

# MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT

podzim 2016

## Plazmidy

Ivana Mašlaňová

*iva.maslanova@gmail.com*

# Co jsou to plazmidy?

## Definice:

Plazmidy jsou extrachromozomální, autonomně se replikující genetické elementy, které se vyskytují v buňkách všech skupin mikroorganismů.

## Význam:

1. Podstatně **ovlivňují základní biologické vlastnosti** svých **hostitelů**, podílejí se na jejich **diverzitě** a **evoluci**.
2. Jsou využívány **k poznání základních molekulárně-biologických procesů** v bakteriálních buňkách a **horizontálního přenosu genů**.
3. Jsou prakticky a široce využívány **v metodách MB a GI**, zejména jako **vektory**.

# Charakteristika plazmidů:

- výskyt u bakterií, archeí; dsDNA – kružnicová nebo lineární topologie; velikost 1 – 1000 kbp, postradatelné pro hostitelskou buňku, ale význam pro přežití za specifických podmínek (ATB v prostředí apod.).

## Objev:

1946 (Lederberg a Tatum) – objev konjugace u *E. coli*.

50. léta (Frederiq) – popis plazmidu ColE1, kódující **kolicin**<sup>1</sup> ; objev R-faktorů (rezistence k ATB)

**Ti-plazmidy** – vznik nádorů u dvojděložných rostlin

Plazmidy **odbourávající sloučeniny těžkých kovů** a plazmidy podílející se na **fixaci vzdušného dusíku**.

60. léta – plazmidy jako modely molekulárně-biologických procesů (replikace, rekombinace)

70. léta–současnost – vektory v GI, klonování, sekvenování a mutageneze *in vitro*

---

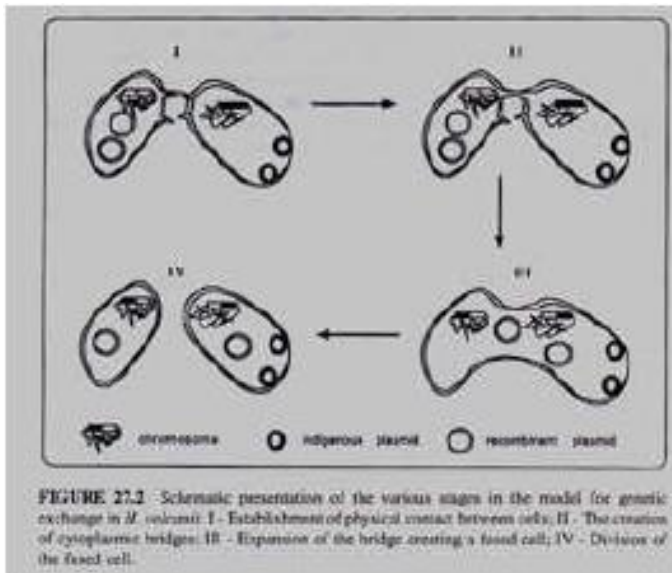
<sup>1</sup> protein s antimikrobiálním účinkem působící na jiné kmeny *E. coli*

# Charakteristika plazmidů u archeí:

- málo prostudované, nejlépe u metanogenních archeí
- většinou kryptické
- některé mají charakter megaplazmidů (např. u *Haloferax volcanii*) – velikost 690, 442 a 86 kb.

## Identifikované geny:

- geny pro tvorbu plynových měchýřků
- geny kódující restriční endonukleázy a metylázy
- konjugativní plazmidy (r. *Sulfolobus*) – schopnost integrace do chromozomu, jednosměrný přenos, **patrně i do bakterií**
- **některé plazmidy mají geny podobné provirům archeí**



*Model konjugativního přenosu plazmidů u Haloferax volcanii<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Zillig *et al.*, 1996 <http://femsre.oxfordjournals.org/content/18/2-3/225.abstract>

# Lineární plazmidy

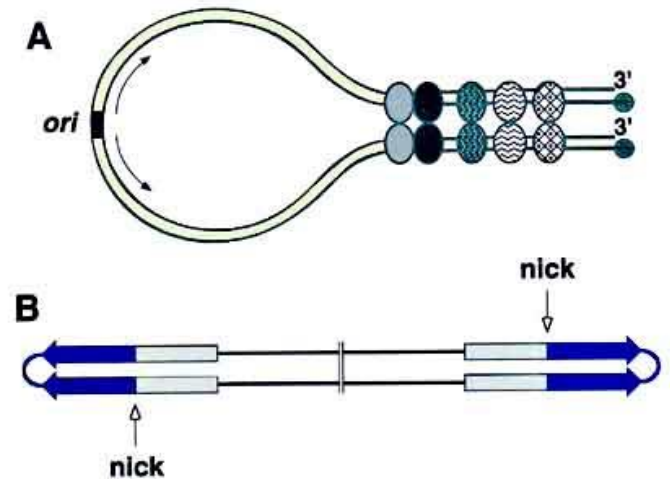
*Streptomyces rochei* – v r. 1979 objev lineární struktury plazmidu

Další zástupci s lineárními plazmidy:

*Borrelia burgdorferi* (Lymeská nemoc), *Nocardia*,  
*Rhodococcus*, *Thiobacillus*

