Evolucija bakterija pod utjecajem integrona

Polenus, Antonela

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:349509

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Antonela Polenus
6809/BT

EVOLUCIJA BAKTERIJA POD UTJECAJEM INTEGRONA
ZAVRŠNI RAD

Modul: Molekularna genetika
Mentor: Dr.sc. *Višnja Bačun-Družina*, red.prof

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Završni rad**

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama

EVOLUCIJA BAKTERIJA POD UTJECAJEM INTEGRONA

Antonela Polenus, 6809/BT

Sažetak: Integroni su dijelovi molekule DNA koji stječu otvorene okvire čitanja koji su ugrađeni u egzogene kazete gena i pretvaraju ih u funkcionalne gene osiguravajući njihovu točnu ekspresiju. Oni su drevni elementi koji su osnova za genomske složenosti, generiranje fenotipske raznolikosti i adaptivnosti bakerija. Integroni su prvo identificirani na temelju njihove važne uloge u širenju rezistencije na antibiotike. U novije vrijeme, naše razumijevanje njihove važnosti u razvoju bakterijskog genoma je prošireno s otkrićem većih integron struktura, nazvanih superintegroni. Ovi elementi DNA sadrže stotine dodatnih gena i čine znatan dio genoma mnogih bakterijskih vrsta. Nadalje, integroni također mogu imati potencijalno negativno djelovanje, ali i značajnu primjenu u biotehnologiji.

Ključne riječi: integroni, kazete gena, antibiotička rezistencija

Rad sadrži: 33 stranice, 4 slike, 91 literaturnu referencu

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Dr.sc. Višnja Bačun-Družina, red.prof*

Rad predan: 4**.** srpanja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Final work**

Faculty of food Technology and Biotechnology

Undergraduate study Biotechnology

Department of biochemical engineering

Laboratory for biology and microbial genetics

EVOLUTION OF BACTERIA UNDER THE INFLUENCE OF INTEGRONS

Antonela Polenus, 6809/BT

Abstract: Integrons are DNA elements that acquire open reading frames embedded in exogenous gene cassettes and convert them to functional genes by ensuring their correct expression. They were first identified by virtue of their important role in the spread of antibiotic-resistance genes. More recently, our understanding of their importance in bacterial genome evolution has broadened with the discovery of larger integron structures, termed superintegrons. These DNA elements contain hundreds of accessory genes and constitute a significant fraction of the genomes of many bacterial species. Finally, integrons can also have potentially negative effects, but also an important role in biotechnology.

Keywords: integrons, gene cassette, antibiotic resistance

Thesis contain: 33 pages, 4 figures, 91 literature references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Ph.D. Višnja Bačun-Družina, Professor*

Thesis delivered: 4th July, 2016.

SADRŽAJ

UVOD …… 1

TEORIJSKI DIO …… 2

1. STRUKTURA I POVIJEST INTEGRONA …….. 2
   1.1 Struktura integrona ……... 2
   1.2 Evolucijska povijest integrona …… 4
   1.3 Raznolikost kromosomskih integrona i superintegrona…….…….. 5
   1.4 Struktura kazete gena i rekombinacija …….. 7
   1.5 Ekspresija kazete gena …… 10
   1.6 Raznolikost kazete gena i njihova funkcija …… 11
2. INTEGRONI U SADAŠNJOSTI …….. 13
   2.1 Porast rezistencije bakterija na antibiotike …….. 13
   2.2 Podrijetlo integrona grupe 1 …… 14
   2.3 Podrijetlo integrona grupe 2 …… 16
   2.4 Podrijetlo integrona grupe 3 …… 17
3. INTEGRONI U BUDUĆNOSTI ……... 18
   3.1 Biološke funkcije povezane s integronima …….. 19
   3.2 Integroni i rezistentni geni kao zagađivači ……... 20
   3.3 Generacija novih DNA elemenata i novih rezistentnih vrsta bakterija ……... 21
   3.4 Integroni kao alati za biotehnologiju …… 21
   3.5 Evolucija bakterija …….……... 22

ZAKLJUČAK ……..... 23

LITERATURA …… 24

UVOD

Razvoj rezistencije na antibiotike doveo je do otkrića mnogih mobilnih elemenata, uključujući transpozone i konjugativne plazmide. Komparativna analiza nukleotidnih sekvenci tih elemenata u konačnici je dovela do otkrića integrona, prirodnih klonirajućih i ekspresijskih sustava koji inkorporiraju otvorene okvire čitanja (*engl*. Open Reading Frame, ORF) te ih pretvaraju u funkcionalne gene.

Integroni su genetski elementi koji imaju sposobnost prihvaćanja i uključivanja novih gena mjesno-specifičnom rekombinacijom u već postojeći genetički materijal te mogu uspješno provoditi njihovu ekspresiju. Oni su naširoko poznati po svojoj ulozi u širenju rezistencije na antibiotike, osobito u Gram-negativnih bakterija. Međutim, budući da su integroni inicijalno otkriveni u kliničkim bakterijskim sojevima, postalo je jasno da su integroni čest sastav bakterijskih genoma te da imaju dugu evolucijsku povijest. Integroni se pojavljuju u gotovo svim sredinama, u mogućnosti su prenositi se između vrsta i rodova te imaju pristup velikom broju gena čija se funkcija još treba utvrditi. Istraživanjem raznolikosti integrona u prirodnim uvjetima pokazalo se da integroni, osim svoje velike uloge u širenju rezistencije na antibiotike, imaju mnogo veći značaj kao što je primjerice utjecaj na adaptaciju bakterija i evoluciju genoma.

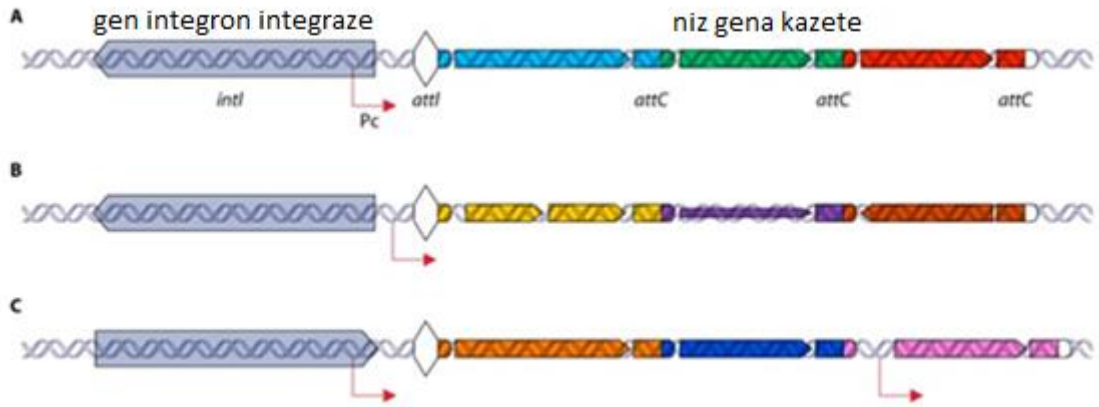
U ovom radu će biti razmatran prirodni tijek integrona. Istraživat će se aktivnost integrona i mehanizmi pomoću kojih integroni uzimaju gene iz okoline i preuređuju već postojeću zalihu gena. Prikazat će se koliko je porastao klinički značaj integrona uzimanjem gena iz raličitih izvora, potencijalna daljnja evolucija integronskih sustava te primjena integrona u biotehnologiji.

TEORIJSKI DIO

1. STRUKTURA I POVIJEST INTEGRONA

1.1 Struktura integrona

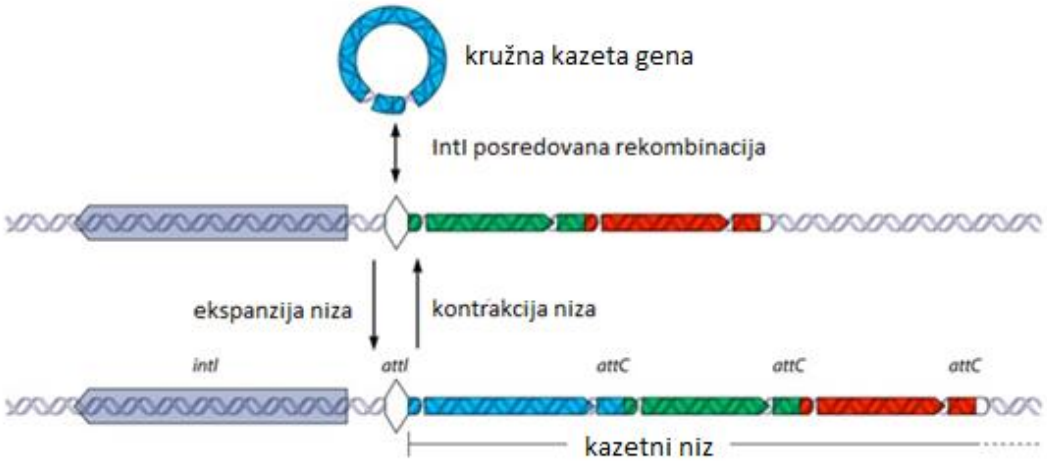
Funkcionalna osnova integrona sastoji se minimalno od tri osnovne komponente. Kombinacijom aktivnosti tih komponenata integroni preuzimaju gene i provode ekspresiju tih gena kao dio kazeta gena (Boucher i sur.,2007). Prva glavna komponenta je gen *intI*, koji kodira za protein integrazu IntI, člana tirozin-rekombinacijske obitelji. Uloga integraze je da katalizira rekombinaciju između ulaznih kazeta gena i druge glavne komponente integrona u rekombinacijsko mjesto gen *attI* (Partridge i sur.,2000). Nakon što se kazeta gena rekombinacijom ugradi u integron provodi se ekspresija gena pomoću treće glavne komponente integrona, promotora Pc (slika 1) (Collis i Hall, 1995).



Slika 1. Struktura integrona. Funkcionalna osnova integrona sastoji se od sljedećeg: gen *intI* kodira za protein integrazu IntI; promotor Pc; gen *attI* je rekombinacijsko mjesto te kazete gena koja se rekombinacijom umeće između rekombinacijskog mjesta integrona *attI* i rekombinacijskog mjesta *attC* kazete gena. **(A)** Kazeta gena sadrži otvoreni okvir čitanja čiju ekspresiju provodi promotor Pc. U nekim integronima promotor Pc se nalazi između gena *intI* i *attI*. **(B)** Postoje i kazete gena s dva ORF-a, bez ORF-a, ili s ORF-om u suprotnom smjeru. U nekim rodovima gen *inlI* se transkribira u istom smjeru kao i kazeta gena. **(C)** Kazeta gena može sadržavati unutarnje promotore. Prilagođeno prema Gillings (2014).

Integroni stječu nove gene kao dio kazeta gena. Kazete gena su mali mobilni elementi koji se sastoje nešto više od jednog gena, otvorenog okvira čitanja i rekombinacijskog mjesta *attC* koji

se originalno zvalo element 59 nukleinskih baza. Mjesta *attC* se sastoje od dva osnovna dijela, svako se sastoji od par očuvanih mjesta dugačkih 7-8 parova baza. Cirkularne kazete gena se ugrađuju mjesno-specifičnom rekombinacijom između mjesta *attI* i *attC*, taj proces provodi integron integraza (Stokes i sur.,1997) (slika 2). Ovaj proces je reverzibilan, tj. kazete gena se mogu izrezati u obliku slobodnih cirkularnih molekula DNA (Collis i Hall, 1992). Insercijom kazete gena u mjesto *attI* omogućena je njihova ekspresija preko promotora Pc (Collis i Hall, 1995).



