

RENATA WOLINOWSKA^{1,2}, ALEKSANDER MASNY¹ i ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK¹

¹*Instytut Biotechnologii i Antybiotyków
Starościńska 5, 02-516 Warszawa
wolinowskar@iba.waw.pl*

²*Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Akademia Medyczna
Oczki 3, 02-007 Warszawa*

INTEGRONY

Integrony są elementami genetycznymi, które zaobserwowano stosunkowo niedawno w genomach kilku różnych rodzajów bakterii Gram-ujemnych, są one związane z obecnością genów oporności na antybiotyki i środki dezynfekcyjne. Od lat poświęca się wiele uwagi zjawisku narastania lekooporności u bakterii, ukazuje się wiele prac opisujących geny warunkujące to zjawisko. Zaobserwowano, że geny nadające komórkom oporność na różne antybiotyki, zlokalizowane w plazmidach, w obszarze transpozonów lub po prostu w chromosomalnym DNA bakterii, posiadają w swoim otoczeniu silnie homologiczną sekwencję. Analiza otoczenia genów oporności doprowadziła do odkrycia struktur, które w 1989 r. nazwano integronami.

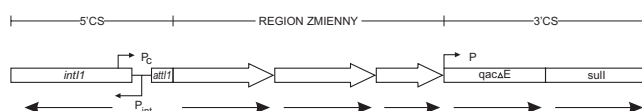
Integrony opisuje się jako elementy genetyczne zdolne do włączania kaset genowych przez umiejscowioną rekombinację (ang. site-specific recombination). Włączanie to umożliwia enzym integraza, kodowany w obrębie integronu. Bardzo szczególną strukturą jest kaset genowa. Jest to mobilny element integronu, może ona istnieć jako forma liniowa, włączona do struktury integronu, lub jako kolistą, kowalencyjnie zamkniętą cząsteczką, występującą w cytoplazmie komórki. Ta struktura przypomina nieco plazmid, z tą wszakże róż-

nicą, że kaset nie ma zdolności autonomicznej replikacji w komórce, a ramka odczytu znajdująca się w kasecie nie posiada promotora transkrypcji. Włączenie kasety do struktury integronu nadaje jej zdolność replikacji i umożliwia ekspresję ramki odczytu, którą niesie kaset. Mobilnym elementem integronu jest więc kaset genowa, a jednocześnie wszystkich funkcji niezbędnych do jej ekspresji i utrzymania się w komórce dostarcza integron. Kaset w formie kolistej, która nie zostanie włączona do struktury integronu, jest nieuchronnie губiona w trakcie podziałów komórkowych. Niektóre opisane integrony mają zdolność transpozycji, inne lokują się w obrębie transpozonów, wiele integronów znaleziono w plazmidach koniugacyjnych. Cechy te sprawiają, że integrony lokują się na skrzyżowaniu zjawisk związanych z narastaniem lekooporności szczepów bakteryjnych i poziomym przekazywaniem genów (ang. horizontal gene transfer), w obszarze podlegającym bardzo intensywnym badaniom. Dane uzyskane w ostatnich latach wskazują, że poziome przenoszenie materiału genetycznego ma ogromne znaczenie dla ewolucji genomów bakteryjnych i nie ogranicza się do nabywania nowych genów oporności na antybiotyki.

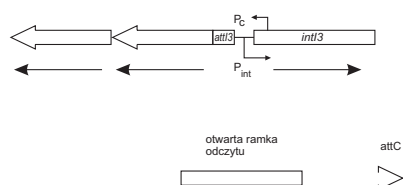
STRUKTURA INTEGRONU

Integron jest stosunkowo niewielką strukturą genetyczną. Podstawowe jego składowe to gen *intI*, kodujący integrację, sekwencja *attI* (ang. attachment site), która wiąże integrację i jest miejscem włączania kaset genowych oraz promotor P_c , który umożliwia ekspresję ramek odczytu kodowanych przez kasety (Ryc. 1).

INTEGRON KLASY 1



INTEGRON KLASY 3



Ryc. 1. Struktura integronów klasy 1 i 3. Opis w tekście.

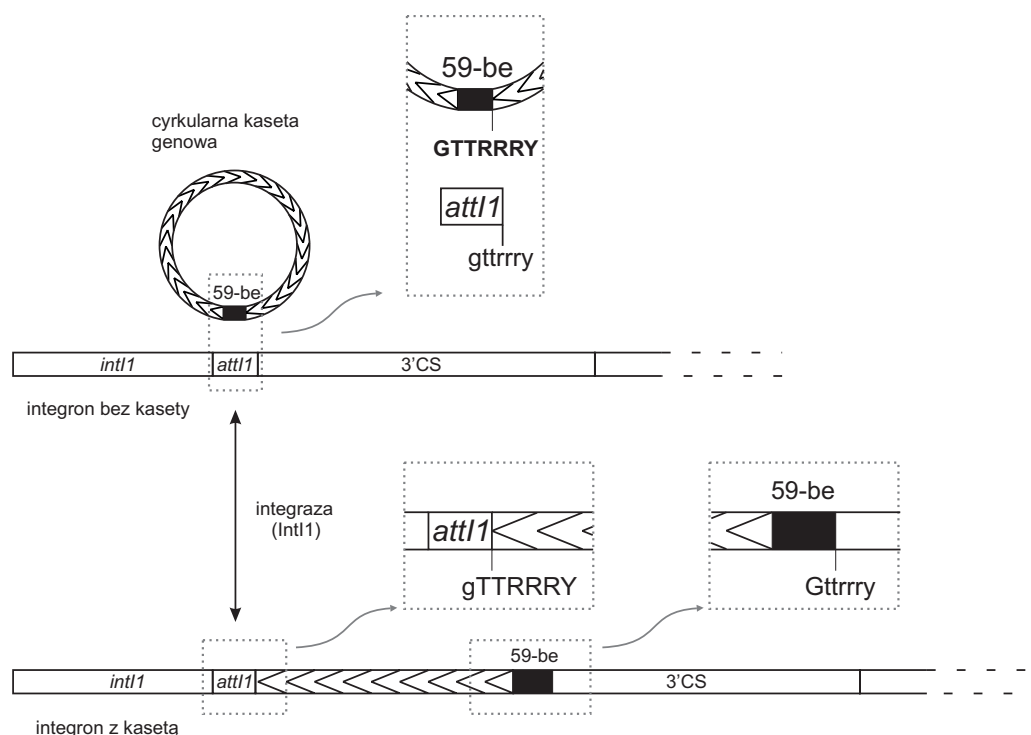
Kierunki ekspresji genu *intI* i promotora P_c są odwrotne. Opisaną wyżej strukturę określa się jako 5'CS (ang. 5' conserved segment) – konserwowany segment końca 5', jest to obszar niezbędny i wystarczający dla aktywności integronu. Kolejne kasety włączane są w miejsce *attI* tuż za genem *intI*. Opisano w literaturze wiele integronów, są to struktury bardzo zróżnicowane, gdyż w przyrodzie funkcjonuje wiele kaset genowych, które mogą być włączane do integronów w dowolnej kolejności. Często opisuje się integrony niosące kilka kaset genowych, istnieją także tzw. integrony zerowe, nie zawierające kaset. Największy opisany integron zawierał w regionie zmiennym 9 kaset (NAAS i współaut. 2001). Stabilnym elementem integronu jest gen *intI*, kodujący integrację. Rodzaj integracji decyduje o tym, do jakiej klasy zalicza się dany integron. Trudno podać aktualną liczbę klas integronów, gdyż zmienia się ona szybko wraz z napływem nowych danych. Dobrze scharakteryzowano integrację należące do trzech klas. Lwią część opisanych dotychczas integronów zalicza się do klasy pierwszej. Integrony tej klasy są najlepiej zbadane, część autorów ma skłonność do zawężania pojęcia integronu do integronów tej klasy. Opisano kilka integronów klasy 2, jeden integron klasy 3.