**Specifická replikace** – chybí primer pro DNA-polymerázu na 5'konci

- na koncích lineárních plazmidů telomery – kovalentně spojené konce DNA – podobné strukturám u eukaryotických virů (*Poxviry*, *Adenoviry*)
- plasmid pSLA2 u *Streptomyces* – proteiny kovalentně spojené s konci plazmidu – obsah tandemových obrácených repetitivních nebo palindromatických sekvencí



**(A) Racket frame structure proposed for linear *Streptomyces* plasmids.** The black circles represent the terminal protein attached to the 5' ends, which is required to protect the ends and complete the replication of both plasmid termini. The ovals represent juxtaposition proteins that bring together the plasmid termini by binding to specific regions of palindromic symmetry. The ori located near the center of the plasmid is depicted by the box and the arrows indicate the bidirectional DNA replication from this ori.

**(B) Typical structure of linear plasmids isolated from *Borrelia*** containing terminal hairpin telomeric structures composed of inverted repeats (thick arrows) harboring the nick sites (vertical arrows) involved in DNA replication.

# Rozdělení plazmidů:

Kryptické - funkce neznámá

Epizomální - reverzibilní integrace do chromozomu hostitele

Konjugativní - schopné přenosu konjugací

Mobilizovatelné - přenositelné za přítomnosti konjugativního plazmidu

## Příklady plazmidů:

**F-plazmidy** (fertilní faktor, konjugativní)  
zodpovědné za konjugaci, příp. mobilizaci jiných plazmidů

**R-plazmidy** (R-faktory)  
zodpovědné za rezistenci k antibiotikům, řada z nich konjugativní

**Kolicinogenní** (Col-plazmidy) (bakteriocinogenní plazmidy)

**Ti-plazmidy** (tumory indukující)

## Virulentní plazmidy

Plazmidy odbourávající **organické sloučeniny** (*Pseudomonas*)

Plazmidy podílející se na **fixaci vzdušného dusíku** (*Rhizobium*)

Plazmidy používané jako **vektory pro přenos DNA** (pBR322, pUC, Ti)

**TABLE 4.1** Some naturally occurring plasmids and the traits they carry

Plasmid	Trait	Original source
ColE1	Bacteriocin which kills <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Tol	Degradation of toluene and benzoic acid	<i>Pseudomonas putida</i>
Ti	Tumor initiation in plants	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
pJP4	2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid) degradation	<i>Alcaligenes eutrophus</i>
pSym	Nodulation on roots of legume plants	<i>Rhizobium meliloti</i>
SCP1	Antibiotic methylenomycin biosynthesis	<i>Streptomyces coelicolor</i>
RK2	Resistance to ampicillin, tetracycline, and kanamycin	<i>Klebsiella aerogenes</i>

# Klasifikace plazmidů:

- označování: pXY123

Univerzální vlastností plazmidů je jejich **inkompatibilita**, kterou se rozumí neschopnost dvou plazmidů koexistovat společně v téže buňce (navzájem se vytěsňují).

Kompatibilitou se rozumí schopnost dvou plazmidů koexistovat v jedné buňce **bez selekčního tlaku** a stabilně se dědit.

Rozlišuje se mezi **vektoriální** a **symetrickou** inkompatibilitou.

- *vektoriální: je ztracen vždy jeden konkrétní plazmid ze dvou.*
- *symetrická: každý z plazmidů je ztrácen při stejné pravděpodobnosti.*

## Využití inkompatibility při analýze genomu a genů

Do stejné inkompatibilní skupiny náležejí **navzájem inkompatibilní** plazmidy.

**Inkompatibilní plazmidy jsou vzájemně příbuzné** (využívají tentýž mechanismus kontroly replikace).

V současné době je známo asi 30 inkompatibilních skupin u enterobaktérií (IntF) , 9 u stafylokoků (Int1 – Int9) atd.



# Jak se dá prokázat, že fenotyp buňky je kódován plazmidem?

Postup: 1. Důkaz přítomnosti plazmidu – 2. Důkaz proteinů kódovaných plazmidem – 3. Ověření (ztráta plazmidu = ztráta daného fenotypu)

## 1. Důkaz přítomnosti plazmidu:

### 1. Elektroforéza po izolaci plazmidové DNA

### 2. Průkaz CCC DNA v elektronovém mikroskopu.

### 3. Centrifugační metody:

Důkaz satelitního pruhu v sacharozovém gradientu; důkaz v CsCl-EB podle konformace CCC, LIN a OC.

## Charakterizace plazmidů

stanovení velikosti: elektronmikroskopicky nebo v agarozovém gelu, kde se nejdříve linearizuje.

### Konstrukce restrikční mapy, sekvenování DNA

**Zařazení plazmidu do inkompatibilní skupiny.** Za tímto účelem je plazmid přenesen do vhodných recipientních testovacích kmenů, které již obsahují známé plazmidy příslušných kompatibilních skupin.

Předpokladem je to, aby oba plazmidy měly různé genetické markery, např. dva různé geny pro rezistence. Při **Inc-testu** se kmen pomnožuje nejdříve bez selekčního tlaku 10-50 generací a pak se vzniklé kolonie testují na přítomnost obou plazmidů.

