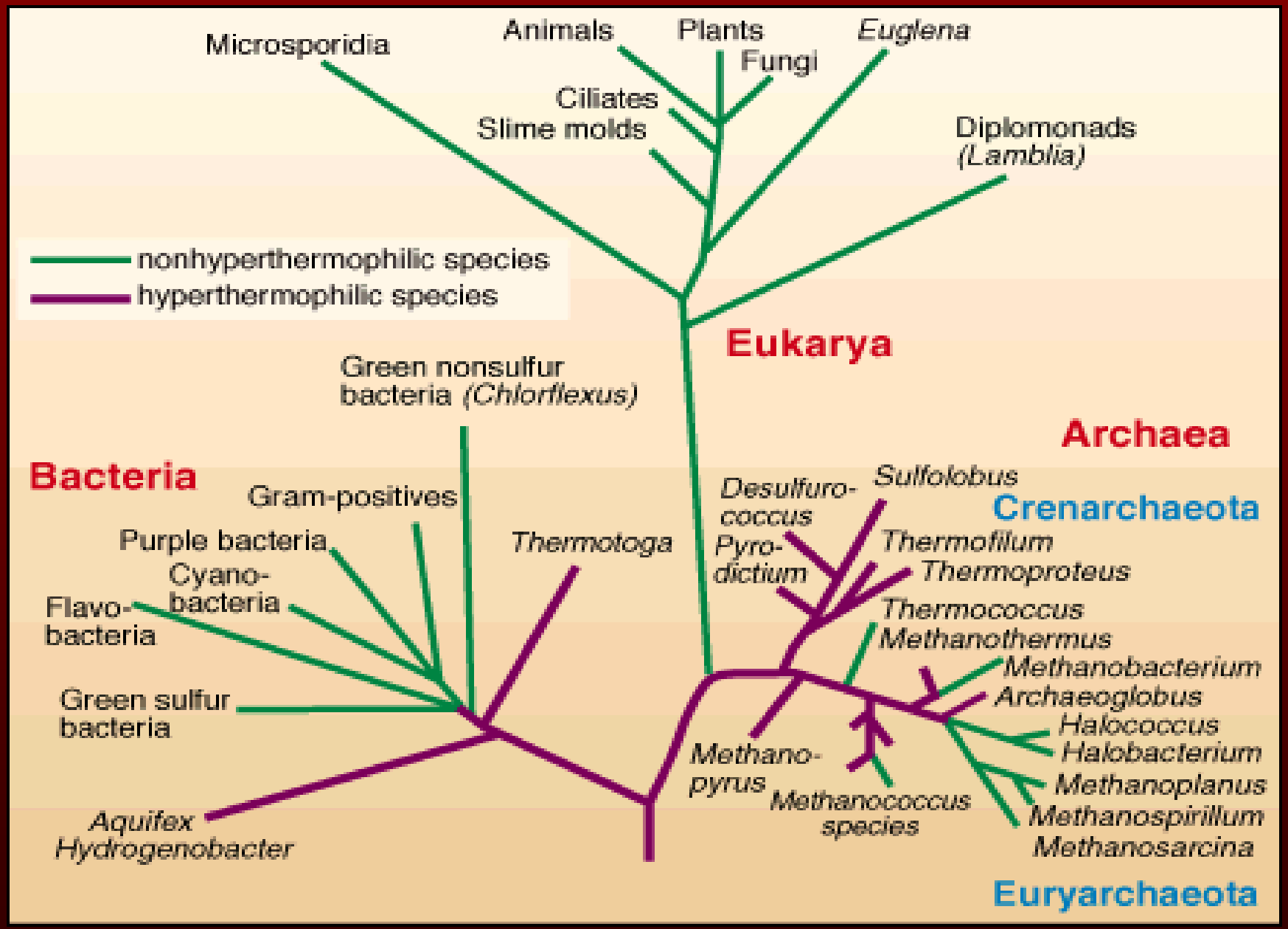
Horizontální přenos genů

Transponovatelné elementy

Horizontální přenos genů


Microsporidia
Animals
Plants
Fungi
Euglena
Ciliates
Slime molds
Diplomonads
(Lamblia)
nonhyperthermophilic species
hyperthermophilic species
Eukarya
Green nonsulfur
bacteria (Chlorflexus)
Archaea
Bacteria
Gram-positives
Purple bacteria
Cyano-
bacteria
Flavo-
bacteria
Green sulfur
bacteria
Aquifex
Hydrogenobacter
Thermotoga
Desulfuro-
coccus
Pyro-
dictium
Sulfolobus
Crenarchaeota
Thermofilum
Thermoproteus
Thermococcus
Methanothermus
Methanobacterium
Archaeoglobus
Halococcus
Halobacterium
Methanoplanus
Methanospirillum
Methanosarcina
Methano-
pyrus
Methanococcus
species
Euryarchaeota

- Lidské tělo žije v těsném spojení s více než 10^{12} bakteriemi, které patří do 500-600 druhů
- 20-50% obsahu lidských střev tvoří bakterie
- Většina bakterií nepůsobí žádné potíže
- Patogenní se mohou stát získáním nových genů

Geny rezistence

- Existují v bakteriích ještě před použitím antibiotik
- Rozšíří se v populacích působením selekčního tlaku

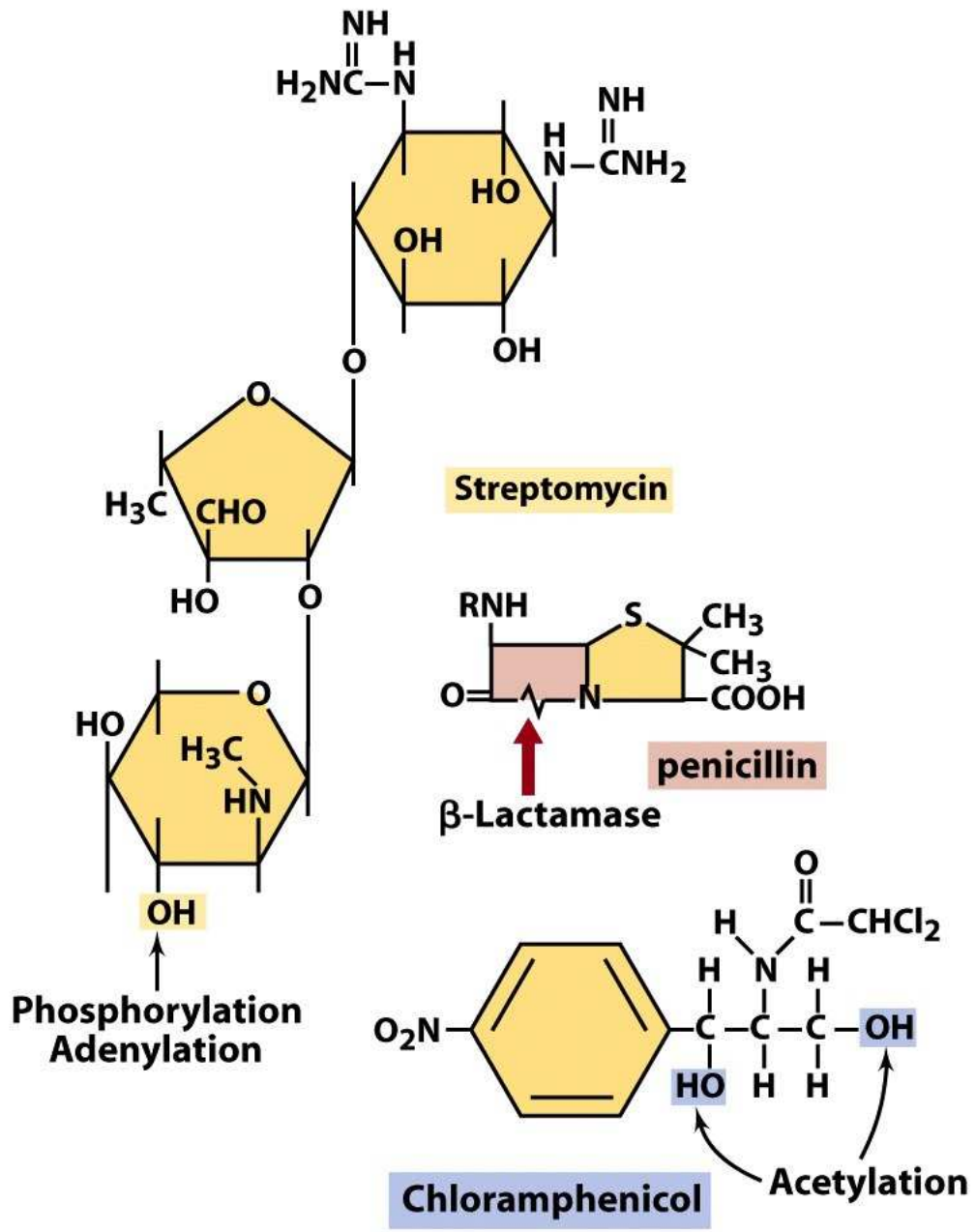


Figure 20-25 Brock Biology of Microorganisms 11/e

© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Brief History of Resistance

Antibiotic	Discovered	Introduced into Clinical Use	Resistance Identified
Penicillin	1940	1943	1940
Streptomycin	1944	1947	1947
Tetracycline	1948	1952	1956
Erythromycin	1952	1955	1956
Vancomycin	1956	1972	1987
Gentamycin	1963	1967	1970

