

Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk  
Sopot

# **Polimorfizm transpozonów z rodziny Tc1-podobnych w genomach ryb**

**Rozprawa doktorska**

*Anita Poćwierz-Kotus*

Promotor: prof. dr hab. Roman Wenne

Recenzenci: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn  
dr hab. Dariusz Grzebelus

# Wprowadzenie

## Elementy transpozonowe

- Transpozony są odcinkami DNA zdolnymi do zmiany miejsca położenia w genomie.
- Transpozony mają znaczący udział w składzie prokariotycznych i eukariotycznych genomów, a zakres ich występowania obejmuje prawie wszystkie zbadane organizmy.
- Dzięki zdolności do transpozycji elementy te mogą rozprzestrzeniać się zarówno w obrębie pojedynczej komórki poprzez kopiowanie się w nowych miejscach genomu, jak i między osobnikami wewnątrz populacji, a także pomiędzy gatunkami w procesie horyzontalnego transferu (HT).

# Wprowadzenie

## Elementy transpozonowe

### Eukariotyczne elementy transpozonowe

#### I klasa:

#### retrotranspozony

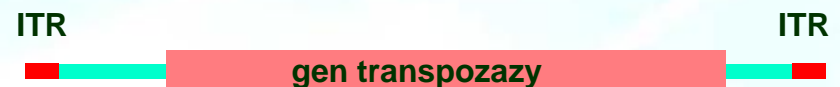
- mechanizm transpozycji „copy-and-paste”
- w transpozycji uczestniczy RNA
- gen kodujący odwrotną transkryptazę



#### II klasa:

#### transpozony DNA

- mechanizm transpozycji „cut-and-paste”
- gen kodujący transpozazę
- odwrócone terminalne powtórzenia - ITR (ang. *inverted terminal repeat*)



# Wprowadzenie

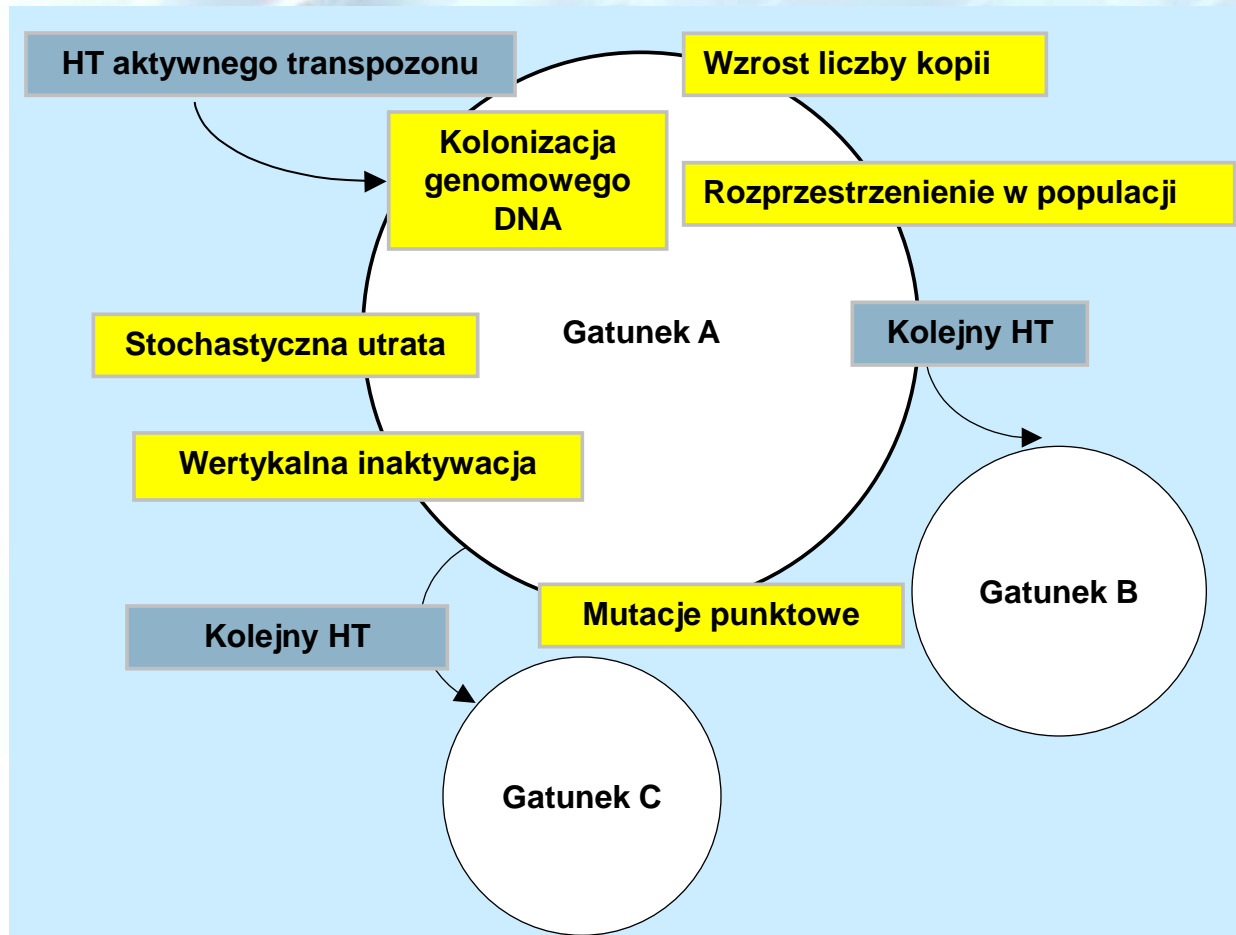
## Transpozony Tc1

- Jedną z rodzin TE klasy II jest rodzina transpozonów Tc1-podobnych, homologiczna do sekwencji Tc1 u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Występuje ona w genomach wielu gatunków zwierząt, szczególnie zaś rozpowszechniona jest w genomach ryb i płazów.
- Większość kopii transpozonów Tc1 z powodu wielokrotnych mutacji jest nieaktywna i występuje w postaci stałych składników genomu (tzw. genetyczna skamieniałość).

# Wprowadzenie

## Horyzontalny transfer

- HT - zjawisko umożliwiające transmisję TE od jednego gatunku gospodarza do innego, za pośrednictwem wektora.



# Wprowadzenie

## Horyzontalny transfer

- Doniesienia w pracy Leavera (2001) o HT u ryb i płazów:
  - Kompletna kopia transpozonu Tc1-podobnego zidentyfikowana w genomie *Pleuronectes platessa* może świadczyć o zachowaniu zdolności do transpozycji tego transpozonu.
  - Obecność spokrewnionych transpozonów z rodziny Tc1-podobnych w genomach *Pleuronectes platessa*, *Salmo salar*, *Rana temporaria*, czyli gatunków, których dywergencja nastąpiła ponad 400 mln lat temu może świadczyć o horyzontalnej transmisji tego transpozonu.