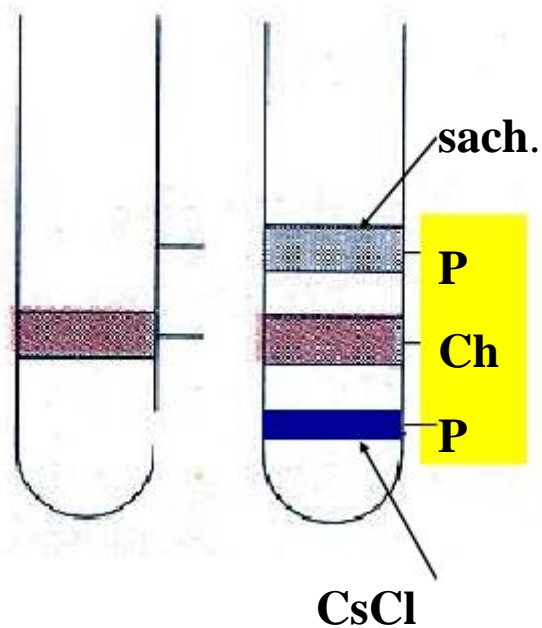
Pro stanovení příbuznosti dvou plazmidů lze použít i srovnání jejich restrikčních map. Přesnější analýza určitých oblastí se pak může provést hybridizací. Poslední krok je sekvenování DNA.

Postup: 1. Důkaz přítomnosti plazmidu – 2. Důkaz proteinů kódovaných plazmidem – 3. Ověření (ztráta plazmidu = ztráta daného fenotypu)

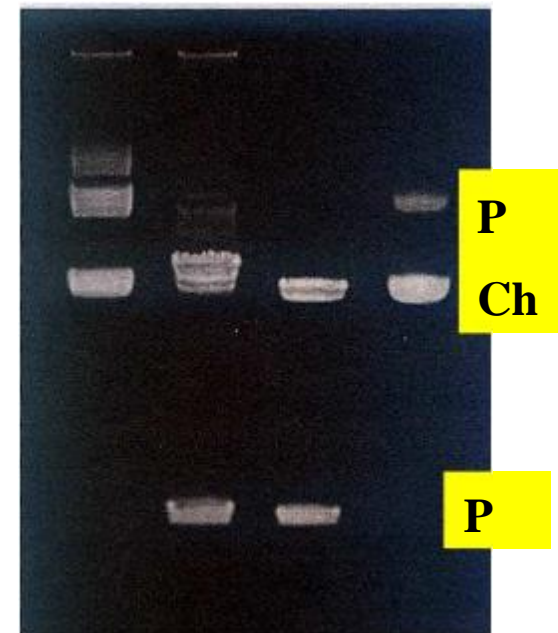
### 1. Průkaz DNA v elektronovém mikroskopu



### 2. Centrifugační metody: důkaz satelitního pruhu po centrifugaci



### 3. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu



(CsCl-EB)

### **A. Systém využívající minibuňky:**

Není přítomen chromozom, ale plazmidy (inkubovány v minimálním mediu za přítomnosti značených aminokyselin (35S-metionin). Proteiny jsou detekovány na SDS-PAGE a prokázány autoradiograficky.

Minubuňky = kmeny s mutacemi, vytvářející buňky bez chromozomu s vysokou frekvencí (mutace tvorby septa).

### **B. Systém využívající maxibuňky:**

Po ozáření **UV-světlem** se **chromozomové geny** v důsledku poškození **neexprimují**, většina plazmidů za těchto podmínek zůstává díky své malé velikosti intaktní a může geny exprimovat. Důkaz tvorby proteinů probíhá analogicky jako u minibuněk.

### **C. Systém translace *in vitro* (Zubayův systém):**

Skládá se z testované plazmidové DNA, ze supernatantu po centrifugaci lyzátu buněk *E. coli*, obsahujícího proteinové komponenty nutné pro transkripci a translaci (RNA-polymeráza, ribozomy, translační faktory, 19 aminokyselin a jedné aminokyseliny značené, rNTP, systému regenerujícího energii a další). Důkaz tvorby proteinů probíhá analogicky jako u minibuněk.

Postup: 1. Důkaz přítomnosti plazmidu – 2. Důkaz proteinů kódovaných plazmidem – 3. **Ověření (ztráta plazmidu = ztráta daného fenotypu)**

## Odstraňování plazmidů („plasmid CURING“, LÉČENÍ)

- odstranění plazmidu - ztráta určité vlastnosti buňky – vnesení plazmidu do nového kmene – projev sledovaného fenotypu

Použití látek zabraňujících replikaci plazmidů. Univerzální metodou jsou změny teploty – zvýšení teploty, skladování kultur v mrazících médiích, vytvoření protoplastů vedoucí k chybné distribuci replikonů do dceřinných buněk.

A. Interkalační barviva:

**Akriflavin, akridinoranž, etidiumbromid a quinarcin** patří mezi interkalační barviva, které se začleňují mezi sousední báze a **zabraňují replikaci** plazmidů.

