

Urszula Kasprzykowska^{1*}, Beata Magdalena Sobieszkańska¹

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny, Wrocław, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław

Wpłynęło w styczniu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Mobilne elementy genetyczne. 3. Sekwencje insercyjne i transpozony. 4. Integrony i kasety genowe. 5. Integracyjne elementy koniugacyjne/integrony koniugacyjne. 6. Wyspy patogenności. 7. Podsumowanie

Bacterial genome plasticity – intracellular transfer of genetic information

Abstract: Bacterial genomes constantly evolve upon selective pressure of an environmental factors. Mechanisms that play a role in the genome plasticity include mutations, DNA rearrangements and horizontal gene transfer. Mobile genetic elements are potent agents of bacterial evolution as they exhibit intracellular and intercellular mobility. They may be excluded from one locus and integrated elsewhere in the chromosome. Before integration some acquired genetic elements undergo replicative transposition or are transferred horizontally by transduction, natural transformation or conjugative transfer. In this review, we described the various mobile genetic elements that have an impact on bacterial genome plasticity and microbial evolution with a focus on their intracellular mobility.

1. Introduction. 2. Mobile genetic elements. 3. Insertion sequences and transposons. 4. Integrons and gene cassettes. 5. Integrative and conjugative elements. 6. Pathogenicity associated islands. 7. Summary

Słowa kluczowe: pangenom, horyzontalny transfer genów, mobilne elementy genetyczne

Key words: pangenome, horizontal gene transfer, mobile genetic elements

1. Wstęp

Bakterie, podobnie jak wszystkie, inne organizmy stale ewoluują. Błędy powstające w procesie replikacji podczas replikacji DNA chromosomalnego lub pod wpływem czynników mutagennych, są przyczyną mutacji, które jeżeli okażą się korzystne, a więc zwiększą zdolność adaptacyjną do środowiska bytowania drobnoustroju, są przekazywane następnym pokoleniom [47]. Spontaniczne mutacje DNA ze względu na lokalny charakter zmian powstających w genomie nie odgrywają zbyt dużej roli w plastyczności genetycznej drobnoustrojów [8, 53]. Drobnoustroje, aby zwiększyć i usprawnić swoją zdolność adaptacji do środowiska bytowania, poza mutacjami, rozwinęły szereg mechanizmów uzyskiwania nowych dla nich genów na drodze tzw. horyzontalnego transferu genów (HGT – horizontal gene transfer) bezpośrednio od innych bakterii w procesie koniugacji, pośrednio poprzez bakteriofagi w procesie transdukcji lub poprzez pobieranie natywnego DNA ze środowiska w procesie transformacji [47, 58, 74, 79]. Utrata oraz nabywanie nowych elementów genetycznych pełni podstawową rolę w kształtowaniu genomów bakterii patogennych. HGT stanowi więc ważny mechanizm szybkiego rozprzestrzeniania się cech genetycznych wśród drobnoustrojów i jest kluczowym czynnikiem promującym dopasowywanie się patogenów do organizmu gospodarza. Cechy nabywane na drodze HGT umożliwiają patogenom zajmowanie

nowych dla nich nisz ekologicznych, natomiast presja rozmaitych czynników środowiska np. temperatury, dostępności składników odżywczych, fazy wzrostu, selekcjonuje warianty najlepiej przystosowane do danej niszy, co określane jest procesem patoadaptacji [17]. Przykładem patoadaptacji jest poziom ekspresji nabytych genów wirulencji. U wielu patogenów nowo nabyte geny wirulencji podlegają kontroli genów regulatorowych istniejących już w genomie „przodka” patogenu (tj. szczepu, z którego dany patogen się wywodzi). U pałeczek *Shigella* ekspresja genów kodujących czynniki zaangażowane w inwazję oraz aparat sekrecji typu III (odpowiedzialny za sekrecję białek efektorowych), są ściśle regulowane temperaturą wzrostu. Geny te ulegają ekspresji tylko w temperaturze ciała ludzkiego, natomiast w niższych temperaturach następuje ich represja [47].

Zgodnie z przyjętą definicją, do gatunku należą szczepy wykazujące 70% podobieństwa, oznaczanego techniką hybrydyzacji DNA/DNA, gdzie różnica w temperaturze topnienia (ΔT_m) heterodupleksów, tj. dwuniciowych cząsteczek DNA powstałych w wyniku hybrydyzacji częściowo komplementarnych nici pochodzących z genomów obu badanych szczepów danego drobnoustroju, jest mniejsza niż 5°C [76]. Przy ustalaniu pozycji taksonomicznej drobnoustroju brane są również pod uwagę identyczność sekwencji genu 16S rDNA, która dla gatunku wynosi minimum 97% oraz zawartość zasad G+C w DNA. Tu różnica w obrębie

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; e-mail: urszula.kasprzykowska@umed.wroc.pl

danego gatunku nie może być większa niż 5 mol% zasad G+C [44, 67].

Pomimo przyjętych kryteriów klasyfikacji drobnoustrojów, modele matematyczne zastosowane do analizy sekwencji genomów wyraźnie wskazują, że zmienność genetyczna szczepów w obrębie jednego gatunku może być tak duża, iż nawet po zsekwencjonowaniu setek genomów różnych szczepów należących do danego gatunku, w dalszym ciągu będą wykrywane nieznanne dotąd geny [50, 72]. To spowodowało wprowadzenie pojęcia pangenu, rozumianego jak zbiór wszystkich genów wykrywanych u różnych szczepów danego gatunku [49]. Pangenom tworzą geny rdzeniowe wspólne dla wszystkich szczepów należących do danego gatunku oraz geny dodatkowe, których występowanie jest zróżnicowane i zmienne pomiędzy szczepami, a które często są nabywane na drodze HGT. Rozmiar pangenu danego gatunku równocześnie stanowi miarę plastyczności jego genomu. Zbiór genów danego gatunku może być ściśle zdefiniowany, a więc tworzyć pangenom zamknięty (np. *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Buchnera apidicola*) lub pangenom otwarty, cechujący gatunki o dużej plastyczności genetycznej (np. *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*) [50, 73]. Pangenom zamknięty zwykle cechuje drobnoustroje bytujące w środowiskach odizolowanych, uniemożliwiających swobodną wymianę informacji genetycznej, np. obligatoryjne pasożyty wewnątrzkomórkowe takie jak *Chlamydia trachomatis*, *Rickettsia prowazekii*, *Borrelia burgdorferii*, *Mycobacterium leprae* [53]. Powyższe tendencje dobrze ilustrują przykłady *Mycoplasma genitalium*, bakterii o najmniejszym jak dotąd opisanym genomie (tj. 580 kbp) oraz pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*, której genom obejmuje 6,3 Mbp [29,71]. O ile duży genom pałeczki ropy błękitnej zawiera informację genetyczną niezbędną bakterii do przeżycia w zmiennym środowisku zewnętrznym, o tyle redukcja genomu *Mycoplasma* odzwierciedla jego pasożytnicze przystosowanie do stabilnego środowiska wewnątrz komórek gospodarza. Mały rozmiar genomu jako wyraz zaawansowanego przystosowania bakterii do pasożytniczego trybu życia określane jest zjawiskiem „ewolucji poprzez redukcję” [20]. Redukcja wielkości genomu jako wyraz zmian ewolucyjnych obserwowana jest także wśród patogenów fakultatywnie wewnątrzkomórkowych np. u *Yersinia pestis*, bakterii która ewoluowała z gatunku *Yersinia pseudotuberculosis*, jak również u pałeczek *Shigella*, wywodzących się od niepatogennych *E. coli*. W przypadku pałeczek *Shigella* nabycie cech wirulencji związane było z utratą przez komensalne szczepy *E. coli* genów *ompT* i *cadA*, leżących w obrębie konserwatywnego ewolucyjnie odcinka DNA obecnego u 90% szczepów *E. coli*. Delecja tego odcinka DNA, nazywana „czarną dziurą”, występuje u pałeczek *Shigella* oraz enteroinwazyjnych