# Cele pracy

- Zbadanie zakresu występowania transpozonów z rodziny Tc1-podobnych w genomach różnych gatunków ryb.
- Określenie polimorfizmu i uzyskanie charakterystyki sekwencji transpozonów Tc1-podobnych w badanych gatunkach ryb.
- Przeprowadzenie analizy filogenetycznej transpozonów Tc1-podobnych zidentyfikowanych w genomach ryb.
- Wykazanie możliwości zajścia horyzontalnego transferu u wybranych gatunków ryb.
- Opracowanie metodyki określania miejsc integracji transpozonów Tc1-podobnych w genomach ryb.

# Metody

## Pobór prób

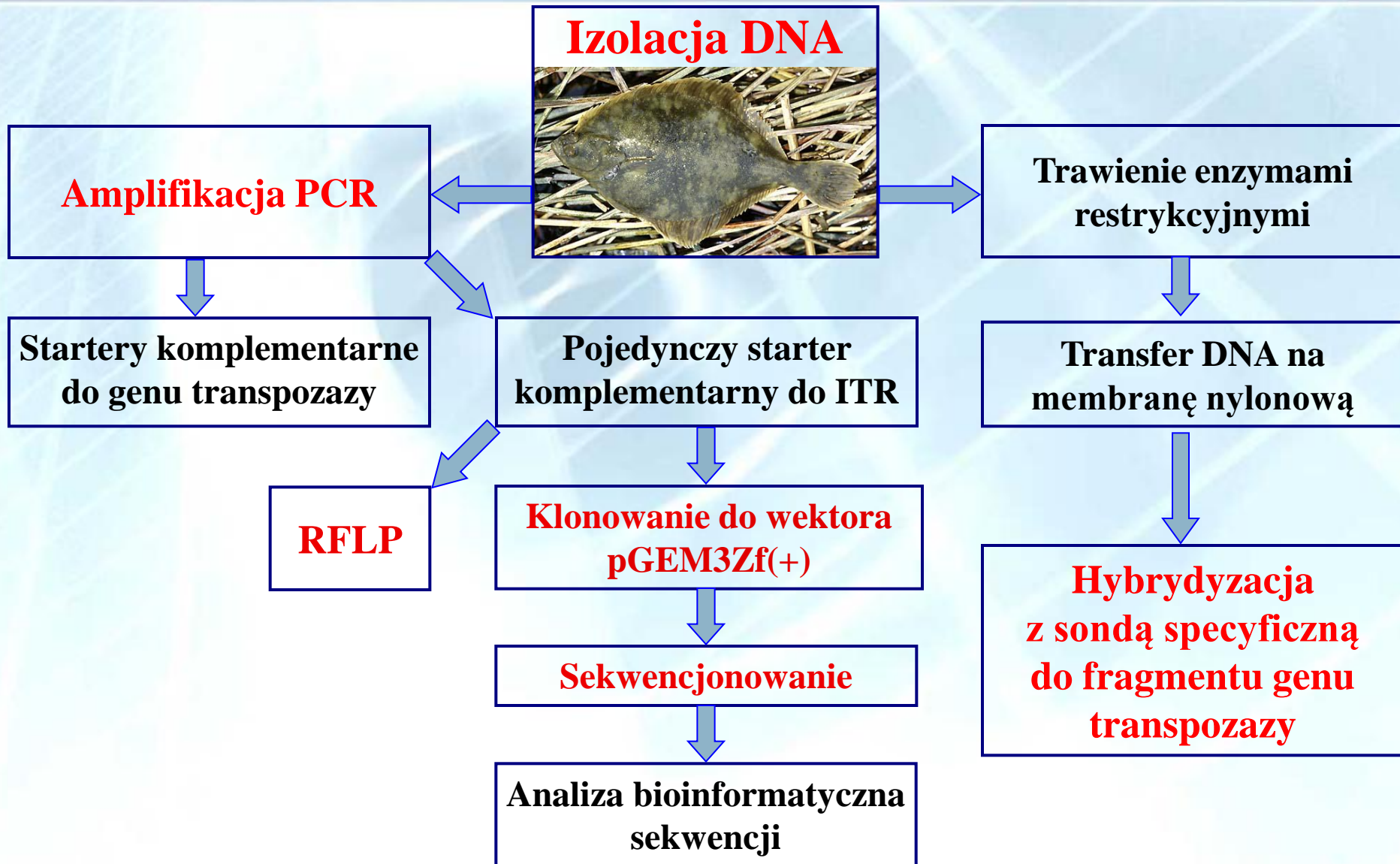
- Badaniami objętych było 495 osobników należących do 36 gatunków ryb zasiedlających wody słone i słodkie.
- Najliczniejszą grupę stanowili przedstawiciele rodzin:
  - Pleuronectidae – 179 osobników:
    - *Platichthys flesus*
    - *Pleuronectes platessa*
  - Scophthalmidae – 82 osobniki:
    - *Scophthalmus maximus*
  - Percidae – 54 osobniki:
    - *Perca fluviatilis*
- Liczebnościowo mniejsze grupy stanowili przedstawiciele rodzin:

Esocidae,	Salmonidae,	Gobidae,	Merlucciidae,
Cyprinidae,	Clupeidae,	Belonidae,	Gadidae,
Poeciliidae,	Dasyatidae,	Ophidiidae,	Channichthyidae,
Anguillidae,	Scombridae,	Gempylidae,	Carangidae,
Scorpaenidae.			



# Metody

## Polimorfizm transpozonów Tc1-podobnych



# Metody

## Identyfikacja miejsc insercji transpozonów Tc1-podobnych

### Izolacja DNA



Trawienie enzymami restrykcyjnymi



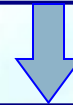
Ligacja fragmentów restrykcyjnych



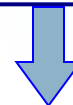
Odwrotna reakcja PCR (ang. *inverse PCR*)



Ponowna reakcja PCR (rePCR)