Integracja występuje także w strukturach zwanych superintegronami, które zostaną omówione w dalszej części pracy.

Integracja kodowana przez gen *intI* należy do rodziny rekombinaz tyrozynowych. Rodzina ta grupuje ponad 100 białek, w tym dobrze poznaną i często opisywaną integrację bakterio-

faga λ . Sekwencje aminokwasowe integracji kodowanych przez integrony różnych klas wykazują identyczność sekwencji od 45 do 59%, a podobieństwo sekwencji 46–72%. W obrębie poszczególnych klas integracji są identyczne lub prawie identyczne. Dla klasy 1, gdzie analizie poddano wiele genów, identyczność sekwencji wynosi 99% (HALL i współaut. 1999). Geny kodowane przez integracje poszczególnych klas oznacza się jako *intI* z numerem grupy (*intI1*, *intI2*, itd.). Aktywność integracji polega na rekombinacji umiejscowionej między miejscem integracji, zlokalizowanym w integronie – *attI* i obszarem oznaczonym jako 59-be (ang. 59-base element) – element pięćdziesięciodziewięciozasadowy, występującym w kasecie genowej (Ryc. 2).

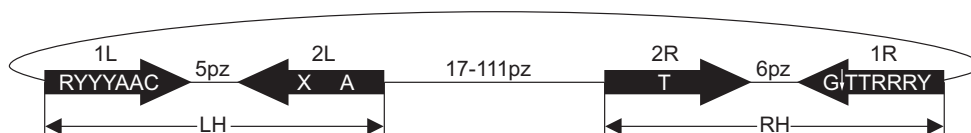
Miejsca *attI*, występujące w strukturze integronów poszczególnych klas, różnią się od siebie. Oznacza się je jako *attI* z numerem klasy (*attI1*, *attI2*, itd.). Poniżej opisany zostanie *attI1*, jako najlepiej scharakteryzowany. Kasecia genowa jest precyzyjnie włączana między G i TT elementu GTTRRRY (R oznacza resztę pirymidynową, Y oznacza resztę purynową) (Ryc. 2 i 3). Sekwencja GTTRRRY jest jedynym śladem homologii między *attI* i 59-be, dwiema sekwencjami wykorzystywanymi przez integrację w



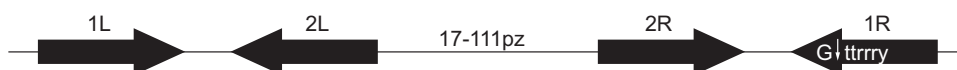
Ryc. 2. Schemat integracji kasety genowej do miejsca *attI1* integronu.

Sekwencja GTTRRRY jest miejscem włączenia kasety, duże lub małe litery oznaczają pochodzenie sekwencji odpowiednio z kasety genowej lub obszaru *attI1* integronu. 3'CS oznacza element stały występujący w integronach klasy 1.

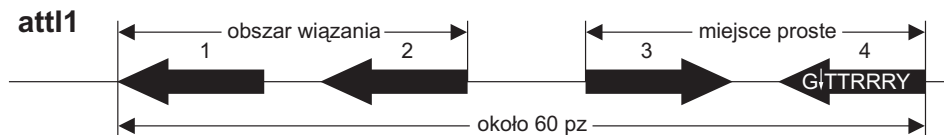
59-be w obrębie kolistej kasety genowej



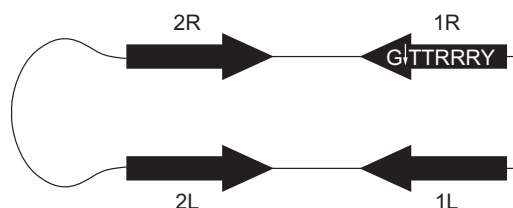
59-be/attC



attI1



59-be/attC w formie struktury szpilki do włosów



Ryc. 3. Struktura elementu *59-be*, *59-be/attC* i *attI1*.

Na rysunku zaznaczono zasady konserwowane w obrębie miejsc wiązania integrazy, X oznacza dodatkową zasadę obecną w 2L. Strzałka w obrębie sekwencji GTTRRRY oznacza miejsce łączenia sekwencji integronu z częścią kasety genowej.

trakcie włączania lub wycinania kasety. Miejsce proste (ang. simple site), do którego wiąże się integraza, składa się z dwóch odcinków o długości 7 pz (par zasad), stanowiących odwrócone powtórzenia (Ryc. 3). W obrębie prawej sekwencji zachodzi włączanie kasety. Oprócz miejsca prostego istnieją jeszcze dwie sekwencje o długości 7 pz wiążące integrazę, pierwsze określa się jako „mocne”, drugie jako „słabe” (na Ryc. 3 oznaczone odpowiednio 1 i 2). Ob-

szar ten funkcjonuje jako wzmacniacz (ang. enhancer) procesu wiązania integrazy. W obrębie miejsc wiążących integrazę stwierdza się obecność sekwencji GTT, tak jak w obszarze integracji kasety. Sekwencje wiążące integrazę mają charakter krótkich sekwencji powtórzonych i prawie nigdy nie są idealnymi powtórzeniami. Cały fragment ma wielkość ok. 60 pz, choć opisano także formy mniejsze, o wielkości ok. 35 pz.

KASETY GENOWE

Kasety genowe należą do najmniejszych znanych ruchomych elementów genetycznych. Ich wielkość waha się od 400 pz do 1 kpz (tysiąc par zasad). Mają bardzo zwartą budowę, składają się z otwartej ramki odczytu i obszaru oznaczonego jako *59-be*, który stanowi miejsce rekombinacji ze strukturą *attI* integronu. Kasety są unikalną ruchomą strukturą genetyczną, która nie koduje enzymów zaangażowanych w integrację kasety do DNA bakterii ani enzymów aktywnych przy wycinaniu kaset. Ich integracja jest zależna od tego, czy w komórce bakteryjnej znajduje się aktywny gen integrazy. Kasety genowe występują w formie liniowej, jako element integronu, ale można też wykazać ich istnienie w cytoplazmie komórki jako kowalencyjnie zamkniętej struktury kolistej. Struktury te są formą tymczasową istnienia kaset, gdyż nie mają zdolności autonomicznej replikacji (RECCHIA i HALL 1995).