szczepów *E. coli*. Choć brakujący fragment DNA, poza genami *cadA* i *ompT*, zawiera również inne geny, jednak to brak tych, konkretnych genów decyduje o wirulencji szczepu. Gen *cadA* koduje dekarboksylazę lizyny, której aktywność katalityczna prowadzi do powstania kadaweryny, hamującej aktywność enterotoksyny. W ten sposób brak genu *cadA* i jego produktu promuje aktywność enterotoksyny. Z kolei proteinaza kodowana przez gen *ompT* zakłóca funkcję białka VirG, niezbędnego w procesie rozprzestrzeniania się w komórkach gospodarza [1, 46, 51]. Innym przykładem powstawania nowych patogenów na drodze ewolucji poprzez redukcję genomu są uropatogenne szczepy *E. coli* (UPEC – uropathogenic *E. coli*). Utrata fragmentów genomu UPEC, zawierających geny kodujące fimbrie typu 1, a także inaktywacja genów kodujących fimbrie typu P oraz F1C, doprowadziła do powstania nowej grupy szczepów *E. coli* określanych akronimem ABU (asymptomatic bacteriuria), które odpowiadają za asymptomatyczną bakteriurię. Inaktywacja kilku genów kodujących czynniki wirulencji UPEC spowodowała atenuację odczynu zapalnego w układzie moczowym gospodarza, co umożliwia szczepom ABU długotrwałą kolonizację bez wywoływania pełnoobjawowego zapalenia dróg moczowych [4]. Redukcja informacji genetycznej może dotyczyć nie tylko utraty pewnych genów, ale również ilości funkcjonalnego DNA poprzez mutacje [8, 53].

Gatunek *E. coli* obejmuje liczne, zróżnicowane pod względem chorobotwórczości szczepy, które doskonale obrazują plastyczność bakteryjnych genomów. Genomy patogennych szczepów *E. coli* są bardziej zróżnicowane i z reguły większe o ponad 1 Mbp (ok. 20% genomu) w stosunku do genomów szczepów komensalnych, co spowodowane jest procesami nabywania oraz utraty różnych genów. Zsekwencjonowane genomy różnych szczepów *E. coli* posiadają rdzeń zbudowany z ok. 2200 genów, ale pangenom składający się z ok. 13 000 genów [17, 59]. W obrębie gatunku nawet wielkość chromosomu *E. coli* jest zmienna i waha się w dużych granicach, od 3.9 do 5.5 Mbp, co wskazuje, że genom tej bakterii podlega ciągłym zmianom poprzez redukcję informacji genetycznej, jak i jej pozyskiwanie na drodze HGT [3, 21]. Dla przykładu: analiza genomu *E. coli* K12 szczepu MG1655 wykazała, że na jego kształt miało wpływ m.in. 37 addycji i 30 delecji różnych fragmentów DNA [54]. Genom pałeczki okrężnicy jest pangenomem otwartym. Szacuje się, że ok. 10–16% genów jej genomu zostało pozyskanych w procesach HGT [54]. Biorąc pod uwagę fakt, że pałeczka *E. coli* jest szeroko rozpowszechniona w środowisku zewnętrznym oraz stanowi składnik mikroflory jelit ludzi i zwierząt, pangenom chorobotwórczych szczepów *E. coli* może również stanowić ważny rezerwuuar informacji genetycznej dla innych drobnoustrojów [57, 59].

2. Mobilne elementy genetyczne

Mobilne elementy genetyczne (MGE – mobile genetic elements) definiowane są jako każdego rodzaju DNA zdolne do przemieszczania się w obrębie genomu lub pomiędzy genomami różnych prokariotów. MGE obecne w genomie danej komórki bakteryjnej określane są jako mobilom. Bakteryjne MGE najczęściej są mozaikowymi fragmentami DNA, które kodują różne determinanty wirulencji lub oporności na antybiotyki oraz enzymy i inne białka pośredniczące w ich przemieszczaniu się i integracji w obrębie genomu danej bakterii (mobilność wewnątrzkomórkowa) albo pomiędzy genomami różnych bakterii (mobilność międzykomórkowa). Wewnątrzkomórkowy transfer informacji genetycznej nosi nazwę transpozycji, natomiast biorące w nim udział mobilne elementy genetyczne generalnie nazywane są elementami transpozycyjnymi (TE – transposable elements). Przemieszczanie się fragmentu DNA w inną pozycję genomu prowadzi do jego rearanzacji i może odbywać się na drodze transpozycji konserwatywnej lub replikacyjnej. Międzykomórkowe przemieszczanie się DNA, a więc horyzontalny transfer genów (HGT) lub lateralny transfer genów (LTG – lateral gene transfer) prowadzi do wzbogacenia puli genów danego gatunku i u bakterii może odbywać się na drodze transformacji, koniugacji lub transdukcji [8, 9, 37].

3. Sekwencje insercyjne i transpozony

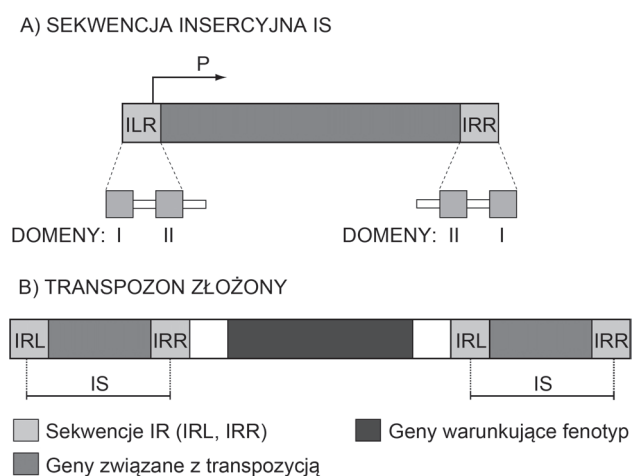
W wewnątrzkomórkowy transfer informacji genetycznej zaangażowane są liczne mobilne elementy transpozycyjne takie jak: sekwencje insercyjne i transpozony, integrony i kasety genowe, integracyjne elementy koniugacyjne oraz wyspy patogenności.

Sekwencje insercyjne IS (insertion sequence) i transpozony należą do mobilnych elementów genetycznych, które z powodu ich zdolności do częstej zmiany lokalizacji w obrębie chromosomu opisywane są jako „skaczące geny” [61]. Sekwencje IS są najprostszymi, mobilnymi elementami genetycznymi spotykanymi u prokariotów, które mogą dowolnie przemieszczać się w obrębie struktur DNA bez wymogu homologii sekwencji nukleotydowej pomiędzy wstawianą sekwencją IS a docelową sekwencją DNA, w którą elementy te wbudowują się (tzw. rekombinacja nieuprawniona). Z tego powodu sekwencje IS są nazywane „samolubnym DNA,” gdyż wbudowanie sekwencji IS w dowolny gen może spowodować jego unieczynnienie [22]. Sekwencje IS dzięki obecności w swojej strukturze promotora, po włączeniu się w dany gen mogą spowodować przerwanie jego ciągłości i unieczynnienie lub ulegać rekombinacji z DNA danego genu w regionie promotorowym, co doprowadzi do jego nadekspresji