Slika 2. Stjecanje kazeta gena. Integroni stječu nove kazete gena rekombinacijom između mjesta *attC* cirkularne kazete gena i mjesta *attI* integrona. Na ovaj način se nove kazete gena ugrađuju blizu gena integraze i njegovog promotora. Kazetni niz se može proširiti ponovljenim stjecanjem kazeta, ali kazete se mogu izrezati kao kružni elementi rekombinacijama *attI* × *attC* ili *attC* × *attC*. Prilagođeno prema Gillings (2014).

Kao genomske inovacije integroni imaju dvije glavne prednosti. Prvo, novi genetički materijal je integriran u bakterijski genom u specifično rekombinacijsko mjesto *attI* i na taj način se ne narušavaju postojeći geni. Drugo, novo integrirani gen je ekspresiran preko integron promotora Pc i stoga je odmah podvrgnut prirodnoj selekciji. Kao posljedica toga, stanice koje sadrže integrone, od kojih svaka sadrži različite kazete gena, ekspresijom gena mogu dati razne korisne fenotipe.

1.2 Evolucijska povijest integrona

Integroni su genetički elementi koji su određeni prisutnošću gena koji kodiraju za protein integron integrazu IntI. Integron integraze su članovi tirozin-rekobinacijske obitelji, ali odlikuju se time što imaju jedinstveni konzervirani motiv od 16 aminokiselina, koji je neophodan za njihovu aktivnost. Na temelju gena *intI*, sekevencioniranjem bakterijskog genoma utvrđeno je da više od 15 % bakterija sadrži integron (Cambray i sur., 2010). Integroni su osim u bakterijama pronađeni u raznolikim okruženjima uključujući šumska tla, pustinjska tla, riječne nanose, izvore, vodene biofilmove, itd.

Različiti integroni mogu se razlikovati na temelju homologije gena *intI*, iako nije definiran točan broj ključnih točaka za razlikovanje između različitih grupa integrona. U posljednjih nekoliko godina otkriveno je nekoliko stotina različitih integrona koji se mogu svrstati u tri glavne skupine s obzirom na evoluciju njihovih gena za integrazu (Boucher i sur., 2007). Prvu skupinu čine integroni koji su nađeni u proteobakterijama iz slatkovodnih voda i tla. Ova skupina uključuje i klinički važne integrone grupe 1 i grupe 3. Drugu skupinu čine integroni koji su pronađeni u gamaproteobakterijama iz morskih okoliša. Ova skupina također uključuje integrone grupe 2 i integrone koji su pronađeni na intergrativnom konjuktivnom elementu SXT (omogućavaju rezistenciju na više antibiotika) i plazmidu pRSV1 iz roda *Vibrio*. Treću skupinu čine integroni kojima su integraza geni u obrnutoj orijentaciji od navedenih integrona. Obrnuti integroni do sada su pronađeni u *Spirochaetes, Planctomycetes, Cyanobacteria* i *Chlorobi*, izolirani iz raznih okolišnih niša (Boucher i sur., 2007).

U početku je bilo zamišljeno da se integroni podijele u dvije grupe: mobilni integroni koji sadrže nekoliko kazeta gena, obično kodiraju za otpornost na antibiotike, imaju različita mjesta *attC*, a mobilnost su stekli udruživanjem s transpozonima ili plazmidima i superintegroni koji bi mogli imati na stotine kazeta i homogena mjesta *attC* te bi bili smješteni na kromosomima (Rowe-Magnus i sur., 1998). U početku razlika između ove dvije vrste bila je temeljena na jako malom broju primjera, no danas je poznat kontinuiran slijed integrona između ove dvije skupine. Položaj integrona na kromosomima u odnosu na mobilnim elementima ima važne funkcionalne i evolucijske posljedice, budući da pokretljivost omogućuje prodiranje u nove taksonomske skupine, a položaj na kromosomima može uzrokovati kompleksne genome i različite fenotipe (Gillings i sur., 2005).

Svrstavanje integrona u određene skupine s obzirom na okoliš, u odnosu na njihovo svrstavanje s obzirom na stanice domaćina, pokazuje da se horizontalni prijenos integrona može dogoditi

između bakterija koje obitavaju u sličnom okruženju. Ovaj prijedlog je baziran na usporedbi filogenetičkih stabala na temelju gena 16S rRNA ili *rpoB* s filogenetičkim stablima na temelju gena *intI*. Pojedine filogenetske analize nisu podudarne i pokazuju da se horizontalni prijenos kromosomalnih integrona dogodio između bakterijskih vrsta (Boucher i sur., 2006). U nekim bakterijama, kao na primjer *Shewanella, Xanthomonas* i *Vibrio cholerae*, integroni su stečeni prije nego što je postojeća vrsta izložena radijaciji. Međutim, u mnogim drugim slučajevima usko povezani integroni pronađeni su u daleko povezanim bakterijskim rodovima. Mogu se izvući dva zaključka: prvo, da su integroni drevni sustavi koji datiraju najmanje stotine milijuna godina unazad, i drugo, da je tijekom evolucijskog procesa došlo je do značajnog horizontalnog prijenosa integrona između različitih rodova, iako su u kratkom roku neki integroni preneseni uglavnom horizontalnim prijenosom (Boucher i sur., 2006).

1.3 Raznolikost kromosomskih integrona i superintegrona

Prvi opisani integron potječe iz *Vibrio cholerae* (Mazel i sur., 1998). Ovaj integron značajno se razlikovao od svih do tada opisanih integrona jer se nalazio na kromosomu i imao je stotine različitih kazeta gena koje su kodirale za proteine uglavnom nepoznate funckije. Istraživanja u posljednjih petnaest godina su pokazala da su kromosomski integroni obavezni za bakterije iz okoliša, dok su integroni iz kliničkih bakterija, a koji se nalaze na plazmidima, uglavnom nađeni u patogenim bakterijama i nedavni su fenomeni izazvani pretjeranim korištenjem antibiotika.

Sekvencioniranjem bakterijskog genoma postalo je jasno da su kromosomalni integroni uobičajena pojava unutar bakterijske molekule DNA. Nedavno istraživanje je pokazalo da čak do 17 % bakterijskog genoma sadrži gen integron integraze (Cambray i sur., 2010). Kromosomski integroni se najčešće nalaze u različitim rodovima *Proteobacteria*, ali su također zabilježeni u *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes* i *Planctomycetes* (Boucher i sur., 2007). Kako je sve više genoma sekvencionirano, raspon vrsta i redova koji sadrže integrone će se vjerojatno širiti.

Integroni su posebice proučavani unutar roda *Vibrio*, gotovo sve ispitivane vrste su sadržavale ove genetičke elemente na njihovim kromosomima (Rowe-Magnus i sur., 2003). Integroni koji su pronađeni unutar roda *Vibrio* imaju velike kazetne nizove, a unutar nizova nalazi se između 36 i 219 kazeta te zauzimaju 0.7 % do 3.1 % genoma (Boucher i sur., 2006). Integroni se unutar roda *Vibrio* uglavnom prenose horizontalnim načinom (Mazel, 2006).

Kromosomski integroni su također nasljedna značajka *Xanthomonas* budući da je gen integron integraze smješten na istom kromosomskom mjestu u svim ispitivanim sojevima (Gillings i

sur., 2005). Kazetni nizovi u *Xanthomonas* su kraći nego ona u *Vibrio* i sadrže otprilike 1 do 22 kazete.

Kromosomski integroni su također prisutni unutar roda *Pseudomonas*, iako su u ovom rodu integroni distribuirani između različitih vrsta što upućuje na stjecanje integrona horizontalnim prijenosom gena (Boucher i sur., 2007). Broj kazeta je sličan onom u *Xanthomonas*, u rasponu od 10 do 32 kazete. Kazetni nizovi se znatno razlikuju po sadržaju, a identični sojevi dijele malo ili niti jednu kazetu gena. Neki članovi roda imaju integrone koji imaju mogućnost preuzimanja i ekspresije kazete gena (Holmes i sur., 2003).

U opisanim integronima gen integron integraze i kazete gena se transkribiraju u suprotnom smjeru (slika 1A). U nekim rodovima bakterija s kromosomskim integronima gen integraze i kazete gena se transkribiraju u istoj orijentaciji, npr. kod bakterijskog roda *Treponema* (Coleman i sur., 2004).

Kromosomski integroni su izvor genetičke raznolikosti (Hall, 2012). Čak i unutar srodnih sojeva jedne bakterijske vrste, različiti izolati mogu imati vrlo različite nizove kazeta gena. U rodu *Treponema* i *Pseudomonas*, različiti izolati identičnih sojeva često nose samo nekoliko zajedničkih kazeta (Holmes i sur., 2003).

Većina komparativnih analiza napravljena je unutar roda *Vibrio*, gdje stjecanje, gubitak i preuređivanje poretka kazeta gena mogu generirati značajne razlike unutar serotipova, sojeva i vrsta (Rowe-Magnus i sur., 2003). Promjene kazeta gena često uključuju čitave blokove u nizu, čime se mobilizira niz povezanih kazeta. Tako generirana raznolikost se može koristiti kao filogenetski sistem za praćenje pandemičnih sojeva (Labbate i sur., 2007).

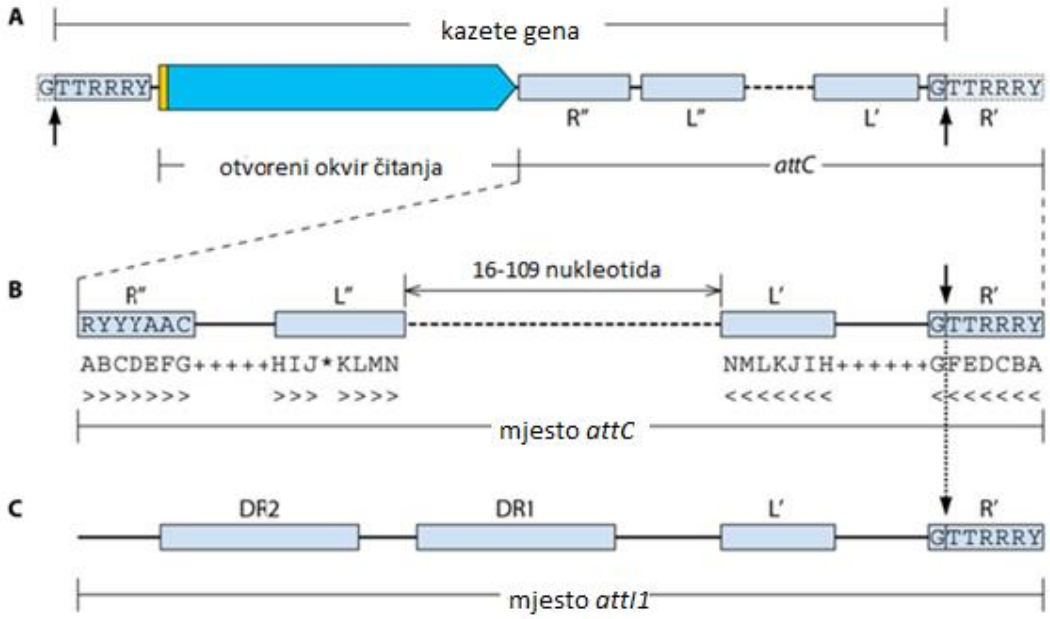
Brzina kojom se generira raznolikost kazetnih nizova u integronima u *V. cholerae* dozvoljava preuređivanje i uzimanje novih uzoraka gena iz ostalih vrsta. Ova aktivnost generira različite genotipove koji se onda mogu podvrgnuti prirodnoj selekciji omogućavajući na taj način brzu adaptaciju lokalnim uvjetima (Boucher i sur., 2011). Detaljna analiza 12 *Vibrio* spp., izoliranih iz koraljne sluzi, pokazala je da samo 1-10 % kazeta je zajedničko njihovim nizovima. Čak i kada su izolati imali iste kazete gena, pozicija tih kazeta u nizovima nije bila ista. Prema tome, kazetni nizovi u nekim vrstama *Vibrio* mogu evoluirati brže nego ona u *V. cholerae* (Koenig i sur., 2011).

