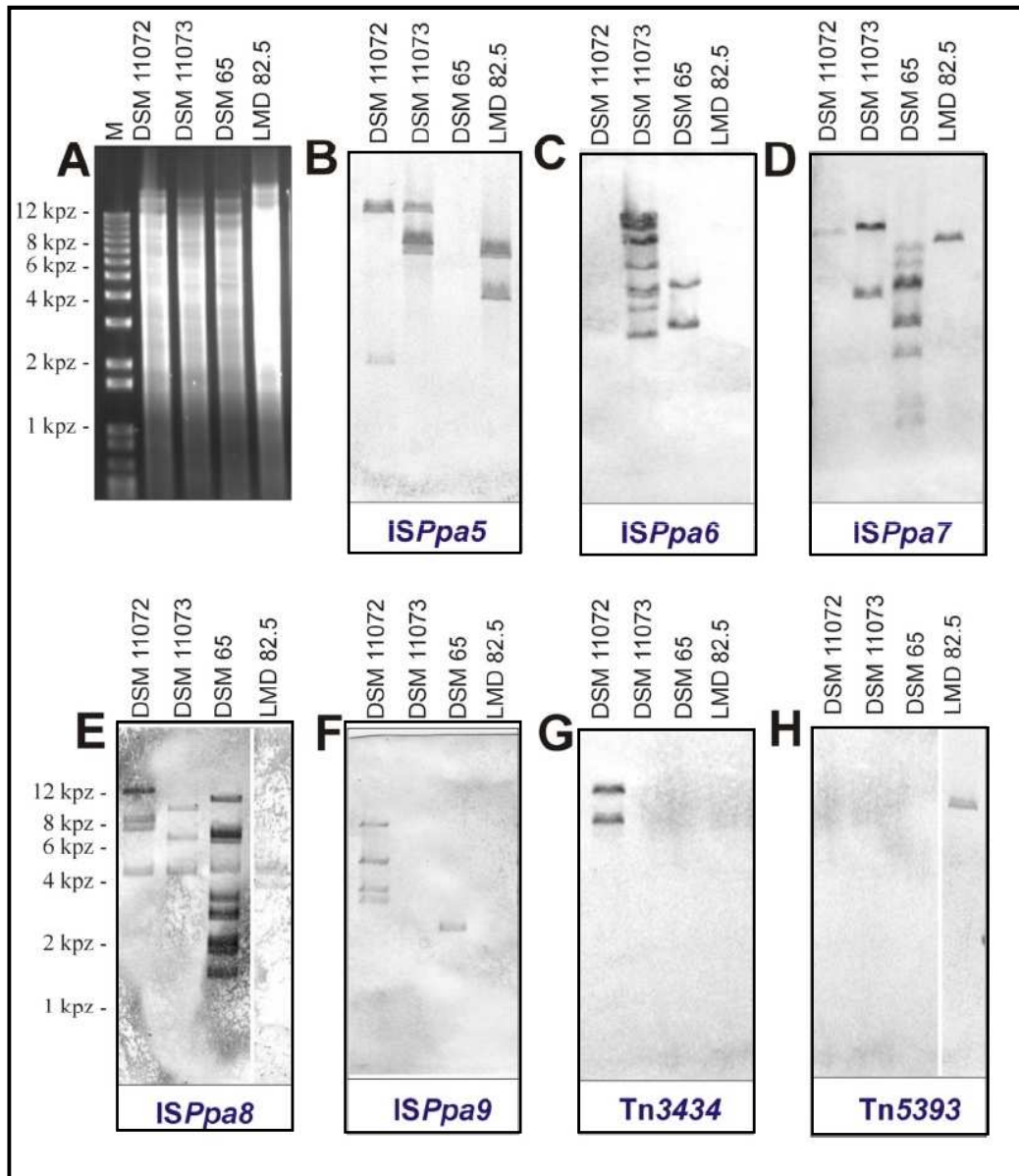
■ transpozazy/ resolwazy	■ konserwowane/ nieznana funkcja	■ aminotransferaza	■ regulatory transkrypcji	■ białka błonowe	□ hydrataza
■ dehydrogenazy	■ katabolizm propionianu	■ fosfomutaza	■ transportery	■ kinaza	■ hydrolaza