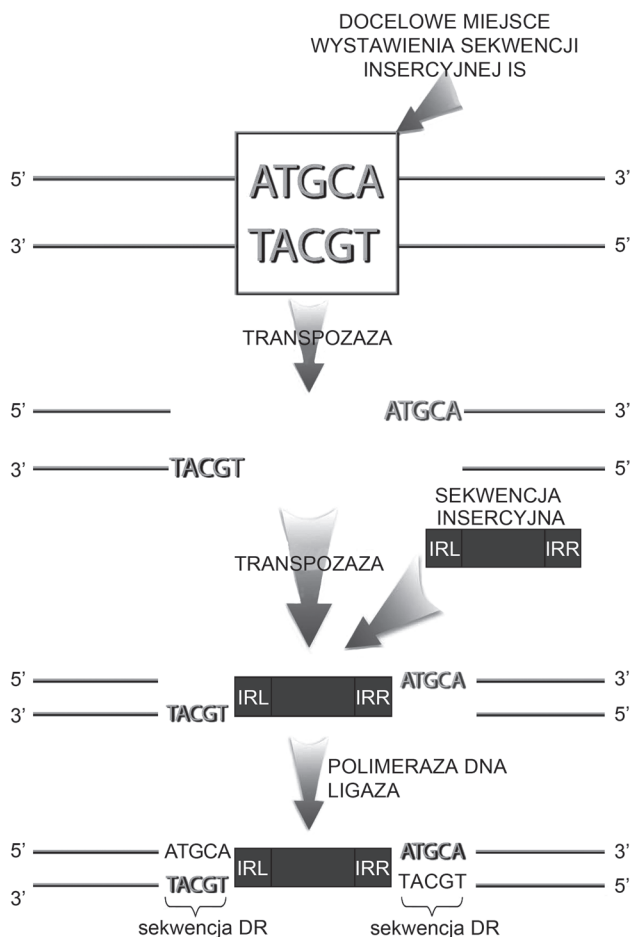
lub aktywacji nieaktywnego genu [24, 64]. Sekwencje IS, wbudowane po obu stronach fragmentu DNA o określonej wielkości, mogą ten fragment przenosić w obrębie genomu bakterii. Strukturę taką, tj. dowolny fragment DNA oflankowany sekwencjami IS, nazywa się transpozonom złożonym. Sekwencje insercyjne transpozonu złożonego często są identyczne o tej samej, bądź przeciwnej orientacji. Przemieszczanie sekwencji insercyjnych oraz transpozonów złożonych w obrębie DNA bakterii przypuszczalnie ma na celu ulokowanie tych elementów w innych, mobilnych jednostkach genetycznych, takich jak plazmidy lub transpozony koniugacyjne, które zdolne są do samodzielnego przemieszczania się między bakteriami [5, 7, 39, 62].

Wielkość sekwencji insercyjnych waha się w granicach 0,5–3 kbp. W centrum struktury sekwencji IS znajduje się gen kodujący transpozazę, tj. enzym katalizujący proces transpozycji. Na obu końcach sekwencji IS znajdują się tzw. odwrócone sekwencje powtórzone IR (inverted repeats), tj. IRL (inverted repeat left) po stronie lewej oraz IRR (inverted repeat right) po stronie prawej. Sekwencje IR są krótkimi fragmentami DNA o długości 10–40 pz, które w obrębie danej sekwencji IS często posiadają podobną lub identyczną sekwencję nukleotydów (Rys. 1).

IR pełnią ważną funkcję ponieważ zawierają miejsce wiązania transpozazy (tzw. domenę II) oraz miejsce nacięcia nici DNA, biorącej udział w transpozycji (tzw. domenę I) [40, 43]. Sekwencja IRL może ponadto zawierać część promotora transpozazy. Obecny w sekwencji IS promotor genu transpozazy zaliczany jest do promotorów słabych, warunkujących niski poziom ekspresji genów, które im podlegają [43].



Rys. 1. Organizacja strukturalna wybranych elementów transpozycyjnych: (A) Sekwencja insercyjna IS; IR (inverted repeats) odwrócone sekwencje powtórzone lewa i prawa (IRL, IRR); domeny I i II elementu IR odpowiedzialne za wiązanie enzymu transpozazy oraz za reakcję cięcia nici DNA; P – sekwencja promotorowa; (B) Transpozon złożony; IS – sekwencje insercyjne ograniczające obszar kodujący transpozonu złożonego



Rys. 2. Transpozycja sekwencji insercyjnej IS przy udziale enzymów transpozazy, polimerazy DNA oraz ligazy połączona z duplikacją miejsca docelowego

Cechą charakterystyczną sekwencji IS i transpozonów złożonych jest ich zdolność powielania krótkiego odcinka DNA, w którym dochodzi do transpozycji, a więc sekwencji docelowej nazywanej sekwencją DR (direct repeats). W miejscu nacięcia DNA w sekwencji docelowej transpozaza generuje tzw. lepkie końce DNA, które po wstawieniu sekwencji IS wypełniane są przez polimerazę DNA nukleotydami według reguł komplementarności, a następnie scalane przez ligazę. W efekcie docelowa sekwencja DR zostaje powielona, natomiast wbudowana sekwencja IS lub transpozon złożony zostają oflankowane identycznymi fragmentami DNA, charakterystycznymi dla danego elementu (Rys. 2).

Na podstawie podobieństwa struktury genetycznej sekwencji IS, homologii sekwencji aminokwasów w transpozazach oraz długości powielanych sekwencji docelowych DR, wyodrębniono 19 rodzin IS, które obejmują ponad 900 elementów izolowanych od ponad 200 gatunków bakterii [2]. Opisane sekwencje IS oznaczane są symbolem, który obejmuje pierwszą literę nazwy rodzaju oraz dwie pierwsze litery nazwy gatunkowej bakterii, u której wykryto daną sekwencję IS, a także numer wskazujący kolejność izolacji danej

sekwencji IS [43]. Dla przykładu, IS_{Pae4} oznacza sekwencję IS *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowaną jako 4 element tego rodzaju.

W przypadku transpozonów nazewnictwo jest bardziej skomplikowane i obejmuje dwa różne podziały. Według pierwszego podziału wyróżnia się sekwencje insercyjne IS i transpozony Tn. Według drugiego podziału transpozony dzieli się na grupy I i II. Do grupy I zalicza się sekwencje IS i transpozony złożone (w obu przypadkach mobilność elementu związana jest z obecnością sekwencji IS). Do grupy II, obejmującej tzw. transpozony niezłożone, zalicza się struktury o skomplikowanej budowie, które nie zawierają sekwencji IS, a których mobilność jest uwarunkowana obecnością wyspecjalizowanych białek kodowanych w obrębie ich struktury. Przykładem transpozonu grupy II jest transpozon Tn7, kodujący pięć białek (oznaczonych TnsA-TnsE), które w procesie transpozycji pełnią ściśle określone funkcje. Współdziałanie poszczególnych białek może prowadzić do przemieszczenia transpozonu Tn7 w ściśle określone miejsce na chromosomie (kompleks białek TnsABC+D) lub w przypadkowe miejsce na plazmidzie koniugacyjnym (kompleks białek TnsABC+E). Białka TnsA-TnsC pełnią rolę wspólną dla obu dróg transpozycji, odpowiadając za nacięcie końców 5' (białko TnsA) i 3' (białko TnsB) transpozonu Tn7, a także regulację całego procesu przemieszczenia transpozonu Tn7 (funkcja ATP – zależnego białka TnsC). Białka TnsD oraz TnsE mają zdolność aktywacji kompleksu TnsABC i promowania insercji transpozonu Tn7 w specyficzne miejsce oznaczone att₇Tn7 na chromosomie (białko TnsD) bądź niespecyficzną transpozycję na plazmid koniugacyjny (białko TnsE) [56]. Inne transpozony niezłożone, np. transpozon Tn3, również mogą wbudowywać się w przypadkowe, ale bogate w pary A+T miejsce na chromosomie. Wydaje się, że transpozony niezłożone wykazują większą predyspozycję do przemieszczania się w określone miejsca docelowe niż sekwencje IS, najczęściej wbudowujące się w przypadkowe sekwencje docelowe [13, 41].