Postavlja se pitanje što to točno dovodi do aktivnosti gena integron integraze i posljedično do pregradnje kazeta gena? Unutar promotorske regije gena *intI* nalaze se mjesta na koje se veže

protein LexA, transkripcijski represor koji upravlja SOS odgovorom. Indukcija SOS odgovora aktivira ekspresiju gena integron integraze i time povećava stopu ekscizije kazete gena za jedan red veličine (Guerin i sur., 2009). Smatra se da je ovaj mehanizam nasljedan s obzirom da se nalazi u kromosomskim i mobilnim integronima (Cambray i sur., 2011). Transformacija sa stranom DNA i bakterijska konjugacija induciraju SOS odgovor i stoga pojačavaju aktivnost integraze, kao i stres i izlaganje antibioticima (Baharoglu i sur., 2010). Integrazom posredovana rekombinacija povećava se za vrijeme stacionarne faze (Shearer i Summers, 2009). Prema tome, stjecanje kazeta i mehanizam pregrađivanja se stimulira upravo u trenutku kada stjecanje novih funkcija i genetske raznolikosti može biti vrlo povoljano.

1.4 Struktura kazete gena i rekombinacija

Kazete gena su kompaktni dijelovi molekule DNA koji općenito imaju jednostavnu strukturu, sastoje se od otvorenog okvira čitanja i rekombinacijskog mjesta (Hall i sur., 1991) (slika 3). Rekombinacijsko mjesto *attC* (prikazan u integriranom obliku, slika 3A) pokazuje značajnu unutarnju homologiju koja omogućuje formiranje stabilne sekundarne strukture koja je važna za prepoznavanje pomoću proteina IntI i rekombinaciju (Stokes i sur., 1997) (slika 3B). Gledajući sliku 3A, s lijevo na desno, tipična obilježja kazete gena su kako slijedi: dio mjesta *attC* koji je odcjepljen tijekom insercije u niz i sastoji se od konzerviranih nukleotida TTRRRY, kratka nekodirajuća regija koja se sastoji manje od 10 nukleotida i može sadržavati mjesta na koja se mogu vezati ribosomi, start kodon (ATG, GTG ili TTG) za interni otvoreni okvir čitanja, stop kodon koji se najčešće nalazi unutar mjesta *attC* te samo mjesto *attC* koje se sastoji od niza obrnutih ponavljanja (R", L", L' i R') koja predstavljaju domenu vezanja integraze (Stokes i sur., 1997). Varijacije osnovne strukture uglavnom uključuju identitet i orijentaciju ugrađenog otvorenog okvira čitanja. Većina kazeta sadrži jedan ORF, orijentiran s lijeva na desno, a poznate su kaseta s dva ili više ORF-ova, bez ORF-a ili s ORF-om u obrnutoj orijentaciji (slika 1) (Holmes i sur., 2003).



Slika 3 Struktura kazete gena i povezana rekombinacijska mjesta. **(A)** Prikazana je jedna kazeta gena u linearnom obliku koja je umetnuta u kazetni niz. S lijeva na desno, istaknute značajke su kako slijedi: konzervirano rekombinacijsko mjesto GTTRRY (vertikalna strelica pokazuje rekombinacijsku točku); start kodon i otvoreni okvir čitanja koje kodira kazeta te mjesto *attC* koje sadrži domene R", L", R' i L' za vezanje integraze. **(B)** Prikazana je detaljna struktura jednog mjesta *attC*. Ovi elementi imaju djelomično palindromske sekvence (označene sa slovima), tako da se R" može upariti s R' i L" se može upariti s L', pri čemu se formira stabilna križna struktura koju prepoznaje integron integraza. Dodatna baza, označena zvjezdicom u L", osigurava pravilnu orijentaciju i umetanje kazeta u nizu. Između završetaka palindromskih regija je regija koja se razlikuje po dužini (od 16 do 109 nukleotida) i slijedu između različitih kazeta. Ova regija može tvoriti sekundarnu strukturu, a nedostatak očuvanosti slijeda sugerira da je struktura važnija od slijeda za prepoznavanje. **(C)** Prikazano je mjesto *attC* iz integrona grupe 1. Mjesto *attI1* također ima L i R elemente s očuvanom rekombinacijskom točkom G↓TTRRRY. Mjesto *attI* integrona grupe 1 ima dva direktna ponavljanja, DR1 i DR2, ali ona nisu poznata u mjestima *attI* kod integrona iz drugih klasa. Prilagođeno prema Gillings (2014).

Mjesta *attC* su rekombinacijska mjesta prepoznata od strane integron integraze IntI. Unutar mjesta *attC* postoje četiri domene za vezanje integron integraze, R", L", L' i R' (slika 3B). Među ovim domenama za vezanje jedino R" i R' imaju konzervirane sekvencije, a to su 5′-RYYYAAC i 5′-GTTRRRY. Unatoč nedostatku konzerviranih sekvenci, unutar mjesta *attC* postoje jako očuvane palindromske sekvence koje mogu tvoriti križnu sekundarnu strukturu sparivanjem R" s R' i L" s L' (Stokes i sur., 1997). Budući da središnji dio mjesta *attC* pokazuje znatne varijacije u dužini i slijedu, čini se da je očuvanje sekundarne strukture važnije za aktivnost nego očuvanje slijeda mjesta *attC* (Bouvier i sur., 2005). Doista, dokazano je da se protein IntI veže za izbočenu DNA ukosnicu (Johansson i sur., 2004). Isturena baza u L" (zvjezdica u slici 3B) služi da bi se odredio polaritet rekombinacijskog događaja tako što se odredi koji će se lanac rekombinirati te se na taj način osigurava da se kazete insertiraju u ispravnom smjeru (Bouvier i sur., 2005). Rekombinacija između mjesta *attI* i *attC* uključuje samo donji lanac dolaznog *attC*, zatim se jednolančana rekombinacijska struktura rješava replikacijom (Bouvier i sur., 2009). S obzirom da protein IntI ovisi o strukturi, a ne o slijedu, objašnjava zašto različiti proteini IntI mogu mobilizirati kazete gena s različitim sekvencama *attC* (MacDonald i sur., 2006).

Najčešći oblik insercije kazete gena uključuje rekombinaciju između mjesta *attC* i *attI* koji je povezan s integronom (Partridge i sur., 2000). Mjesto *attI*, kao i mjesto *attC*, ima mjesta za vezanje integrona, a to su L i R (slika 3C). Vezno mjesto R sadrži kanonsku sekvencu 5′-GTTRRRY, a dolazeća kazeta gena se umeće između nukleotida G i T. U mjestima *attI* integrona grupe 1 postoje još dva vezna mjesta za integrazu, DR1 i DR2, koja se sastoje od direktnih ponavljanja (Gravel i sur., 1998) (slika 3C). Međutim, niti ova regija niti vezna regija L nije očuvana u mjestima *attI* unutar drugih grupa integrona. Različiti proteini IntI preferirano prepoznaju svoja polazna mjesta *attI*, ali u mogućnosti su raditi na mjestima *attI* iz drugih heterolognih sustava, iako s manje učinkovitosti (Collis i sur., 2002).

Integron integraza može katalizirati i druge rekombinacijske reakcije osim *attl* × *attC*, ali manje učinkovito (Partridge i sur., 2000). Rekombinacijom između dva mjesta *attC* u području kazeta dolazi do izrezivanja kazeta u obliku kružnih molekula DNA (Collis i Hall, 1992). Kružne molekule DNA mogu sadržavati više kazeta gena te tako brišu ili preuređuju blokove povezanih kazeta (Labbate i sur., 2007). Insercija kazeta prilikom rekombinacije *attC* × *attC* je moguća, ali mjesto *attI* ima veći afinitet za inserciju nadolazećih kazeta (Collis i sur., 1993).

Rekombinacija između dva mjesta *attI* je najmanje efektivna reakcija koju katalizira integraza (Collis i sur., 2001), ali može pokazati povećanje učinkovitosti tijekom kasne log faze i rane

stacionarne faze (Shearer i Summers, 2009). Ovakve rekombinacije mogu generirati hibridna mjesta *attI* (Hansson i sur., 1997) i spojiti različite integrone u nova uređenja. Mjesta *attI* također mogu rekombinirati u sekundarna mjesta koja obično sadrže očuvan GTT, karakterističan motiv rekombinacijske točke *attI*. Insercija u sekundarna mjesta putem rekombinacije *attI* spaja inegrone u nove genomske lokacije (Hansson i sur., 1997) te bi se ovime moglo objasniti kretanje integrona između kromosomskih mjesta.

Mjesta *attC* također mogu rekombinirati sa sekundarnim mjestima u genomu te se u takvim slučajevim mjesta za prepoznavanje mogu pojednostavniti s nukleotidnom sekvencom GNT. Ove insercije čine mjesto *attC* inaktivnim te tako popravljaju kazete u sekundarnom mjestu. Ovakav način insercije može biti važan mehanizam za stjecanje gena na plazmidu i kromosomu (Recchia i Hall, 1995). U drugim slučajevima, kada sekundarno mjesto sadrži kanonsku sekvencu GTTRRRY, nespecifične insercije zadržavaju integritet mjesta *attC* te tako kazete gena mogu biti izrezane putem integrazne aktivnosti (Segal i sur., 1999).

1.5 Ekspresija kazete gena

Kazete gena često sadrže samo otvoreni okvir čitanja i rekombinacijsko mjesto *attC*. To znači da se oslanjaju na vanjski promotor za ekspresiju. Većina istraživanja ekspresije kazete gena provedena je u integron sustavu grupe 1, gdje se ekspresija provodi pomoću jednog od dva promotora, Pc1- lociran unutar gena IntI1 i Pc2- lociran unutar mjesta *attI1*. Identificiran je broj promotora koji se razlikuju po snazi (Collis i Hall, 1995). Integroni sa slabijim promotorima često imaju smanjenu aktivnost integron integraze (Coyne i sur., 2010).

Promotori unutar gena integron integraze provode ekspresiju kazete gena, ali jačina ekspresije opada kako se kazete udaljavaju od promotora (Collis i Hall, 1995). Ovo može biti razlog zašto kazetni nizovi kliničkih integrona grupe 1 ne sadržavaju više od 6 kazeta, ekspresija dodatnih kazeta ne bi mogla biti provedena zbog njihove udaljenosti od promotora. Osim toga, sposobnost mjesta *attC* da formiraju stabilne steam-and-loop strukture omogućuje im da sprječavaju progresiju ribosoma duž policistronskih RNA te daljnju redukciju translacije polipeptida kodiranih nizvodno od kaseta (Jacquier i sur., 2009).