Sekwencjonowanie

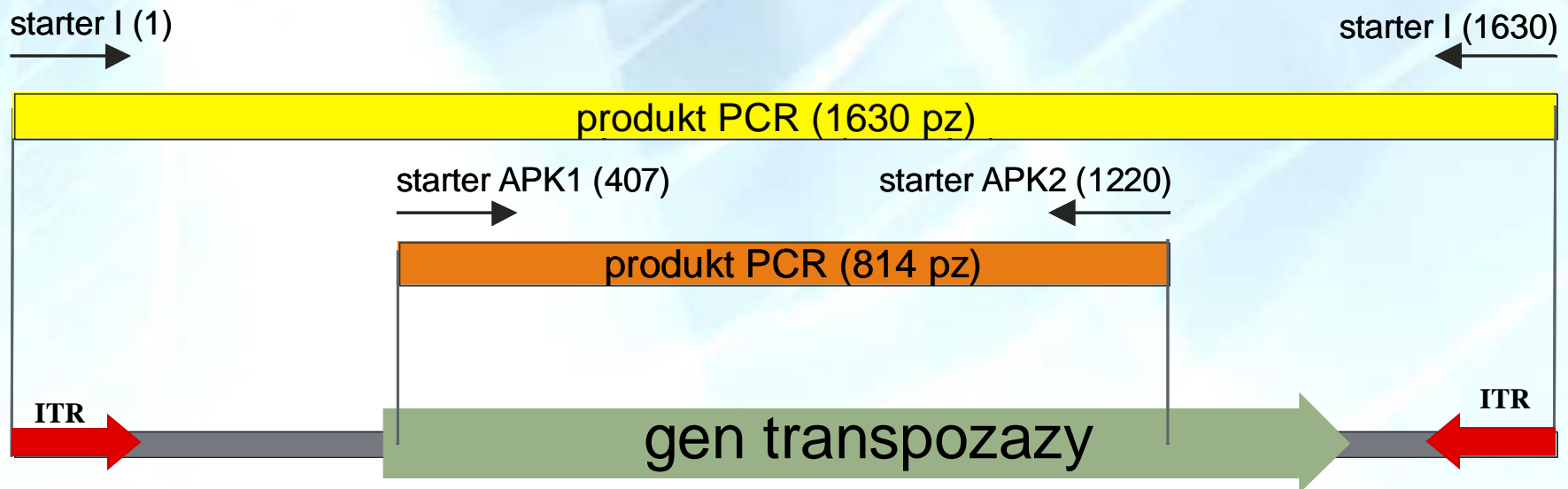


Obróbka bioinformatyczna sekwencji

# Wyniki

## Zakres występowania transpozonów Tc1-podobnych w genomach różnych gatunków ryb

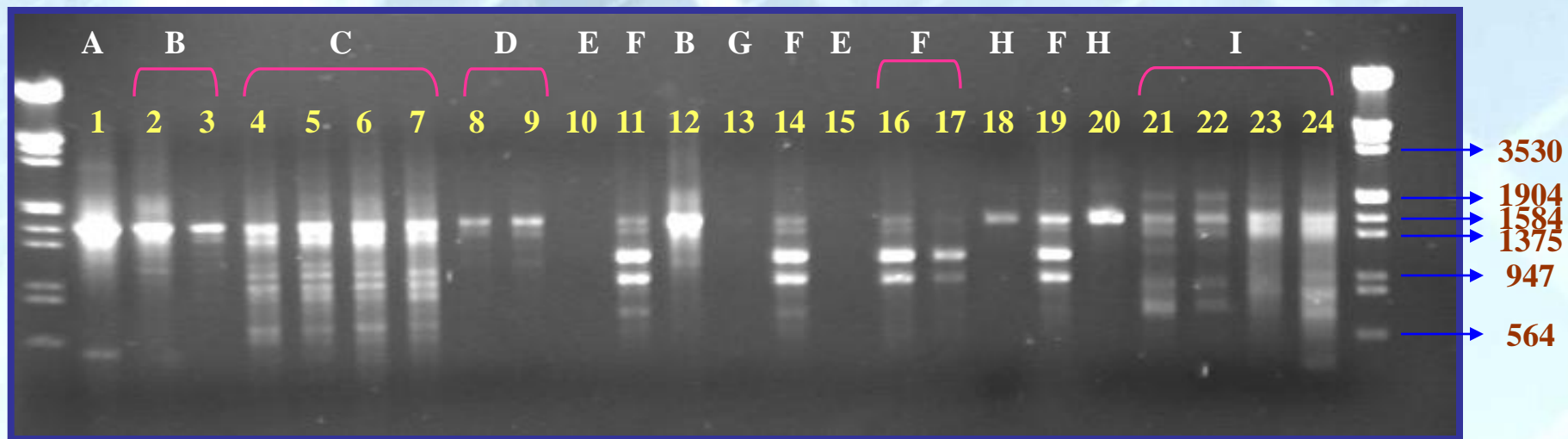
- Analiza przesiewowa przy pomocy techniki PCR
- Liczba przebadanych gatunków – 36
- Liczba przebadanych osobników – 495



# Wyniki

## Zakres występowania transpozonów Tc1-podobnych w genomach różnych gatunków ryb

- Dystrybucja transpozonów Tc1-podobnych w genomach wybranych gatunków ryb oszacowana dzięki amplifikacji PCR z pojedynczym starterem I.