Osobną kategorią transpozonów są transpozony koniugacyjne, oznaczane symbolem CTn (conjugative transpozon), najczęściej występujące w formie zintegrowanej z DNA chromosomalnym i zaliczane do większej grupy integracyjnych elementów koniugacyjnych, które zostały opisane w dalszej części artykułu.

Zarówno transpozony grup I i II, jak i transpozony koniugacyjne CTn, często niosą w swoich strukturach geny kodujące funkcje kataboliczne bakterii, oporność na jony metali ciężkich oraz antybiotyki, a także determinanty wirulencji. Chociaż uzyskanie drogą transferu horyzontalnego nowych cech fenotypowych kodowanych przez transpozony wydaje się korzystne, proces transpozycji może także generować mutacje ujemnie wpływające na metabolizm drobnoustroju, a nawet

prowadzić do jego śmierci. Proces transpozycji związany jest z powstawaniem mutacji o charakterze insercji, delekcji, powielenia, inwersji, a także translokacji dużych fragmentów DNA. Z tego powodu częstość transpozycji podlega ścisłej, wieloetapowej, negatywnej regulacji genetycznej, która obejmuje kontrolę poziomu transkrypcji genu transpozazy lub jej odpowiednika, hamowanie translacji, a także modulowanie aktywności czynnego enzymu. Dodatkowymi czynnikami negatywnej regulacji procesu transpozycji jest obecność w elementach transpozycyjnych słabych promotorów oraz szybka inaktywacja enzymu transpozazy [18, 19].

4. Integrony i kasety genowe

Pojęcie integronu zostało wprowadzone w 1989 r. dla określenia grupy mobilnych elementów genetycznych, zawierających determinanty genetyczne pozwalające na rekombinację zlokalizowaną genu lub genów kodujących oporność na antybiotyki [68]. W krótkim czasie badania integronów wykazały istnienie dwóch poziomów ich mobilności tj. zdolność przemieszczania się integronów rozumianych jako kompleks genów oporności i systemu rekombinacyjnego oraz zdolność samodzielnego przemieszczania się integronowych genów oporności na antybiotyki i rekombinacji specyficznej, poza strukturami danego integronu [32, 33, 35]. Dziś wiadomo, że faktyczną zdolność przemieszczania się w obrębie genomu mają tylko kasety genowe, integrony natomiast nie są mobilne jednak ze względu na fakt, że często spotyka się je na plazmidach koniugacyjnych bądź transpozozonach, uznawane są za struktury biorące udział w horyzontalnym transferze genów. Obecnie integrony definiuje się jako naturalne systemy rekombinacji zlokalizowanej, pozwalające na włączanie do swojej struktury genów w postaci kaset genowych oraz ich ekspresję [2].

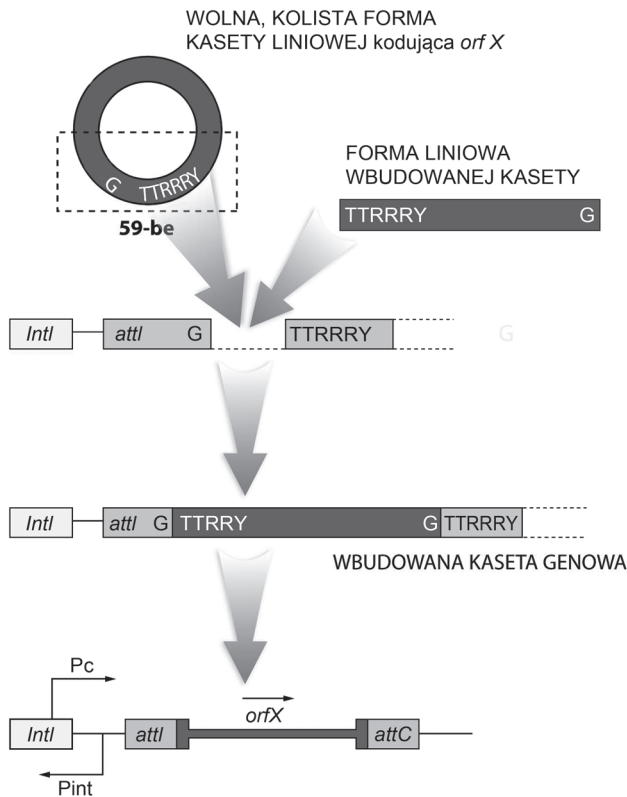
Wśród integronów wyróżnia się dwie grupy, tzw. superintegrony (SI – superintegrons), których istnienie wykryto w DNA chromosomalnym niektórych gatunków bakterii oraz integrony oporności (RI – resistance integrons) spotykane na plazmidach, transpozozonach i wyspach patogenności. Uważa się, że superintegrony stanowią formę, z której ewoluowały integrony oporności [23]. Na podstawie enzymu integrazy, integrony podzielone zostały na klasy. Dotychczas wyodrębniono 8 grup integronów opisanych jako integrony klas 1–8 oraz jedną klasę nieoznaczoną numerycznie (GeneBank AJ277063) [52]. Integrony klasy 1 są największą i najlepiej poznaną klasą integronów [23, 30].

Integrony oporności rozpowszechnione są przede wszystkim wśród bakterii Gram-ujemnych, natomiast u bakterii Gram-dodatnich występują znacznie rzadziej [14, 27, 65, 75]. Najczęściej integrony wykrywane są

wśród szczepów klinicznych, związanych ze środowiskiem szpitalnym, choć ich obecność opisano także wśród bakterii środowiskowych [52]. Integrony wykryte u dzikich szczepów bakterii często nie posiadają żadnych wbudowanych kaset genowych i stąd nazywa się je zerowymi. Wykazanie obecności integronów u bakterii środowiskowych, żyjących z dala od siedzib ludzkich, a więc nie podlegających bezpośredniej presji antybiotykowej, sugeruje iż integrony są naturalną składową genomu bakterii [6, 48].

O aktywności integronu decyduje tzw. konserwatywny segment 5' DNA, określane jako 5'CS (5' conserved segment). W jego obrębie znajdują się: gen (*int*) kodujący enzym integrazę, która dokonuje rekombinacji wbudowywanego do integronu elementu, sekwencja *attI*, będąca miejscem działania integrazy oraz dwa promotory P_{int} i P_c ułożone przeciwległe (promotor P_{int} zapewnia ekspresję genu integrazy, natomiast promotor P_c umożliwia ekspresję genów włączonych w postaci kaset genowych) [42, 60]. Zarówno geny kodujące integrazę, jak i sekwencje *attI*, różnią się od siebie w poszczególnych klasach integronów, dlatego oznacza się je wskazując klasę integronu, z której się wywodzą (np. *intI1*, *intI2*, *attI1*, *attI2* itd.) [36]. Integraza kodowana przez gen *intI* należy do tej samej grupy enzymów, rekombinaz tyrozynowych, co integraza bakteriofaga λ . Jej funkcja polega na przeprowadzeniu rekombinacji pomiędzy sekwencjami *attI* integronu a sekwencją 59-be, należąca do wbudowywanej lub usuwanej kasety genowej. Struktura kasety genowej jest stosunkowo prosta. Tworzy ją otwarta ramka odczytu (ORF) wraz z krótką sekwencją, określaną jako 59-be (59-base element). Sekwencja 59-be może mieć różną wielkość, od 57 do 141 pz. [69]. Kasety genowe mogą posiadać strukturę liniową, włączoną w integron lub prezentować struktury kowalencyjnie zamknięte, znajdujące się w cytoplazmie bakterii, które nie mając zdolności samodzielnej replikacji są tracone, o ile nie zostaną wbudowane przez integrazę w struktury integronu [15]. Ponieważ w większości przypadków kasety genowe nie posiadają własnego promotora, zawarta w nich informacja genetyczna nie ulega ekspresji. Stąd, utrzymanie informacji genetycznej niesionej w kasecie genowej oraz jej ekspresja zależą od poprawnej rekombinacji integronu. Miejscem rekombinacji zlokalizowanej, katalizowanej przez integrazę jest charakterystyczna sekwencja GTTRRRY (R = reszta pirymidynowa, Y = reszta purynowa), znajdująca się w obrębie sekwencji *attI* oraz 59-be [34, 69]. Kasety genowe w większości przypadków nie kodują własnych promotorów, więc po włączeniu się w strukturę integronu przechodzą pod kontrolę promotora P_c , leżącego w obrębie genu integrazy (Rys. 3).