Promotori koji provode ekspresiju kazeta također su pronađeni u regijama *attI* unutar integrona grupe 2 (Biskri i sur., 2005), unutar gena *intI* integrona grupe 3 te unutar kromosomalnih integrona *Pseudomonas stutzeri* (Collis i Hall, 1995). Prema toma, pretpostavlja se da svi integroni nose promotore kazeta unutar regije *intI – attI*. Međutim, neki kromosomalni kazetni nizovi sadrže više stotina kazeta gena i predugačka su da bi se ekspresija provela samo pomoću

jednog promotora. Ovakve kazete su transkripcijski „tihe“ ili sadrže svoje interne promotore. U jako dugačkim kazetnim nizovima, koje karakteriziraju *Vibrio* vrste, većina kazeta je transkribirana i transkripcija je pojačana stresnim situacijama (Michael i Labbate, 2010). Stoga, kazete gena s internim promotorima rasprostranjene su unutar kazetnih nizova roda *Vibrio* i na ovaj način je olakšana nizvodna ekspresija kazeta.

Unutarnji promotori su identificirani u brojnim kazetama gena. Primjerice, kazeta gena *cmlA* za rezistenciju na kloramfenikol ima svoj interni promotor (Stokes i Hall, 1991). Na ovaj način omogućit će se ekspresija kazeta bez obzira na njihov položaj u nizu. Geni sustava toksin-antitoksin (TA) su zajednička osobina velikih kromosomalnih kazetnih nizova i njihova glavna značajka je da pridonose stabilnosti nizova (Yuan i sur., 2011). Da bi se održali unutar roda određene bakterije takvi geni moraju biti eksprimirani te njihove kazete također imaju svoje promotore (Rowe-Magnus i sur., 2003).

1.6 Raznolikost kazete gena i njihova funkcija

Integron kazete gena su zajednička osobina okolišnih bakterija te se nalaze u prirodi u obilnim količinama. Metagenomičke analize pokazuju da se kazete gena mogu naći u gotovo svakom istraživanom području: pustinjskom tlu, šumskom tlu, polarnom tlu, riječnim sedimentima, gejzirima i ušćima (Stokes i sur., 2001), morskim vodama, morskim sedimentima, dubokim morskim otvorima (Stokes i sur., 2001), biofilmovima, biljnim površinama i simbiontima ekukariota (Gillings i sur., 2005).

Kazete gena su velika novost u svijetu genetike. Kombinirana analiza metagenomičkih i kromosomalnih kazeta gena pokazala je da do 65 % kazeta i njihovi kodirani polipeptidi nemaju homologe u molekuli DNA ili proteinskim bazama podataka. Kodiranjem kazeta dobivaju se novi polipeptidi koji tvore nove proteinske strukture i na taj način omogućavaju fleksibilnost molekulama za tvorbu novih kvarternih struktura (Robinson i sur., 2008).

Mobilna priroda kazeta gena znači da genomske lokacije i stanice domaćini nisu fiksni, a to stvara probleme za konvencionalne anotacije. Zbog toga, na temelju broja predanih baza podataka uspostavljeni su sustavi za označavanje i stručnu obradu integrona i njihovih kazeta gena (Moura i sur., 2009). Razvijen je i softver za identifikaciju kazeta unutar sekvence DNA (Rowe-Magnus i sur., 2003). Budući da su se neke istraživačke skupine više usredotočile na kliničke aspekte integrona, razvijene su baze podataka i anotacijski sustavi koji se bave isključivo kazetama gena iz integrona nađenim u patogenima. Ove kazete uglavnom kodiraju za otpornost na antibiotike (Partridge i sur., 2009).

Neke kazete gena pronađene u metagenomičkim DNA ili kromosomskim integronima ne kodiraju za polipeptide (Stokes i sur., 2001). Takve nekodirajuće kazete mogu zauzimati značajan dio nizova. Primjerice, unutar roda *Vibrio* takve nekodirajuće sekvence zauzimaju od 4 do 49 % kazetnih nizova (Boucher i sur., 2006). Ove nekodirajuće kazete bi mogle kodirati promotore ili regulatorne RNA. U metagenomičkim DNA otkrivene su skupine nekodirajućih kazeta gena koje pokazuju očuvanje središnjeg motiva s nesavršenim obrnutim ponavljanjima, što ukazuje da je RNA struktura važnija nego slijed (Holmes i sur., 2003), što je opet značajka svih regulatornih RNA.

Funkcije oko 20 % okolišnih kazeta gena mogu se zaključiti putem homologije s poznatim genima. Ove funkcije su raznolike i uključuju sekundarne metabolizme, održavanje plazmida, virulencije i površinska svojstva. Sustavi toksin-antitoksin (TA) najčešće se nalaze unutar ili u susjedstvu integrona (Boucher i sur., 2007). Gubitak sustava TA ubija stanice koje su ih posjedovale, budući da toksin ima duži poluživot od antitoksina koji ga inaktivira. Prema tome, prisutnost sustava TA unutar integrona može stabilizirati kromosomske nizove i održavati plazimide u stanicama koje imaju integrone (Yuan i sur., 2011).

Veliki broj kazeta gena kodira za funkcije povezane s virulencijom i „gostoprimstvom" domaćina, uključujući lipokalin, polisaharidne kapsule, enterotoksine, lipaze i metionin sulfoksid reduktaze (Holmes i sur., 2003). Impresivna je raznolikost kazeta s drugim pretpostavljenim funkcijama, uključujući modifikaciju DNA, funkcije vezane za fag, biosintezu polisaharida, sintezu aminokiselina, transportera i sustave za izbacivanje itd. (Mazel, 2006). Prisutnost signalnih peptida za izlučivanje kroz stanične membrane posredno ukazuje da su proizvodi kazeta gena često važni za interakciju s lokalnim okruženjem i pomažu stvoriti uvjete potrebna za formiranje bakterijskog biofilma ili interakcije s fagom (Rowe-Magnus i sur., 2003).

Na temelju navedenog možemo zaključiti da kazete gena koje sadrže integroni su važan sastavni dio bakterijske prilagodbe. Sposobnost integrona da steknu nove kazete gena i preurede one koje su već u nizu, pruža brz način stvaranja adaptivne raznolikosti (Koenig i sur., 2011). Integroni pomažu bakterijama da se prilagode određenim nišama, kodiraju funkcije koje se odnose na interakcije sa simbiontima, a mogu pomoći u generiranju ekotipova (Boucher i sur., 2011). U zagađenim sedimentima, kazete kodiraju različite funkcije važne za katabolizam industrijskog otpada, kao što su polipeptidi koji se bave prijenosom i katabolizmom aromatskih spojeva (Koenig i sur., 2009). U današnje vrijeme integroni imaju glavnu ulogu u adaptaciji bakterija na različite antibiotke. Sustav integrona, omogućava bakterijama pristup velikom

broju kazeta gena s različitim funkcijama koje im omogućavaju stjecanje i izražavanje rezistencije, tj. brzi odgovor na djelovanje antibiotika (Wright, 2011).

2. INTEGRONI U SADAŠNJOSTI

2.1 Porast rezistencije bakterija na antibiotike

Integroni imaju glavnu ulogu u širenje otpornosti na antibiotike, osobito kod Gram-negativnih bakerija. Prilikom stvaranja otpornosti funkcionalna osnova integrona povezana je s mobilnim elementima DNA kao što su transpozoni i/ili konjugativni plazmidi te na taj način pospješu prijenos između stanica i vrsta (Mazel, 2006). Postoji pet grupa mobilnih integrona, svi su povezani s rezistencijom na antibiotike: grupe 1, 2 i 3, obično povezane s kliničkim bakterijskim sojevima (Partridge, 2011); grupa 4, nalazi se na elementu SXT bakterije *Vibrio cholerae* (Hochhut i sur., 2001) i grupa 5, nalazi se na plazmidu pRSV1 bakterije *Alivibrio salmonicida* (Sørum i sur., 1992).

Ovi integeroni dijele velik broj kazeta gena od kojih većina kodira za rezistenciju na antibiotike. Ukupno je identificirano oko 130 kazeta gena za rezistenciju, koje uporabom različitih kodona i heterolognih mjesta *attC* snažno ukazuju na to da su akumulirane iz različitih filogenetiskih sredina (Cambray i sur., 2010). Kazetni nizovi u mobilnim integronima su obično kratki, najduži zabilježen niz ima osam kazeta (Naas i sur., 2001), vjerojatno zato što ekspresiju kazeta provodi jedan promotor. Skupine kazeta gena, koje nose mobilni integroni, mogu steći otpornost na većinu antibiotika koji se koriste u medicini i poljoprivredi (Partridge i sur., 2009).

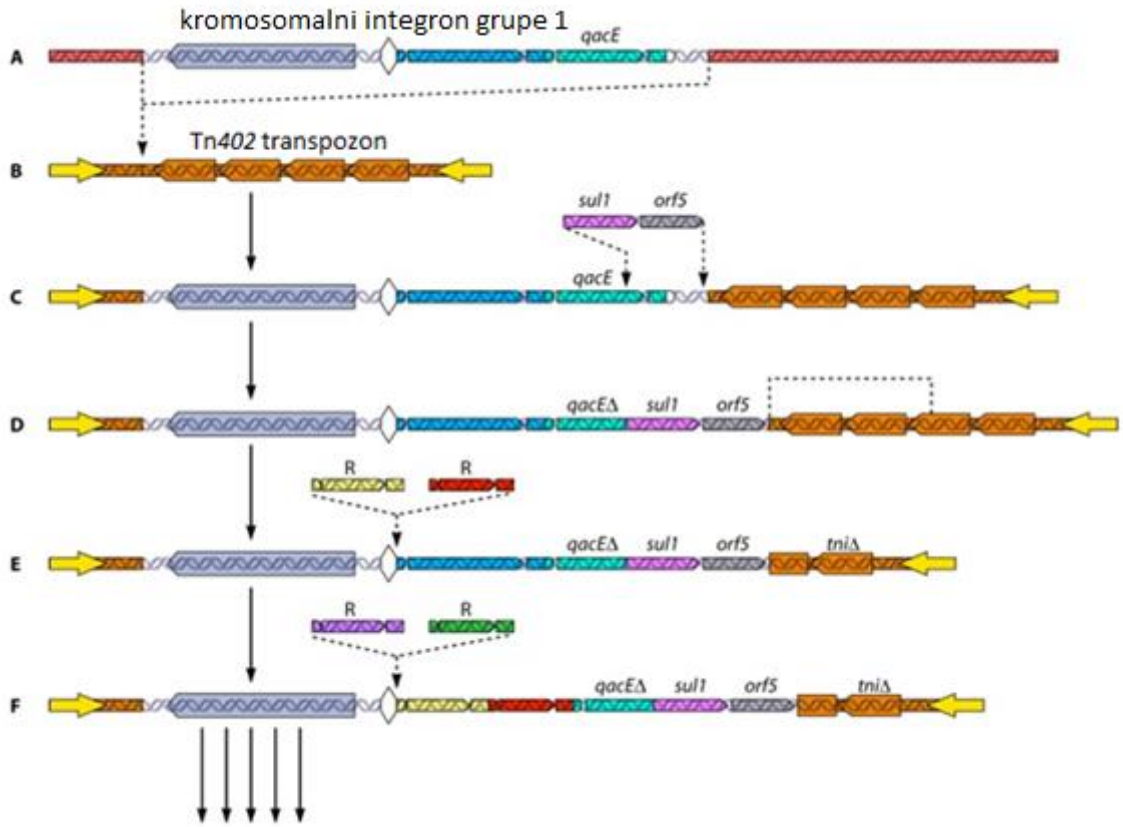
Integroni koji su rezistentni na antibiotike pokazuje brojne zajedničke osobine. Oni su obično pokretni, a njihova kazetni nizovi su kratki i kodiraju za otpornost na antibiotike. Međutim, njihove zajedničke karakteristike nisu suštinske osobine predaka integrona već su nastale kao rezultat konvergentne evolucije, uzrokovane jakim selekcijskim pritiscima nametnutim tijekom ljudske uporabe antibiotika. Sve glavne grupe integrona, koje su pronađene u antibiotički rezistentnim patogenima, imaju sličnu evolucijsku povijest.