W zbadanych dotąd integronach wykryto ponad 70 różnych kaset genowych. Kodują one białka nadające bakteriom oporność na antybiotyki wszystkich podstawowych grup: β -laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, trimetoprim, rifampicynę i chloramfenikol oraz czwartorzędowe związki amoniowe. Szczególnie często stwierdza się obecność kaset kodujących oporność na aminoglikozydy i trimetoprim. W obrębie kaset stwierdzono kilkakrotnie obecność ramek odczytu o nie ustalonej funkcji.

Uważa się, że elementem kasety może być każda ramka odczytu. Kasety na ogół zawierają jedną ramkę odczytu, choć w nielicznych przypadkach stwierdzono obecność dwóch ramek. Zwykle jedna z nich koduje gen oporności na antybiotyki, a druga jest genem o nieznanym celu. Kasety mają zwykle bardzo zwartą budowę. Są takie, w których kodon inicjacyjny ATG (od którego rozpoczyna się proces trans-

lacji) jest odległy zaledwie o 7 pz od struktury *59-be*. Kodon terminacyjny (oznaczający koniec ramki odczytu) leży zwykle bardzo blisko lub nawet wewnątrz elementu *59-be*. Ekspresja białka kodowanego przez kasetę zależy więc od zewnętrznego promotora. Jeżeli integracja kasety nastąpi do integronu, to promotorem tym jest *P_c*, leżący w obrębie genu integrazy. Z tego powodu istotny jest kierunek integracji kasety. Tylko w jednej, prawidłowej orientacji może dojść do ekspresji genu kodowanego w obrębie kasety. W nielicznych przypadkach kasety zawierają własne sygnały translacyjne i transkrypcyjne. Takim wyjątkiem jest gen *cmlA*, kodujący gen oporności na chloramfenikol. Stwierdza się tutaj obecność zarówno promotora, jak i sekwencji zaangażowanej w atenuację (przedwczesną terminację transkrypcji), która jest zależna od obecności chloramfenikolu.

Nazwa element *59-be* fragmentu kasety genowej, odpowiedzialnego za wiązanie integrazy i włączanie w strukturę integronu, opisuje wielkość tego obszaru, zaobserwowaną w pierwszych analizowanych kasetach. Opisane do tej pory struktury *59-be* mają długość od 57 pz do 141 pz i charakteryzują się ogromną różnorodnością sekwencji. Elementy wspólne dla tej struktury to dwa regiony o wielkości 25-30 pz, zlokalizowane na dwóch końcach *59-be*, oznaczane jako RH i LH (ang. right hand, left hand). Każdy z nich stanowi tzw. simple site, wiążące integrazę i zawiera dwie sekwencje o długości 7 pz, stanowiące odwrócone powtórzone sekwencje drugiego elementu (Ryc. 3). Pomiedzy powtórzonymi sekwencjami, stanowiącymi miejsca proste, znajduje się odcinek DNA o długości 5 pz dla LH i 5 lub 6 pz dla RH. Odcinek oddzielający miejsca proste może mieć długość od 17 do 111 pz, to różnice jego wielkości stanowią o zróżnicowaniu długości

całego elementu *59-be*. Obszar ten złożony jest z dwóch sekwencji stanowiących długie, odwrócone, niedoskonałe powtórzenie (nie zostały one zaznaczone na Ryc. 3). Consensus sekwencji w obrębie *59-be* dla opisanych dotąd kaset genowych jest niewielki. Nieliczne zasady, które zawsze występują w obrębie *59-be*, zaznaczono na Ryc. 3. Wspólny i stały jest natomiast schemat budowy tego elementu, polegający na istnieniu trzech par odwróconych sekwencji powtórzonych. Analiza licznych sekwencji *59-be* wskazuje, że nacisk selekcyjny jest położony na utrzymanie dostatecznego stopnia komplementarności pomiędzy powtórzeniami, a nie na zachowanie określonej sekwencji. Najwyższy stopień komplementarności posiadają elementy 1L i 1R, mniejszy 2L i 2R, komplementarność odwróconych powtórzeń, położonych między LH i RH, jest najmniejsza.

Integraza przeprowadza proces włączania kasety genowej do integronu przez połączenie sekwencji GTTRRRY obszaru *attI* i analogicznej sekwencji elementu *59-be*. W efekcie kłosa kaset, występująca jako cząsteczka bytująca w cytoplazmie, przechodzi w formę liniową (Ryc. 2). Sekwencja miejsca *attI* integronu, który włączył kasety, zmienia się, gdyż 6 ostatnich zasad pochodzi z włączonej kasety. Sekwencja sześciu zasad z 3' końca *attI* staje się końcowym obszarem elementu *59-be* po integracji. Włączenie kolejnej kasety sprawia, że proces się powtarza, sekwencja *attI* jest ponownie nieco zmieniona. Między dwoma włączonymi kasetami powstaje sekwencja oznaczana *attC*, będąca hybrydą między elementami *59-be* pierwszej i drugiej kasety. Należy zwrócić uwagę, że w tym procesie nie dochodzi do duplikacji żadnego odcinka zaangażowanego w proces integracji. Nie powstają typowe dla procesu transpozycji proste powtórzenia.

Integraza w sposób preferencyjny włącza nową kasety w miejsce *attI*. Możliwa jest jednak także rekombinacja między dwoma elementami *attC*, a także między miejscami *attI* różnych integronów. Proces wycinania kaset, usuwania ich z integronu, zachodzi z udziałem sekwencji *attI* i *attC* lub dwóch sekwencji *attC*. Z niewielką częstością dochodzi do włączania przez integrację kasety genowej do DNA poza integronem. Zachodzi to zwykle w miejscu o sekwencji GATT, między A i T. Funkcja tego procesu nie jest jasna. Kasetka może znaleźć się w wielu miejscach w genomie bakterii, gdyż krótka sekwencja GATT występuje wiele razy, kasetka jest w ten sposób zabezpieczona przed

zgubieniem. Jednak ekspresja genu kodowanego w kasecie może zajść tylko wtedy, gdy w pobliżu znajdzie się aktywny promotor. Kasetka taka nie może zostać wycięta z miejsca inkorporacji, więc „wypada” z puli kaset aktywnych w procesie integracji.