# Transpozycyjna wyspa genomowa *TnPpa1*

Ustalenie pierwotnego  
miejsca integracji  
*TnPpa1* w pWKS5  
*P. pantotrophus* DSM 11072

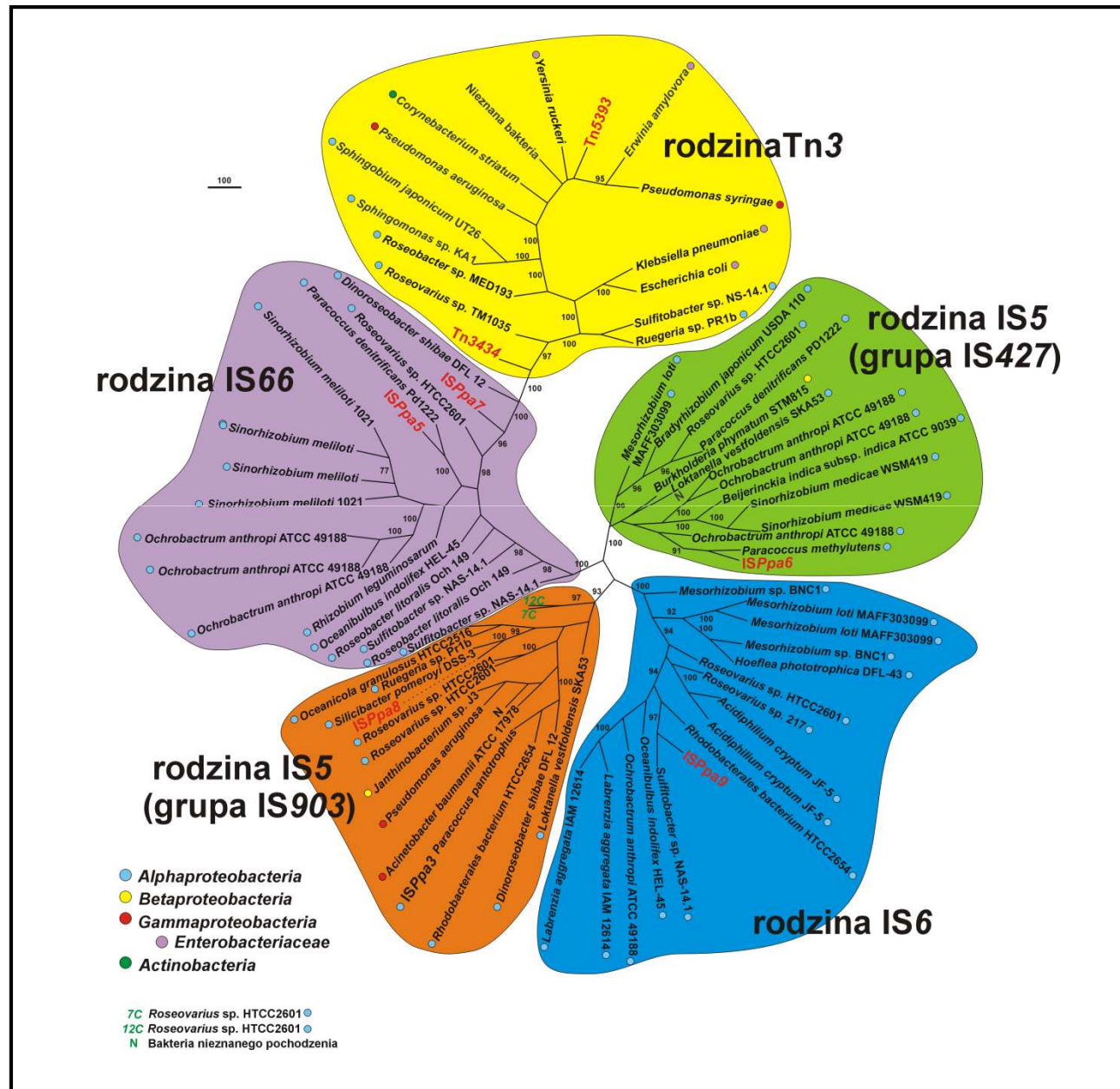


# Rozpowszechnienie badanych TE w *P. pantotrophus*



**Hybrydyzacja DNA-DNA sond  
specyficznych dla poszczególnych  
TE z całkowitym DNA  
(trawionym EcoRI) wyizolowanym  
ze szczepów *P. pantotrophus***