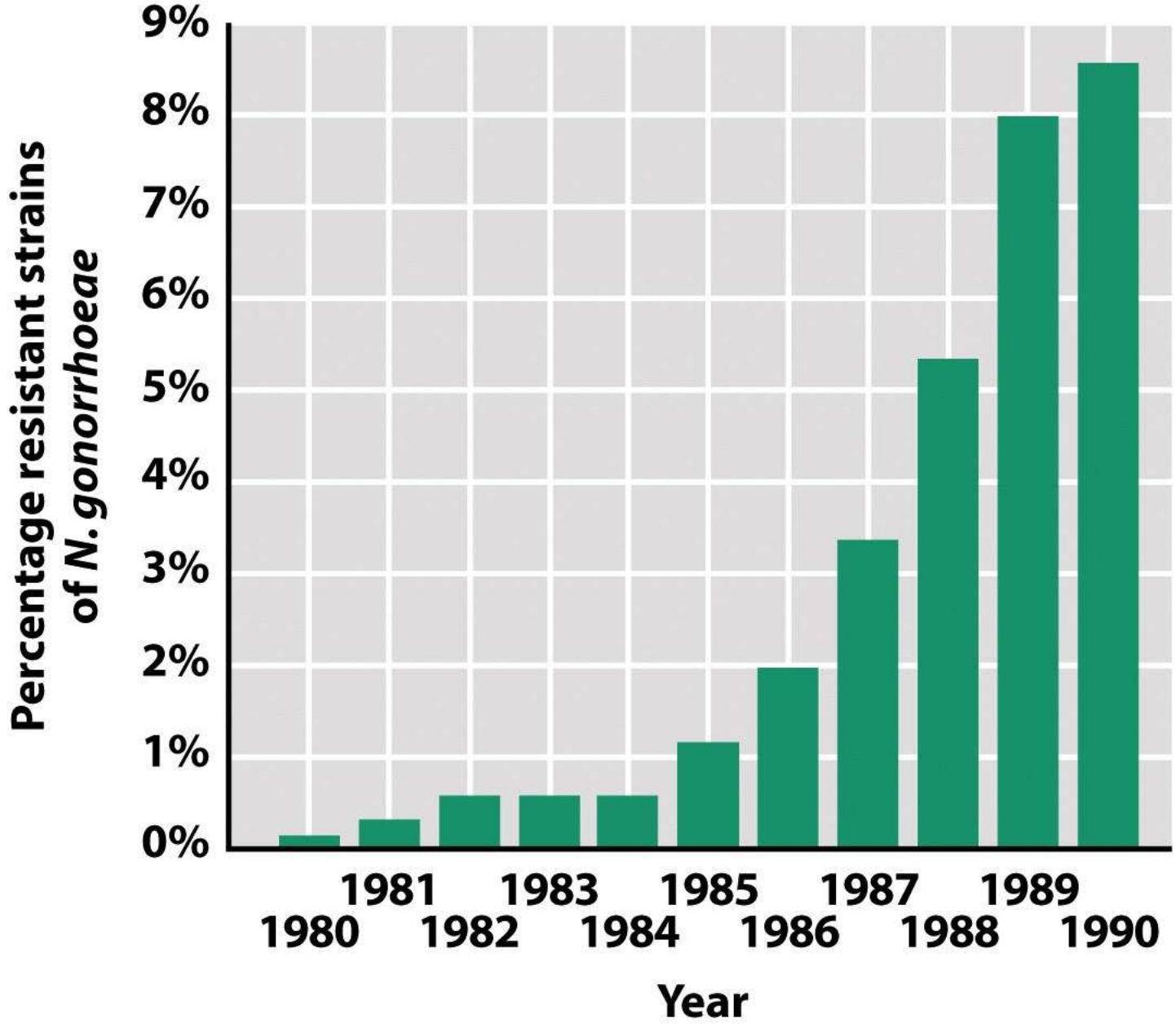


Figure 20-26b Brock Biology of Microorganisms 11/e

© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

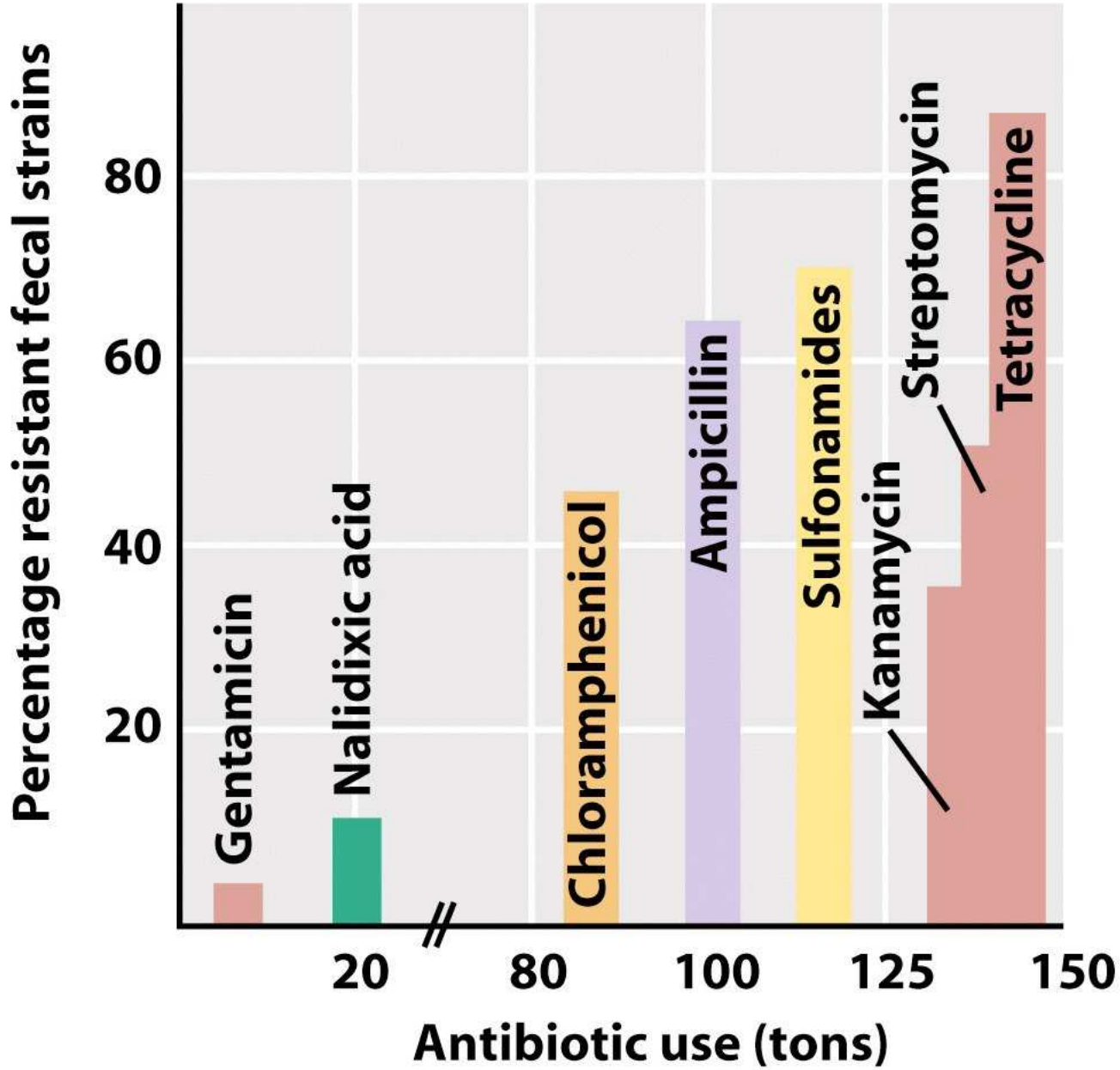


Figure 20-26a Brock Biology of Microorganisms 11/e

© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Rezistence se rozvíjí zejména v nemocnicích ...

% resistant to	IP	OP
methicillin/coagulase-negative Staphylococcus	49	36
methicillin/Staphylococcus aureus	33	14
ceftazidime/Enterobacter cloacae	26	12
imipenem/Pseudomonas aeruginosa	12	6
ceftazidime/P. aeruginosa	8	4
vancomycin/Enterococcus species	6	1

Archibald L1997. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. Clinical Infectious Diseases. 24(2):211-215

Tremendous quantities of antibiotics are produced and released into the environment.

90 – 180 million kg/year of antibiotics are used (enough for 25 BILLION full treatment courses ~ 4 per human/yr!)

About 10 X more antibiotics are used in agriculture than to treat people.

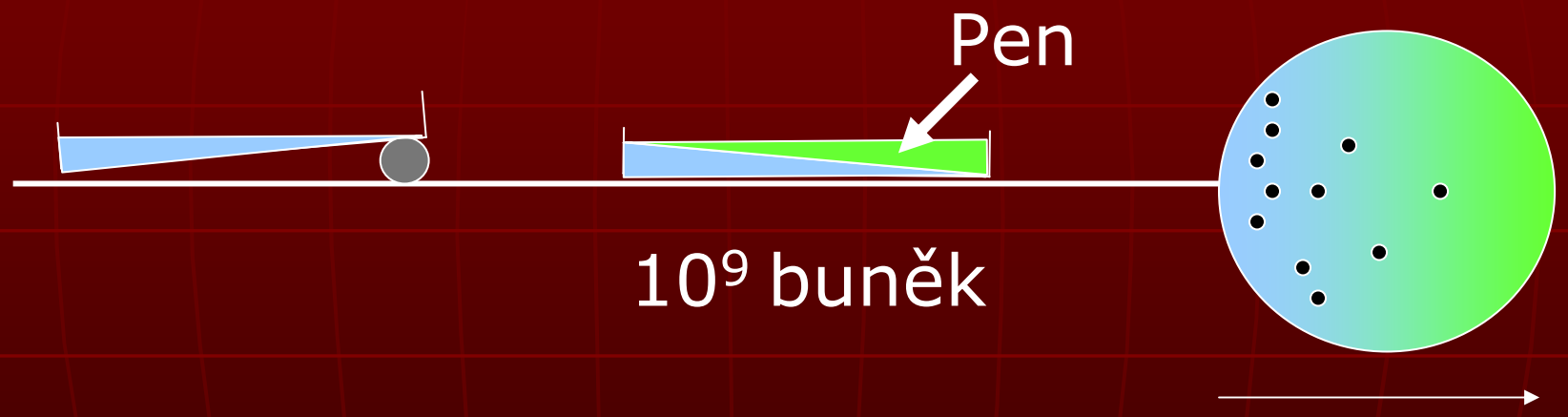
Používání antibiotik v zemědělství podporuje vznik rezistencí

- Chickens fed tet-feed
- In 1 week intestinal flora ≃ entirely tetR organisms
- ⇧ resistant intestinal bacteria in farm members, not in neighbors
- within 6months:
  - farm dwellers: 31% weekly fecal samples > 80% tetR
  - neighbors: 6.8%
  - resistant bacteria contained transferable plasmids
  - selective pressure by tet-feed extends to human beings in contact with chickens and the feed

Způsoby získání rezistence

1. Adaptace (selekcí) – velmi rychlá při vysokém selekčním tlaku a krátké generační době
2. Horizontální přenos genů rezistence – R plazmidy

Generace plazmidů rezistentních k Pen

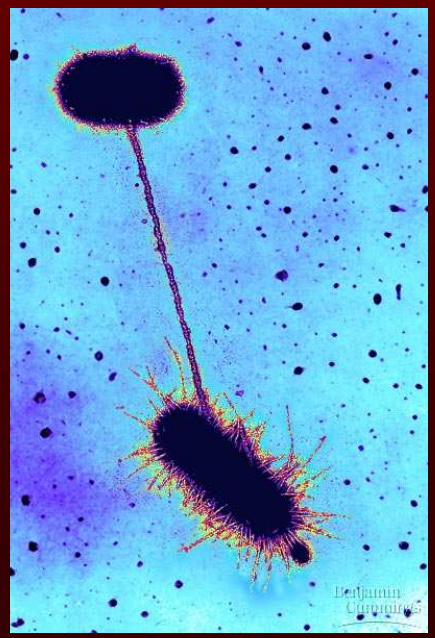


Evoluce genomů

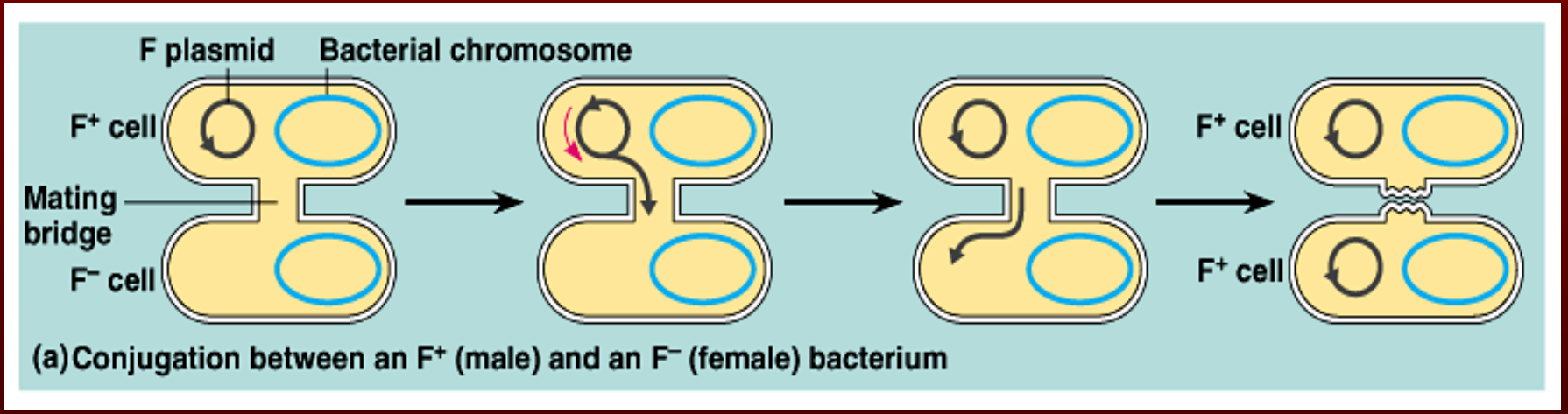
- Získání nových sekvencí:
  - a) Bakterie- konjugace plazmidů (F plasmid, Hfr)
  - b) Fágy – transdukce
  - c) DNA transformace
  - D) Transposony