2.2 Podrijetlo integrona grupe 1

Integroni grupe 1 su kao vektori za rezistenciju na antibiotike. Kromosomski integroni grupe 1 pronađeni su u širokom rasponu nepatogenih baktrija *Betaproteobacteria*, uključujući i pripadnike rodova *Hydrogenophaga, Aquabacterium, Acidovorax, Imtechium, Azoarcus* i *Thauera*. Ovi kromosomski integroni nose kazete gena nepoznate funkcije i pokazuju značajan raznolik slijed nukleotida u genu za integrazu *intI1* (Gillings i sur., 2008). Svi kromosomski integroni grupe 1 koji su do sada izolirani iz okolišnih izvora imaju zajedničke terminalne sekvence. Očuvano lijevo prijelomno mjesto nalazi se 107 parova baza ispred stop kodona gena *intI1* i to na istom mjestu gdje se insertira insercijska sekvenca ISPa7, koju nose određeni izolati bakterije *P.aeruginosa* (Gillings i sur., 2008), u integron grupe 1. Desno prijelomno mjesto također je očuvano i nalazi se 43 para baza iza elementa *attC*. Prisutnost takvih preciznih prijelomnih mjesta u različitim kromosomskim područjima i različitim vrstama dokazuje relativnu mobilnost kromosomskih integrona grupe 1, obzirom na kratko evolucijsko vremensko razdoblje te djelovanje mjesno-specifične rekombinacije (Gillings i sur., 2008).

Ispitivanja bakterija iz tla, slatkovodnih voda i biofilmova ukazuju da 1-5 % stanica može nositi integrone grupe 1 (Gaze i sur., 2005). U nekim sredinama, taj postotak može biti i viši, čak do 30 % (Gillings i sur., 2008). Integroni grupe 1 prilikom izmjene gena su dinamični, a integron integraza grupe 1 je u mogućnosti pristupiti kazetama gena iz drugih grupa kromosomskih integrona (Gillings i sur., 2009).

Stvarni slijed događaja nikada ne može biti točno poznat, ali postoji dovoljno informacija za opis evolucijske povijesti mobilnih integrona grupe 1 koji su sada glavni čimbenici u širenju otpornosti na antibiotike (slika 4). Ispitivanje metagenomičke DNA rezultiralo je otkrivanjem različitih gena integron integraze grupe 1. Mnogi od tih gena imaju manje od 95 % identičnih sekvenci nukleotida (Gillings i sur., 2008). Nasuprot tome, geni integron integraze u svim integronima grupe 1 iz kliničkih izvora su identični, što upućuje na to da su svi klinički integroni grupe 1 nedavni potomci jednog događaja koji uključuje samo jednog predstavnika iz raznolikih varijanti sekvenci gena *intI1* prisutnih u prirodnim uvjetima. Činjenica da se identične sekvence gena *intI1*, koje se nalaze u kliničkim patogenima, također mogu naći na kromosomima okolišnih nepatogenih *Betaproteobacteria* pridonosi ovom zaključku (Gillings i sur., 2008).



Slika 4 Model za podrijetlo i naknadnu divergenciju mobilnih integrona grupe 1 koji se sada većinom nalaze u Gram-negativnim patogenim bakterijama. **(A)** Zajednički predak svih kliničkih integrona grupe 1 je član različite grupe integrona grupe 1 smještenih na kromosomima *Betaproteobacteria*. **(B, C)** Transpozon Tn*402* zauzima kromosomalni integron grupe 1 **(B)** kako bi nastao hibrid transpozon/integron koji nosi rezistenciju na dezinficijense kodiranu kazetom *qacE* **(C)**. **(D)** Preuzimanjem rezistencije na sulfonamide kodirane genom *sul1* briše se dio kazete *qacE* i nastaje 3' konzervirani segment (3'-CS). **(E)** Delecije i insercije, koje uključuju gen *tni*, generiraju Tn*402* integrone koji su nesposobni vršiti transpoziciju; dok sjecanje novih kazete gena, koje kodiraju za rezistenciju na antibiotike, generira integrone koji će dati različite antibiotički rezistentne fenotipove. **(F)** Stjecanje novih kazeta gena i dalje se nastavlja, a hibrid Tn*402*/integron se prenosi na različite plazmide i transpozone kao što je obitelj transpozona Tn*21*. Navedeni događaji generiraju različitosti i ubrzavaju prodiranje integrona grupe 1 u različite patogene i komenzale bakterije. Prilagođeno prema Gillings (2014).

Evolucijska povijest integrona grupe 1 kliničkih patogenih bakterija vjerojatno se dogodila na sljedeći način. Integron koji se nalazi u bakteriji iz razreda *Betaproteobacteria* iz biofilma ili slatkovodnog okoliša izrezan je iz kromosoma domaćina u preciznim okvirima. Ovaj integron tada je pruzet pomoću transpozona Tn*402*, mjesno-specifičnom rekombinacijom. Novonastali hibridni element tada se sastojao od integron integraze grupe 1 i kazeta ugrađenih u transposon te je sadržavao obrnuta terminalna ponavljanja i cijeli mehanizam za transpoziciju.

Uspješnost hibrida Tn*402*/integron leži u neobičnom i prilagodljivom svojstvu Tn*402*. Usmjerava se i premješta u plazmidna mjesta *res* (Minakhina i sur., 1999). Prema tome, integroni grupe 1 ugrađeni u Tn*402* transposone uskoro bi se mogli naći u različitim plazmidnim vektorima, čime se povećava njihova sposobnost za širenje između bakterijskih stanica i vrsta. Doista, jedna od najuspješnijih insercija uključivala je transpoziciju Tn*402*/integrona u mobilni element koji je sadržavao operon *mer* koji kodira za otpornost na živu. Rezultirajući element Tn*21* je široko rasprostranjen u različitim plazmidima i producira niz složenih derivata (Liebert i sur., 1999).

Prvi bakteriostatski antimikrobicin sulfonamid uveden je sredinom 1930-ih godina (Sköld, 2000). Otpornost na antimikrobicine počinje od tada, tako da ne čudi da je sljedeći događaj u evoluciji kliničkih integrona grupe 1 uključivao gen za otpornost na sulfonamid. Gen *sul1* kodira za rezistentni enzim, koji je varijanta ciljanog enzima sulfonamida-dihidropteroat sintaza. Ovaj gen je insertiran u hibrid Tn*402*/integron grupe 1 uklanjanjem kraja gena *qacE* i popratne regije *attC* (Kholodii i sur., 1995), stvarajući 3 'konzervirani segment (3'-CS) koji je karakterističan za postojeće kliničke integrone grupe 1 (slika 4) (Stokes i Hall, 1989). Razne daljnje delecije u elementu Tn*402* dovele su do gubitka transpozicijske funkcije i generiranja raznolikosti na 3' kraju hibrida Tn*402*/integrona grupe 1 (Hall i sur., 1994).

Hibrid Tn*402*/integron grupe 1 sada je čvrsto ugrađen u ljudski mikrobiom i moguća je ugradnja uzoraka kazete gene iz drugih grupa integrona (Holmes i sur., 2003). Tijekom vremena, hibridi Tn*402*/integroni grupe 1 stekli su kazete gena koje pokazuju rezistenciju na većinu vrsta antibiotika koji se koriste za suzbijanje Gram-negativnih bakterija (Cambray i sur., 2010).

2.3 Podrijetlo integrona grupe 2

Integroni grupe 1 većinom su odgovorni za otpornost organizama na antibiotike. Povezuju se s najvećom raznolikošću kazeta gena, nalaze se u sve složenijim mobilnim elementima te su pronađeni u vrlo širokom rasponu vrsta. Pored toga, druge klase integrona koje dovode do rezistencije na antibiotike su također opisane u kliničkim bakterijskim sojevima. Integroni

grupe 2 i integroni grupe 3 dijele svoje skupine kazeta s integronima grupe 1, ali se razlikuju po tome što imaju drugačiju nukleotidnu sekvencu integron integraze. Također, integroni grupe 2 i grupe 3 iz kliničkih bakterijskih sojeva dijele sličnu evolucijsku povijest s Tn*402*/integronom grupe 1, jer su vjerojatno svi regrutirani na transponirajući elemenat iz kromosomalnog pretka.

Integroni grupe 2 su povezani s transpozonom Tn*7* (Rådström i sur., 1994), kojem je transpozicijska aktivnost usmjerena na specifična mjesta na kromosomima ili plazmidima (Peters i Craig, 2001). Metagenomičke studije su otkrile potencijalno funkcionalne gene integron integraze grupe 2 u poljoprivrednim staništima, povezane s različitim bakterijama iz redova *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (Rodríguez i sur., 2009), a funkcionalni integron grupe 2 pronađen je u *Providencia stuartii* te je na temelju toga opisana njegova aktivnost. Integroni iz okolišnih uzoraka nose niz kazeta gena nepoznate funkcije, kao što se moglo i očekivati za okolišne integrone (Barlow i sur., 2006). Nasuprot tome, geni integron integraze grupe 2 izoliranih iz kliničkih patogenih bakterija su inaktivirani internim stop kodonom (Hansson i sur., 2002), a njihovi povezani nizovi kazeta kodiraju za otpornost na antibiotike. Činjenica da svi klinički integroni grupe 2 nose istu mutaciju u genu za protein IntI2 ukazuje da su svi potomci istog događaja.

Budući da gen integron integraze kliničkih integrona grupe 2 nije aktivan, to ograničava sposobnost integrona da stječu i preuređuju kazete gena. Stoga ne čudi da su njihovi kazetni nizovi visoko konzervirani te da je njihov raspon kazetnih funkcija znatno manji od integrona grupe 1 (Biskri i Mazel, 2003). Opisane su određene varijante kazetnih nizova, a pretpostavlja se da su kazetna pregrađivanja posredovana aktivnošću integraze ili supresijom unutarnjeg stop kodona. Dokazano je da integraza grupe 1 može prepoznati rekombinacijska mjesta *attI2* grupe 2 (Hansson i sur., 2002), tako da bi izloženost kliničkih integrona grupe 2 na aktivnost drugih integron integraza mogla objasniti različitosti u kazetnim nizovima integrona grupe 2.

Poput kliničkih integrona grupe 1, integroni grupe 2 iz kliničkih bakterijskih sojeva su prošireni u različitim patogenima, komenzalima i okolišnim bakterijama, a također su pronađeni unutar mikrobiona domaćih i divljih životinja (Stokes i Gillings, 2011).