Promotor P_c jest promotorem uniwersalnym, mogącym funkcjonować u różnych gatunków bakterii,



Rys. 3. Schemat insercji kasety genowej w strukturę integronu. Kasetka genowa w formie liniowej jest precyzyjnie włączana pomiędzy sekwencje G i TTRRRY, należące do sekwencji *attI*. Ponieważ wbudowywana kasetka genowa posiada własną sekwencję GTTRRRY a rekombinacja zachodzi według zasad komplementarności, efektem integracji kasety genowej jest obecność sekwencji GTTRRRY po obu jej stronach, co pozwala na włączanie w strukturę integronu kolejnych kaset genowych. Ponieważ sekwencja GTTRRRY jest hybrydą pochodzącą ze składowych sekwencji *attI* i 59-be, dla zaznaczenia tego faktu hybrydową sekwencję GTTRRRY, powstającą pomiędzy kolejnymi włączanymi do integronu kasetami genowymi opisuje się jako *attC*

choć równocześnie wykazującym nieznaczne różnice w sekwencji nukleotydowej w obrębie poszczególnych klas integronów, czego skutkiem jest różna jego aktywność. Poziom ekspresji poszczególnych genów znajdujących się pod wpływem promotora P_c bywa zróżnicowany i jest uzależniony od miejsca oddalenia danego genu od promotora. Silniejszej ekspresji ulegają geny położone najbliżej promotora, stąd lokalizacja integronu nie pozostaje bez znaczenia [16, 42, 55].

Pomimo, że integrony związane są z horyzontalnym transferem genów oporności na antybiotyki i środki dezynfekcyjne, w struktury integronów mogą być włączane kasetki genowe, niosące geny kodujące czynniki wirulencji lub enzymy [77]. *Marquez* i wsp. [45] wykazali u pałeczek *E. coli* obecność integronu klasy 2, zawierającego oprócz kasetki z genem oporności na antybiotyki, drugą kasetkę prawdopodobnie kodującą proteazę serynową, uczestniczącą w biosyntezie lipopolisacharydu. Podobnie, u szczepu *Acinetobacter*

wykryto obecność integronu klasy 1, zawierającego dwie kasetki genowe, z których jedna niosła gen oporności na antybiotyki, druga natomiast zawierała gen dla reduktazy sulfotlenku metioniny, zwiększającej u bakterii tolerancję na stres tlenowy [28].

Według *Stokes* oraz *Gillings* [70] propagacja cech wirulencji zawartych w kasetkach genowych na drodze transferu horyzontalnego jest kolejnym etapem ewolucji bakterii patogennych, które w ten sposób uzyskują przewagę selekcyjną.

5. Integracyjne elementy koniugacyjne/ integrony koniugacyjne

Integracyjne elementy koniugacyjne (ICE – integrative and conjugative elements) stanowią różnorodną grupę mobilnych elementów genetycznych obecnych u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, które u bakterii-dawcy pierwotnie zlokalizowane są na chromosomie, ale mają zdolność wyłączenia się z genomu i koniugacyjnego transferu do bakterii-biorcy. Pomimo, że ICE prezentują różne mechanizmy promujące ich integrację, transfer oraz regulację, posiadają również wiele cech wspólnych, na podstawie których zaliczane są do tej samej grupy mobilnych elementów genetycznych. ICE obejmują wszystkie (także transpozony koniugacyjne), samoreplikujące się, zdolne do integracji i koniugacji ruchome elementy genetyczne, bez względu na prezentowane mechanizmy koniugacji oraz integracji, niezależnie czy zachodzi ona w miejscu o minimalnej lub restrykcyjnej swoistości sekwencji DNA. Uważa się, że niektóre genomowe, niemobilne wyspy patogenności również należą do defektywnych ICE, które utraciły zdolność transferu koniugacyjnego. Jako moduły fizycznie związane z chromosomem, integracyjne elementy koniugacyjne są niezwykle trudne do identyfikacji eksperymentalnej, lecz analizy genomów bakteryjnych bazujące na programach komputerowych (tzw. analizy *in silico*) wskazują, że są one szeroko rozpowszechnione wśród wielu drobnoustrojów [11, 78].

ICE łączą w sobie cechy innych, mobilnych elementów genetycznych takich jak: a) fagi, które mogą włączać się i wyłączać z chromosomu bakteryjnego, ale nie są przenoszone horyzontalnie, b) transpozonów, które podobnie jak fagi mogą włączać się i wyłączać z chromosomu bakteryjnego i są przenoszone horyzontalnie oraz c) plazmidy koniugacyjne, przenoszone z bakterii-dawcy do bakterii-biorcy w procesie koniugacji, zdolne do autonomicznej replikacji [78]. Integracyjne elementy koniugacyjne w przeciwieństwie do fagów nie potrafią utrzymać się w formie pozachromosomalnej w cytoplazmie bakterii i replikują się tylko wraz z chromosomem, z którym są zintegrowane. Wszystkie integracyjne elementy koniugacyjne posiadają strukturę

zorganizowaną w trzy moduły genów, które odpowiadają za ich integrację z chromosomem, wyłączanie się z genomu i koniugację oraz geny regulatorowe [10, 78].

Wszystkie ICE kodują integrację (Int), która umożliwia integrację z chromosomem oraz jest konieczna, poza innymi czynnikami zaangażowanymi w ten proces, w procesie wycinania integracyjnego elementu koniugacyjnego. Integrazy ICE determinując miejsce insercji ICE, a nierzadko także częstość wyłączania się tych elementów z chromosomalnego DNA, stanowią kluczowy czynnik kontrolujący koniugacyjny transfer ICE. Najlepiej poznanym przedstawicielem integraz ICE jest integraz kodowana przez faga lambda (λ), która wykazuje 46% podobieństwa sekwencji z homologicznym białkiem lamboidalnego faga $\phi 80$. Podobnie, wiele ICE integruje się z chromosomem w sposób podobny do faga λ . Integraz pośredniczy w procesie integracji elementu ICE w regionie kodującym 3'tRNA chromosomu, który umożliwia utworzenie optymalnej, konserwatywnej sekwencji pomiędzy *attB* i *attP*, tj. sekwencjami ograniczającymi elementy ICE. Aby przenieść się z bakterii-dawcy do bakterii-biorcy zintegrowany element ICE musi uprzednio zostać wycięty z chromosomu. Proces ten zachodzi w kierunku odwrotnym do procesu integracji z pozostawieniem miejsca insercji w stanie nietkniętym, dzięki ewolucyjnie konserwatywnemu mechanizmowi rekombinacji przeprowadzonej przez integrazę ICE. Poza integrazą, proces wycinania promują tzw. czynniki ukierunkowania rekombinacji RDF (recombination directionality factor), które są małymi, dodatnio-naładowanymi białkami wiążącymi DNA, wpływającymi na architekturę DNA oraz interakcje DNA z białkami. RDF promując wycinanie elementu ICE równocześnie hamują integrację tych elementów z chromosomem. Dynamika integracji i wycinania jest cechą swoistą każdego integracyjnego elementu koniugacyjnego [78]. Elementy ICE (np. Tn916 lub Tn916-podobne) wykryto u licznych Proteobakterii (np. *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *E. coli*, *Haemophilus* spp.), a także u *Actinobacteria* i *Firmicutes*. ICE nadając bakteriom różne cechy np. oporność na antybiotyki, jony metali ciężkich, zdolność metabolizmu aminokwasów aromatycznych lub wiązania azotu, ale także np. zdolność kolonizacji tkanek gospodarza, tworzenia biofilmu lub inne determinanty związane z wirulencją, mają zasadniczy wpływ na plastyczność bakteryjnych genomów [10, 26, 66, 78]. Kształtując bakteryjne genomy elementy ICE promują zróżnicowanie szczepów w obrębie gatunków oraz rozprzestrzenianie się czynników wirulencji pomiędzy niespokrewnionymi rodzajami bakterii. Dzięki wykorzystywaniu konserwatywnych miejsc integracji z chromosomem, elementy ICE mogą ponadto ułatwiać insercję innych modułów DNA, np. wysp genomowych [10, 12].