Plazmidy

- Plazmidy jsou mezi bakteriemi velmi běžné
- Až 25% všech bakterií obsahuje plazmid …



Konjugace F (fertility) plazmidu



Copyright © 2002 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

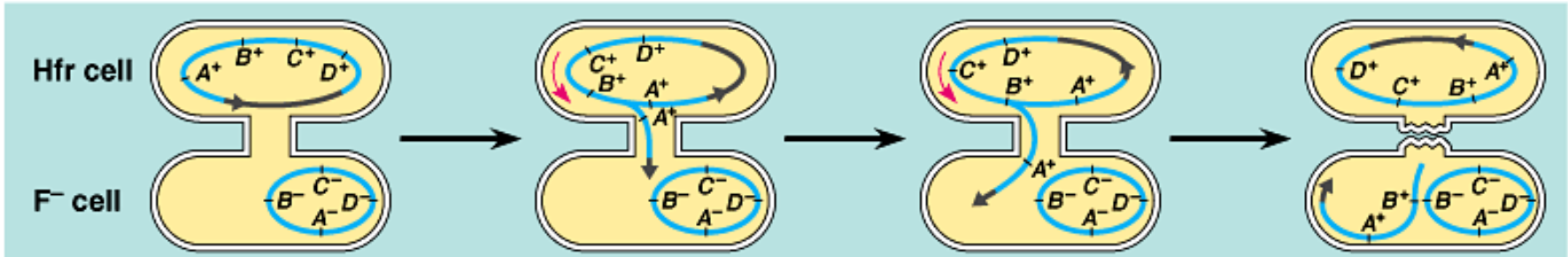
F plazmid se může začlenit do genomu bakterie

- Vzniká Hfr buňka (high frequency of recombination)

(b) Conversion of an F+ male into an Hfr male by integration of the F plasmid into the chromosome

Copyright © 2002 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

- Při konjugaci se může F plazmid chybně vyštěpit a přenést do F^- buňky geny z Hfr buňky



Copyright © 2002 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

- Rekombinací dojde k výměně genů v chromozomu bakterie
- Výsledkem je bakterie, která obsahuje gen(y) z jiné bakterie

(d) Recombination between the Hfr chromosome fragment and the F− chromosome

Copyright © 2002 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

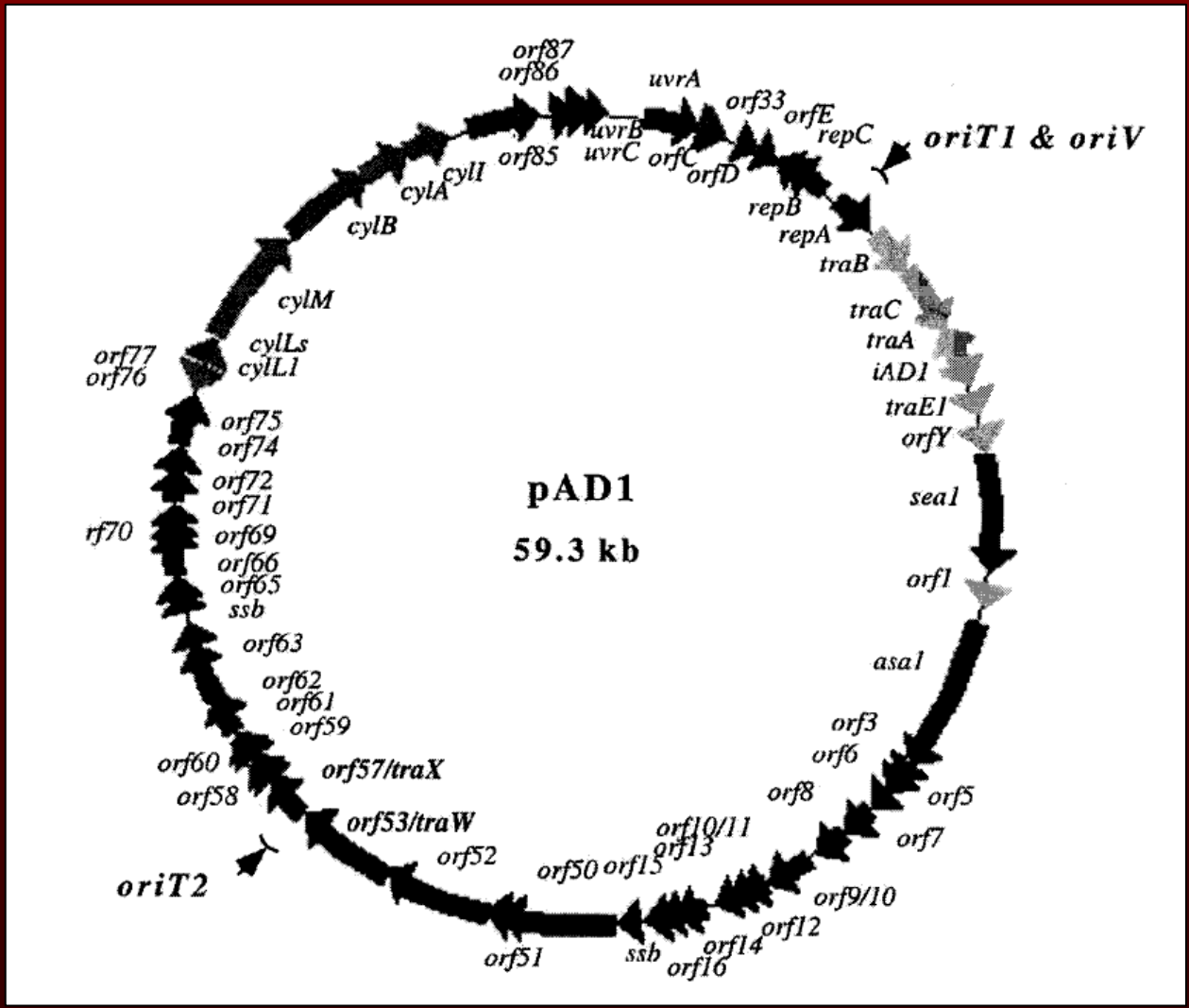
Potvrzené přirozené konjugace bakterií

donor	recipient	gen	prostředí
Erwinia herbicola	*E.cloacae*	Plasmid s rezistencí k Ab.	Larva hmyzu
Rhizobium leguminosarum	*R.leguminosarus*	Symbiotický plazmid fixující N_2	Půda
Pseudomonas fluorescens	*P.fluorescens*	Mobilní plazmid	Půda
Ralstonia eutrophus	*P.fluorescens*	Mobilní plazmid	Rhizosféra
Pseudomonas syringae	*E.amylowora*	Plasmid s rezistencí k Ab	Listy hrušně
P.syringae	*P.syringae*	Plasmid s rezist. Ab, těžké kovy, Tn A^R	Listy bobu
Pseudomonas putida	*P.putida*	Katabolický plazmid, plasmid s GFP	Listy bobu

Charakteristiky konjugativních plazmidů

- Tend to be relatively large: > 50kb
- Plasmid encoded features
  - Origin of transfer (*ori*T)
  - DNA replicating enzymes (e.g., helicase, relaxase, replicase)
  - Coupling proteins, transport proteins, aggregating proteins
- Konjugací se mohou přenášet geny i mezi velmi vzdálenými bakteriálními druhy
- Konjugace je hlavní způsob přenosu genů rezistence

Enterococcus faecalis Conjugative Plasmid



Clewell, Plasmid 48:193 (2002)