2.4 Podrijetlo integrona grupe 3

Integroni grupe 3 prvi su put opisani u kliničkih patogenih bakterija u Japanu (Arakawa i sur., 1995), ali kao i integroni grupe 1 i 2, također potječu iz okolišnih bakterija. Tipični kromosomski integroni s integrazama grupe 3 opisani su u dvije vrste *Delftia* (Xu H i sur.,

2007). Ovi integroni imaju povezane kazetne nizove koji kodiraju za proteine nepoznate funkcije. Kromosomski integroni grupe 3 mogu dijeliti kazete gena s okolišnim organizama koji nose integrone grupe 1, budući da je identična kazeta gena pronađena u integronu bakterije *Delftia* i kazetnom nizu kromoskomskog integrona grupe 1 u bakterije *Pseudomonas* (Sajjad i sur., 2011).

Integroni grupe 3 iz kliničkih bakterijskih sojeva su povezani s rezistencijom na antibiotike i imaju evolucijsku povijest sličnu integronima grupe 1. Transpozon Tn*402* također je uključio funkcionalnu osnovu integrona grupe 3, ali u obrnutoj orijentaciji u odnosu na integrone kliničkih bakterijskih sojeva 1 (Collis i sur., 2002). Integroni grupe 3 su relativno česti u Japanu, gdje su prošireni u više ljudskih patogenih i komezalnih bakterija (Correia i sur., 2003). Nisu prošireni po ostatku svijeta (Kor i sur., 2013) te nemaju veliku raznolikost kazeta gena, možda zato što integron integraza grupe 3 nije tako aktivana kao kod drugih grupe (Collis i sur., 2002). Klinički integron grupe 3 još uvijek evoluira tako što kolonizira nove vrste, stječe nove kazete za razvijanje rezistencije te stvara svoj put prema novim plazmidnim vektorima (Correia i sur., 2003).

3. INTEGRONI U BUDUĆNOSTI

Tijekom posljednjih 50 godina raširena uporaba antibiotika utjecala je na stvaranje mozaičnih elemenata molekule DNA koji nose višestruke gene za rezistenciju. Elementi DNA, integroni, nalaze se u različitim bakterijskim domaćinima, komenzalnim i patogenim, a koji koloniziraju ljude, kućne ljubimce i domaće životinje. Rezultat toga je da su integroni, odnosno njihovi geni za rezistenciju na antibiotike i mobilni elementi DNA, koji su široko rasprostranjeni, vrlo raznoliki te se nalaze u izobilju u ljudskim ekosustavima.

Razumijevanje prirodnih aktivnosti i evolucije integrona daje nam moć predviđanja kako će ovi elementi izgledati u budućnosti, koja su njihova potencijalna svojstva te na koji način mogu biti iskorišteni. Važna osobina integrona je da mogu pruzeti bilo koji gen i provesti njegovu ekspresiju bez narušavanja slijeda postojećih gena. Navedene osobine omogućavaju prilagodbu okolišnim uvjetima stvarajući vrlo brzo genske varijacije. To omogućava bakterijskim stanicama, koje sadrže integrone, da se prilagode bakterocidnim sredstvima, ali i istraživačima bogate mogućnosti za genska ispitivanja i razvijanje novih biosintetskih putova u bakterija.

3.1 Biološke funkcije povezane s integronima

Osim što integroni i superintegroni pružaju rezistenciju na antibiotike, postoji velik broj funkcija za koje kodiraju kazete gena integrona i superintegrona koje još treba precizno odrediti. Većina kazeta gena superintegrona jedinstvena je za pojedine vrste, a njihova funkcija je i dalje nepoznata. Gen za rezistenciju na antibiotike koji je povezan s mobilnim integronima, izoliranih iz kliničkih izolata, još treba biti identificiran u superintegronima. Međutim, nekoliko kazeta gena superintegrona pokazuje značajnu homologiju s genima koji kodiraju za rezistenciju na antibiotike, fosfomicine i streptomicine te mogu iskazivati fenotip rezistentncije ako su izloženi djelovanju drugih antibiotika (Rowe-Magnus i sur., 1999). Nedavno su dva takva gena iz superintegrona, koja su se nalazila u genomu okolišnih izolata, eksprimirani kao rekombinantni proteini te je ispitivana aktivnost enzima (Nield, 2004). Jedan od ovih proteina, koji ima sličan slijed s aminoglikozidnom fosfotransferazom (APH), pokazao je ATPaznu aktivnost koja je u skladu s prisutnošću Mg^{2+} vezajućeg taloga, karakteristika APH proteina (Wright i Thompson, 1999). Međutim, njihov supstrat je još uvijek nepoznat. Preliminarne studije pokazuju da kazete gena superintegrona također kodiraju za proteine koji su uključeni u adaptivne funkcije, osim otpornosti na antibiotike. U kazetama gena superintegrona bakterije *Vibrio cholerae* nalaze se geni koji kodiraju za nekoliko čimbenika virulencije, uključujući toplinski stabilan gen *sto* za toksičnost, manoza-fukoza-rezistentni hemaglutinin gen *mrhA* i gen lipoproteinau (Abbott i Janda, 1994).

U kazetama gena superintegrona *Vibrio vulnificus* također je prisutan gen, koji je identificiran pomoću transposon-mutageneze, a bitan je za izražavanje glavne virulentne odrednice *V. vulnificus*, polisaharidne kapsule (Smith i Siebeling, 2003). Eksperimentalno su određene metaboličke funkcije triju proteina koji su dobiveni kodiranjem kazeta gena superintegrona, *V. cholerae* sulfat-vezajući protein, *Moritella marini* psihrofilna lipaza, *X. campestris* metilaza, (Rowe-Magnus, 2001). Dodatni proteini koji su dobiveni kodiranjem kazeta gena superintegrona obuhvaćaju proteine koji imaju homologiju s DNA modificirajućim enzimima, uključujući hidrolaze i restrikcijske endonukleaze, i enzimima koji su uključeni u primarni metabolizam (Vaisvila i sur., 2001).

Od posebnog interesa je otkriće da superintegroni imaju i nekoliko kazeta gena koji kodiraju članove toksin-antitoksin skupine (Rowe-Magnus i sur., 2003). Ove kazete su među rijetkim kazetama koje nose vlastiti promotor i zato se ekspresiraju bez učešća gena *attI* i promotora P_c. Oni mogu imati važnu ulogu u stabiliziranju velikog niza kazeta pronađenih u superintegronima

u *Vibrio* spp., s obzirom da je njihov gubitak štetan za genom bakterije domaćina (Rowe-Magnus i sur., 2003).

Određivanje različitih metaboličkih aktivnosti povezanih s kazetama gena superintegrona, osim otpornosti na antibiotike i virulencije, ukazuje na to da integroni djeluju kao opći sustav za preuzimanje gena tijekom bakterijske adaptacije. Analizirajući biološku raznolikost zarobljenih gena mogli bismo doći do otkrića novih proteina koji imaju znanstveni i biotehnološki značaj.

3.2 Integroni i rezistentni geni kao zagađivači

Zbog prekomjerne primjene antibiotika u kliničkoj i poljoprivrednoj praksi nastali su mobilni integroni koji imaju izuzetnu rezistenciju na većinu postojećih antibiotika. Klinički integroni grupe 1, koji su osobito rasprostranjeni, javljaju se u otprilike od 10 do 50 % komenzalnih bakterija u zdravih ljudi, uključujući i djecu koja još nisu izložena antibioticima (Sepp i sur., 2009). Također su prisutni u komenzalnim bakterijama domaćih životinja, gdje integron koji se nalazi u komezalnoj *E. coli* može povećati i do 80 % (Sepp i sur., 2009).

Budući da je stopa integrona jako visoka u ljudi i domaćih životinja, veliki broj bakterija koje sadrže integrone i gene za rezistenciju se bacaju u okoliš putem otpada. Jedna procjena sugerira da se otprilike 10^{19} bakterija koje sadrže inegrone grupe 1 ispuste u okoliš u Velikoj Britaniji svake godine samo preko zbrinjavanja kanalizacijskog mulja (Gaze i sur., 2011). Kao posljedica toga, integroni se mogu odmah detektirati u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda. Rezistentni geni i integroni su prisutni u talogu sitnih čestica i kanalizacijskom mulju te unatoč rastućoj upotrebi metoda za uklanjanje takvih gena tijekom obrade otpadnih voda znatne količine se bacaju u reciklažne vode ili izravno u rijeke te na kraju odlaze u mora i oceane (Laroche i sur., 2009).

Geni za rezistenciju na antibiotike i integroni sada se smatraju značajnim zagađivačima okoliša i kao markeri za praćenje izvora zagađenja (Storteboom i sur., 2010). Geni za rezistenciju i integroni koji potječu od ljudskih domintnih ekosustava mogu se smatrati ksenogenetičkim zagađivačima, jer su ti DNA elementi sastavljeni pod uvjetima kontinuirane selekcije zbog ljudske upotrebe antibiotika. Međutim, za razliku od uobičajenih zagađivača, integroni i geni za rezistenciju se mogu replicirati i stoga imaju svojstva zagađivača i invazivnih elemenata (Gillings, 2013). Posebno je promatran utjecaj gena za rezistenciju na ljudsko zdravlje, dok se puno manje pažnje posvećuje potencijalnim učincima na prirodni okoliš (Gillings, 2013).

3.3 Generacija novih DNA elemenata i novih rezistentnih vrsta bakterija

Zagađenje okoline antibioticima i sredstvima za dezinfekciju utječe na strukturu zajednice i dovodi do povećanog prijenosa gena za rezistenciju u okolišne organizmime. Sada je široko prihvaćeno da je prirodni okoliš vrlo pogodan sustav za otporne organizame i moguće oportunističke patogene (Stokes i Gillings, 2011).

Nastavak zagađivanja s kliničkim integronima i selektivnim agensima će dovesti do obilja rezistentnih stanica bakterija u okolišu i staviti dodatne selektivne pritiske na organizme u okolišu. Mogu se predvidjeti dva opća trenda: da će se pojaviti nove oportunističke patogene bakterije s otpornošću na antibiotike i da će njihovi integroni akumulirati dodatne gene s učincima na prijenos, patogenost i virulenciju.

Tijekom svog širenja integron je podvrgnut kroz mnoge evolucijske promjene. Sada ima prebivalište u *Acinetobacter johnsonii*, vrsti koja se obično ne povezuje s ljudima, i zbog toga mora imati horizontalan prijenos gena u svojoj trenutnoj lokaciji. Osim toga, integron je stekao neobične kazete gena koje kodiraju za dvije metionin sulfoksid reduktaze. Ovi enzimi popravljaju proteine koji su oštećeni zbog oksidativnog stresa i vjerojatno poboljšavaju kolonizaciju i opstanak u životinjskim tkivima. Nadalje, kraj izvornog integrona je zamijenjen minijaturnim obrnutim ponavljajućim transponirajućim elementima (MITEs) koji potencijalno daju integronu mehanizam za mobilnost (Gillings i sur., 2009).

Iz toga slijedi da pomoću integrona i selektivnih sredstava možemo selekcionirati mikroorganizme u okolišu (Martinez, 2008). Ovaj sekundarni neočekivani učinak antibiotičke revolucije će uzrokovati evolucijske promjene među mikroorganizmima diljem svijeta i imati potencijalno negativne posljedice za ljudsku dobrobit (Gillings, 2013).