B. Coumermycin a novobiocin:

Interference s účinkem **DNA-gyrázy**, který zavádí **negativní superhelikální** otáčky do kruhové dsDNA.

C. Rifampicin a mitomycin C:

Rifampicin se **váže na RNA polymerázu** a **zabraňuje tak transkripci**. Mitomycin C je metabolicky aktivován na intermediát, který **kroslinkuje DNA řetězce** a **blokuje tak transkripci**.

D. Natriumdodecylsulfát (SDS):

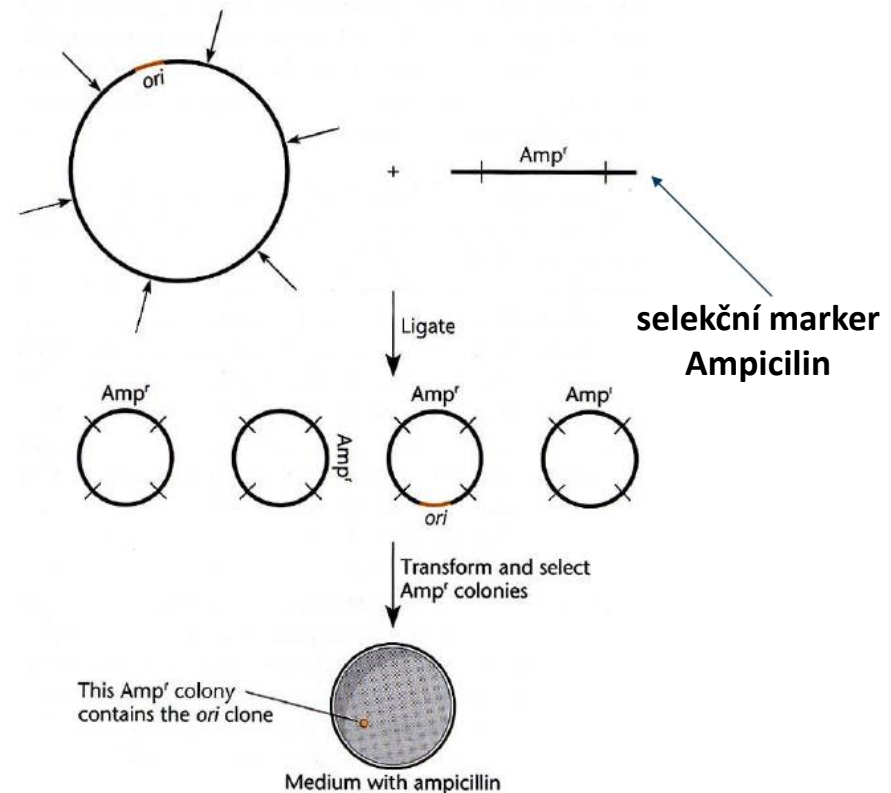
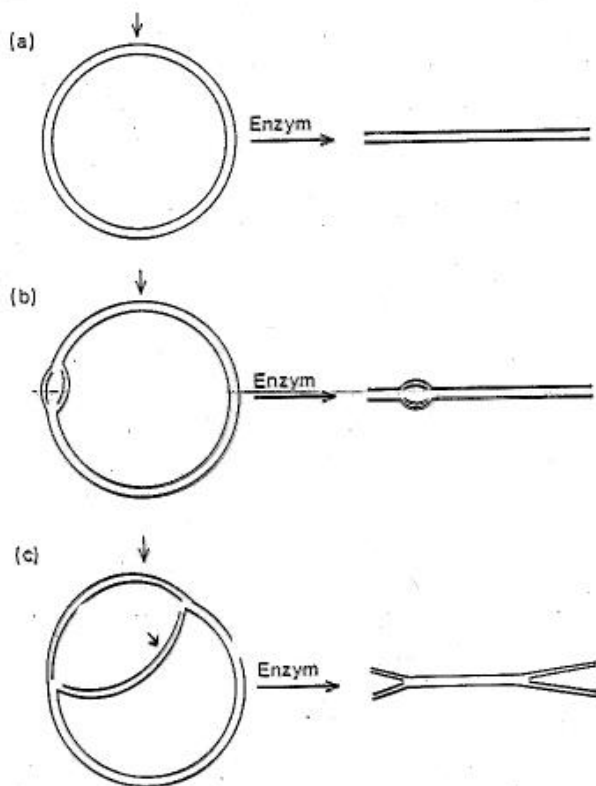
Narušuje **vazbu** plazmidu k **buněčné membráně**.

## Jak se stanovuje počátek replikace (*ori*) plazmidů?

1. Štěpení plazmidu v jednom místě a pozorování v elektronovém mikroskopu.
2. Tvorba minireplikonů – štěpení plazmidu vhodným enzymem na větší počet fragmentů, přidání selekčního markeru – selekce - pouze fragment s funkčním *ori* a selekčním markerem bude životaschopný.

1. Štěpení plazmidů v různých stadiích replikace restrikčním enzymem, sledování struktury v EM.