**A** - *P. platessa*

**B** - *P. flesus*

**C** - *S. salar*

**D** - *H. platessoides*

**E** - *R. hippoglossoides*

**F** - *E. lucius*

**G** - *S. maximus*

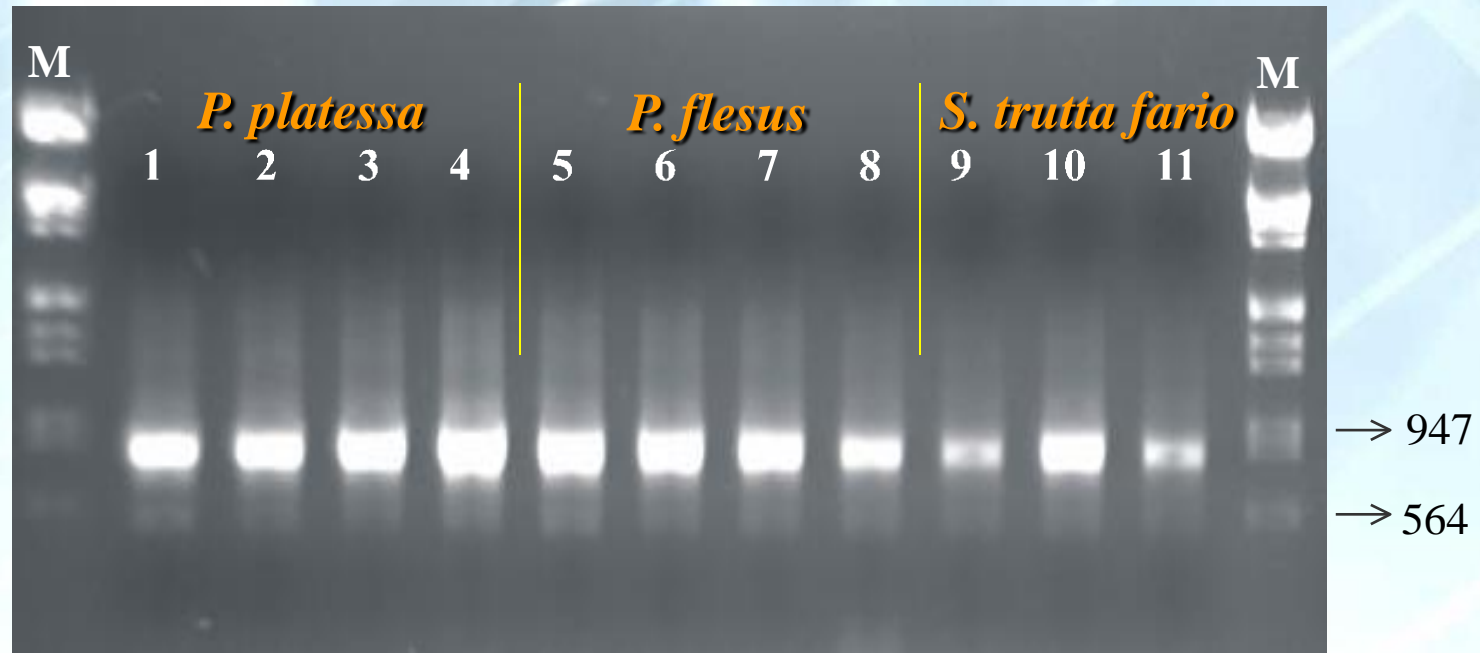
**H** - *S. lucioperca*

**I** - *C. harrengus* (I)

# Wyniki

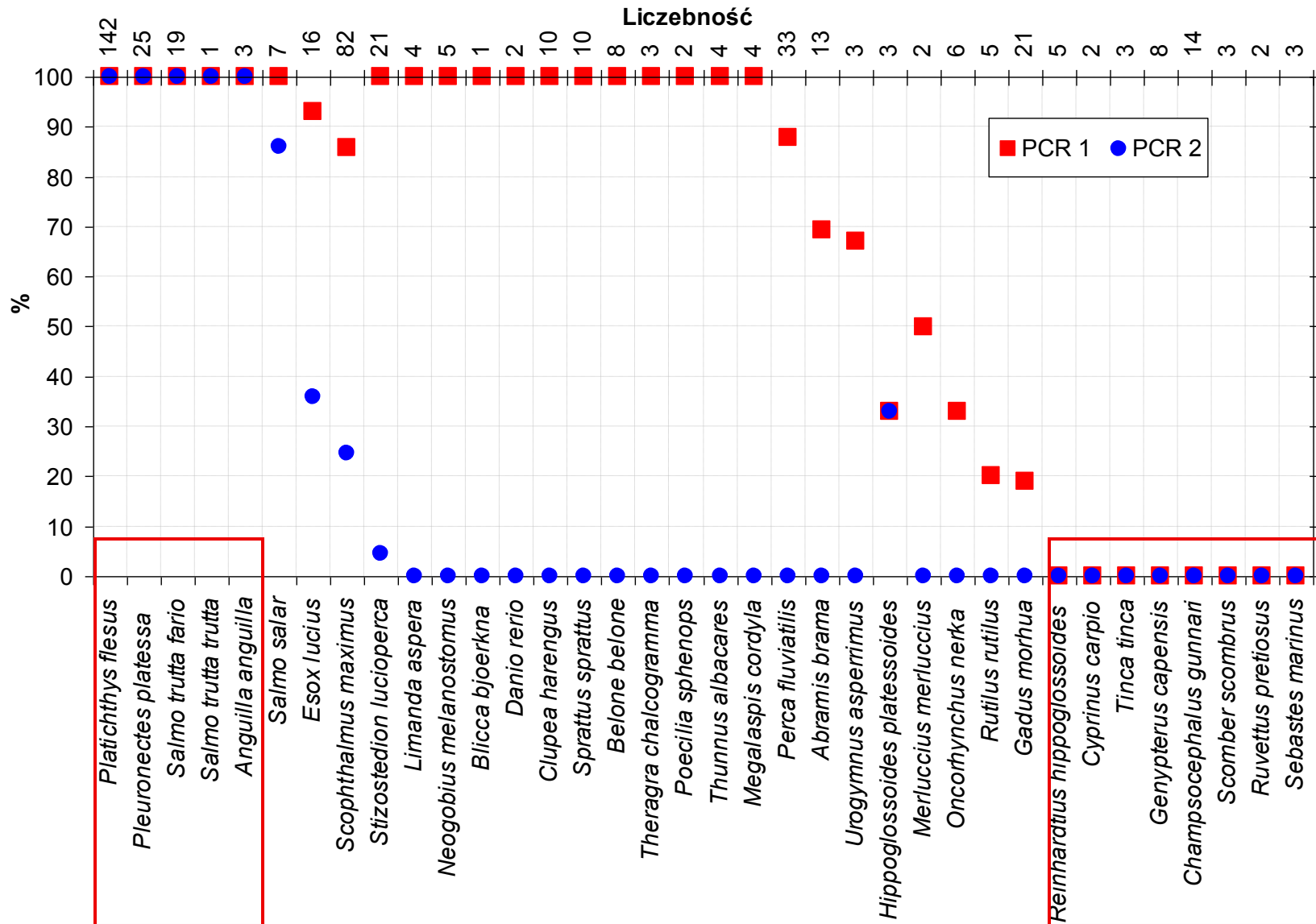
## Zakres występowania transpozonów Tc1-podobnych w genomach różnych gatunków ryb

- Dystrybucja transpozonów Tc1-podobnych w genomach różnych gatunków ryb oszacowana z zastosowaniem amplifikacji PCR z parą starterów komplementarnych do genu Tnp.



# Wyniki

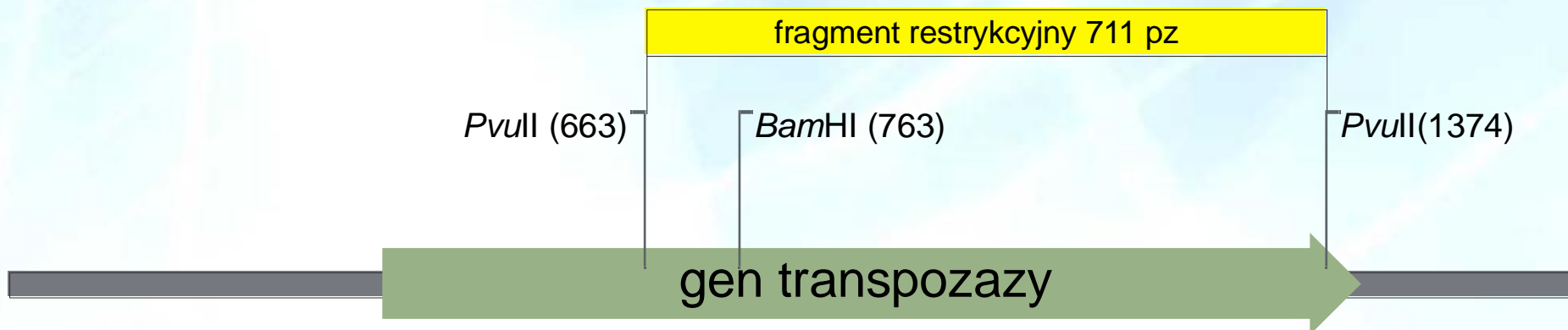
## Zakres występowania transpozonów Tc1-podobnych w genomach różnych gatunków ryb



# Wyniki

## Potwierdzenie specyficzności wykrytych transpozonów Tc1-podobnych

Gatunek	Liczba osobników	Miejsce pochodzenia
<i>Platichthys flesus</i>	15	Morze Bałtyckie
<i>Pleuronectes platessa</i>	10	Morze Bałtyckie
<i>Scophthalmus maximus</i>	5	Morze Bałtyckie
<i>Salmo trutta fario</i>	2	hodowla rybna, Gościcino
<i>Salmo salar</i>	2	Morze Norweskie
<i>Esox lucius</i>	13	Jeziro Żarnowieckie







# Wyniki

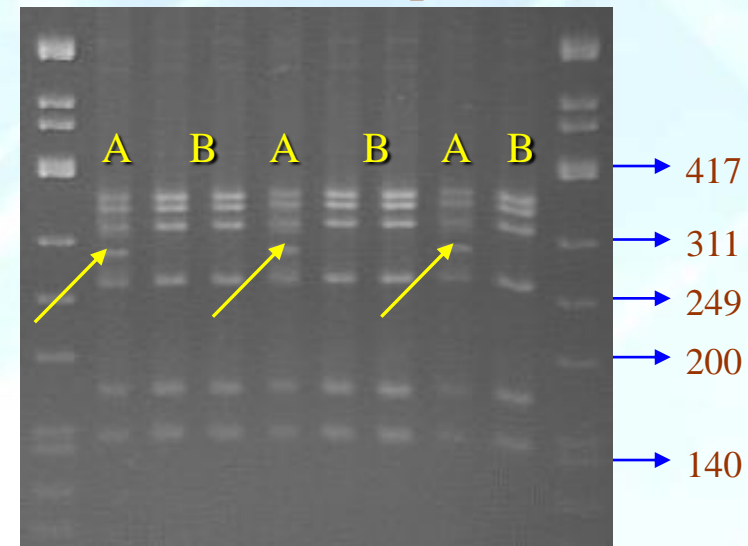
## Polimorfizm sekwencji transpozonów Tc1-podobnych określony przy użyciu RFLP

- Użyto enzymów restrykcyjnych: *AluI*, *MboI*, *DdeI*, *HinfI*.