3.4 Integroni kao alati za biotehnologiju

Integroni imaju značajne prednosti kao funkcionalne osnove za biotehnološke primjene. Imaju sve mehanizme za stjecanje, preuređivanje i ekspresiju egzogenih gena u *in vivo* sustavu. Prirodna aktivnost integron integraze može se koristiti za dobivanje funkcionalnih kazeta gena u plazmidima za daljnje manipulacije (Rowe-Magnus, 2009). Sintetske i prirodne kazete gena mogu se lako uvesti u stanice putem transformacije. To potencijalno omogućuje da se svaki gen ugradi u integron (Gestal i sur., 2011). Kazete koje se upotrebljavaju kao markeri, poput kazeta gena koje kodiraju za zeleni fluorescentni protein, mogu se upotrijebiti za transformiranje okolišnih bakterije s aktivnim integron rekombinacijskim sustavom. To bi omogućilo

kromosomskim kazetnim nizovima laku obnovu s uzorcima iz okoliša i detekciju nizova koji će se tek ugraditi u organizme.

Kromosomalni kazetni nizovi golem su izvor za otkrivanje novih proteina te za otkriće proteina koji bi mogli činiti blokove za prihvaćanje novih proteina (Koenig i sur., 2009). Takvi kazetni nizovi već su bili podvrgnuti prirodnoj selekciji u okruženju u kojem su se našli i tako da će vjerojatno kodirati za proteine značajne za adaptaciju bakterija (Koenig i sur., 2009). Prema tome, potraga za proteinima sa specifičnim svojstvima i/ili aktivnostima može biti učinkovitija u prirodnoj okolini koja odgovara željenim uvjetima pod kojima protein treba raditi, a zatim pronalaziti odgovarajuće kazete gena. Te kazete ne moraju biti članovi niti jedne poznate obitelji proteina.

Nakon što su potencijalni geni sastavljeni u kazetne nizove, prirodna aktivnost integrona mogla bi se koristiti za generiranje različitih razmještaja gena. Navedeni princip dokazan je kroz optimizaciju sintetskog puta triptofana pomoću sintetičkih kazeta gena koje su slučajno premještene pomoću aktivnosti integron integraze (Bikard i sur., 2010). Prema tome, funkcionalne osnove integrona se mogu koristiti za generiranje novih biokemijskih putova za bioremediaciju ili biosinteze proteina pomoću inženjerstva posredovanog integron operonoma (Koenig i sur., 2009).

3.5 Evolucija bakterija

Uporaba antimikrobnih spojeva je dovela do razvoja sve složenijih elemenata DNA koji sadrže integrone, gene za rezistenciju, transpozone i druge mobilne DNA elemente u svim ljudskim ekosustavima. Ovi ksenogenetički DNA elementi su pušteni natrag u okoliš, istovremeno s antibioticima, dezinficijensima i teškim metalima koji su izvorno utjecali na njihovu selekciju (Gillings i Stokes, 2012). Otpadne vode i kanalizacije postale su velike reakcijske posude za rekombinaciju i preuređenje ovih elemenata te za horizontalni prijenos gena između kliničkih, komenzalnih i okolišnih bakterija (Gillings i sur., 2009). Vodena okruženja će vjerojatno biti glavna žarišta za složene interakcije između integrona, odrednica za otpornost i mobilne molekule DNA, gdje su biofilmovi posebno značajna žarišta za genske razmjene (Gillings, 2013).

Ljudsko korištenja selektivnih agenasa će i dalje utjecati na stvaranje kompleksnih genetičkih elemenata koji će sadržavati gene s učincima na virulenciju, prijenos i patogenost. Međutim, ta ista selektivna sredstva također će imati mnogo šire posljedice na cijelu mikrobnu biosferu i na opći tempo mikrobne evolucije (Gillings, 2013). Genetička raznolikost u bakterija nastaje

mutacijama, rekombinacijama i horizontalnim prijenosom gena. Stopa za svaki od navedenih procesa je pod utjecajem stabilizirane selekcije, pri čemu je prisutna ravnoteža između prednosti genskih inovacija i mogući gubitk genomskog integriteta. Nije iznenađujuće da je u stabilnim uvjetima genska promjena bakterija potisnuta. Međutim, u uvjetima selekcije i stresa stope rekombinacije, mutacije i horizontalnog prijenosa gena su pod kontrolom SOS odgovora (Schlacher i Goodman, 2007). Stalna izloženost promjenama, subinhibicijskim razinama selektivnih agenasa stvara okolnosti gdje bakterijski sojevi s višim stopama genetske promjene imaju prednost (Baquero, 2009). Dakle, neželjena posljedica revolucije antibiotika može učvrstiti bakterijske sojeve s višom stopom mutacija, rekombinacija i horizontalnog prijenosa gena (Gillings i Stokes, 2012). Jasna je potreba da se pažljivije prate učinci bioaktivnih zagađivača na okoliš.

ZAKLJUČAK

Regrutacija egzogenih gena je najučinkovitiji način na koji bakterijske vrste mogu preživjeti razne izazove kojim su izložene u okolišu, uključujući izloženost antimikrobnim spojevima. Integroni osiguravaju bakterijama sustav za uzimanje gena iz okoliša te tako mogu steći rezistenciju na razne antibiotike. Međutim, nakon otkrića superintegrona i tisuća kazeta gena povezanih s integronima u genomima okolišnih bakterijskih vrsta, važnost tih elemenata jasno nadilazi fenomen otpornosti na antibiotike. Regrutacija integron kazeta gena osigurava bakterijama nove proteine i nove enzimske funkcija te omogućava stanicama prednost u prilagođavanju na određeni okoliš. Eksperimentalni i filogenetski podaci ukazuju da bi superintegron mogao biti predak mobilnih integrona i kazeta gena, koji nose gene za rezistenciju, uočenih u genomima bakterijskih izolata kliničkog značaja. Ipak, mnogo važnih pitanja o ovom sustavu ostaje bez odgovora. Konkretno, postoji potreba da se objasne mehanizmi na kojima se temelji proces rekombinacije pomoću integraze, formiranje novih kazeta gena i dinamika razmjene kazete gena u složenim bakterijskim populacijama.

LITERATURA

Abbott, S. L., Janda, J. M. (1994) Severe gastroenteritis associated with *Vibrio hollisae* infection: report of two cases and review. *Clin. Infect. Dis.* **18**, 310–312.

Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M. (1995) A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother*. **39**, 1612–1615. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.39.7.1612

Baharoglu, Z., Bikard, D., Mazel, D. (2010) Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet*. **6**, e1001165. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001165.

Baquero, F. (2009) Environmental stress and evolvability in microbial systems. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 5–10. http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02677.x

Barlow, R. S., Gobius, K. S. (2006) Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J. Antimicrob. Chemother*. **58**, 1133–1138. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl423.

Bikard, D., Julié-Galau, S., Cambray, G., Mazel, D. (2010) The synthetic integron: an in vivo genetic shuffling device. *Nucleic Acids Res*. **38**, 53–153. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq511

Biskri, L., Bouvier, M., Guérout, A.-M., Boisnard, S., Mazel, D. (2005) Comparative study of class 1 integron and *Vibrio cholerae* superintegron integrase activities. *J. Bacteriol.* **187**, 1740 –1750. http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.5.1740-1750.2005.

Biskri, L., Mazel, D. (2003) Erythromycin esterase gene ere (A) is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother*. **47**, 3326 – 3331. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.10.3326-3331.2003.

Boucher, Y., Cordero, O. X., Takemura, A., Hunt, D. E., Schliep, K., Bapteste, E., Lopez, P., Tarr, C. L., Polz, M. F. (2011) Local mobile gene pools rapidly cross species boundaries to create endemicity within global *Vibrio cholerae* populations. *mBio*. **2,** e00335– 00310. http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00335-10.

Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J. E., Stokes, H. W. (2007) Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol*. **15**, 301–309. http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.05.004.

Boucher, Y., Nesbø, C. L., Joss, M. J., Robinson, A., Mabbutt, B. C., Gillings, M. R., Doolittle, W. F., Stokes, H. (2006) Recovery and evolutionary analysis of complete integron gene cassette arrays from *Vibrio*. *BMC Evol. Biol*. **6**, 3. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-6-3.

Bouvier, M., Demarre, G., Mazel, D. (2005) Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J.* **24**, 4356 – 4367. http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600898

Bouvier, M., Ducos-Galand, M., Loot, C., Bikard, D., Mazel, D. (2009) Structural features of single-stranded integron cassette *attC* sites and their role in strand selection. *PLoS Genet.* **5**, e1000632. http://dx.doi.org /10.1371/journal.pgen.1000632

Cambray, G., Guerout, A.-M., Mazel, D. (2010) Integrons. *Annu. Rev. Genet*. **44**, 141–166. http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504

Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Guerin, E., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Ploy, M.-C., Barbe, J., Mazel, D., Erill, I. (2011) Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mobile DNA.* **2**, 6. http://dx.doi.org/10.1186/1759-8753-2-6.

Coleman, N., Tetu, S., Wilson, N., Holmes, A. (2004) An unusual integron in *Treponema denticola*. *Microbiology.* **150**, 3524 –3526. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27569-0

Collis, C. M., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Stokes, H., Hall, R. M. (1993) Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol. Microbiol*. **9**, 41–52. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01667.x

Collis, C. M., Hall, R. M. (1992) Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol*. **6**, 2875–2885. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01467.x

Collis, C. M., Hall, R. M. (1995) Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother*. **39**, 155–162. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.39.1.155

Collis, C. M., Kim, M.-J., Partridge, S. R., Stokes, H., Hall R. M. (2002) Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J. Bacteriol*. **184**, 3017–3026. http://dx.doi.org/10.1128 /JB.184.11.3017-3026.2002

Collis, C. M., Recchia, G. D., Kim, M.-J., Stokes, H., Hall, R. M. (2001) Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1. *J. Bacteriol*. **183**, 2535–2542. http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.8.2535 -2542.2001.

Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M., Lito L., Cristino, J. M., Mendo, S., Duarte, A. (2003) Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **47**, 2838 –2843. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.9.2838-2843.2003

Coyne, S., Guigon, G., Courvalin, P., Périchon, B. (2010) Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrob. Agents Chemother*. **54**, 333–340. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01037-09.

Gaze, W. H., Abdouslam, N., Hawkey, P. M., Wellington, E. M. H. (2005) Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob. Agents Chemother*. **49**, 1802–1807. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.5.1802-1807.2005

Gaze, W. H., Zhang, L., Abdouslam, N. A., Hawkey, P. M., Calvo-Bado, L., Royle, J., Brown, H., Davis, S., Kay, P., Boxall, A. B. A., Wellington, E. M. H. (2011) Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J*. **5**, 1253–1261. http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.15.

Gestal, A. M., Liew, E. F., Coleman, N. V. (2011) Natural transformation with synthetic gene cassettes: new tools for integron research and biotechnology. *Microbiology*. **157**, 3349 –3360. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.051623-0

Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., Stokes, H. W. (2008) The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **190**, 5095–5100. http://dx.doi.org/10.1128/JB.00152-08.

Gillings, M. R., Holley, M. P., Stokes, H., Holmes, A. J. (2005) Integrons in *Xanthomonas*: a source of species genome diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4419–4424. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406620102.