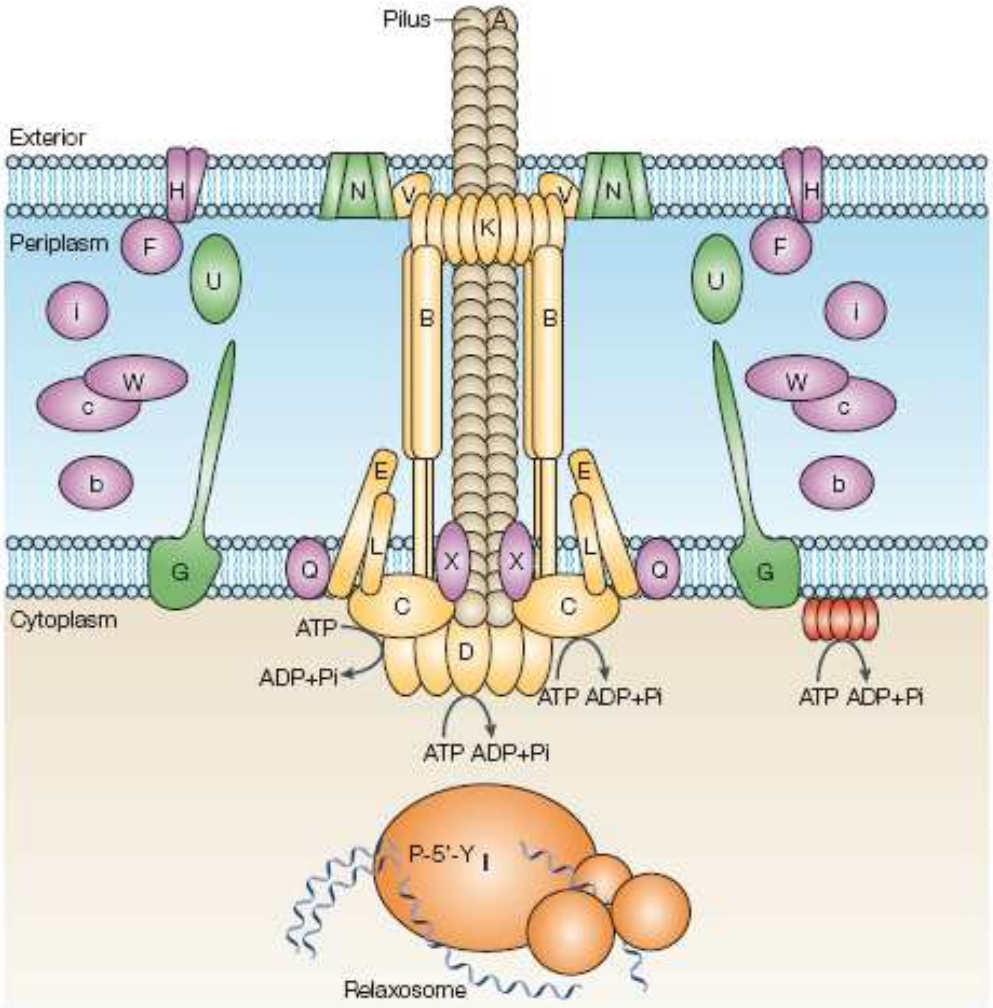
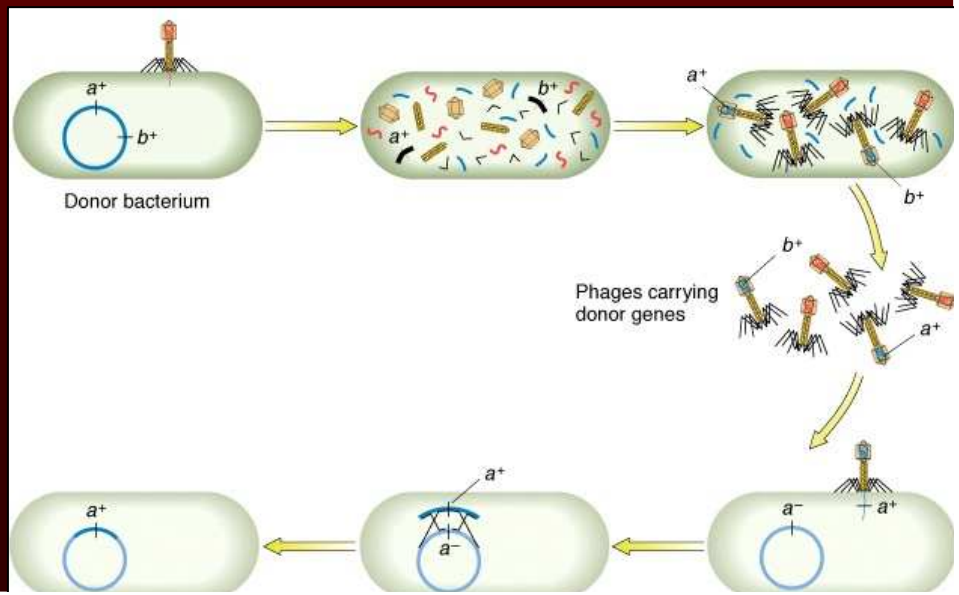


Figure 2 | **Signature proteins of conjugative systems in Gram-negative bacteria.**

Transdukce fágy

- V 1 ml mořské vody je až 1 000 000 virů
- Bakteriofágy mohou přenést genomové geny s frekvencí 10^{-8}
- Mezidruhový přenos genů v oceánu je cca 20^{15}/sec



Potvrzené přirozené transdukce bakterií

donor	recipient	fág	prostředí
Pseudomonas aeruginosa	*P.aeruginosa*	*F116*	Voda
Pseudomonas aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*	F116	Povrch listů
Vibrio	*Vibrio*		Sladká voda
E.coli	*E.coli*	P1	Půda
Vibrio cholerae	*Vibrio cholerae*		

Transpozice

- Proces přemístění DNA sekvence z jednoho místa do druhého (inter-, intramolekulární)
- Cílovým místem je libovolná oblast genomu
- Nejjednodušší transpozony = inzerční elementy - (650-1600pb) obsahují jen gen(y) pro svou vlastní transpozici
- Inzertovaná sekvence obsahuje transpozázu a obrácené repetice (20-40nt dlouhé)

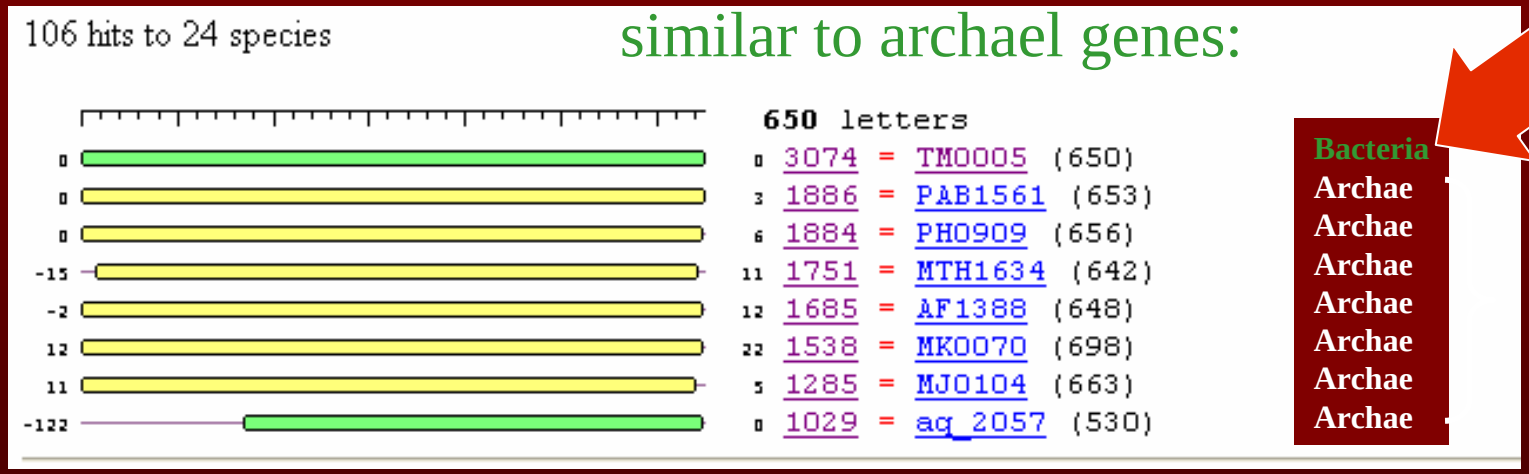
Jak identifikovat horizontální přenos genů?

- Informace z DNA
  - Fylogenetické stromy
  - Obsah G+C
  - Využívání kodónů

„Nová“ sekvence v genomu si podržuje po nějaký čas vlastnosti donorového genomu a je tak odlišitelná od zbývající DNA daného organismu

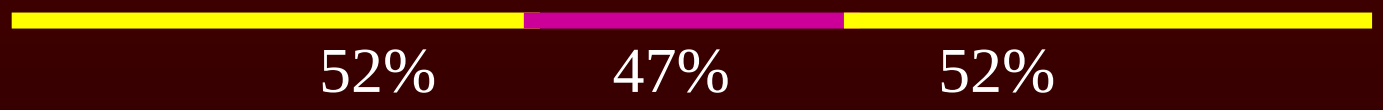
Podobnost daného genu s nepříbuzným organismem

TM0005 of *T. maritima* (a bacteria) is m
similar to archael genes:

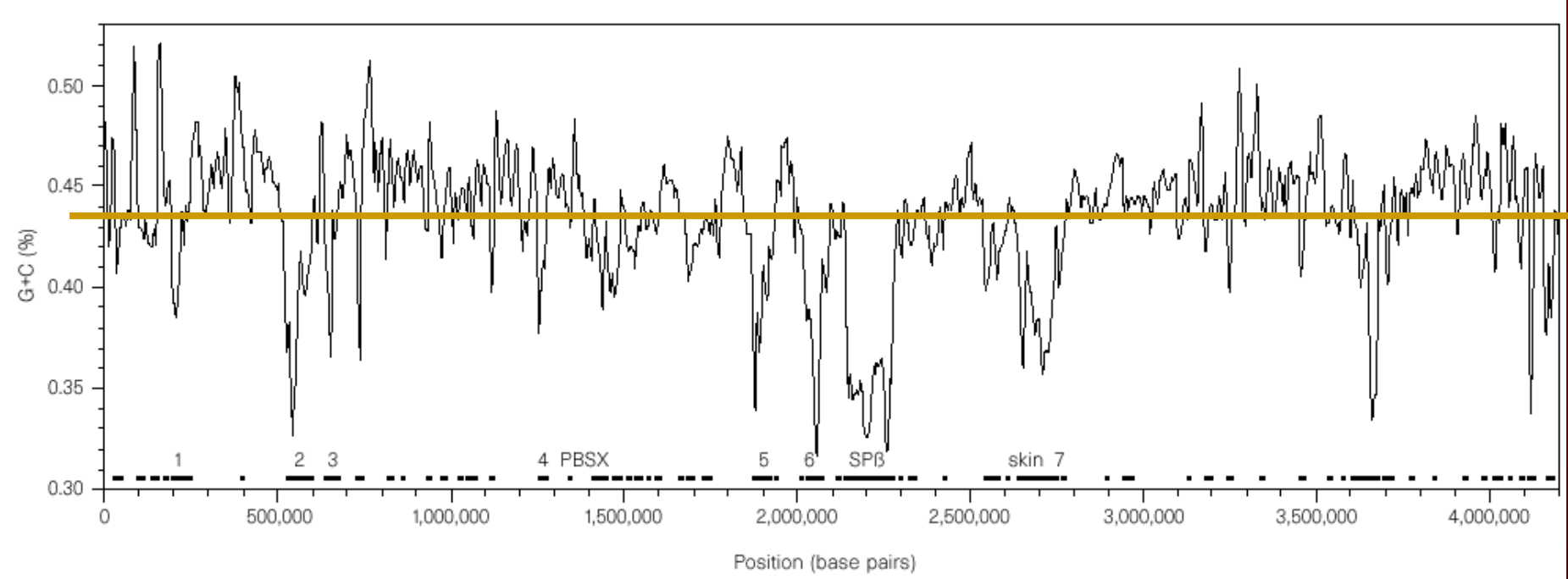


Obsah G+C

- Measure the amount of G+C content in regions
- If one region varies from most of the genome, than likely HGT



Most genes have roughly the same GC content within a genome



- Distribution of A + T-rich islands along the chromosome of *B. subtilis.*
- Known prophages (PBSX, SPb and skin) are indicated by their names, and prophage-like elements are numbered from 1 to 7.