6. Wyspy patogenności

Wraz z rozwojem techniki sekwencjonowania możliwe stało się porównywanie całych genomów różnych drobnoustrojów. Jednym z zaskakujących odkryć analiz porównawczych było to, że genomy bakterii często zawierają „obce DNA,” nierzadko w znaczących ilościach, które w przypadku pałeczek *E. coli* może stanowić nawet 16% całego genomu [31, 38]. Główna część genomu bakterii (70–80% DNA genomowego) zawiera stosunkowo homogenną ilość molową par G+C i stanowi konserwatywny, stabilny rdzeń genomu, który zawiera informację genetyczną dotyczącą podstawowych funkcji komórki bakteryjnej. „Obce odcinki DNA” mogą obejmować region od 10 kbp do 200 kbp chromosomalnego DNA o różnej niż genom danego drobnoustroju zawartości molowej par G+C. Te osobliwe odcinki DNA, nie pasujące pod względem zawartości par C+G do reszty genomu, zostały nazwane wyspami patogenności (PAI – pathogenicity associated island) u bakterii chorobotwórczych lub wyspami genomowymi u bakterii niepatogennych (GEI – genomic islands) [25, 63]. Dodatkowo niektóre szczepy patogenne posiadają mniejsze odcinki obcego DNA (1–10 kbp), określane jako wysepki patogenności. Chociaż większość PAI zlokalizowana jest na chromosomie, wyspy patogenności mogą być również częścią bakteryjnych plazmidów lub profagów [31].

Najprościej PAI definiowane są jako mobilne regiony DNA, zawierające geny wirulencji, które występują w genomach szczepów patogennych, lecz są nieobecne w genomach ich niechorobotwórczych odpowiedników. Swoją mobilność wyspy patogenności zawdzięczają obecności ruchomych elementów genetycznych takich jak sekwencje insercyjne (IS), transpozony, integrony lub profagi, dzięki którym te duże bloki DNA są przekazywane na drodze HGT pomiędzy bakteriami tego samego lub różnych gatunków. Niekiedy wyspy patogenności mogą przemieszczać się w obrębie chromosomu [38]. Cechą charakterystyczną opisanych dotychczas wysp patogenności jest obecność w obu regionach ograniczających odcinki „obcego DNA” tzw. bezpośrednich powtórzeń (DR – direct repeats). Sekwencje DR prawdopodobnie tworzone są podczas procesu wbudowywania się w genom bakterii tzw. elementów pre-PAI, tj. bakteriofagów lub plazmidów. Dodatkowo, segmenty DR mogą stanowić cel aktywności integraz wycinających wyspę patogenności z genomu w procesie jej delekcji [31]. W obrębie wysp patogenności występują różnorodne geny warunkujące ich mobilność, szczególnie geny kodujące fagowe integrony oraz transpozony [31, 63]. Obecność oraz funkcjonalność tych genów jest różna pomiędzy wyspami patogenności, od genów kodujących funkcjonalne enzymy, po geny kodujące nieczynne

enzymy. Opisano również wyspy patogenności nie zawierające genu integrazy [31].

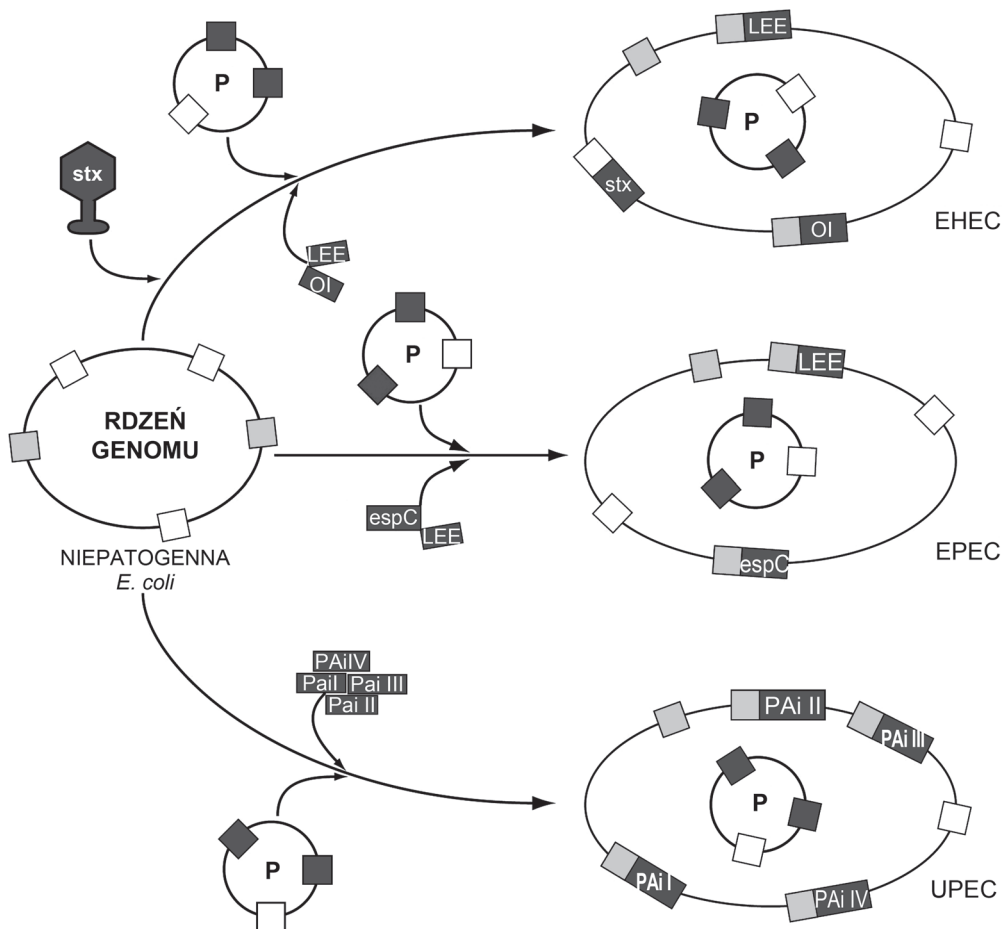
Okolo 75% opisanych wysp patogenności posiada geny tRNA, które często stanowią miejsce integracji obcogatunkowego DNA. Jednym z genów tRNA często związanym z wyspami patogenności jest gen *selC*, kodujący seleno-cysteinowo swoiste tRNA^{sec}. Locus *selC* towarzyszy trzem wyspom patogenności u trzech różnych patotypów *E. coli*, a także PAI obecnym u pałeczek *Salmonella enterica* i *Shigella flexneri*.