Gillings, M. R., Holley, M. P., Stokes, H. W. (2009) Evidence for dynamic exchange of qac gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **296**, 282–288. http: //dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01646.x

Gillings, M. R., Stokes, H. (2012) Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends Ecol. Evol.* **27**, 346 –352. http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2012.02.006.

Gillings, M. R. (2013) Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front. Microbiol.* **4**, 4. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00004

Gillings, M. R. (2014) Integrons: Past, Present and Future. *Microbiol. Mol. Biol.* **78**, 257-277

Gravel, A., Fournier, B., Roy, P. H. (1998) DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the *attI1* site. *Nucleic Acids Res*. **26**, 4347– 4355. http://dx.doi.org/10.1093/nar/26.19.4347

Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbe, J., Ploy, M.-C., Mazel, D. (2009) The SOS response controls integron recombination. *Science* **324**, 1034. http://dx.doi.org/10.1126/science.1172914.

Hall, R., Brookes, D., Stokes, H. (1991) Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination crossover point. *Mol. Microbiol.* **5**, 1941–1959. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00817.x.

Hall, R. M., Brown, H. J., Brookes, D. E., Stokes, H. (1994) Integrons found in different locations have identical 5= ends but variable 3= ends. *J. Bacteriol.* **176**, 6286 – 6294.

Hall, R. M. (2012) Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1267**, 71–78. http://dx.doi.org /10.1111/j.1749-6632.2012.06588.x

Hansson, K., Sköld, O., Sundström, L. (1997) Non-palindromic *attI* sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. *Mol. Microbiol.* **26**, 441– 453. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5401964.x

Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A., Roy, P. H. (2002) IntI2 integron integrase in Tn*7*. *J. Bacteriol.* **184**, 1712–1721. http://dx.doi.org/10.1128 /JB.184.6.1712-1721.2002

Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S. M., Woodgate, R., Waldor, M. K. (2001) Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2991–3000. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.11.2991-3000.2001

Holmes, A. J., Gillings, M. R., Nield, B. S., Mabbutt, B. C., Nevalainen, K., Stokes, H. (2003) The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environ. Microbiol.* **5**, 383–394. http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00429.x.

Jacquier, H., Zaoui, C., Sansonle, Pors, M. J., Mazel, D., Berçot, B. (2009) Translation regulation of integrons gene cassette expression by the *attC* sites. *Mol. Microbiol.* **72,** 1475–1486. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365 -2958.2009.06736.x.

Johansson, C., Kamali-Moghaddam, M., Sundström, L. (2004) Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4033– 4043. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh730.

Kholodii, G. Y., Mindlin, S., Bass, I., Yurieva, O., Minakhina, S., Nikiforov, V. (1995) Four genes, two ends, and a res region are involved in transposition of Tn*5053*: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a mer operon or an integron. *Mol. Microbiol.* **17**, 1189 –1200. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061189.x

Koenig, J. E., Bourne, D. G., Curtis, B., Dlutek, M., Stokes, H., Doolittle, W. F., Boucher, Y. (2011) Coral-mucus-associated *Vibrio* integrons in the Great Barrier Reef: genomic hotspots for environmental adaptation. *ISME J.* **5**, 962–972. http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.193

Koenig, J. E., Sharp, C., Dlutek, M., Curtis, B., Joss, M., Boucher, Y., Doolittle, W. F. (2009) Integron gene cassettes and degradation of compounds associated with industrial waste: the case of the Sydney tar ponds. *PLoS One*. **4**, 5276. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005276.

Kor, S.-B., Choo, Q.-C., Chew, C.-H. (2013) New integron gene arrays from multiresistant clinical isolates of members of the *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* from hospitals in Malaysia. J. *Med. Microbiol.* **62**, 412– 420. http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.053645-0

Labbate, M., Boucher, Y., Joss, M., Michael, C., Gillings, M., Stokes, H. (2007) Use of chromosomal integron arrays as a phylogenetic typing system for *Vibrio cholerae* pandemic strains. *Microbiology*. **153**, 1488- 1498. http: //dx.doi.org/10.1099/mic.0.2006/001065-0.

Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., Petit F. (2009) Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* **68**, 118 –130. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574 -6941.2009.00655.x.

Liebert, C. A., Hall, R. M., Summers, A. O. (1999) Transposon Tn*21*, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 507–522.

MacDonald, D., Demarre, G., Bouvier, M., Mazel, D., Gopaul, D. N. (2006) Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature*. **440**, 1157–1162. http://dx.doi.org/10.1038/nature04643

Martinez, J. L. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*. **321**, 365–367. http://dx.doi.org/10.1126/science.1159483.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., Davies, J. (1998) A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science*. **280**, 605– 608. http://dx.doi.org/10.1126/science.280.5363.605.

Mazel, D. (2006.) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 608 – 620. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1462

Michael, C. A., Labbate, M. (2010) Gene cassette transcription in a large integron-associated array. *BMC Genet.* **11**, 82. http://dx.doi.org/10.1186 /1471-2156-11-82

Minakhina, S., Kholodii, G., Mindlin, S., Yurieva, O., Nikiforov, V. (1999) Tn*5053* family transposons are res site hunters sensing plasmidal res sites occupied by cognate resolvases. *Mol. Microbiol.* **33**, 1059- 1068. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01548.x.

Moura, A., Soares, M., Pereira, C., Leitão, N., Henriques, I., Correia, A. (2009) INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*. **25**, 1096 –1098. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105

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. http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.1.235-249.2001

Nield, B. S. (2004) New enzymes from environmental cassette arrays: functional attributes of a phosphotransferase and an RNA-methyltransferase. *Protein Sci.* **13**, 1651–1659.

Partridge, S. R., Recchia, G. D., Scaramuzzi, C., Collis, C. M., Stokes, H., Hall, R. M. (2000) Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology*. **146**, 2855–2864.

Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J. R. (2009) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev*. **33**, 757–784. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x

Partridge, S. R. (2011) Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 820 – 855. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x

Peters, J. E., Craig, N. L. (2001) Tn*7*: smarter than we thought. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 806 – 814. http://dx.doi.org/10.1038/35099006

Rådström, P., Sköld, O., Swedberg, G., Flensburg, J., Roy, P. H., Sundström, L. (1994) Transposon Tn*5090* of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn*7*, Mu, and the retroelements. *J. Bacteriol.* **176**, 3257–3268.

Recchia, G. D., Hall, R. M. (1995) Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the aadB gene cassette precisely inserted at a secondary site in the IncQ plasmid RSF1010. *Mol. Microbiol.* **15**, 179 –187. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02232.x

Robinson, A., Guilfoyle, A. P., Sureshan, V., Howell, M., Harrop, S. J., Boucher, Y., Stokes, H. W., Curmi, P. M., Mabbutt, B. C. (2008) Structural genomics of the bacterial mobile metagenome: an overview, *Structural proteomics*. **426**, 589 –595.

Rodríguez-Minguela, C. M., Apajalahti, J. H., Chai, B., Cole, J. R., Tiedje, J. M. (2009) Worldwide prevalence of class 2 integrases outside the clinical setting is associated with human impact. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5100- 5110. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00133-09

Rosewarne, C. P., Pettigrove, V., Stokes, H. W., Parsons, Y. M. (2010) Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn*402*-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**, 35– 46. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00823.x.

Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A.-M., Biskri, L., Bouige, P., Mazel D. (2003) Comparative analysis of superintegrons: engineering extensive genetic diversity in the *Vibrionaceae. Genome Res.* **13**, 428 – 442. http://dx.doi.org/10.1101/gr.617103.

Rowe-Magnus, D. A., Guérout, A.-M., Mazel, D. (1999) Superintegrons. *Res. Microbiol.* **150**, 641– 651. http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(99) 00127-8.

Rowe-Magnus, D. A. (2009) Integrase-directed recovery of functional genes from genomic libraries. *Nucleic Acids Res.* **37**, 118 http: //dx.doi.org/10.1093/nar/gkp561

Rowe-Magnus, D. A. (2001) The evolutionary history of chromosomal superintegrons provides an ancestry for multi-resistant integrons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 652–657

Sajjad, A., Holley, M. P., Labbate, M., Stokes, H., Gillings, M. R. (2011) Preclinical class 1 integron with a complete Tn*402*-like transposition module. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 335–337. http://dx.doi.org/10.1128 /AEM.02142-10.

Schlacher, K., Goodman, M. F. (2007) Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 587–594. http://dx.doi.org/10.1038/nrm2198

Segal, H., Francia, M. V., Lobo, J. M. G., Elisha, G. (1999) Reconstruction of an active integron recombination site after integration of a gene cassette at a secondary site. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2538 –2541.

Sepp, E., Stsepetova, J., Lõivukene, K., Truusalu, K., Kõljalg, S., Naaber, P., Mikelsaar, M. (2009) The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **8**, 34. http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-8-34

Shearer, J. E., Summers, A. O. (2009) Intracellular steady-state concentration of integron recombination products varies with integrase level and growth phase. *J. Mol. Biol.* **386**, 316 –331. http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.041

Sköld, O. (2000) Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist. Updat.* **3**, 155–160. http://dx.doi.org/10.1054/drup.2000.0146

Smith, A. B., Siebeling, R. J. (2003) Identification of genetic loci required for capsular expression in *Vibrio vulnificus. Infect. Immun.* **71**, 1091–1097. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.3.1091-1097.2003

Sørum, H., Roberts, M., Crosa, J. (1992) Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 611– 615. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.36.3.611

Stokes, H., Hall, R. (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* **3**, 1669 –1683. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x

Stokes, H., Hall, R. M. (1991) Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the TN*1696* integron suggests regulation by translational attenuation. *Plasmid*. **26**, 10 –19. http://dx.doi.org /10.1016/0147-619X(91)90032-R.

Stokes, H., Holmes, A. J., Nield, B. S., Holley, M. P., Nevalainen, K. H., Mabbutt, B. C., Gillings, M. R. (2001) Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5240 –5246. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.11.5240-5246.2001.

Stokes, H., O'Gorman, D., Recchia, G. D., Parsekhian, M., Hall, R. M. (1997) Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol. Microbiol.* **26**, 731–745. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6091980.x.

Stokes, H. W., Gillings, M. R. (2011) Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 790 – 819. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x

Storteboom, H., Arabi, M., Davis, J. G., Crimi, B., Pruden, A. (2010) Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine river, urban, and agricultural sources. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 1947–1953. http://dx.doi.org/10.1021/es902893f

Vaisvila, R., Morgan, R. D., Posfai, J., Raleigh, E. A. (2001) Discovery and distribution of superintegrons among *Pseudomonads*. *Mol. Microbiol*. **42**, 587– 601.

Wright, G. D. (2011) Antibiotic resistome: a framework linking the clinic and the environment. *Antimicrobial Resistance in the Environment.* 15–27.

Wright, G. D., Thompson, P. R. (1999) Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Frontiers Biosci*. **4**, 9–21

Xu, H., Davies, J., Miao, V. (2007) Molecular characterization of class 3 integrons from Delftia spp. *J. Bacteriol.* **189**, 6276 – 6283. http://dx.doi.org/10.1128/JB.00348-07.

Yuan, J., Yamaichi, Y., Waldor, M. K. (2011) The three *Vibrio cholerae* chromosome II-encoded ParE toxins degrade chromosome I following loss of chromosome II. *J. Bacteriol*. **193**, 611– 619. http://dx.doi.org/10.1128/JB.01185-10.