2. Tvorba minireplikonů.



## PODLE POČTU KOPIÍ SE PLAZMIDY DĚLÍ DO TŘÍ SKUPIN

1. S nízkým počtem kopií (1-2/chr)
2. Se středním počtem kopií (asi 15)
3. S vysokým počtem kopií (více jak 15)  
(dělení je umělé a hranice není pevná)

<b>Plasmid</b>	<b>Approximate copy number</b>
F	1
P1 prophage	1
RK2	4–7 (in <i>E. coli</i> )
pBR322	16
pUC18	~30–50
pIJ101	40–300

When low-copy-number plasmids containing the pMB1 or ColE1 origin of replication are prepared, plasmid DNA yields can be improved by adding chloramphenicol to the culture medium. Chloramphenicol inhibits host protein synthesis and thus prevents replication of the host chromosome. Plasmid replication, however, is independent of newly synthesized proteins and continues for several hours until up to 2000–3000 copies per cell are accumulated.

# Jak se stanovuje počet kopií plazmidu na buňku?

## A: Ultracentrifugace s radioaktivně značenou DNA

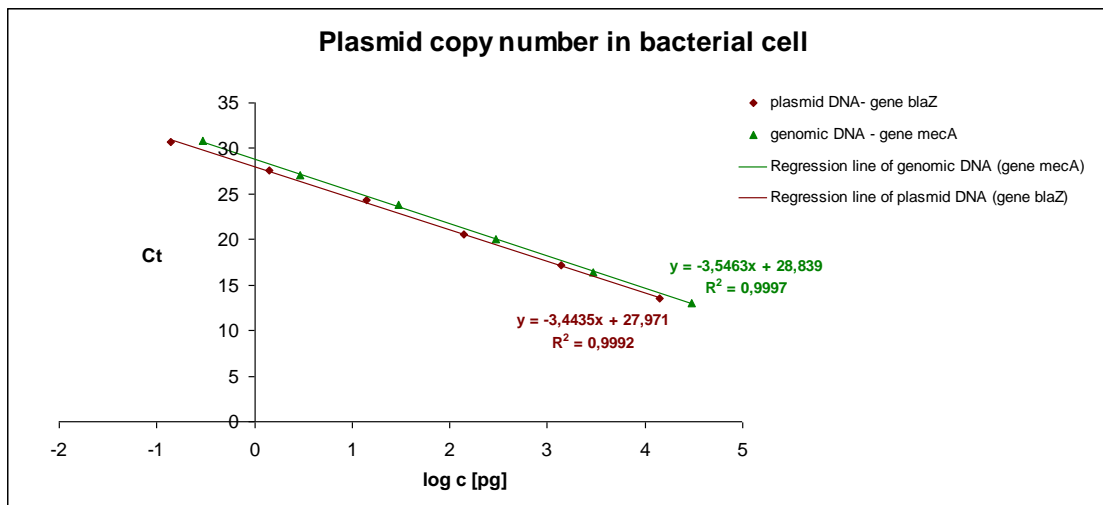
$$\text{POČET KOPIÍ} = \frac{\text{velikost chromozomu (kb)}}{\text{velikost plazmidu (kb)}} \times \frac{\text{radioaktivita plazmidu (cpm)}}{\text{radioaktivita chromozomu (cpm)}}$$

Ultracentrifugace v CsCl-EB s radioaktivně značenou DNA, stanovení radioaktivity v jednotlivých frakcích (pruzích).  
Elektroforéza v gelu, stanovení množství DNA (densitometricky).