Rekombinazy z rodziny rekombinaz tyrozynowych wymagają do swej aktywności ściśle określonej sekwencji nukleotydowej w DNA, który ma być włączany, i w miejscu docelowym. Często przywoływanym przykładem takiego procesu jest włączanie bakteriofaga λ do genomu bakterii, co prowadzi do uzyskania formy uśpionej, zwanej profagiem. Włączanie DNA fagowego wymaga istnienia tej samej, 15-nukleotydowej sekwencji w DNA faga i bakterii. Integraza *IntI*, kodowana przez integrony, jest bardzo nietypową rekombinazą tyrozynową. Prowadzi rekombinację w miejscu o specyficznej sekwencji zasad, ale jest w stanie rozpoznać wiele takich sekwencji. Szczególnie wyraźnie widać to w przypadku obszaru *59-be*. Jak wspomniano wcześniej, sekwencje nukleotydowe tego odcinka są bardzo zróżnicowane, a tak zwany consensus, czyli zasady, które są zawsze obecne w miejscu włączania, to zaledwie kilka nukleotydów. Integraza może sprawnie działać, jeżeli *59-be* tworzy określony układ odwróconych powtórzeń. Bardzo niewielkie jest też podobieństwo sekwencji między obszarem *attI* integronu i elementem *59-be* kasety. Nietypowa dla rekombinaz tyrozynowych jest także ogólna struktura *59-be*, zawierająca dwa miejsca proste zamiast jednego. Opublikowane dotychczas badania wskazują, że integraza *IntI* sama przeprowadza zarówno proces integracji, jak i wycinania bez udziału innych enzymów. To także jest nietypowe, gdyż zwykle oprócz integrazy niezbędne są białka wspomagające, a proces wycinania prowadzi inny enzym. W przypadku faga λ jest to produkt genu *xis*, nazywany „ekscisionazą” (od ang. excision – wycinanie).

Transkrypcja otwartych ramek odczytu, niesionych przez kasety, zachodzi z promotora *Pc*. *Pc* ma charakter bardzo uniwersalnego promotora, który może funkcjonować w komórkach bakterii wielu gatunków. Poszczególne integrony różnią się nieco sekwencją *Pc*, co skutkuje różną jego aktywnością. W przypadku niektórych integronów, zwłaszcza tych o słabym promotorze *Pc*, stwierdza się obecność dodatkowego, często silniejszego promotora. Poziom ekspresji genu kodowanego przez kasety bardzo silnie zależy od jej po-

zycji w regionie zmiennym integronu. Transkrypcja zaczyna się od promotora Pc, a długość powstających transkryptów jest różna. Stąd też najsilniejszej ekspresji podlega gen zajmujący pierwsze miejsce w regionie zmiennym. Przypuszcza się, że elementy *59-be*, ze względu na swoją budowę tzw. szpilki do włosów, mogą funkcjonować jako terminatory transkrypcji. W przypadku istnienia silnej presji antybiotycznej obserwowano rearanżacje w obrębie integronu, prowadzące do przeniesienia potrzebnej kasety genowej na miejsce tuż za promotorem Pc lub delecję części sekwencji z obszaru między promotorem a genem niezbędnym bakterii do przetrwania (COLLIS i HALL 1995). Nieliczne kasety genowe niosą własne promotory. W przypadku integronu *in53*, zawierającego aż 9 ramek odczytu, stwierdzono, że dwie z nich, położone w obszarze 3' części zmiennej, mają własne sekwencje promotorowe. Jedną z tych ramek jest opisany wcześniej gen *cmlA* (NAAS i współaut. 2001).

Pochodzenie kaset genowych pozostaje intrygującą zagadką. Ich zwarta budowa i brak sygnałów regulacyjnych nasuwa myśl, że mogły powstać na drodze odwrotnej transkrypcji z mRNA genów oporności (RECCHIA i HALL 1997). W komórkach Enterobacteriaceae stwierdza się niekiedy obecność struktury zwa-

nej retronem, którego elementem jest gen kodujący odwrotną transkryptazę (DZIADEK i współaut. 1997). Opisano także przypadek genu maturazy o aktywności odwrotnej transkryptazy, występującej w obrębie integronu (CENTRÓN i ROY 2002).

Sekwencja *59-be* mogłaby powstawać razem z ramką odczytu, jako cDNA lub zostać później dodana do kasety. Jako struktury, od których mógłby się wywodzić *59-be*, proponuje się takie elementy genomu bakterii, które posiadają strukturę szpilki do włosów, a więc rho-niezależne sygnały terminacji transkrypcji lub sekwencje repetytywne, takie jak REP i ERIC (RECCHIA i HALL 1995). Elementy *59-be* wykazują ogromną różnorodność. Wielokrotnie opisywano identyczne lub prawie identyczne ramki odczytu, którym towarzyszą bardzo mało homologiczne sekwencje *59-be*, co można interpretować jako przesłankę wskazującą na możliwość dodawania elementu *59-be* do ramki odczytu. W obrębie największego opisanego dotąd integronu, niosącego 9 ramek w obszarze zmiennym, znaleziono dwie: *qacI* (nadającą oporność na czwartorzędowe sole amoniowe) i *aacA6* (oporność na streptomycynę) o identycznych elementach *59-be*. Być może świadczy to o istnieniu wymiany całych elementów *59-be* pomiędzy kasetami (NAAS i współaut. 2001).

INTEGRONY KLAS 1-3

Integronom klasy 1 poświęcono bardzo wiele badań. Dane opisane powyżej w całości pochodzą z badań nad tą grupą integronów. Na podstawie ograniczonej ilości danych dostępnych na temat integronów klasy 2 i 3 wydaje się, że ich właściwości są takie same lub zbliżone. Integrony klasy 1, oprócz sekwencji stałej na końcu 5', mają także sekwencję konserwowaną na końcu 3', oznaczaną 3'CS (ang. 3' conserved segment). Znajdują się tam geny *qacEΔ1* i *sul1*: *sul1* jest genem oporności na sulfonamidy, gen *qacEΔ1* jest pochodną genu *qacE1*, który nadaje komórce oporność na czwartorzędowe sole amoniowe oraz bromek etyldyny. Kasety niosące w pełni funkcjonalny gen *qacE1* są znajdowane niekiedy w integronach. W genie *qacEΔ1* stwierdza się niewielką delecję (stąd litera Δ w nazwie genu), gen ten nadaje komórce nieznaczną oporność, mimo że posiada własny promotor. Geny *qacEΔ1* i *sul1* są niemobilne i stanowią stały element in-

tegronów klasy 1. Integron nie niosący żadnych kaset, złożony tylko z części 5'CS i 3'CS określa się jako integron zerowy – *int0*. Obecność takich struktur stwierdza się w szczepach klinicznych, a szczególnie często pojawiają się w szczepach izolowanych ze środowiska. Region 3'CS opisuje się jako element stały, gdyż znajdowany jest często w integronach klasy 1, nie jest jednak niezbędny do funkcjonowania integronu. Opisano szereg przykładów integronów klasy 1. pozbawionych całego regionu 3'CS lub jego części (BROWN i współaut. 1996).