Kunst, F et al. Nature (1997) **390** 249-256

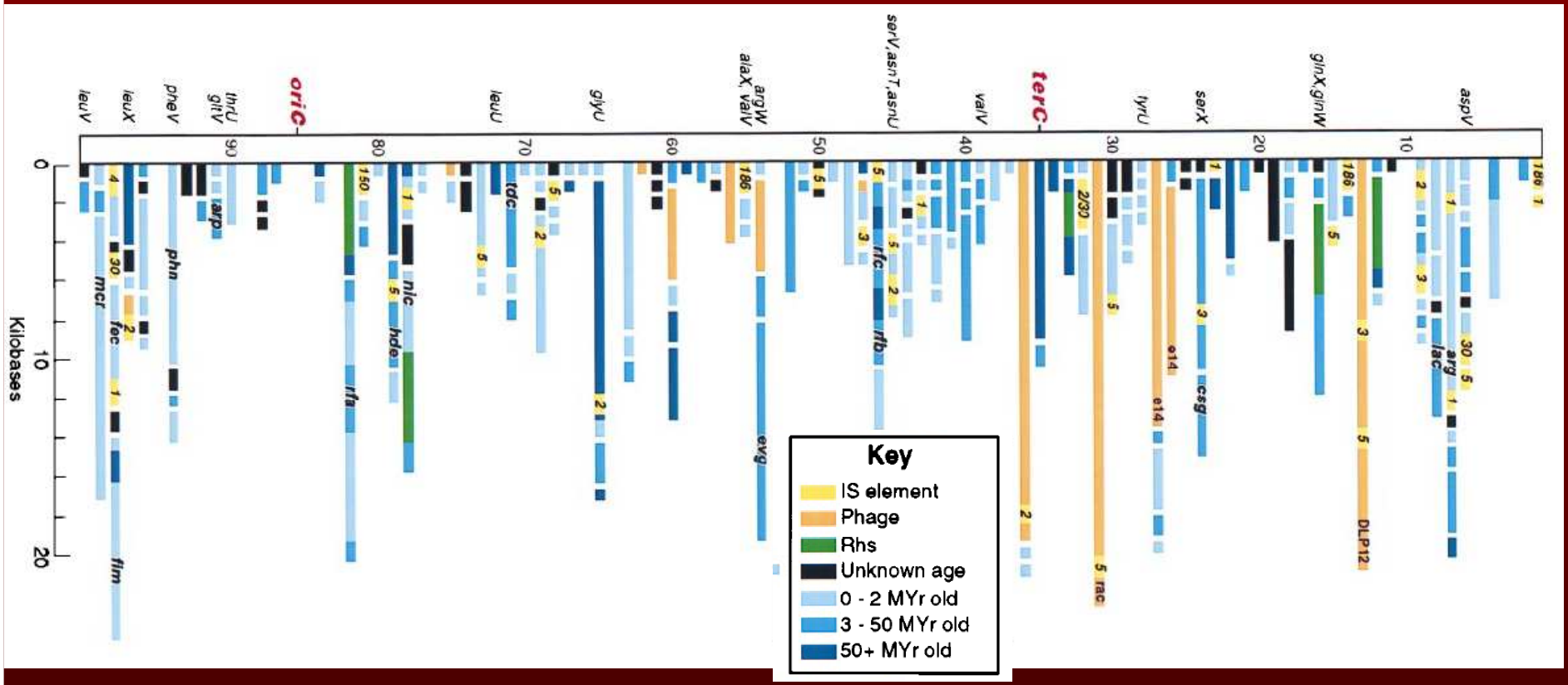
Neobvyklé složení DNA

U synonymních kodónů se očekává jejich stejně častý výskyt

AAA	AAC	ACA	ACC	CAA	CAC	CCA	CCC
AAG	AAU	ACG	ACU	CAG	CAU	CCG	CCU
AGA	AGC	AUA	AUC	CGA	CGC	CUA	CUC
AGG	AGU	AUG	AUU	CGG	CGU	CUG	CUU
GAA	GAC	GCA	GCC	UAA	UAC	UCA	UCC
GAG	GAU	GCG	GCU	UAG	UAU	UCG	UCU
GGA	GGC	GUA	GUC	UGA	UGC	UUA	UUC
GGG	GGU	GUG	GUU	UGG	UGU	UUG	UUU

Expect 50/50 frequency for two phenylalanine codons

18% of *E. coli* genes are foreign



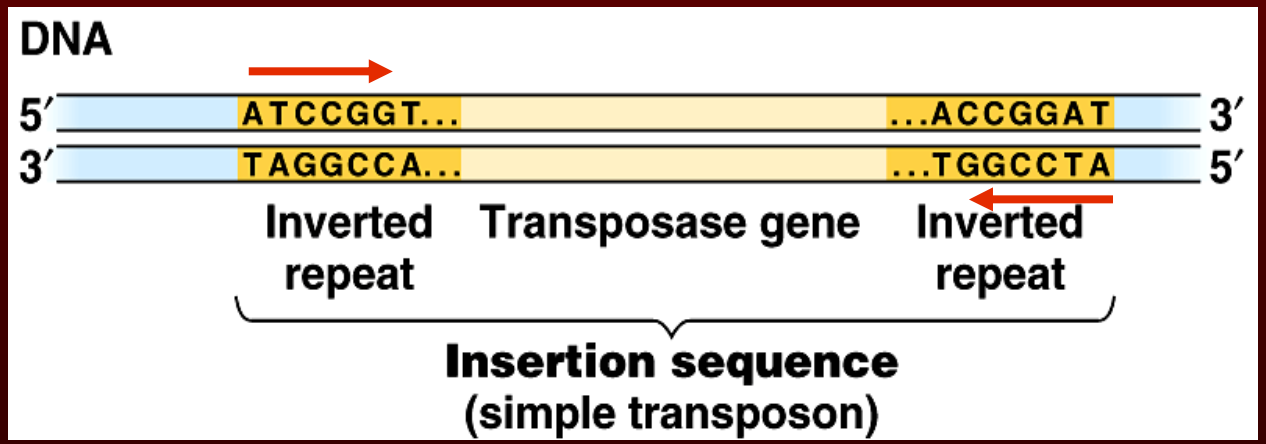
- Using base composition and codon usage to identify HT's
- 755 (17.6%) of the 4288 ORFs in the genome originated through horizontal gene transfer.
- Transferred in at least 234 events

Lawrence and Ochman. PNAS (1998) **95** 9413–9417

Transponovatelné elementy

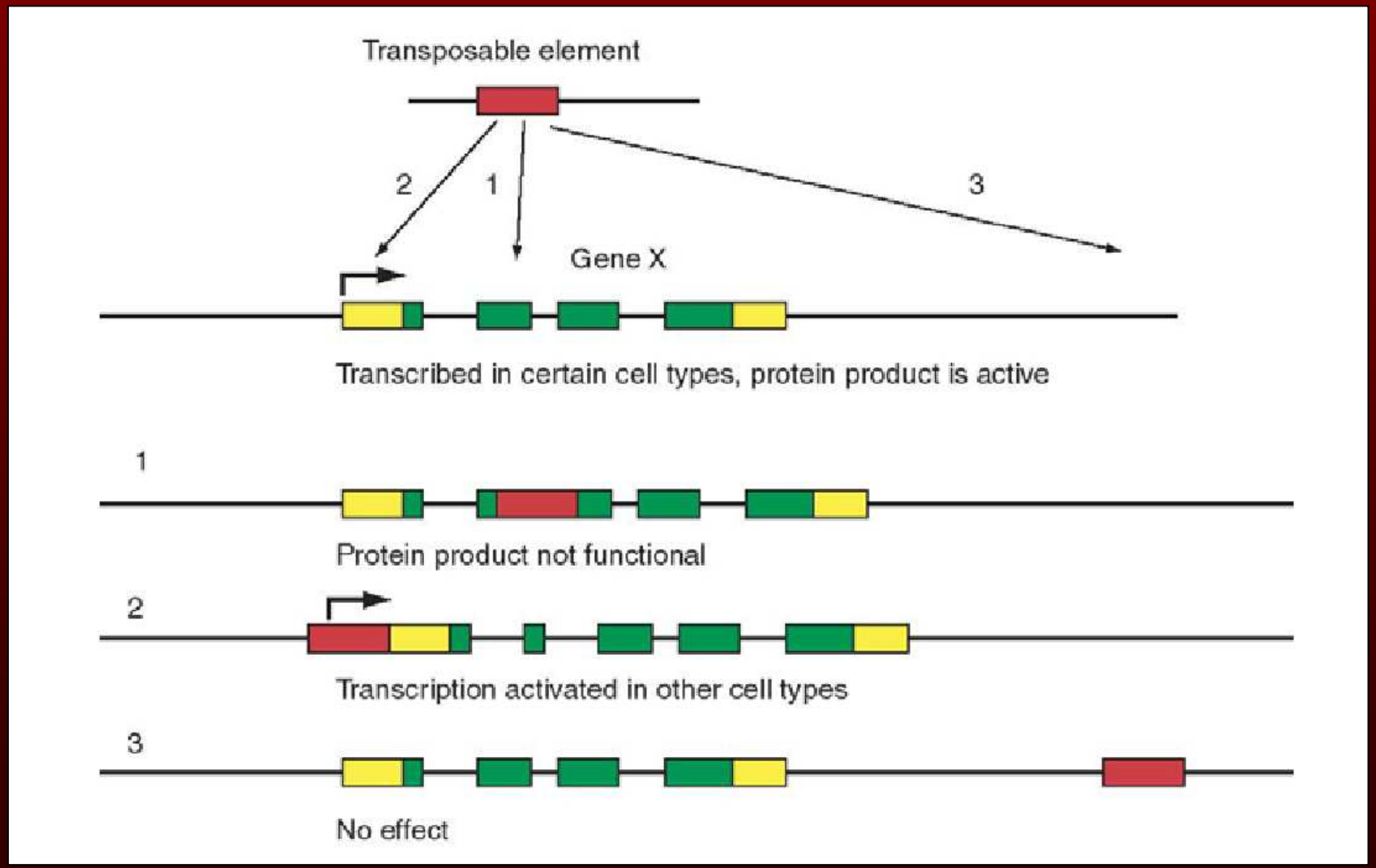
- “mobilní genetické elementy”
- představují 45% lidské chromosomální DNA
- Účastní se spontánních mutací, přeuspořádávání, horizontálního přenosu
- Přispívají speciaci a změně genomu (u bakterií jsou TE spojeny s geny rezistence)
- Buňky musí potlačovat transpozici aby udržely stabilitu genomu

- Transpozáza
  - Rozeznává koncové repetice
  - Štěpí cílové sekvence
  - Po transpozici spojuje cílové sekvence



Copyright © 2002 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

Možné efekty transpozonu



Složené Tn elementy

- Jejich konce jsou tvořeny IS-elementy
- Centrální část může nést geny rezistence

Složené Tn elementy

- Jejich konce jsou tvořeny IS-elementy
- Centrální část může nést geny rezistence
- Transponovat se mohou jak samotné IS-elementy, tak celý složený transpozon

Properties of IS and Tn elements

Name	Size (bp)	Direct Repeats	Terminal Repeats	Genes Carried
IS*1*	768	9 bp	23 bp, inverted	None
IS2	1327	5 bp	32 bp, inverted	None
IS*3*	1400	3-4 bp	32 bp, inverted	None
Tn3	4957	5 bp	38 bp, inverted	*amp*^{R}
Tn*5*	5700	9 bp	1400 bp (IS*50*), inverted	*kan*^{R}, *ble*^{R}, *str*^{R}
Tn*9*	2500	9 bp	768 (IS*1*), direct	*cam*^{R}
Tn*10*	9300	9 bp	1400 bp (IS*10*), inverted	*tet*^{R}

Struktura Tn3

3 trans-acting genes:

4957 bp

transposase

tnpA

"repressor"

tnpR

Tn3 resolváza – působí během transpozice

ampicilin-rezist.