Pomimo, że wyspy patogenności często posiadają własne geny regulatorowe, określające ekspresję genów zawartych w ich obrębie, geny te mogą także regulować ekspresję genów spoza wyspy patogenności i odwrotnie, geny spoza wyspy patogenności mogą regulować ekspresję genów kodowanych przez wyspę patogenności. Geny regulatorowe spoza wyspy patogenności regulują przede wszystkim ekspresję genów wirulencji kodowanych przez PAI, ale także regulatory obecne u patogenych i niepatogennych szczepów, które z kolei poza

genami wirulencji mogą regulować ekspresję genów podstawowego metabolizmu bakterii [31]. Zespoły genów zawarte w obrębie wysp patogenności mogą kodować te cechy drobnoustroju, które przyczyniają się do jego chorobotwórczości, np. adhezyny, toksyny, mechanizmy inwazji do komórek gospodarza lub cechy ułatwiające adaptację do danej niszy ekologicznej (np. systemy wychwytu jonów żelaza). Często wyspy patogenności kodują systemy sekrecji typu III lub IV, umożliwiające bakterii sekrecję białek efektorowych wprost do cytozolu komórki gospodarza, które wpływają na jej funkcje (np. promują apoptozę lub internalizację patogenu, zaburzają szlaki sygnałowe lub metaboliczne w komórce gospodarza). Wyspy patogenności mogą także obejmować geny kodujące oporność na antybiotyki (Rys. 4) [38].

Pomimo, że opisane dotychczas wyspy patogenności mają zróżnicowaną strukturę i funkcje, posiadają wiele cech wspólnych, a mianowicie:

a) zawierają jeden lub więcej genów wirulencji;



Rys. 4. Przykład ewolucji patogennych szczepów *E. coli*. EHEC, enterokrwtoczne szczepy *E. coli*; EPEC, enteropatogenne szczepy *E. coli*; UPEC, uropatogenne szczepy *E. coli*; LEE, wyspa patogenności EPEC i EHEC obejmująca geny odpowiedzialne za zdolność szczepu do reorganizacji aktywnej i indukcji swoistych zmian histopatologicznych w komórkach nabłonka jelita; OI, O wyspa; *stx*, bakteriofag niosący gen kodujący toksyny shiga; *espC*, gen kodujący wydzielniczą proteazę *E. coli*, znajdujący się na wyspie patogenności *espC* PAI; PAI I–IV, wyspy patogenności UPEC; P, plazmid; kolorem czerwonym oznaczono ruchome elementy genetyczne, obejmujące geny wirulencji; kolorem zielonym i szarym oznaczono konserwatywne sekwencje DNA chromosomalnego i plazmidowego.

- b) występują u szczepów chorobotwórczych, ale są nieobecne u niepatogennych odpowiedników tych szczepów;
- c) są to elementy duże (zwykle > 40 kbp; 10–200 kbp), które mogą zawierać mniejsze inserty (1–10 kbp) tzw. wysepki patogenności;
- d) z reguły różnią się od reszty genomu zawartością molową par G+C, choć różnice te mogą nie występować jeżeli DNA bakterii dawcy i biorcy wykazują identyczną lub bardzo podobną zawartość zasad G+C;
- e) są oflankowane swoistymi sekwencjami DR (bezpśrednimi powtórzeniami), które powstają podczas integracji z chromosomem na drodze rekombinacji genetycznej;
- f) zwykle są związane z konserwatywnymi ewolucyjnie genami tRNA, które przypuszczalnie stanowią miejsce integracji obcogatunkowego DNA;
- g) często posiadają geny lub kryptyczne pseudogeny warunkujące mobilność np. sekwencje insercyjne (IS), transpozony, integrony lub profagi;
- h) najczęściej wykazują mozaikową strukturę wskazującą na akumulację horyzontalnie nabywanych, kolejnych genów wirulencji;
- i) z uwagi na zawartość licznych sekwencji insercyjnych, są względnie niestabilne i mogą ulegać delecji [31, 38, 63].

7. Podsumowanie

Plastyczność genomu bakteryjnego, a więc zdolność do pozyskiwania, rearanżacji i modyfikacji poprzez mutacje nowego materiału genetycznego od innych mikroorganizmów jest cechą wszystkich drobnoustrojów, a także narzędziem ewolucji. Natężenie zjawisk między- i wewnątrzkomórkowego transferu informacji genetycznej z udziałem mobilnych elementów genetycznych takich jak sekwencje insercyjne, transpozony, kasety genowe integronów, wysp patogenności i integracyjne elementy koniugacyjne, jest cechą osobniczą i wydaje się być funkcją już istniejącego przystosowania do warunków życia danego organizmu. Drobnoustroje wysoce przystosowane do zajmowanej określonej niszy lub żyjące w środowiskach odizolowanych wykazują pangenom zamknięty, a plastyczność ich genomu wyraża się często poprzez wyzbywanie się zbędnej, obciążającej metabolizm komórki informacji genetycznej, a więc poprzez tzw. ewolucję przez redukcję. Większość mikroorganizmów cechuje jednak pangenom otwarty. Intensywność zachodzących u tych organizmów zmian genetycznych skutkuje pojawianiem się szczepów bardziej wirulentnych i niezmiernie zróżnicowanych genetycznie nawet w obrębie jednego gatunku.

Piśmiennictwo

1. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiry A., Carniel E.: *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14043–14048 (1999)
2. Baj J., Markiewicz Z. (red.), *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2006; s. 422–423.
3. Bergthorsson U., Ochman H.: Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 6–16 (1998)
4. Bielaszewska M., Zdziarski J. i wsp.: Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**, 625–639 (2007)
5. Bisercic M., Ochman H.: The ancestry of insertion sequences common to *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **175**, 7863–7868 (1993)
6. Boucher Y., Labbate M., Koenig J.E., Stokes H.W.: Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* **15**, 301–309 (2007)
7. Bourgoin F., Guedon G., Pebay M., Roussel Y., Panis C., Decaris.: Characterization of a mosaic ISS1 element and evidence for the recent horizontal transfer of two different types of ISS1 between *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Gene*, **178**, 15–23 (1996)
8. Brunder W., Karch H.: Genome plasticity in *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 153–165 (2000)
9. Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., Ron E., Hacker J., Dobrint U., Adaptation of pathogenic *E. coli* to various niches: genome flexibility is the key (w) *Microbial Pathogenomics*. Genome Dyn, red. H. de Reuse, S. Bereswill, Krager, Basel, 2009; **6**, s. 110–125.
10. Burrus V., Waldor M.K.: Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* **155**, 376–386 (2004)
11. Burrus V., Marrero J., Waldor M.K.: The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid*, **55**, 173–183 (2006)
12. Ceccarelli D., Daccort A., Rene M., Burrus V.: Identification of the origin of transfer (oriT) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *J. Bacteriol.* **15**, 5328–5338 (2008)
13. Choi K.H., Kim K.J.: Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19** (3), 217–228 (2009)
14. Clark N.C., Olsvik O., Swenson J.M., Spiegel C.A., Tenover F.C.: Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (aadA) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 157–160 (1999)
15. Collis C.M., Hall R.M.: Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* **19**, 2875–2885 (1992)
16. Collis C.M., Hall R.M.: Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 155–162 (1995)
17. Croxen M.A., Finlay B.B.: Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 26–38 (2010)
18. Derbyshire K.M., Kramer M., Grindley N.D.: Role of instability in the cis action of the insertion sequence IS903 transposase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4048–4052 (1990)
19. Derbyshire K.M., Grindley N.D.: Cis preference of the IS903 transposase is mediated by a combination of transposase instability and inefficient translation. *Mol. Microbiol.* **21**, 1261–1272 (1996)