*cpm = počet rozpadů za minutu*

## B: Kvantitativní PCR (qPCR)

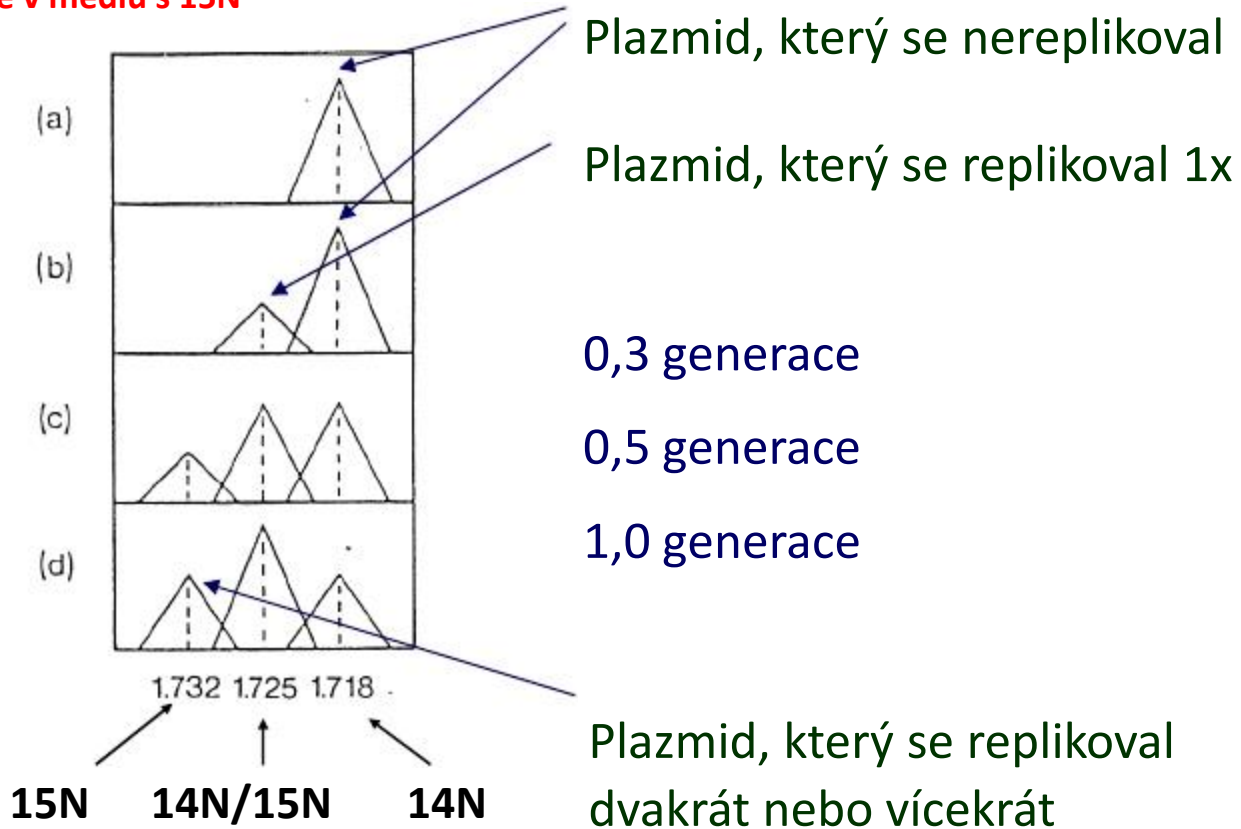
$$\text{POČET KOPIÍ} = \frac{\text{velikost chromozomální DNA [bp]} \times \text{množství plazmidové DNA [pg]}}{\text{velikost plazmidové DNA [bp]} \times \text{množství chromozomální DNA [pg]}}$$



Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria (Chai Lian Lee et al,2006)

# STANOVENÍ ČETNOSTI REPLIKACE PLAZMIDŮ CENTRIFUGACÍ V GRADIENTU CsCl

Růst buněk v mediu s  $^{14}\text{N}$  a  
následně v mediu s  $^{15}\text{N}$





## Jak se plazmidy replikují?

Replikace plazmidů souvisí s inkompatibilitou – soutěžení o replikační aparát (využití replikačního aparátu hostitelské buňky)-vyředění některého plazmidu ze stejné inkompatibilní skupiny.

**Začíná ve specifickém místě** ( $oriV$ )( $n. oriT$ ) vytvořením volné 3' OH skupiny (buď RNA primer, nebo zlom DNA).

**malé plazmidy** – mechanismus otáčivé kružnice (RC – plazmidy)

**velké plazmidy** – theta mechanismus – obousměrná replikace, podoba s replikací chromozomu

Rep protein a další proteiny hostitele (DnaA, B, G aj.), v místě  $ori$  je po vazbě iniciačních faktorů syntetizována primerová-RNA (plazmidy typu ColE1 nevyžadují pro tvorbu primerové-RNA žádný protein kódovaný plazmidem).

# STRATEGIE KONTROLY POČTU PLAZMIDOVÝCH KOPIÍ

## Inhibitor – cíl

Plazmid kóduje difuzibilní inhibitor replikace, který se váže na cílovou sekvenci

Přímá regulace

Nepřímá regulace

Vazba inhibitoru  
brání iniciaci replikace

Vazba inhibitoru brání  
syntéze produktu nezbytného  
pro zahájení replikace

## Iteronová strategie

Regulační protein (Rep) nezbytný k zahájení replikace je vázán (titrován) opakujícími se sekvencemi (iterony) poblíž ori. Replikace nastává po nasyntetizování dostatečného množství volného regulačního proteinu.

# REGULACE REPLIKACE CoIE1 PLAZMIDU A JEHO DERIVÁTŮ

oriV – denaturace DNA, syntéza řetězců od primerů

Primer – vznik z pre-primeru-prekurzorová RNA (RNAII, 500-550 bp) – syntetizovaná RNA polymerázou.