bla

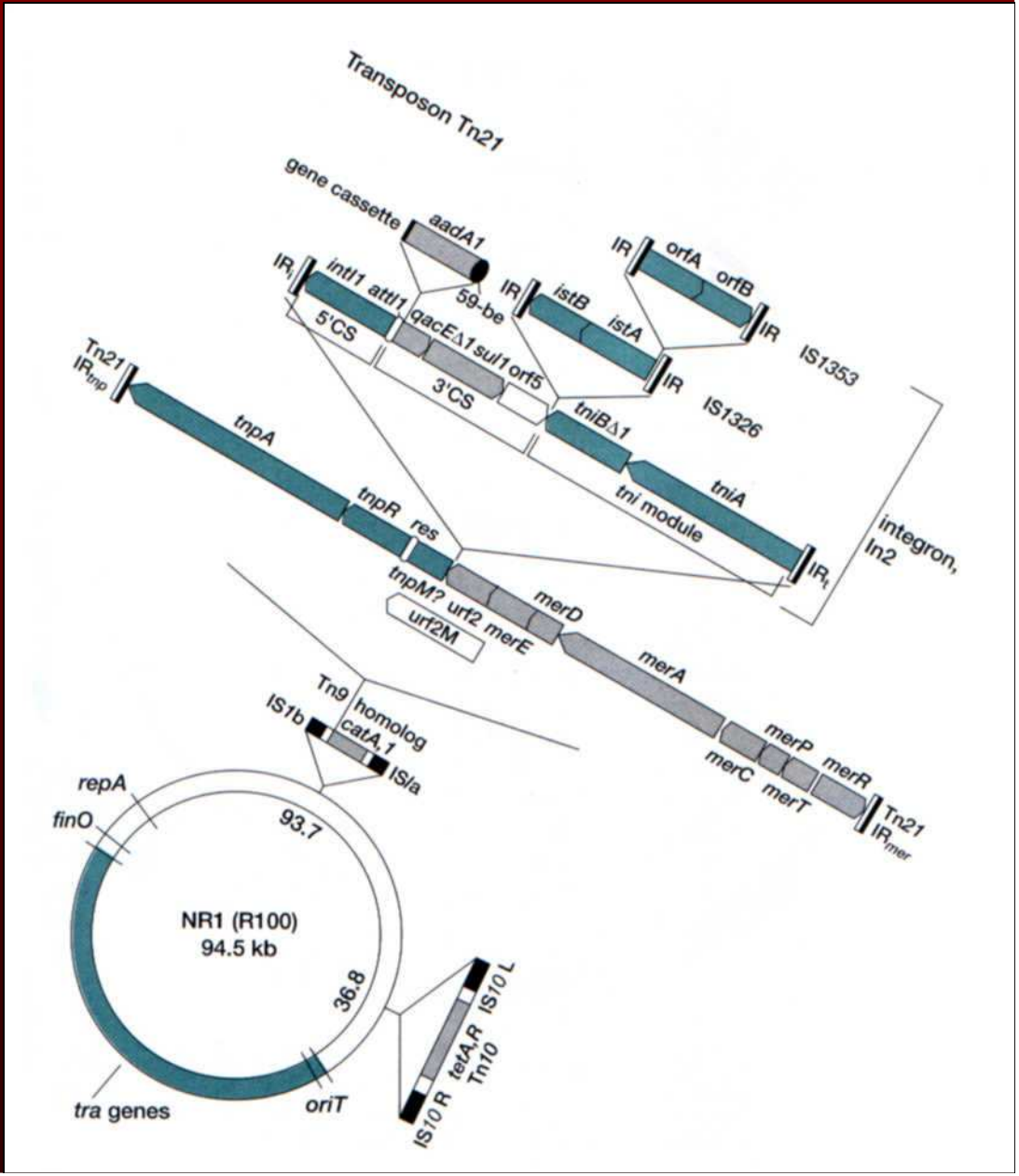
2 cis-acting sites:

38 bp inverted repeat ends

120 bp "IRS" or *res* internal resolution site

Složené Tn elementy

- Konjugativní plazmid R100 ze *Shigella flexneri* nese geny rezistence proti Tet (Tn10), Chl, Str, Spectinomycinu, sulfonamidu, kvarterním amoniovým solím (Tn2670)



- 1. Frekvence transpozice
  - ~10^{-3}-10^{-4} per element per generation
- 2. Frekvence spontánních mutací
  - ~10^{-5}-10^{-7} per generation
- 3. Frekvence reverze (přesné vyštěpení IS elementu):
  - ~10^{-6}-10^{-10} per generation
  - ~10^{3} x méně častá než inzerce

Transposony u eukaryot

- ~3% lidského genomu jsou transpozony
- Většina eukaryotických transposonů není podobných s prokaryotickými
- Jiné sekvencemi připomínají retroviry (Retrotransposony)
- ~20% lidského genomu jsou retrotransposony

Genetika McClintockové

Transponovatelné elementy kukuřice

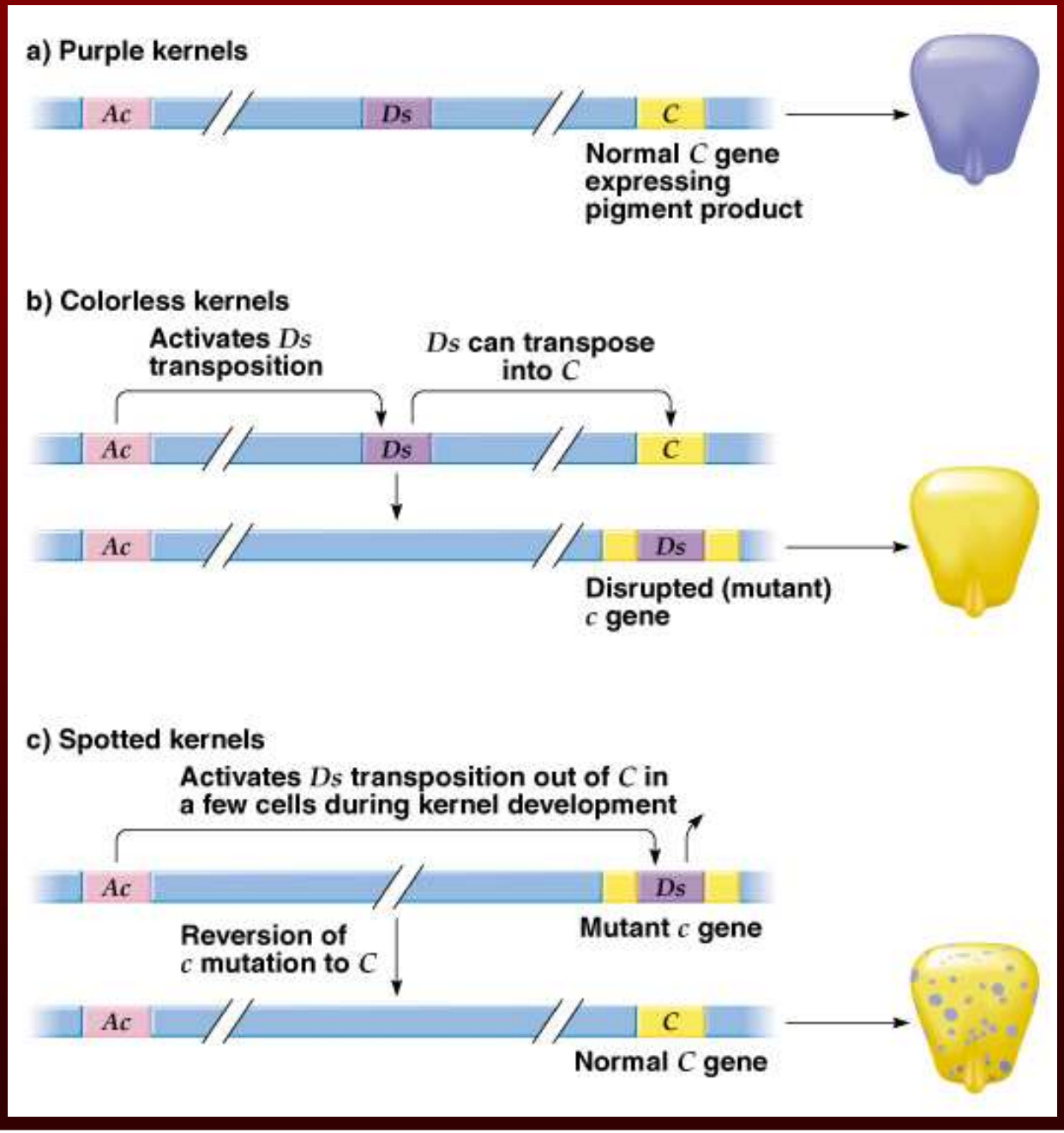
Barbara McClintock (1902-1992)
Cold Spring Harbor Laboratory, NY

Nobel Prize in Physiology and Medicine 1983

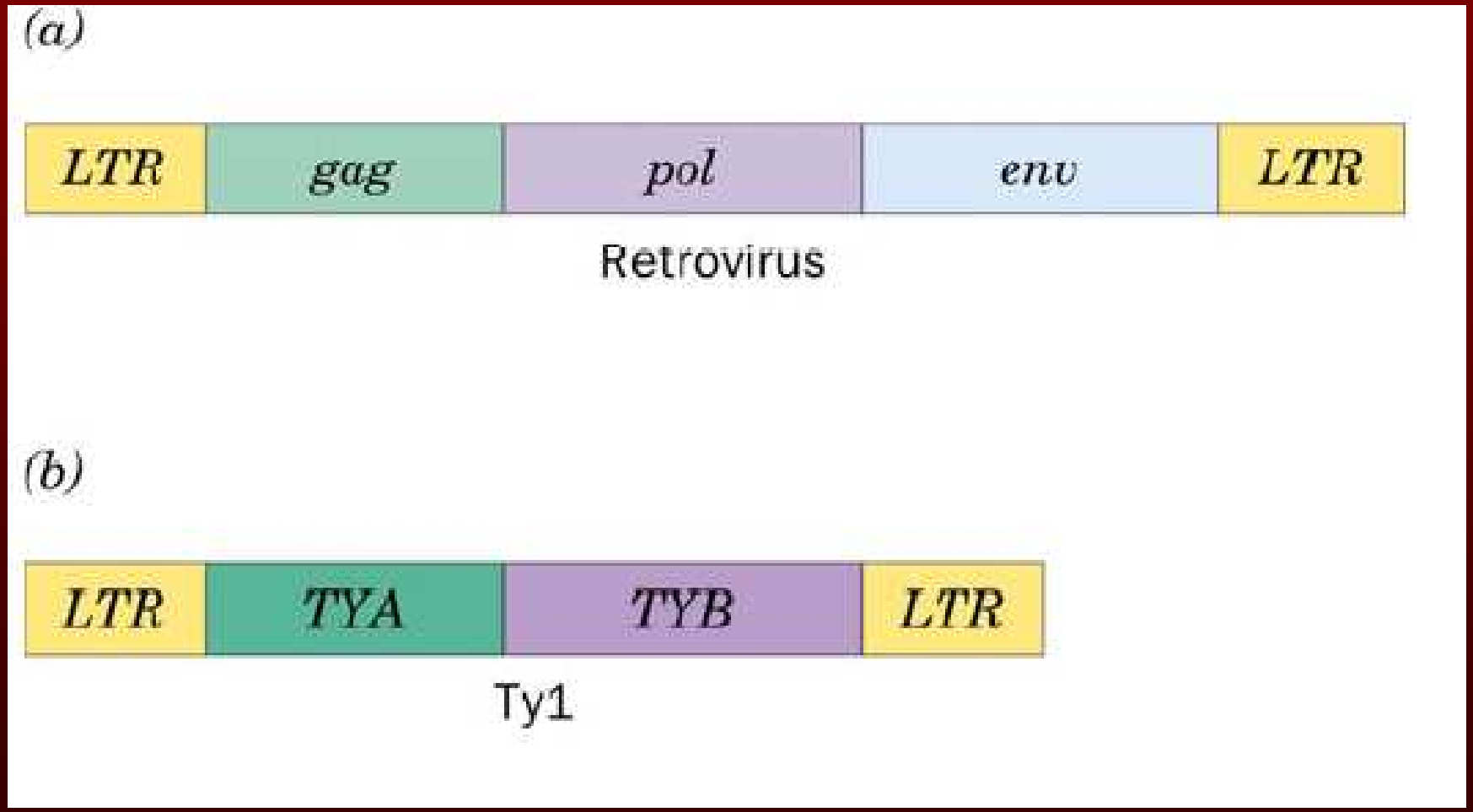
“for her discovery of mobil genetic elements”

- Studied transposable elements in corn (*Zea mays*) 1940s-1950s

Transposon effects on corn kernel color.