Gatunek	Liczba osobników	Miejsce pochodzenia
<i>Platichthys flesus</i>	44	Morze Bałtyckie Morze Północne
<i>Pleuronectes platessa</i>	20	Morze Bałtyckie
<i>Scophthalmus maximus</i>	5	Morze Bałtyckie
<i>Salmo trutta fario</i>	5	hodowla rybna, Gościcino
<i>Salmo salar</i>	10	Morze Norweskie

**A** - *Platichthys flesus*

**B** - *Pleuronectes platessa*



# Wyniki

## Polimorfizm sekwencji transpozonów Tc1-podobnych na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych

Klonowanie sekwencji transpozonów Tc1-podobnych z 10 osobników ryb reprezentujących 8 gatunków:

Lp.	Gatunek	Symbol osobnika	Pochodzenie	Liczba uzyskanych klonów
1	<i>Platichthys flesus</i>	31S 200S 8ST	Morze Bałtyckie Morze Bałtyckie Morze Północne	94 20 20
2	<i>Pleuronectes platessa</i>	50G	Morze Bałtyckie	20
3	<i>Scophthalmus maximus</i>	11SKB	Morze Bałtyckie	20
4	<i>Esox lucius</i>	10E	Jezioro Żarnowieckie	30
5	<i>Belone belone</i>	BB5	Morze Bałtyckie	16
6	<i>Neogobius melanostomus</i>	4B	Morze Bałtyckie	19
7	<i>Perca fluviatilis</i>	O35	Morze Bałtyckie	16
8	<i>Oncorhynchus nerka</i>	ON6	Ocean Spokojny	20

Ogółem 275 klonów

# Wyniki

## Polimorfizm sekwencji transpozonów Tc1-podobnych na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych

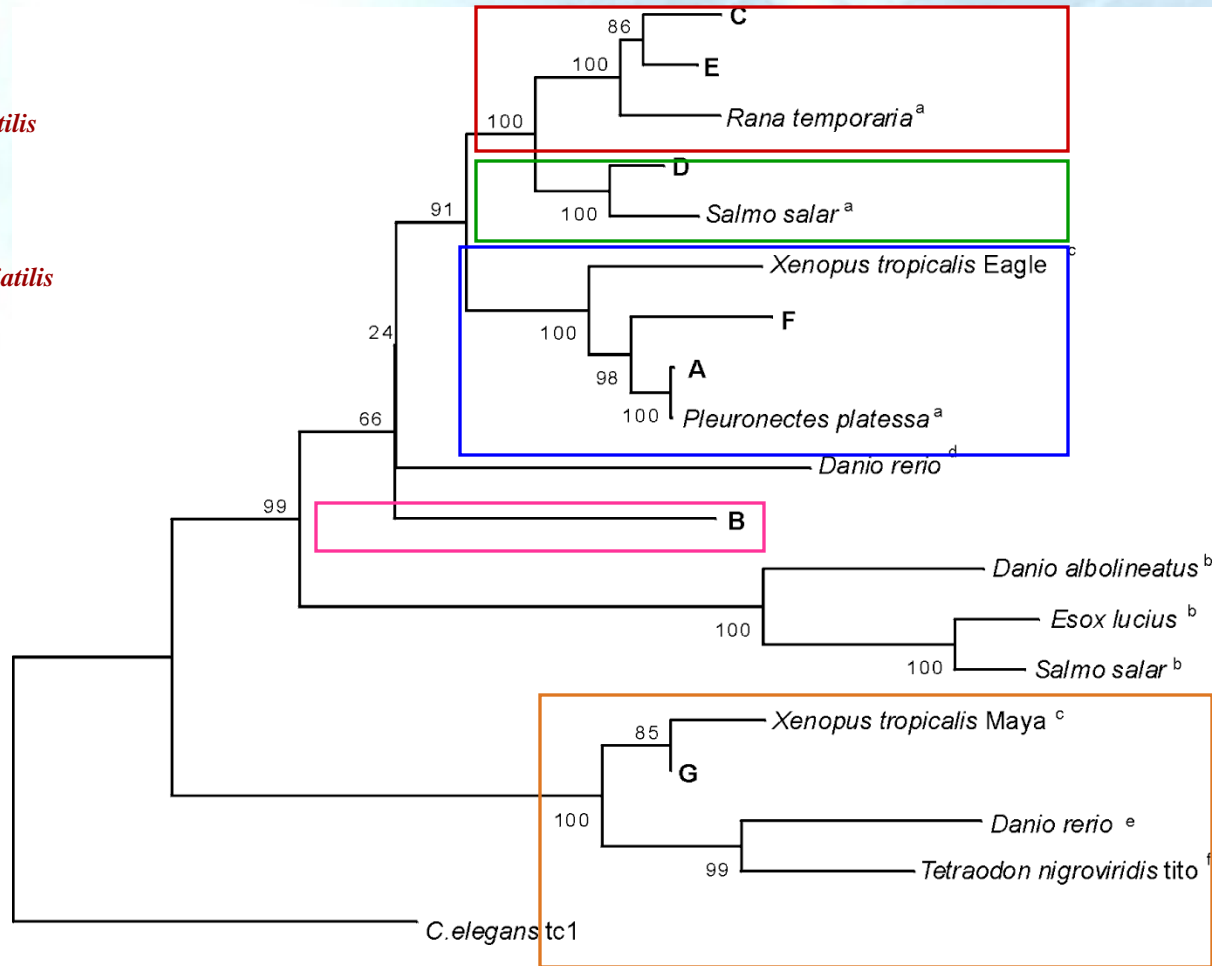
- Przeprowadzono zestawienie 275 sekwencji, na bazie którego skonstruowano globalne drzewo filogenetyczne.
- Na podstawie jego topologii wydzielono 7 kładów: A, B, C, D, E, F, G, których odrębność potwierdzono za pomocą obliczeń średniego zróżnicowania genetycznego.