Integrony związane są z mobilnymi elementami genomu, tzn. mają zdolność przemieszczania się w DNA gospodarza. Integron oznaczony jako Tn402 (lub Tn5090) jest jedynym opisanym przypadkiem integronu, który, oprócz elementów stałych dla integronów klasy 1 zawiera geny niezbędne do transpozycji (*tniA*, *B*, *Q*, *R*) (Ryc. 4). Struktura ta, będąca zdolnym do transpozycji integronem, jest

oznaczona Tn, tak jak oznacza się transpozony (BROWN i współaut. 1996). Tn402 jest transpozonom, przenoszącym się z użyciem mechanizmu replikacyjnego. Oznacza to, że w efekcie transpozycji powstają dwie kopie Tn402, jedna w miejscu wyjściowym, druga w nowym locus. Jest to transpozon bardzo ruchliwy, wymagający bardzo niewielkiej homologii sekwencji do transpozycji. W analizowanych szczepach rzadko znajduje się Tn402, dużo częściej integrony, które są pochodnymi Tn402. Na ogół oprócz części integronowych zawierają one sekwencje IR (ang. inverted repeat) i część genów *tni*. Powodem utraty części sekwencji jest często aktywność sekwencji insercyjnych IS, które włączają się w obrębie integronu, a następnie powodują delekcje lub

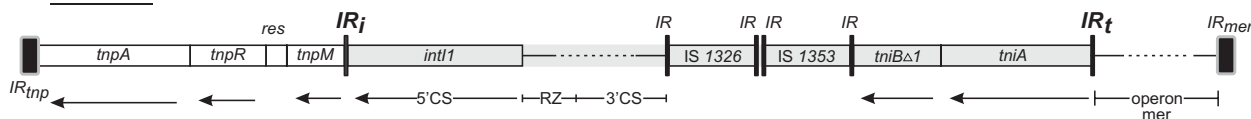
współaut. 1996). Struktura opisywanych integronów często wskazuje, że są one uszkodzone przez sekwencje insercyjne. Zależność między integronami a sekwencjami insercyjnymi IS może być jednak inna, jak pokazano na Ryc. 4. Sekwencje IS26 i integron tworzą strukturę o charakterze transpozonu złożonego Tn2000. Enzym kodowany przez IS nadaje strukturze możliwość ruchu, a integron niesie geny oporności na antybiotyki oraz dostarcza zdolności wychwytywania nowych kaset (NAAS i współaut. 2001).

W przypadku niezdolnych do ruchu pochodnych Tn402 możliwa jest jeszcze inna strategia. Integrony takie inkorporują do czynnego transpozonu, jak w przypadku transpozonu Tn21 (Ryc. 4). Integron ma budowę typową dla

Tn 402



Tn 21



Tn 2000



Ryc. 4. Struktura transpozonów Tn402, Tn21, Tn2000.

Zaciemniono elementy stanowiące integron. Geny *tmiR*, *tmiQ*, *tmiA* i *res* stanowią moduł transportowy Tn402. *tnpA*, *tnpR*, *tnpM*, *res* kodują geny transpozycji Tn21, operon *mer* koduje oporność na jony miedzi. IS1326, IS353, IS26 oznaczają sekwencje insercyjne.

rearanzacje jego struktury. Takie pochodne integronu Tn402 wciąż mogą podlegać transpozycji, jeżeli in trans dostarczony zostanie komplet niezbędnych białek. W miejscu integracji takiego elementu można znaleźć krótkie (5-10 pz) proste powtórzenie sekwencji, do której został włączony, oznacza to, że element zmienił miejsce na drodze transpozycji. Pochodne Tn402, jako niezdolne do ruchu, nie są klasyfikowane jako transpozony, ale jako integrony, i oznaczane In (BROWN i

defektywnych pochodnych Tn402, posiada na końcach sekwencje IR, otoczone prostymi powtórzonymi sekwencjami, co wskazuje, że znalazł się w obrębie transpozonu przez transpozycję. Obecne w obszarze integronu sekwencje IS są prawdopodobnie odpowiedzialne za utratę części modułu *tmi*. Tn21 jest transpozonom typu Tn3, innym niż transpozony złożone, wspomniane powyżej. Posiada geny transpozycji, kodujące transpozazę (TnpA), białko odpowiedzialne za integrację Tn21 do nowego miej-

sca i kilka białek wspomagających. Tn21 przenosi się stosując mechanizm replikacyjny, ma niewielkie wymagania co do sekwencji miejsca, w obrębie którego integruje (LIEBERT i współaut. 1999). Transpozony z grupy Tn21 są bardzo szeroko rozpowszechnione na całym świecie, niosą bardzo różne geny oporności, zarówno na antybiotyki, sole metali ciężkich i środki dezynfekcyjne. Transpozony te są związane z dużymi plazmidami koniugacyjnymi o szerokim spektrum gospodarza. Opisany tutaj Tn21 został pierwotnie znaleziony w plazmidzie NR1, wyizolowanym w latach pięćdziesiątych ze szczepów *Shigella flexneri*. NR1 zawiera w swojej strukturze jeszcze jeden transpozon Tn10, jest to transpozon złożony, niosący gen oporności na tetracyklinę.

Znane są cztery integrony klasy 2. Ich struktura jest analogiczna do obszaru 5'CS integronów klasy 1 i składa się z genu *intI2*, promotora PinA1 i *attI2*. Żaden z tych elementów nie wykazuje silnej homologii z odpowiednimi strukturami integronów klasy 1, niemniej jednak podobieństwo ogólnej struktury jest zachowane. Identyeczność sekwencji aminokwasowej IntI1 i IntI2 wynosi tylko 46%. Sekwencjonowanie wykazało, że w połowie ramki odczytu, kodującej integrację IntI2, znajduje się mutacja punktowa powodująca powstanie kodonu stop, co oznacza przedwczesne zakończenie translacji (HANSSON i współaut. 2002). Znaczenie tego zjawiska nie jest znane. Być może w naturze istnieją integrony klasy 2 z funkcjonalną ramką odczytu, możliwe jest także, że integrony tego typu funkcjonują w naturze w szczepach zdolnych do supresji mutacji nonsense lub że białko o niepełnej długości pełni jakieś funkcje regulacyjne. Integracja IntI1, mimo znacznych różnic w budowie, rozpoznaje sekwencję *attI2*. Za pomocą manipulacji genetycznych przekształcono kodon stop w sekwencji *intI2* w trójkę kodującą kwas glutaminowy. Uzyskane w ten sposób białko miało właściwości zbliżone do IntI1. W genomie *Acinetobacter baumannii* znaleziono integron klasy 2 jako fuzję z obszarem 3'CS klasy 1 (PLOY i współaut. 2000). Integrony klasy 2. znajdują się w strukturze transpozonu Tn7. Tn7 wykorzystuje nie replikacyjny mechanizm transpozycji, jest często obserwowany w plazmidach koniugacyjnych. Kasety, których obecność stwierdzono w transpozonie Tn7 i transpozonach pokrewnych, to te same, które wcześniej znajdowano w integronach klasy 1 (HANSSON i współaut. 2002).