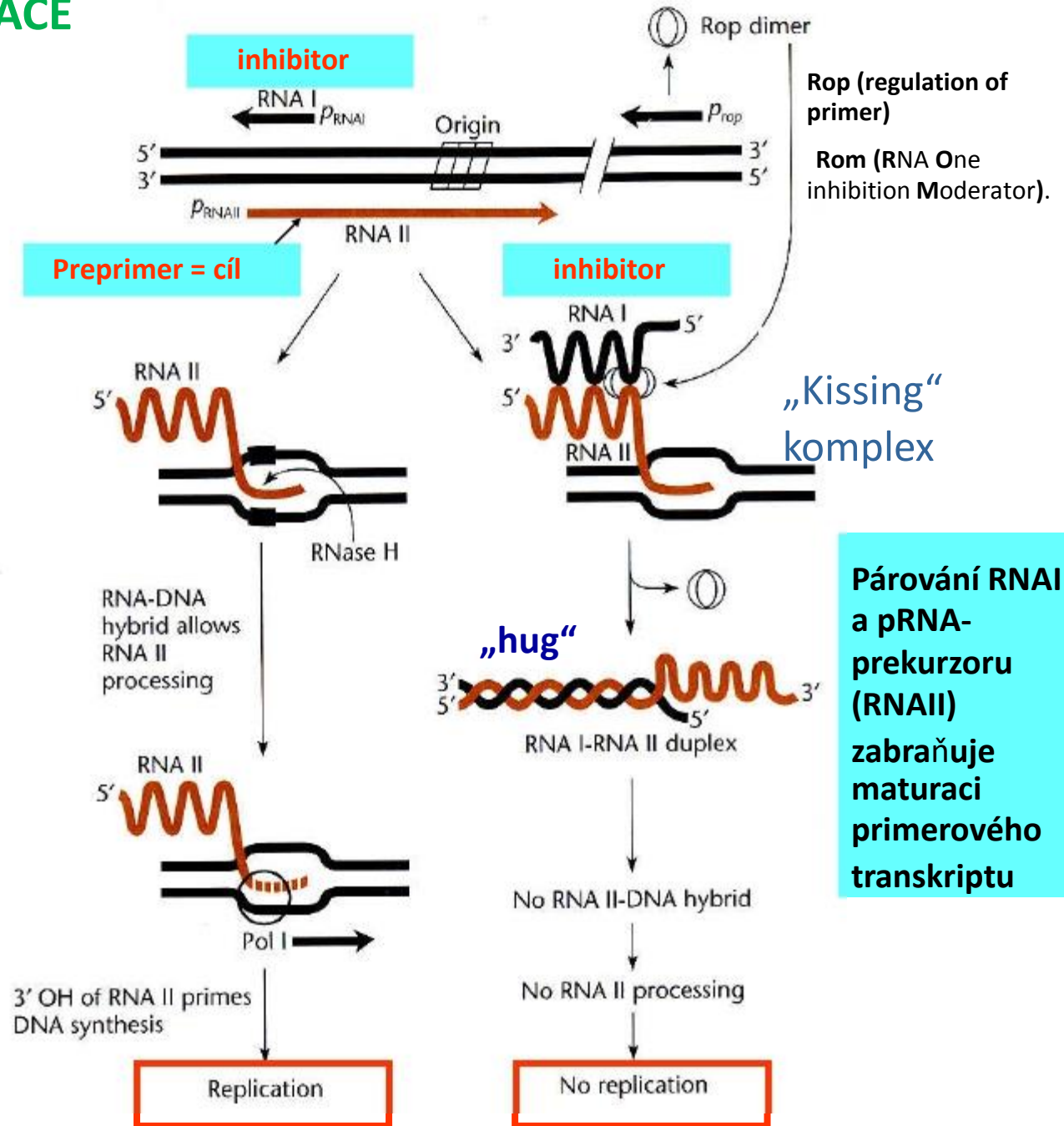
3OH' přesahuje ori – úprava na primer RNázou H (enzym kódovaný hostitelem) – 3'OH konec do počátku replikace – vytváření komplementárního řetězce.

Regulace – RNAI vs. RNAII – antisense – vazba RNAI na preprimer RNAII – brání úpravě 3'OH konce RNázouH – replikace neprobíhá.

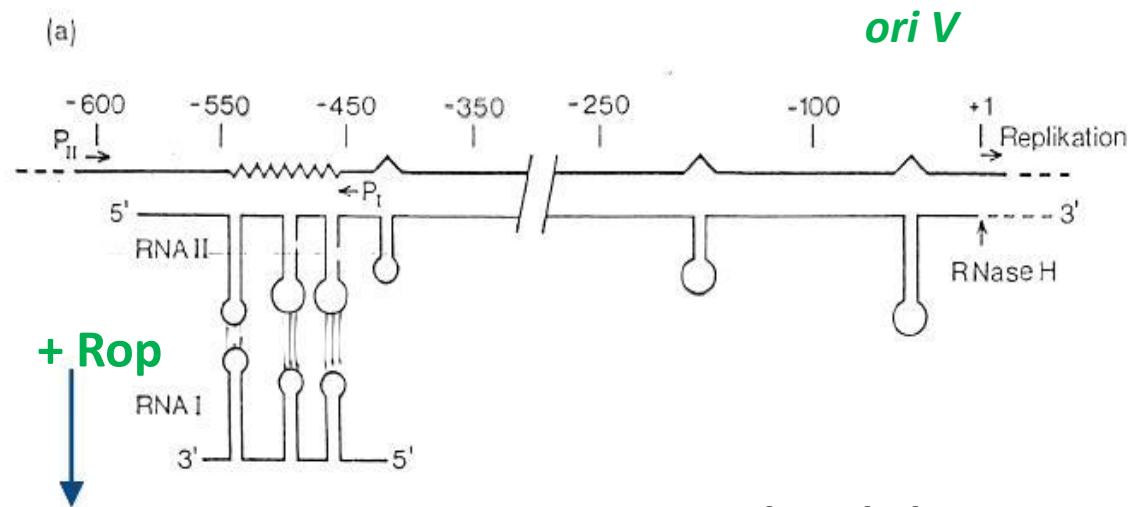
Rop dimer – negativní regulátor – Kissing komplex.