# Elementy transpozycyjne *Paracoccus* sp.



## Podsumowanie i wnioski

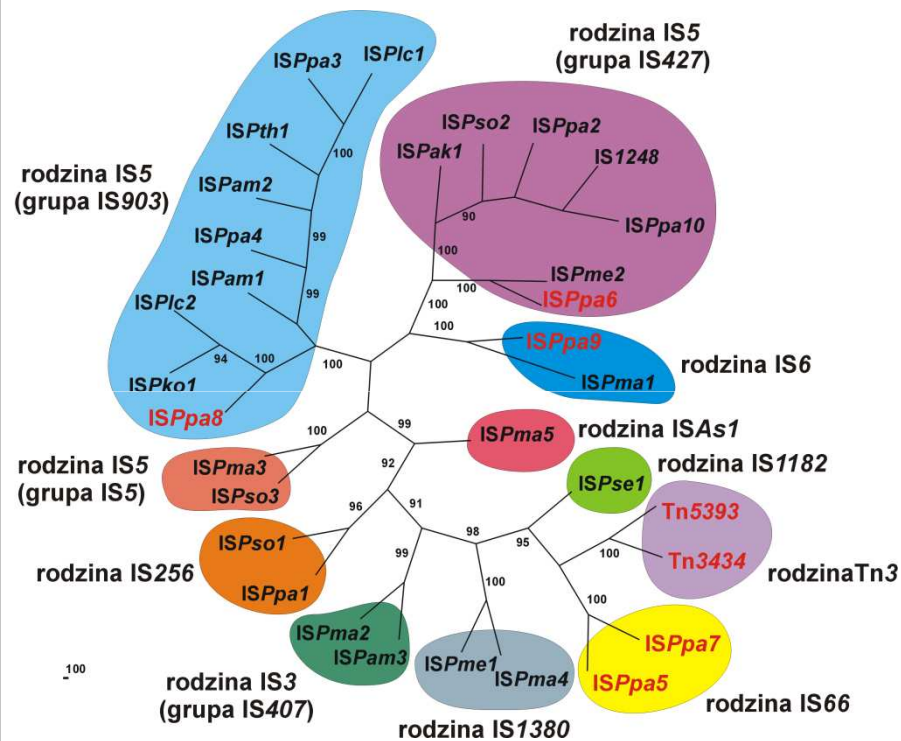
- Stosując wektory pułapkowe zidentyfikowano, nieopisane wcześniej: (i) pięć IS, (ii) dwa transpozony niezłożone oraz (iii) transpozon złożony o mozaikowej strukturze (*TnPpa1*).
- Na podstawie przeprowadzonych kompleksowych analiz bioinformatycznych elementy te zaliczono do odpowiednich rodzin IS: (i) IS6, (ii) IS66, (iii) IS5 (grupa IS903 i IS427), bądź Tn – transpozony z rodziny Tn3. Wyznaczono częstość transpozycji dla każdego z badanych elementów.
- Szczegółowe analizy *in silico* sekwencji genomów bakterii umożliwiły wyróżnienie TE, które nie zostały scharakteryzowane przez innych badaczy podczas deponowania sekwencji nukleotydowych w bazach danych.
- Scharakteryzowany w tej pracy *TnPpa1* jest pierwszą mobilną wyspą genomową, którą zidentyfikowano w wyniku odpowiednio przeprowadzonej selekcji zdarzenia transpozycyjnego.
- Ustalono liczbę kopii poszczególnych TE w genomie gospodarza oraz poznano ich lokalizację (plazmid/chromosom).
- Przeprowadzono komputerowe analizy filogenetyczne, co dało wyobrażenie o częstości i kierunkach transferu horyzontalnego genów w *Paracoccus* spp. Uzyskane dane sugerują występowanie rzadko obserwowanego zjawiska transferu horyzontalnego między bakteriami gramdodatnimi i gramujemnymi.