Opisano dotychczas tylko jeden integron klasy 3, wyizolowany ze szczepu *Serratia marcescens*. Integron ten zawiera wszystkie elementy obszaru 5'CS integronów klasy 1, z tym, że kierunek ułożenia elementów jest odwrócony (Ryc. 1). Kasety znajdujące się w tym integronie to *bla_{IMP-1}* – kodująca β-laktamazę rozkładającą karbopenemy i *aacA4* nadająca komórce oporność na aminoglikozydy. Obie kasety opisano wcześniej dla integronów klasy 1. Właściwości IntI3 co do włączania i wycinania kaset są analogiczne do opisanych dla IntI2. Integrasy IntI2 i IntI3 wykazują 59% identyczności sekwencji aminokwasowej, ale wydaje się, że każda z nich rozpoznaje tylko własną sekwencję *attI* (COLLIS i współaut. 2002). Na podstawie niepełnych danych, dotyczących sekwencji otaczających opisany integron, można sądzić, że on także jest częścią elementu transpozonowego.

Integrony wielokrotnie izolowano ze szczepów *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*. Część integronów sama ma zdolność ruchu, bardzo często lokują się one w plazmidach koniugacyjnych o szerokim spektrum gospodarza, a ponadto występują we wszędobylskich transpozonach, toteż nie dziwi fakt, że można je znaleźć w szczepach bardzo różnych gatunków pałeczek Gram-ujemnych. Integrony klasy 1 znaleziono także w szczepach *Vibrio cholerae*, izolowanych w różnych krajach, od Włoch aż po Tajlandię i Wietnam. W tym także przypadku integrony są zlokalizowane w plazmidach koniugacyjnych. Wysokolekooporny szczep *V. cholerae*, niosący integron w wielkim plazmidzie (150 kbp) spowodował w latach 1996–1997 groźną epidemię na terenie Gwinei Bissau; o ruchliwości integronów może świadczyć fakt, że identyczny integron znaleziono w szczepach *Shigella* izolowanych w szpitalu geriatrycznym w Finlandii. Integron był zlokalizowany w transpozonie Tn21, niesionym przez inny plazmid (DALSGAARD i współaut. 2000).

Opisany został przypadek znalezienia kompletnego integronu klasy 1 na plazmidzie *Corynebacterium glutamicum*. Integron wykazuje bardzo wysoką homologię z integronem wcześniej opisanym u *Pseudomonas aeruginosa*. Jest to jeden z pośrednich dowodów na istnienie w środowisku transferu genów między bakteriami Gram-ujemnymi i Gram-dodatnimi. Wcześniej donoszono o stwierdzeniu obecności fragmentu genu integrasy klasy 1 w trans-

pozonie *Mycobacterium smegmatis* i niewielkiej sekwencji homologicznej do Tn21 w genomie *Rhodococcus erythropolis* (NEŠVERA i współaut. 1998).

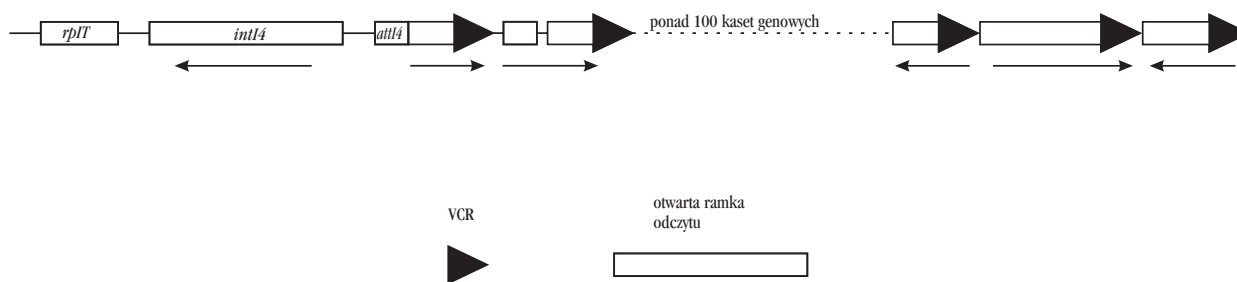
Podawana w literaturze częstość występowania integronów w szczepach bakterii Gram-ujemnych jest bardzo zróżnicowana i jest to związane z tym, jakiego rodzaju kolekcję szczepów poddaje się analizie. Bardzo wysoką częstość (80%) zanotowano dla klinicznych szczepów *Acinetobacter baumannii* (PLOY i współaut. 2000). Ogólnie rzecz biorąc częstości są wysokie dla szczepów klinicznych, zwłaszcza izolowanych w specjalistycznych szpitalach i na oddziałach intensywnej terapii (30–40%). Integrony stosunkowo łatwo znaleźć w szczepach izolowanych ze środowiska, choć tutaj częstości są wielokrotnie niższe, a znaczna część integronów to „puste” integrony zerowe.

Trzy nowe klasy integraz opisano analizując próbki ziemi i wody pobrane w Australii. Dane uzyskane przy użyciu metody PCR wskazują, że nie zidentyfikowane jeszcze bakterie niosą integrony. Stosując primery komplementarne do regionu *attC* wyizolowano liczne kasety genowe (NIELD i współaut. 2001). Na tym etapie badań trudno powiedzieć, czy mamy tu do czynienia z integronami, czy superintegronami. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że próbki ziemi były pobierane z dala od siedzib ludzkich, w rezerwatach przyrody, kopalni srebra i gorących źródłach. Dane te pokazują jednoznacznie, że integrony są naturalnym składnikiem genomu bakterii, natomiast zawartość regionów zmiennych, rodzaj kaset genowych, jakie tam występują, ma związek z selekcją szczepów opornych na antybiotyki, do jakiej dochodzi na skutek działalności człowieka.

SUPERINTEGRONY

W genomie *Vibrio cholerae*, na jego mniejszym chromosomie, stwierdzono obecność struktury o wielkości 120 kpz, niosącej 214 otwartych ramek odczytu, którą nazwano superintegronem. Podstawowe elementy struktury superintegronu są analogiczne do opisanych wcześniej dla klasycznych integronów: integraza, miejsce *attI* i kasety genowe (Ryc. 5).

towarzyszący kasetom, nazywany tutaj VCR (ang. *Vibrio cholerae* repeat), ma strukturę analogiczną do *attC* klasycznych integronów. Opisanie struktury VCR, wielokrotnie powtórzonej sekwencji, która może stanowić do 10% całego DNA *V. cholerae*, doprowadziło do odkrycia superintegronu. Sekwencja VCR ma wielkość 121-123 pz i jest silnie konserwowa-



Ryc. 5. Struktura superintegronu *V. cholerae*.

Gen *rplT* nie wchodzi w skład superintegronu, koduje rybosomalne białko L20. Pozostałe opisy w tekście.