KLAD	GATUNKI	Śr. zróżnicowanie genetyczne
<b>A</b>	<i>P. flesus</i> (131), <i>P. platessa</i> (20), <i>S. maximus</i> (18), <i>O. nerka</i> (1)	0,043
<b>B</b>	<i>N. melanostomus</i> (19), <i>P. fluviatilis</i> (13)	0,01
<b>C</b>	<i>B. belone</i> (10)	0,06
<b>D</b>	<i>O. nerka</i> (19)	0,19
<b>E</b>	<i>E. lucius</i> (11), <i>B. belone</i> (6), <i>P. fluviatilis</i> (3)	0,1
<b>F</b>	<i>P. flesus</i> (3), <i>S. maximus</i> (2)	0,04
<b>G</b>	<i>E. lucius</i> (19)	0,0005

# Wyniki

## Analiza filogenetyczna transpozonów Tc1-podobnych z uwzględnieniem sekwencji uzyskanych z baz danych

- A** *P. flesus*, *P. platessa*  
*S. maximus*, *O. nerka*
- B** *N. melanostomus*, *P. fluviatilis*
- C** *B. belone*
- D** *O. nerka*
- E** *E. lucius*, *B. belone*, *P. fluviatilis*
- F** *P. flesus*, *S. maximus*
- G** *E. lucius*



a - (Leaver, 2001)

b - (Ivics i in., 1996)

c - (Sinzelle i in., 2005)

d - transozaza BX294110 of *Danio rerio*,

e - transozaza CR931802 of *Danio rerio*,

f - (Jaillon i in., 2004)

0.1

# Wyniki

## Analiza filogenetyczna transpozonów Tc1-podobnych oparta na sekwencjach aminokwasowych

- W obrębie zidentyfikowanych 7 kładów wydzielono 13 sekwencji konsensusowych dla każdego gatunku:

Tc1-1Pla, *Platichthys flesus*

Tc1-1Ple, *Pleuronectes platessa*

Tc1-1Sco, *Scophthalmus maximus*

Tc1-1Onc, *Oncorhynchus nerka*

Tc1-2Onc, *Oncorhynchus nerka*

Tc1-1Bel, *Belone belone*

Tc1-1Neo, *Neogobius melanostomus*

Tc1-2Per, *Perca fluviatilis*

Tc1-1Eso, *Esox lucius*

Tc1-1Per, *Perca fluviatilis*

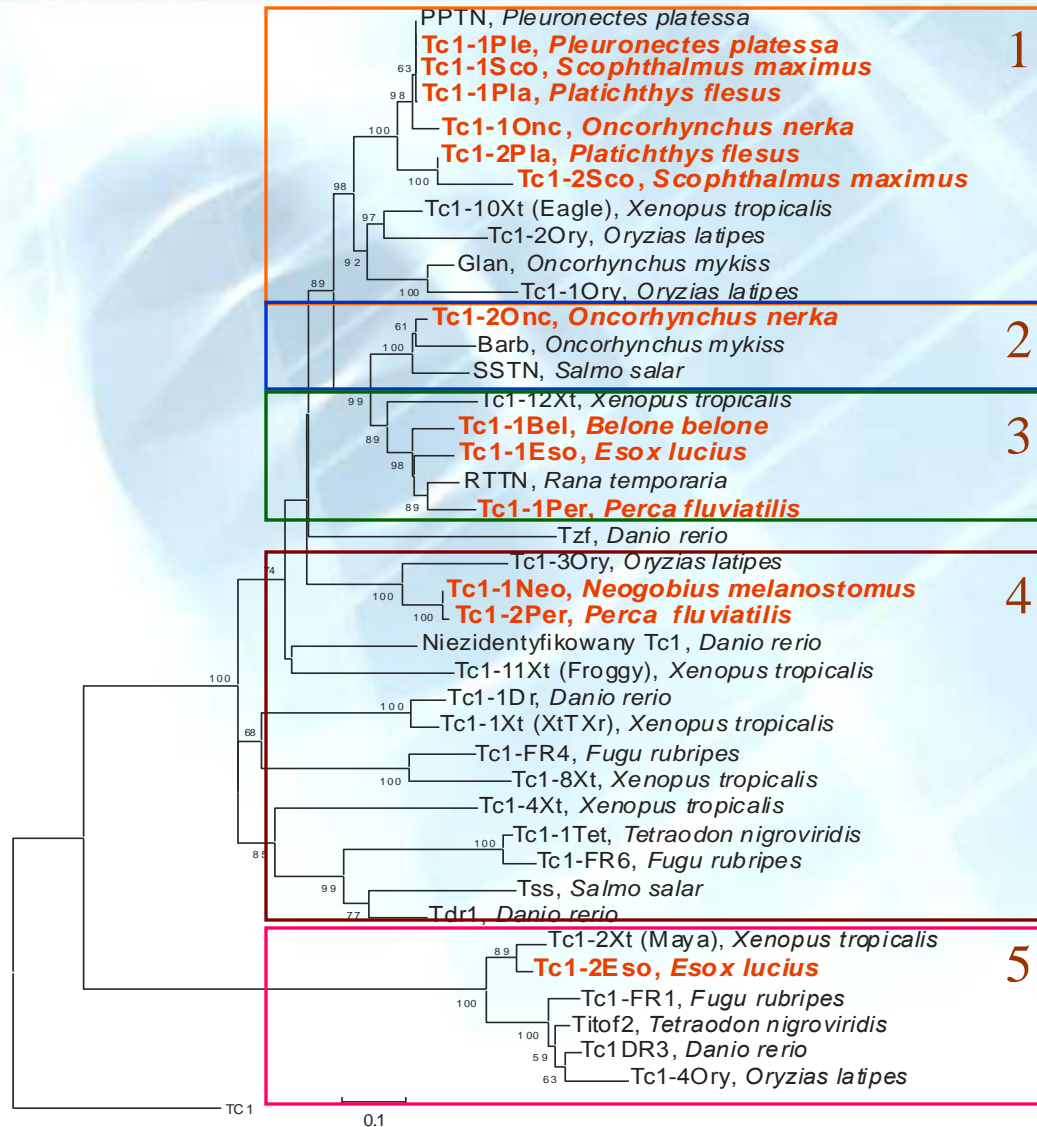
Tc1-2Pla, *Platichthys flesus*

Tc1-2Sco, *Scophthalmus maximus*

Tc1-2Eso, *Esox lucius*

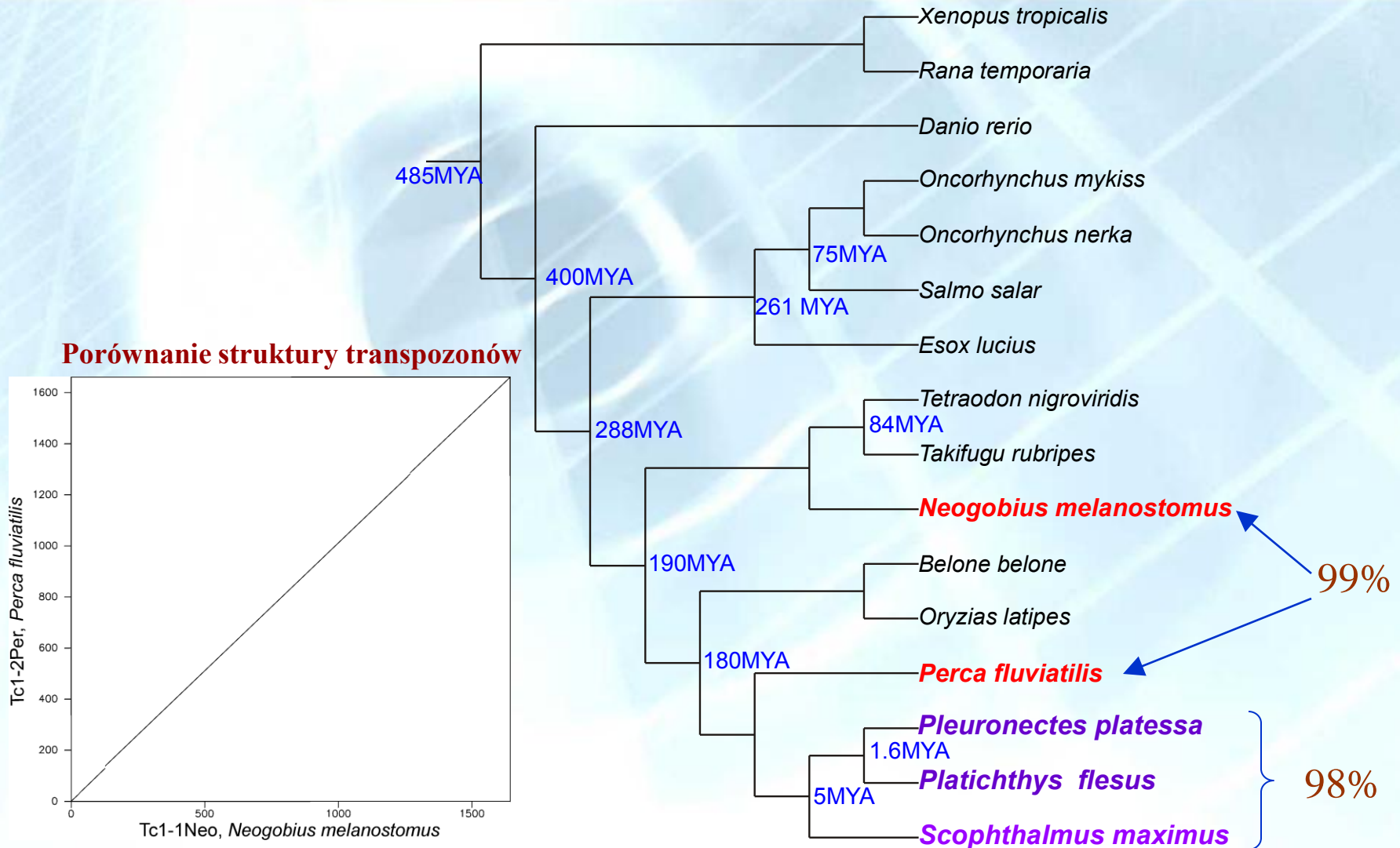
# Wyniki

## Analiza filogenetyczna transpozonów Tc1-podobnych oparta na sekwencjach aminokwasowych



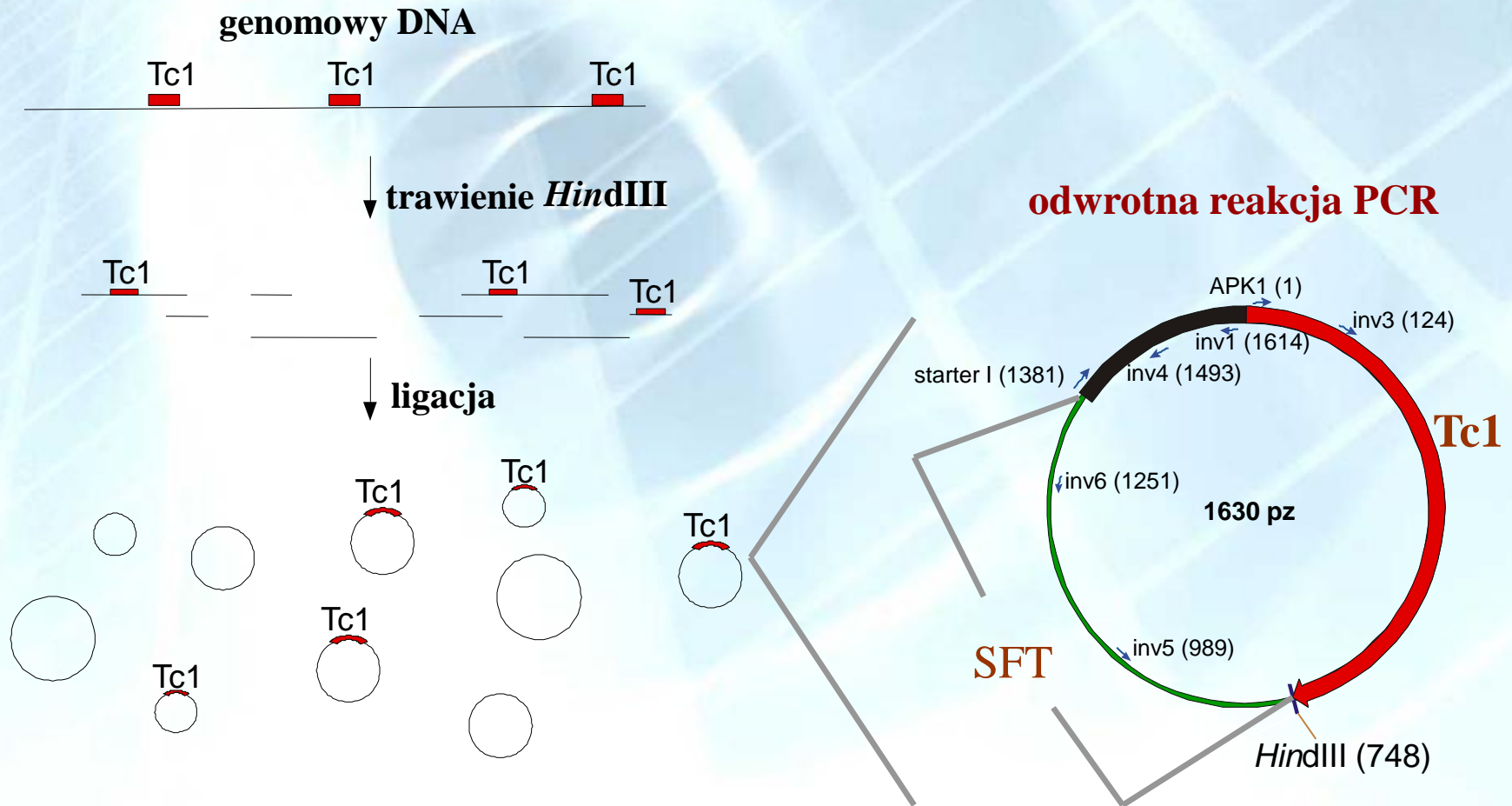
# Wyniki

Szacowanie prawdopodobieństwa zajścia HT na podstawie dystrybucji zidentyfikowanych transpozonów Tc1-podobnych w genomach ryb



# Wyniki

Opracowanie metodyki umożliwiającej identyfikację miejsca integracji transpozonów Tc1-podobnych w genomie storni *P. flesus*