## Podsumowanie i wnioski

- Wykazano eksperymentalnie, że natura systemu replikacyjnego wektora pułapkowego może stanowić czynnik limitujący transpozycję dużych elementów transpozycyjnych.
- Identyfikacja Tn5393 w izolacie *P. pantotrophus* jest dowodem na to, że bakterie glebowe mogą stanowić istotny rezerwuar determinant oporności na antybiotyki w środowisku.
- Wykazano po raz pierwszy, że elementy z grupy IS903 (rodzina IS5), jak również transpozon Tn5393, kodują promotory umożliwiające transkrypcję sąsiednich genów.
- Wykazano, że utworzenie kointegratów w trakcie transpozycji replikacyjnej może prowadzić do ekspresji bezpromotorowych genów opornościowych.
- Uzyskano wyniki podważające przekonanie, iż tzw. zjawisko odporności DNA docelowego na kolejną insercję pokrewnych TE jest powszechne wśród rodziny Tn3.
- Uzyskano interesujące dane umożliwiające wyciągnięcie wniosków na temat ewolucji transpozonów z rodziny Tn3.

# Elementy transpozycyjne *Paracoccus* spp.

L.p	TE	Gospodarz	Rodzina/grupa	Sposób identyfikacji
1	IS1248	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 11073	IS5/IS427	pCM132TC (kointegrat)
2	ISPaK1	<i>P. alkenifer</i> DSM 11593	IS5/IS427	pMAT1*
3	ISPam1	<i>P. amionophilus</i> JCM7686	IS5/IS903	pEBB10 i pCM132TC
4	ISPam2	<i>P. amionophilus</i> JCM7686	IS5/IS903	pEBB10*
5	ISPam3	<i>P. amionophilus</i> JCM7686	IS3/IS407	pCM132TC
6	ISPko1	<i>P. kondratievae</i> NCIMB 13773 <sup>1</sup>	IS5/IS903	pMEC1 i pCM132TC
7	ISPlc1	<i>P. alcaliphilus</i> JCM 7364	IS5/IS903	pMAT1
8	ISPlc2	<i>P. alcaliphilus</i> JCM 7364	IS5/IS903	pMAT1
9	ISPma1	<i>P. marcusii</i> DSM 11574	IS6	pMEC1
10	ISPma2	<i>P. marcusii</i> DSM 11574	IS3/IS407	pMEC1
11	ISPma3	<i>P. marcusii</i> OS22	IS5/IS5	pMEC1 i pCM132TC
12	ISPma4	<i>P. marcusii</i> OS22	IS1380	pMAT1
13	ISPma5	<i>P. marcusii</i> OS22	ISAe1	pMAT1
14	ISPme1	<i>P. methylutens</i> DM12	IS1380	pMEC1
15	ISPme2	<i>P. methylutens</i> DM12	IS5/IS427	pMEC1
16	ISPPa1	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 11072	IS256	pMEC1
17	ISPPa2	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 11072	IS5/IS427	pMEC1
18	ISPPa3	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 11072	IS5/IS903	pMEC1
19	ISPPa4	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 65	IS5/IS903	pMEC1
20	ISPPa5	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 11072	IS66	pMEC1
21	ISPPa6	<i>P. pantrotrophi</i> KL100 (pochodna DSM 11073)	IS5/IS427	pMEC1
22	ISPPa7	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 65	IS66	pMEC1
23	ISPPa8	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 65 i DSM 11073	IS5/IS903	pCM132TC
24	ISPPa9	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 65	IS6	pDS132K
25	ISPPa10	<i>P. pantrotrophi</i> LMD 82.5	IS5/IS427	pMAT1
26	ISPse1	<i>P. seriniphilus</i> DSM 14827	IS1182	pMAT1
27	ISPso1	<i>P. solventivorans</i> DSM 11592	IS256	pMEC1
28	ISPso2	<i>P. solventivorans</i> DSM 11592	IS5/IS427	pMEC1
29	ISPso3	<i>P. solventivorans</i> DSM 11592	IS5/IS5	pMEC1
30	ISPth1	<i>P. thiocyanatus</i> IAM 12816	IS5/IS903	pMAT1
31	Tn3434	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 11072	Tn3	pMEC1
32	Tn5393	<i>P. pantrotrophi</i> LMD 82.5	Tn3	pMEC1
33	TnPPa1	<i>P. pantrotrophi</i> DSM 11072	Tn3	pMMB2





# Podsumowanie i wnioski