20. Dobrindt U, Hacker J.: Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 550–557 (2001)
21. Dobrindt U: (Patho-) Genomics of *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **6–7**, 357–371 (2005)
22. Doolittle W.F., Kirkwood T.B., Dempster M.A.: Selfish DNAs with self-restraint. *Nature*, **307**, 501–502 (1984)
23. Fluit A.C., Schmitz F.J.: Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 272–288 (2004)
24. Galas D.J., Chandler M.: Bacterial insertion sequences (w) Mobile DNA, red. D.E. Berg, M.M. Howe, ASM. Washington, 1989, s. 109–162.
25. Gal-Mor O., Finlay B.B.: Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol.* **8**, 1707–1719 (2006)
26. Garriss G, Waldor M.K., Burrus V.: Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity. *PLOS Genetics*, **5**, e1000775 (2009)
27. Gibreel A., Skold O.: An integron cassette carrying *dfri* with 90-bp repeat sequences located on the chromosome of trimethoprim-resistant isolates of *Campylobacter jejuni*. *Microb. Drug Resist.* **6**, 91–98 (2000)
28. Gillings M.R., Labbate M., Sajjad A., Giguere N.J., Holley M.P., Stokes H.W.: Mobilization of a Tn402-like class 1 integron with a novel cassette array via flanking miniature inverted-repeat transposable element-like structures. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 6002–6004 (2009)
29. Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Smith H.O., Center J.C.: Essential genes of a minimal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **10**, 425–430 (2006)
30. Goldstein C., J.J. Maurer i wsp.: Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 723–726 (2001)
31. Hacker J., Kaper J.B.: Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 641–679 (2000)
32. Hall R.M., Brookes D.E., Stokes H.W.: Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* **5**, 1941–1959 (1991)
33. Hall R.M., Vockler, C.: The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to beta-lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonamides is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. *Nucleic Acids Res.* **15**, 7491–74501 (1987)
34. Hall R.M., Brookes D.E., Stokes H.W.: Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* **5**, 1941–1959 (1991)
35. Hall R.M., Collis C.M.: Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**, 593–600 (1995)
36. Hall R.M., Collis C.M., Kim M.J., Partridge S.R., Recchia G.D., Stokes H.W.: Mobile gene cassettes in evolution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **87**, 68–80 (1999)
37. Hensel M., Schmidt H., Horizontal gene transfer in the evolution of pathogens (w) *Advances in Molecular and Cellular Microbiology*, red. M. Hensel, H. Schmidt, Cambridge Univ. Press, New York, 2008; s. 49–158.
38. Hentschel U., Hacker J.: Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microb. Infect.* **3**, 545–548 (2001)
39. Kato K., Ohtsuki K., Mitsuda H., Yomo T., Negoro S., Urabe I.: Insertion sequence IS6100 on plasmid pOAD2, which degrades nylon oligomers. *J. Bacteriol.* **176**, 1197–1200 (1994)
40. Kleckner N.: Transposable elements in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **15**, 341–404 (1981)
41. Lett M.C.: Tn3-like elements: molecular structure, evolution. *Biochimie*, **70**, 167–176 (1988)
42. Levesque C., Brassard S., Lapointe J., Roy P.H.: Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic resistance genes of several integrons. *Gene*, **142**, 49–54 (1994)
43. Machillon J., Chandler M.: Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 725–774 (1998)
44. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Święcicka I., Studzińska B.: W poszukiwaniu koncepcji gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* **44**, 323–328 (2005)
45. Marquez C., Labbate M., Ingold A.J.: Recovery of a functional class 2 integron from *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4153–4154 (2008)
46. Maurelli A.T., Fernandez R.E., Bloch C.A., Rode C.K., Fasano A.: “Black holes” and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3943–3948 (1998)
47. Maurelli A.T.: Black holes, antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **267**, 1–8 (2007)
48. Mazel D.: Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 608–620 (2006)
49. Mediani D., Donati C., Tettelin H., Massignani V., Rappuoli R.: The microbial pan-genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 589–594 (2005)
50. Mira A., Martin-Cuadrado A.B., D’Auria G., Rodriguez-Valera.: The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbial. *Int. Microbiol.* **13**, 45–57 (2010)
51. Nakata N., Tobe T., Fukuda I., Suzuki T., Komatsu K., Yoshikawa M., Sasakawa C.: The absence of a surface protease, OmpT, determines the intercellular spreading ability of *Shigella*: the relationship between the *ompT* and *kcpA* loci. *Mol. Microbiol.* **9**, 459–468 (1993)
52. Nield B.S., Holmes A.J., Gillings M.R., Rechia G.D., Mabbutt B.C., Nevalainen K.M., Stokes H.W.: Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**, 59–65 (2001)
53. Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A.: Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, **405**, 299–304 (2000)
54. Ochman H., Jones I.B.: Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **19**, 6637–6643 (2000)
55. Papagiannitsis C.C., Tzouveleki L.S., Miriagou V.: Relative strengths of the class 1 integron promoter hybrid 2 and the combinations of strong and hybrid 1 with an active P2 promoter. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 277–280 (2009)
56. Parks A.R., Peters J.E.: Transposon Tn7 is widespread in diverse bacteria and forms genomic islands. *J. Bacteriol.* **189**, 2170–2173 (2007)
57. Pupo G.M., Lan R., Reeves P.R.: Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10567–10572 (2000)
58. Ragan M.A., Beiko R.G.: Lateral genetic transfer: open issues. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364**, 2241–2251 (2009)
59. Rasko D.A., Rosovitz M.J., Myers G.S., Mongodin E.F., Fricke W.F., Gajer P., Crabtree J., Sperandio V., Ravel J.: The pan-genome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* **190**, 6881–6893 (2008)
60. Recchia G.D., Stokes H.W., Hall R.M.: Characterization of specific and secondary recombination sites recognized by the integron DNA integrase. *Nucl. Acid. Res.* **22**, 2071–2078 (1994)

61. Sansonetti P., Bacterial virulence: basic principles, models and global approaches. Wiley-Blackwell, 2010; s. 3–16.
62. Sawyer S.A., Dykhuizen D.E., DuBose R.F., Green L., Mutangadura-Mhlanga T., Wolczyk D.F., Hartl D.L.: Distribution and abundance of insertion sequences among natural isolates of *Escherichia coli*. *Genetics*, **115**, 51–63 (1987)
63. Schmidt H., Hensel M.: Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 14–56 (2004)
64. Scordilis G.E., Ree H., Lessie T.G.: Identification of transposable elements which activate gene expression in *Pseudomonas cepacia*. *J. Bacteriol.* **169**, 8–13 (1987)
65. Shengjie G., Yanmei L., Jin C., Li W., Xihong Z., Nanjing Z., Shaopeng Q., Junxing C., Yanyan L.: First observation of excision and integration in Class 1 integron in staphylococci. *African J. Biotechnol.* **10**, 12847–12851 (2011)
66. Sitkiewicz I., Green N.M., Gou N., Mereghetti L., Musser J.M.: Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. *BMC Microbiol.* **11**, 65 (2011)
67. Stackebrandt E., Goebel B.M.: Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **44**, 846–849 (1994)
68. Stokes H.W., Hall R.M.: A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* **3**, 1669–1683 (1989)
69. Stokes H.W., O’Gorman D.B., Recchia G.D., Parsekhian M., Hall R.M.: Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol. Microbiol.* **26**, 731–745 (1997)
70. Stokes H.W., Gillings M.R.: Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 790–819 (2011)
71. Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrener P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M.: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, 959–964 (2001)
72. Tettelin H., C.M. Fraser i wsp.: Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial pan-genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13950–13955 (2005)
73. Tettelin H., Riley D., Cattuto C., Medini D.: Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 472–477 (2008)
74. Thomas C.M., Nielsen K.M.: Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 711–721 (2005)
75. Van Belkum A., Goessens W., van der Schee C.: Rapid emergence of ciprofloxacin resistant *Enterobacteriaceae* containing multiple gentamycin resistance-associated integrons in a Dutch hospital. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 862–871 (2001)
76. Wayne L.G., H.G. Truper i wsp.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **37**, 463–464 (1987)
77. Wolinowska R., Masny A., Płucienniczak A.: Integrony. *Kosmos*, **51**, 353–364 (2002)
78. Woźniak R.A., Waldor M.K.: Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 552–563 (2010)
79. Zaneveld J.R., Nemergut D.R., Knight R.: Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology*, **154**, 1–15 (2008)