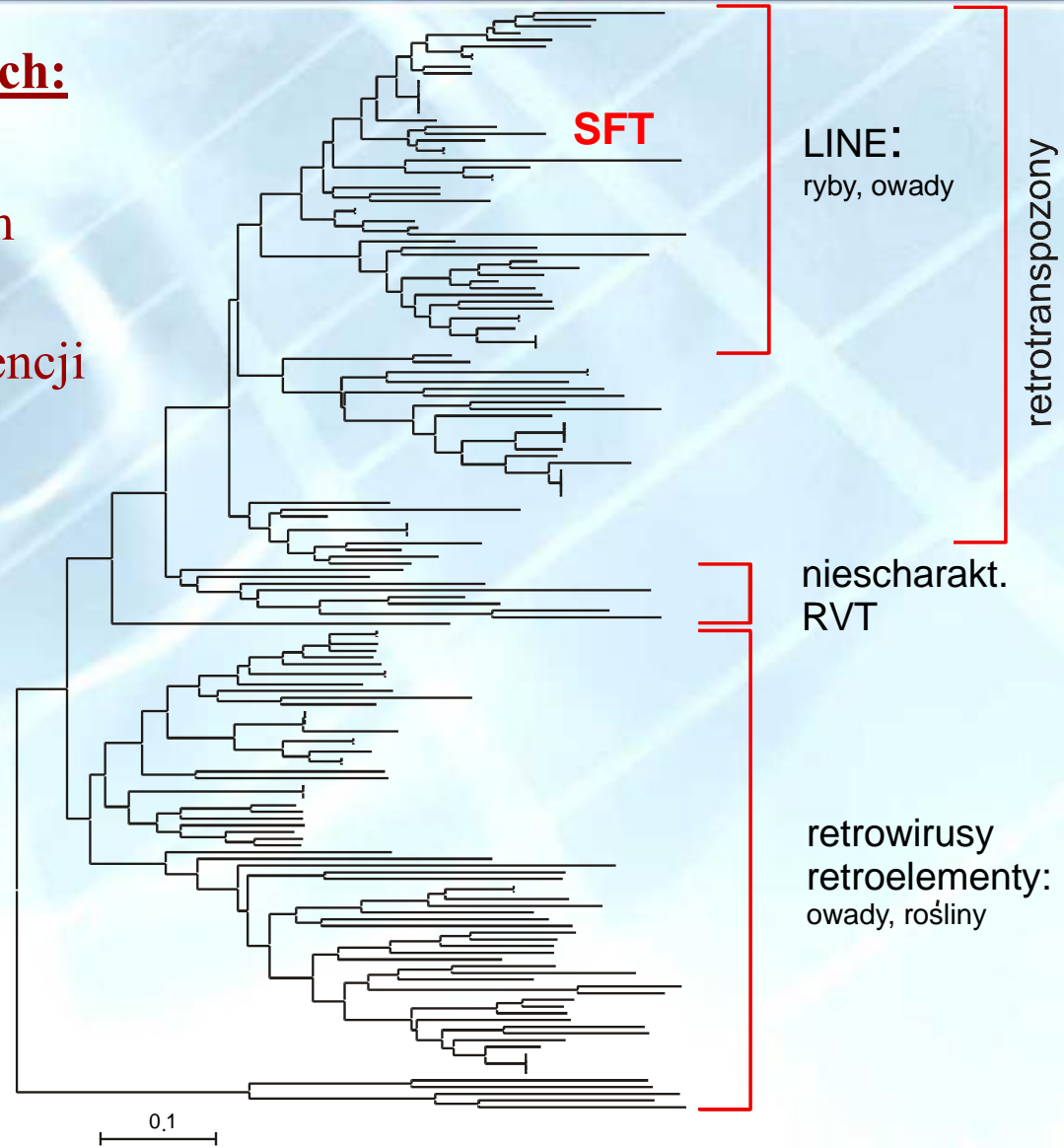


# Wyniki

## Identyfikacja i analiza sekwencji miejsca integracji kopii transpozonu Tc1-podobnego w genomie storni *P. flesus*

### Wykres zależności filogenetycznych:

- sekwencje aa
- 156 sekwencji RVT z bazy Pfam (tzw. SEED)
- 10 reprezentantów ze 100 sekwencji z bazy est (GenBank)



# Wnioski

- Transpozony z rodziny Tc1-podobnych są szeroko rozpowszechnione w genomach ryb.
- Lokalizacja sekwencji transpozonowych w obrębie gatunku jest konserwatywna, natomiast zaobserwowano polimorfizm na poziomie międzygatunkowym.
- Identyczność transpozonów zidentyfikowanych u okonia i babki może wskazywać na horyzontalny transfer.

# Wnioski

- Zademonstrowano integrację transpozonu Tc1 do zdegenerowanego retrotranspozonu LINE.
- Zależności filogenetyczne między analizowanymi transpozonami nie potwierdzają hipotezy Leavera.

# Dziękuję za uwagę

**Poćwierz-Kotus A**, Wenne R. Properties of mobile elements of genomes and their application in biotechnology. *Environmental Biotechnology*, *in press*.

Wenne R, Handschuh L, **Poćwierz-Kotus A**, Urbaniak R, Formanowicz P, Całkiewicz J, Brzozowska K, Figlerowicz M, Węgrzyn G, Wróbel B. The application of microarray technology to the identification of Tc1-like element sequences in fish genomes. *Marine Biology Research*, *in press*

**Poćwierz-Kotus A**, Burzyński A, Wenne R. 2010. Identification of a Tc1-like transposon integration site in the genome of the flounder (*Platichthys flesus*): a novel use of an inverse PCR method. *Marine Genomics*, 3: 45-50

**Poćwierz-Kotus A**, Burzyński A, Wenne R. 2007. Family of Tc1-like elements from fish genomes and horizontal transfer. *Gene*, 390: 243-251

# Dziękuję za uwagę

## Citing Articles

Title: **Family of Tc1-like elements from fish genomes and horizontal transfer**

Author(s): Pocwierz-Kotus, A; Burzynski, A; Wenne, R

Source: **GENE** Volume: 390 Issue: 1-2 Pages: 243-251 Published: APR 1 2007

 [Citation Map](#)

The above article has been cited by the articles listed below.

**Note:** The Times Cited count is calculated across all *Web of Science* editions. [More information.](#)

Results: **2**

Page 1 of 1 [Go](#)

Sort by: Latest Date

## Refine Results

Search within results for

[Search](#)

### Subject Areas [Refine](#)

BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (1)

FISHERIES (1)

[more options / values...](#)

### Document Types [Refine](#)

ARTICLE (2)

### Authors

[Print](#) [E-mail](#) [Add to Marked List](#) [Save to EndNote® Web](#)  
[Save to EndNote®, RefMan, ProCite](#) more options

[Analyze Results](#)

1. Title: **Passport, a native Tc1 transposon from flatfish, is functionally active in vertebrate cells**  
Author(s): Clark KJ, Carlson DF, Leaver MJ, et al. Source: **NUCLEIC ACIDS RESEARCH** Volume: **37** Issue: **4** Pages: **1239-1247** Published: **MAR 2009**  
Times Cited: **2**  
[Full Text](#)
2. Title: **Autocidal technology for the control of invasive fish**  
Author(s): Thresher RE Source: **FISHERIES** Volume: **33** Issue: **3** Pages: **114-121** Published: **MAR 2008**  
Times Cited: **2**