Integraza, początkowo opisana jako *IntI4*, oznaczana teraz *VchintI4*, ma typową dla integraz wielkość 312 aminokwasów i około 50% identyczności sekwencji z integrazami *IntI1*, *IntI2* i *IntI3*. Z podobną jak one częstością włącza i wycina kasety genowe. Element *59-be*

na. Sekwencje obserwowane w poszczególnych kasetach genowych wykazują 74% homologii. VCR wykazuje silną homologię (90%) do elementu *59-be* kaset genowych integronów klasy 1 niosących gen *blaP3* (oporność na karbenicylinę) i *dfr5* (jeden z genów oporności na

trimetoprim). W opisanym superintegronie można wyróżnić co najmniej 179 kaset genowych. Ramki odczytu mają różne kierunki ekspresji, natomiast element VCR jest skierowany zawsze w tym samym kierunku. Zdecydowana większość kaset niesie ramki odczytu o nieznanej wcześniej sekwencji i nieznanej funkcji. Nieliczne kasety kodują toksyny – toksynę ciepłostalą, hemaglutyninę i lipazę, w superintegronie *Xanthomonas campestris* znaleziono geny systemu restrykcja-modyfikacja (ROWE-MAGNUS i współaut. 1999). Kasety, podobnie jak w przypadku klasycznych integronów, nie zawierają promotorów transkrypcji. Trudno sobie wyobrazić, aby tak wielka struktura genetyczna ulegała ekspresji z jednego promotora. Niektóre kasety zawierają dodatkową ramkę odczytu, dla której nie obserwuje się translacji. Struktury takie stwierdzono także w kasetach

czas niewiele wiadomo o sposobie funkcjonowania superintegronu. Opisane wyżej doświadczenie wskazuje, że podobnie jak w przypadku integronów klasycznych kasety są mobilne, a ich ekspresja zależy od pozycji w obrębie struktury integronu. Wśród kaset *V. cholerae*, które zsekwencjonowano, nie ma żadnych genów oporności na antybiotyki. Stwierdza się niekiedy obecność ramek odczytu wykazujących pewną homologię do genów oporności. Eksperyment opisany powyżej wskazuje, że mogą one nadawać komórkom efektywną oporność. Obecność superintegronów stwierdzono w genomach szczepów bakterii kilku gatunków będących patogenami ludzi i zwierząt (*Vibrio*, *Pseudomonas*), roślin (*Xanthomonas*) oraz niepatogennych bakterii środowiskowych (*Nitrosomonas*, *Shewanella*). W Tabeli 1 przedstawiono dane o części superinte-

Tabela 1. Szczepy bakterii niosące superintegrony (wg ROWE-MAGNUSA i współaut. 2001)

Nazwa gatunkowa z oznaczeniem szczepu	Wielkość superintegronu (kbp)	Nazwa genu integrazy	Element 59-be	
			Nazwa	Wielkość (pb)
<i>Vibrio cholerae</i> 569B	125	VchintIA	VCR	121–123
<i>Vibrio mimicus</i> 101888T	>100	VmiintIA	VMiR	121–123
<i>Vibrio metschnikovii</i> A267	>100	VmeintIA	VMeR	117–120
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 75.2T	>100	VpaintIA	VPR	119–120
<i>Vibrio fischeri</i> 103206T	>100	VfiintIA	VFR	119–120
<i>Listonella pelagia</i> 10276.2T	>100	LpeintIA	LPR	117–120
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1	b.d.	SonintIA	b.d.	b.d.
<i>Shewanella putrefaciens</i> 69.34	b.d.	SpuintIB	SPR	68–94
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>badrii</i> 11672	b.d.	XcaintIB	XCbR	53–54
<i>Nitrosomonas europaea</i> 103999	b.d.	NeuintIA	b.d.	b.d.

genowych klasycznych integronów. Możliwe jest, że małe ramki odczytu są źródłem sekwencji promotorowej. Wykazano, że kasety genowe superintegronu mogą być włączane do struktury integronu przez integrazę IntI1. Stworzono układ eksperymentalny, który pozwalał na przeniesienie, dzięki aktywności IntI1, przy użyciu plazmidu koniugacyjnego kasety genowej, kodującej oporność na chloramfenikol z superintegronu do komórki *E. coli*. Szczep *V. cholerae*, który niósł kasety, był wrażliwy na chloramfenikol, a ramka odczytu wykazywała 60% homologii sekwencji do znanych genów oporności na ten antybiotyk. Po ponownym wprowadzeniu kasety do *V. cholerae* uzyskano szczep odporny na chloramfenikol (ROWE-MAGNUS i współaut. 2002). Dotych-

gronów, zostały one zanalizowane w różnym stopniu, ale dostępne informacje są zbieżne z danymi opisanymi wyżej, które pochodzą z badań nad szczepem *V. cholerae* 569B. Integrazy wykazują zróżnicowany, ale na ogół duży stopień identyczności sekwencji (VchintIA i VmiintIA – 94%, VchintIA i VmeintIA – 76%). Elementy 59-be są bardzo konserwowane w obrębie gatunku (70–90%), a stopień homologii sekwencji między gatunkami, choć wysoki, jest zróżnicowany, na ogół gatunki o podobnych integrazach mają też silnie homologiczne elementy 59-be (ROWE-MAGNUS i współaut. 2001). Porównując ramki odczytu znajdujące się w superintegronach różnych gatunków nie znaleziono elementów wspólnych; wydaje się, że każdy gatunek ma odrębny zestaw kaset.

Analiza cech sekwencji nukleotydowej takich jak: stosunek par G-C do A-T, tzw. *codon usage* i porównanie ich z cechami pozostałej części genomu wskazuje, że geny integrazy i elementy *59-be* są stałym i starym składnikiem genomu, natomiast znaczna część ramek odczytu została nabyta. Superintegrony określa się niekiedy jako integrony chromosomalne, jest to struktura stabilna, nie stwierdzono ich związku z jakimikolwiek elementami ruchomymi.

Oprócz wielkich struktur, jakimi są superintegrony i małych, ale bardzo zróżnicowanych, jakimi są integrony klasyczne, opisano strukturę pośrednią. Została ona znaleziona w niepatogennym szczepie *Pseudomonas alcaligenes*; określana jest jako superintegron. Składa się on z 33 kaset genowych, ich ramki odczytu są zorientowane w tym samym kierunku, żadna nie jest genem oporności na antybiotyki. Funkcja białek kodowanych na kasetach nie jest znana, ale wydaje się, że połowa to białka związane z osłonami komórkowymi. Element *59-be*, oznaczany tu PAR (ang. *Pseudomonas alcaligenes repeat*) jest bardzo konserwowany (90% homologii). Wśród kaset znajdujących w klasycznych integronach są takie, których element *59-be* bardzo przypomina PAR (VAISVILA i współaut. 2001).