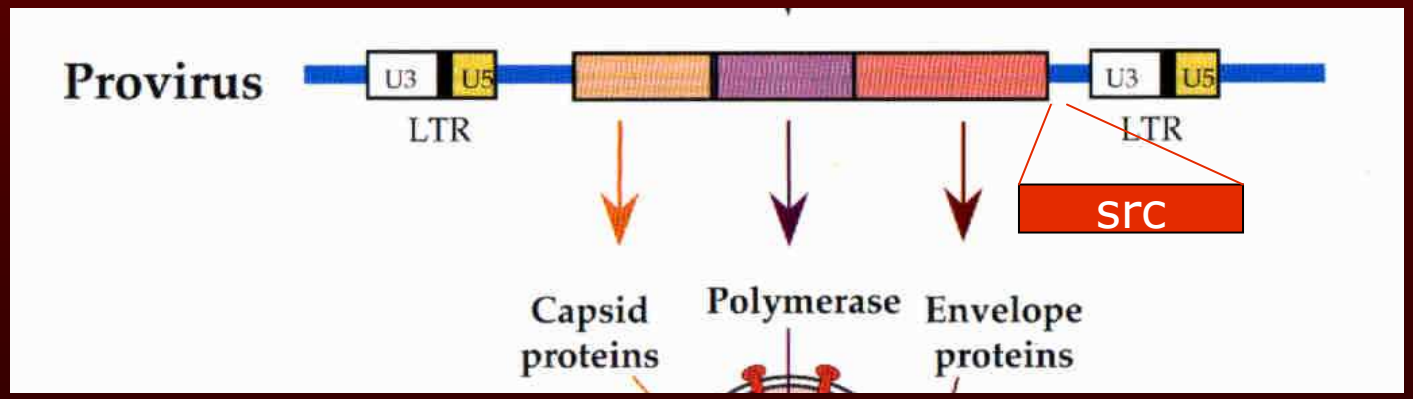


Gene sequences of (*a*)retroviruses and (*b*) the Ty1 retrotransposon.



Retroviry a rakovina

- Buněčný protoonkogen (strukturní gen, kontrolující dělení buňky) může být aktivován
  - Translokací
  - Může být začleněn do retroviru

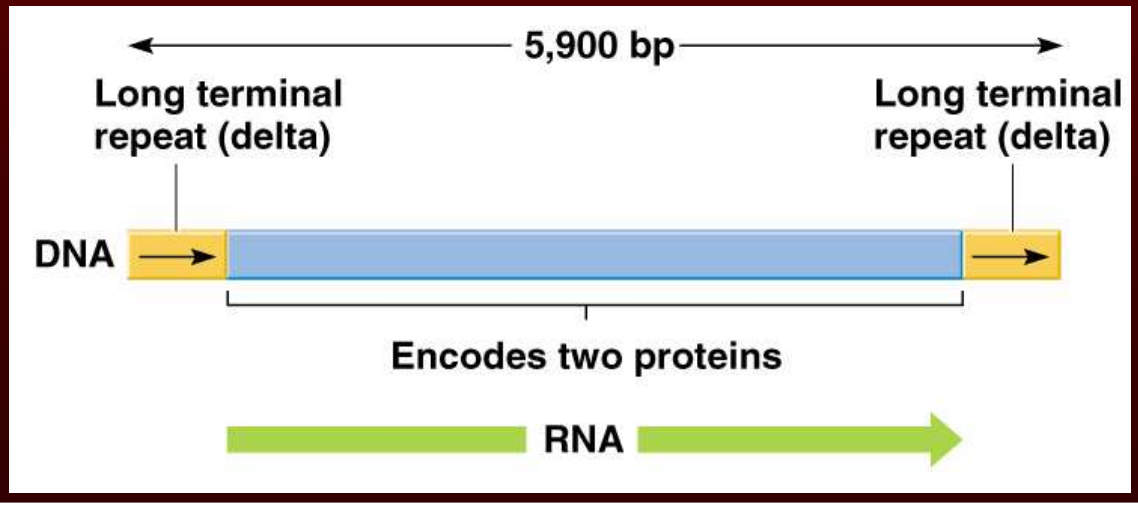


Ty elementy kvasinek

- Similar to bacterial transposons; terminal repeated sequences, integrate at non-homologous sites, target site duplication…

- Ty elements share properties with retroviruses, retrotransposons:
  - Synthesize RNA copy and make DNA using reverse transcriptase.
  - cDNA integrates at a new chromosomal site.

- Na genom připadá 30-35 Ty-elementů
- Mění expresi genů, když se začlení do regulačních oblastí kvasinky



Copia elementy *Drosophila melanogaster*

- ~15% of *Drosophila* genome thought to be mobile.

  - Conserved, 5-100 scattered copies/genome
  - Structurally similar to yeast *Ty* elements
  - Use RNA intermediate and reverse transcriptase

  - Aktivují expresi vkládáním se do regulačních oblastí

Lidské elementy

Alu1 SINE (short-interspersed sequences)

- ~300 bp long, 300,000-1M x (10% genomu)
- Flanked by 7-20 bp direct repeats
- Some are transcribed, thought to move by RNA intermediate
- AluI SINEs detected in neurofibromatosis

L-1 LINE (long-interspersed sequences)

- 6.5 kb element, 50,000-100,000X (~20% genomu)
- Contain ORFs with homology to reverse transcriptases; nemají LTR
- Some cases of hemophilia

LTR elementy – proviry

- Cca 100 000x v genomu (8%)

LINE structure

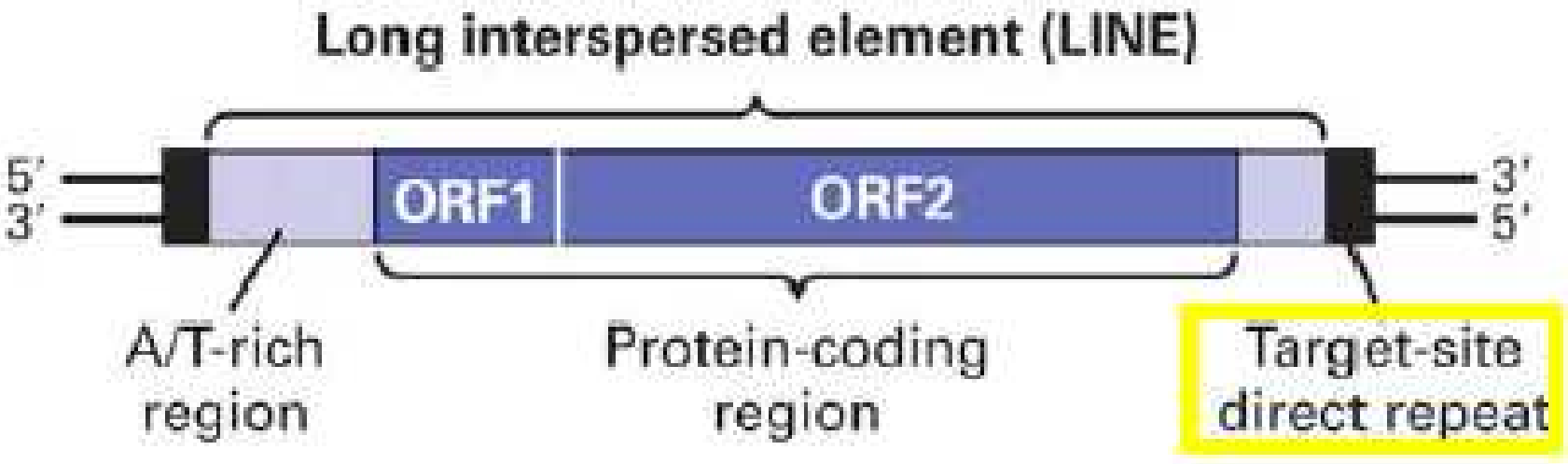
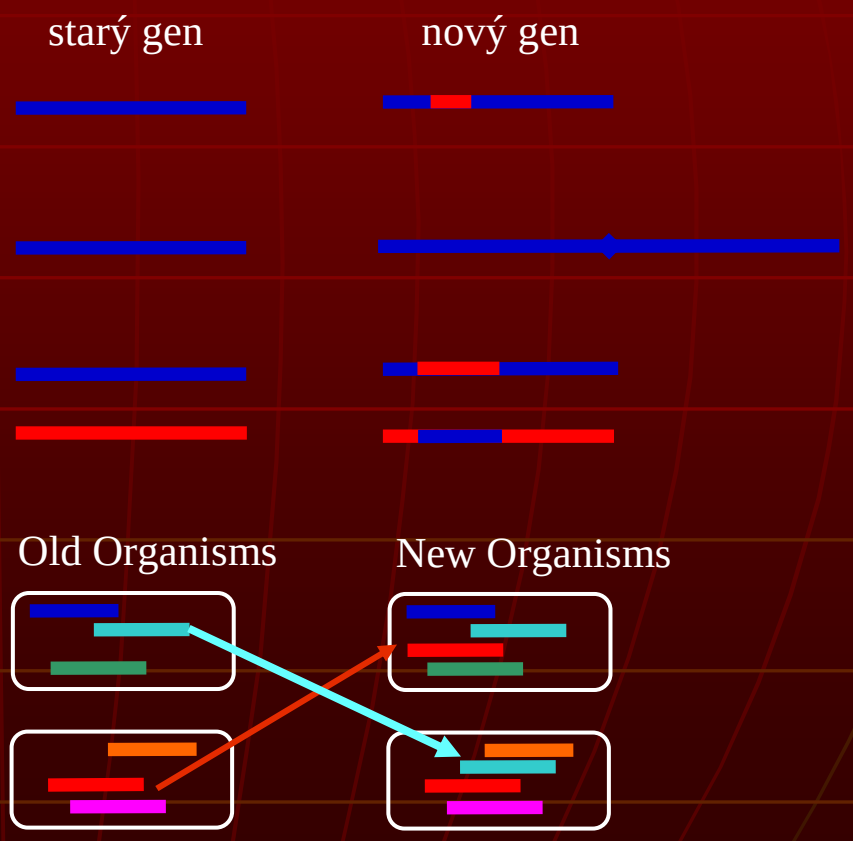


Fig. 10-15

ORF1 - RNA binding protein
ORF2 - RT, DNA endonuclease

Evoluce genomů

Existují 4 základní cesty, jak získat nové geny z již existujících genů:



Intragenní mutace

Duplikace genů

Promíchání segmentů DNA

Horizontální přenos

Evoluce genomů

- Soubor genů v jednom organizmu je potenciálně dostupný i dalším organizmům
  - Záleží jen na pravděpodobnosti přenosu…

Chraňme blechy, nevíme, jestli jednou nebudou součástí našeho genomu!