Wysunięto hipotezę, mówiącą, że klasyczne integrony, występujące w komórkach bakterii Gram-ujemnych, powstały przez przeniesienie struktur superintegronu, czyli genu integrazy, promotora obsługującego kasety i sekwencji *attI* do bakterii z rodzin *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonadaceae*. Analiza sekwencji pozwala na zgrupowanie genu integrazy *intI2* z genem integrazy *Shewanella*, a genów *intI1* i *intI3* z genem integrazy *Xanthomonas* (ROWE-MAGNUS i współaut. 2001). Można by to interpretować jako wskazówkę mówiącą o wielokrotnym przeniesieniu systemu integronowego z superintegronu do innych bakterii. Bardzo silne zróżnicowanie kaset genowych,

występujących w integronach klasycznych, może oznaczać, że pobierane były one z różnych źródeł. Znaleziono 12 kaset kodujących geny oporności na antybiotyki, których element *59-be* jest identyczny z odpowiednimi strukturami superintegronów. Można sobie wyobrazić, że superintegrony ze swoim ogromnym zestawem kaset genowych, zawierającym geny w większości nie ulegające ekspresji, stanowią coś w rodzaju ogromnego składu, rezerwuaru genów. Istnienie mechanizmu, pozwalającego na łatwe „zonglowanie” kasetami, sprawia, że system ten może stanowić rodzaj warsztatu, pozwalającego bakterii modelować swój genom w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. System ten jest stary, stwierdza się jego obecność u bakterii, których drogi ewolucyjne rozeszły się 300–800 mln lat temu. Wśród ramek odczytu, znajdujących w superintegronach, te, które mają homologię do genów oporności na antybiotyki, stanowią niewielką część. Stwierdza się ich obecność nawet w najstarszych izolatach, jak na przykład szczep *V. metschnikovii*, pochodzący z 1888 r. Bakterie od dawna żyją w sąsiedztwie grzybów, które wytwarzają substancje antybiotyczne, a stres antybiotyczny to nie jedyny rodzaj zagrożenia, z jakim styka się bakteria. Narzędzie, jakim jest integraz, w połączeniu z dużym zestawem mobilnych kaset, wydaje się bardzo przydatne do adaptacji do różnych zmian środowiska. Fakt, że integrony klasyczne niosą głównie geny oporności na antybiotyki, jest pewnie pochodną rozwoju przemysłu farmaceutycznego i szerokiego, nie zawsze racjonalnego stosowania antybiotyków. Selekcjonuje to te szczepy, które zdobyły stosowny gen i zdołały przetrwać. Dodatkowo narastająca lekooporność szczepów klinicznych sprawia, że szczególnie dużo uwagi poświęca się elementom genetycznym związanym z tym zjawiskiem.

INTEGRONS

S u m m a r y

Accumulation of antibiotic resistance among pathogenic bacteria has called attention to horizontal gene transfer that involves plasmids and transposons. Integrons, usually placed on mobile genome elements, are very deeply engaged in the process of origin of multiple-drug-resistant strains. Integrons are genetic elements that contain determinants of the components of the site-specific recombination sys-

tem that recognizes and captures mobile gene cassettes. More than 70 different antibiotic resistance genes covering most classes of antimicrobials presently in use have been detected in gene cassettes. Integrons are frequently found in clinical and environmental strains of gram-negative rods. The discovery of super-integrons, i.e. genetic structures gathering gene cassettes in a huge number, led to the con-

ception of genome cassettes capture as an element of a broader phenomenon of bacterial genome modifi-

cation in response to changing environmental conditions.

LITERATURA

- BROWN H. J., STOKES H. W., HALL R. M., 1996. *The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives*. J. Bacteriol. 178, 4429–4437.
- CENTRÓN D., ROY P. H., 2002. *Presence of a group II intron in a multiresistant Serratia marcescens strain that harbors three integrons and a novel gene fusion*. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 1402–1409.
- COLLIS C. M., HALL R. M., 1995. *Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons*. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 155–162.
- COLLIS C. M., KIM M.-J., PARTRIDGE S. R., STOKES H. W., HALL R. M., 2002. *Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines*. J. Bacteriol. 184, 3017–3026.
- DALSGAARD A., FORSLUND A., PETERSEN A., BROWN D. J., DIAS F., MONTEIRO S., MØLBÆK K., AABY P., RODRIGUES A., SANDSTRÖM A., 2000. *Class 1 integron-borne, multiple-antibiotic resistance encoded by a 150-kilobase conjugative plasmid in epidemic Vibrio cholerae O1 strains isolated in Guinea-Bissau*. J. Clin. Microbiol. 38, 3774–3779.
- DZIADEK J., BRZOSTEK A., PARNIEWSKI P., JAWORSKI A., 1997. *Retrony – retroelementy bakterii*. Postępy Mikrobiologii 36, 1–17.
- HANSSON K., SUNDSTRÖM L., PELLETIER A., ROY P. H., 2002. *IntI2 integron integrase in Tn7*. J. Bacteriol. 184, 1712–1721.
- HALL R. M., COLLIS C. M., KIM M.-J., PARTRIDGE S. R., RECCHIA G. D., STOKES H. W., 1999. *Mobile gene cassettes and integrons in evolution*. Ann. NY Acad. Sci. 870, 68–80.
- LIEBERT C. A., HALL R. M., SUMMERS A. O., 1999. *Transposon Tn21, flagship of the floating genome*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 507–522.
- NAAS T., MIKAMI Y., IMAI T., POIREL L., NORDMANN P., 2001. *Characterization of In53, a class 1 plasmid and composite transposon-located integron of Escherichia coli which carries an unusual array of gene cassettes*. J. Bacteriol. 183, 235–249.
- NEŠVERA J., HOCHMANNOVÁ J., PÁTEK M., 1998. *An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. 169, 391–395.
- NIELD B. S., HOLMES A. J., GILLINGS M. R., RECCHIA G. D., MABBUTT B. C., NEVALAINEN K. M. H., STOKES H. W., 2001. *Recovery of new integron classes from environmental DNA*. FEMS Microbiol. Lett. 195, 59–65.
- PLOY M.-C., DENIS F., COURVALIN P., LAMBERT T., 2000. *Molecular characterization of integrons in Acinetobacter baumannii: description of a hybrid class 2 integron*. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2684–2688.
- RECCHIA G. D., HALL R. M., 1995. *Gene cassettes: a new class of mobile element*. Microbiology 141, 3015–3027.
- RECCHIA G. D., HALL R. M., 1997. *Origins of the mobile gene cassettes found in integrons*. Trends Microbiol. 5, 389–394.
- ROWE-MAGNUS D. A., GUÉROUT A.-M., MAZEL D., 1999. *Super-integrons*. Res. Microbiol. 150, 641–651.
- ROWE-MAGNUS D. A., GUÉROUT A.-M., MAZEL D., 2002. *Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes*. Mol. Microbiol. 43, 1657–1669.
- ROWE-MAGNUS D. A., GUÉROUT A.-M., PLONCARD P., DYCHINCO B., DAVIES J., MAZEL D., 2001. *The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 652–657.
- VAISVILA R., MORGAN R. D., POSFAI J., RELEIGH E., 2001. *Discovery and distribution of super-integrons among Pseudomonads*. Mol. Microbiol. 42, 587–601.