Evoluce genomů

- Pokud je pravděpodobnost horizontálního přenosu nejvýše v řádu 10^{-6}, bude se týkat převážně mikrobiálního světa…

Potenciální místa HGT

Ekosystémy s vysokou koncentrací organismů a variabilitou

- Půda
- Voda
- Sedimenty
- Žaludky přežvýkavců
- Trávicí trakty
- Povrch listů
- Cévní svazky
- Nemocnice…
- ??

Evoluce genomů

- Získání nových sekvencí:

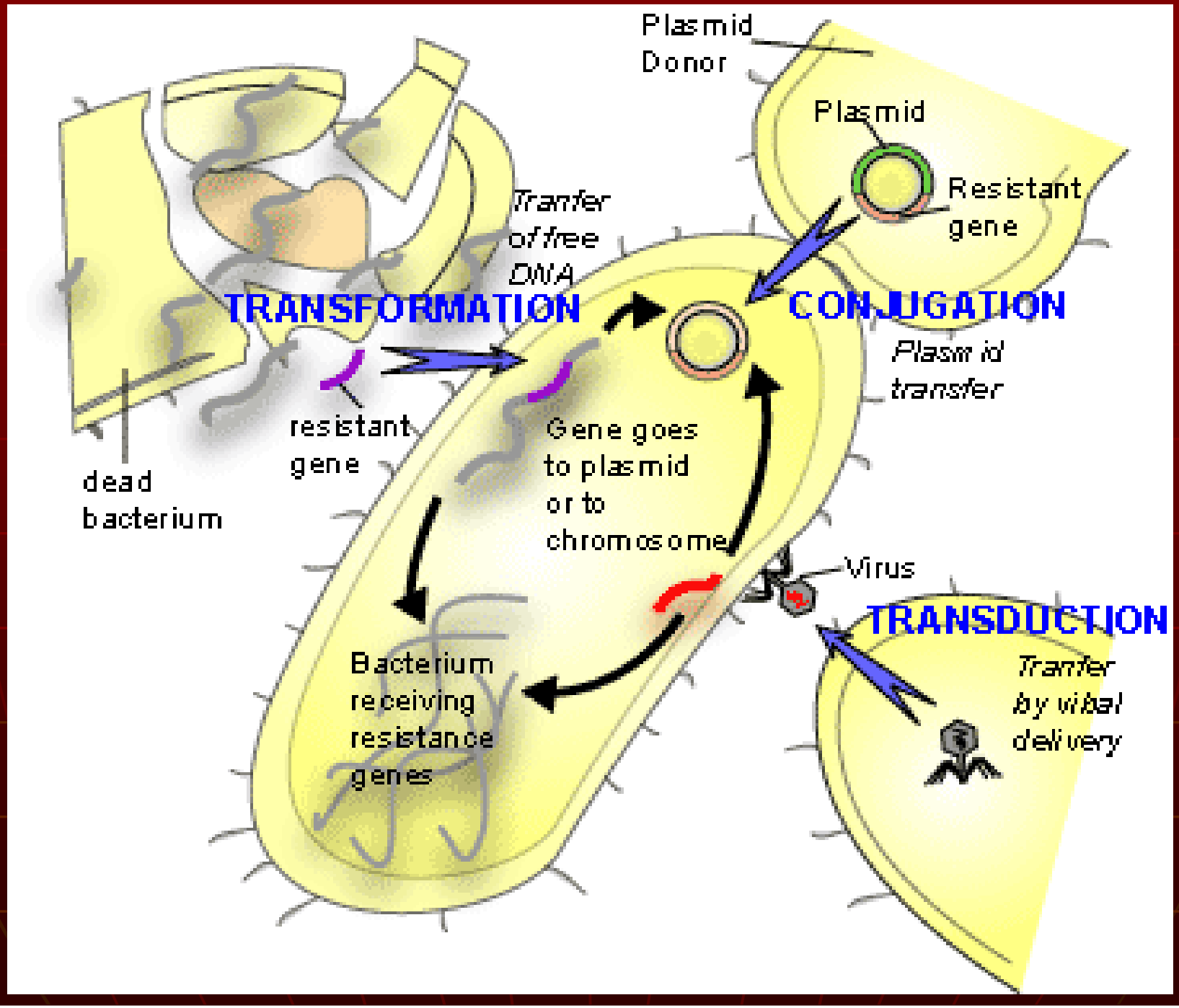
  a) DNA transformace

  b) Inkorporace do genomu rekombinací

  c) Bakterie- konjugace plazmidů (F plasmid, Hfr)

  d) Fágy – transdukce

  e) Transposony – transpozice


Plasmid
Donor
Plasmid
Resistant
gene
Tranfer
of free
DNA
TRANSFORMATION
CONJUGATION
Plasmid
transfer
resistant
gene
dead
bacterium
Gene goes
to plasmid
or to
chromosome
Virus
TRANSDUCTION
Tranfer
by viral
delivery
Bacterium
receiving
resistance
genes

Tok genů u půdních mikroorganizmů

- Mikroorganizmy tvoří převážnou část půdních společenstev a podstatně ovlivňují fungování ekosystému jako je koloběh živin a jejich odbourávání. Jejich přímé a nepřímé interakce s rostlinami tvoří zpětné vazby, které ovlivňují primární produkci a dynamiku vegetace. Jsou významné z patogenního hlediska i z hlediska ochrany.

Tok genů u půdních mikroorganizmů

- Mikroorganizmy tvoří převážnou část půdních společenstev a podstatně ovlivňují fungování ekosystému jako je koloběh živin a jejich odbourávání. Jejich přímé a nepřímé interakce s rostlinami tvoří zpětné vazby, které ovlivňují primární produkci a dynamiku vegetace. Jsou významné z patogenního hlediska i z hlediska ochrany.

Tok genů u půdních mikroorganizmů

- Většina půdních mikroorganizmů je nekultivovatelná (až 99%). V gramu půdy jsou tisíce druhů bakterií, včetně mnoha, které jsou pro člověka patogenní.

HGT u půdních mikroorganismů

- Pravděpodobnost horizontálního přenosu je nejvyšší v případě, že obě bakterie mají homologní úseky

- U homologních sekvencí může být frekvence až 10^{-4}, u nehomologních bakterií se frekvence snižuje až na 10^{-17}

- (the *nptII* gene in transgenic potato plants transforms soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* BD413 with the same high efficiency as *nptII* genes on plasmid DNA ($3x10^{-5}$ -$1x10^{-4}$) <u>despite</u> the presence of more than 10^{6} fold excess of plant DNA. However, in the absence of homologous sequences in the recipient cells the transformation dropped to 10^{-16}–10^{-17} (de Vries J, Wackernagel 1998)

Homologní sekvence u půdních bakterií?

- U půdních bakterií byly nalezeny geny rezistence pro ampicilin a kanamycin (*bla* a *npt11)*
- Rovněž geny rezistence k herbicidům!

Herbicide	Resistance Gene	Gene Source
Glufosinate, phosphinothricin, bialaphos	*bar*, PAT (phosphinothricin acetyl transferase)	*Streptomyces* sp. *Alcaligenes* sp.
Glyphosate	*aro*A, EPSPS (3-enoyl pyruvyl shikimate 5-phosphate synthase) gene	*Agrobacterium* sp.
Bromoxynil	BXN (Bromoxynil nitrilase)	*Klebsiella pneumoniae*
Sulfonamides	DHPS (dihydropteroate synthase), *sul*	Broad host range plasmid
Sulfonylurea	ALS (acetolactate synthase)	*Nicotiana tabacum*

*Bialaphos (Phosphinothricin-alanyl-alanine) is an antibiotic that inhibits a key enzyme in the nitrogen assimilation pathway, glutamine synthetase, leading to accumulation of toxic levels of ammonia in both bacteria and plant cells

Faktory zvyšující pravděpodobnost získání cizích genů

- Stabilita DNA
- Přítomnost homologních sekvencí in resident microorganisms
- Doba, po kterou zůsává DNA dostupná v blízkosti potenciálních recipientů

Factors that increase HGT

- Cokoli, co vyvolá protistresovou odpověď
- SOS odpověď — indukce specifických genů reagujících na poškození DNA— zmírňuje současně represi genů, které jsou nezbytné pro HGT

Factors that increase HGT

- Stres mohou vyvolat běžné zemědělské aktivity – orba, aplikace pesticidů, herbicidů, nebo rychlé změny prostředí – změna expozice UV, přemokření, sucho, změna osvětlení…

Stabilita a přetrvávání DNA

- DNA může přetrvávat v půdě i roky a transformovat další organismy
- Transgenní DNA se může rozšířit do bakterií a virů a šířit tak např. geny rezistence k antibiotikům

As a result of these risks to human health the EU has decided to prohibit and phase out GMOs with antibiotic resistance marker genes (directive 2001/18EC and Revising Directive 90/220/CEE)

Rizika HGT

Mnohem významnější než frekvence přenosu je selekční tlak:

I velmi nízká frekvence může mít velký dopad, existuje-li silná selekce.

Velký dopad je i v případě vzniku evoluční novinky, kdy se může projevit synergický nebo aditivní efekt

Risk analysis
Summary of unintended effects

- Increased spread of antibiotic resistance
- Increased resistance to herbicides, leading to super-weed characteristics
- Increased occurrence of cancers caused by insertional mutagenesis and position effect changes in gene expression.
- Reduced biodiversity due to transgene selection
- Unpredictable effects on genetic evolution and ecosystem function

Potvrzené případy přirozené transformace bakterií

Pseudomonas sp.	Mořská voda, sedimenty	Multimery plazmidů
A.calcoaceticus	půda	Chromozomální *trp*
A.calcoaceticus	voda	Plazmid
A.calcoaceticus	Říční sedimenty	Chromozomální *his*
E.coli	Říční voda	Plazmid
P.stutzeri	půda	Chromozomální *his*, plazmid
P.stutzeri	Mořská voda	Chromozomální rif^R

Výměna DNA mezi vzdálenými organismy

- Bakterie – archea (bakt. *Thermatoga* obsahuje 24% archebakteriální DNA)
- Bakterie – rostliny (Ti plazmid *A.tumefaciens*)
- Bakterie – kvasinky (konjugativní přenos na *S.cerevisiae*)
- Bakterie – savec (intracelulární bakterie *Shigella flexneri*)
- Bakterie – eukaryota (endosymbiotické bakterie)
- Konzumace DNA ???

Ne strom, ale síť života…