Kontrola počtu plazmidů:

1. Počet ori na buňku.
2. Hladina regulačních proteinů.

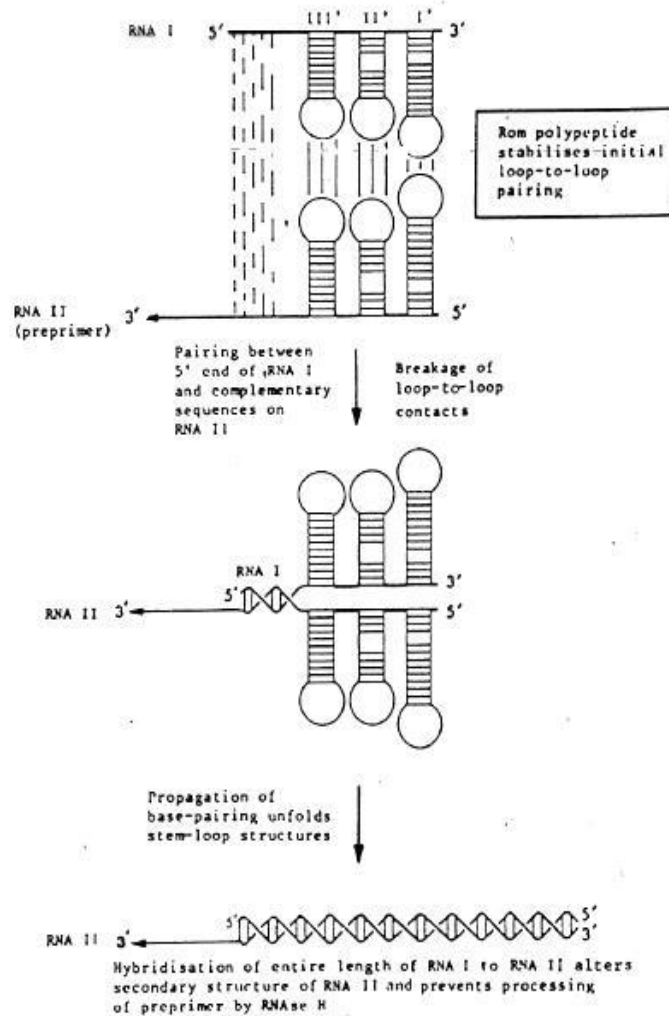


# INTERAKCE RNAI S RNAII PŘI INCIACI REPLIKACE *ColE1*



Mutace v genu *rop* vedou ke zvýšení počtu kopií plazmidu

Po spárování RNA I a RNA II se změjí sekundární struktura RNA II (preprimeru), který pak není RNázou H upraven na primer



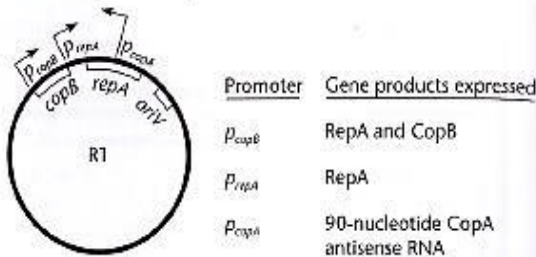
Interakce RNAI, RNAII a proteinu Rom (~Rop) při iniciaci replikace ColE1 plazmidu.



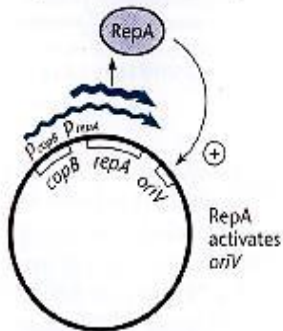
Mutace v genu pro protein Rop vedou ke změně počtu plazmidových kopií.

# REGULACE REPLIKACE R1 PLAZMIDU A JEHO DERIVÁTŮ

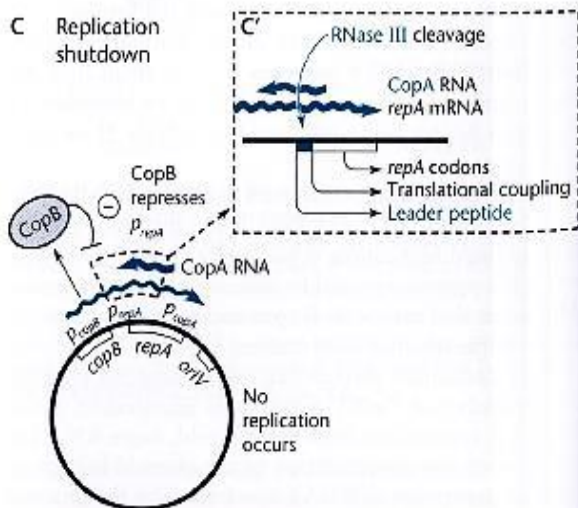
A Plasmid genetic organization



B Replication occurs after plasmid enters cells



C Replication shutdown



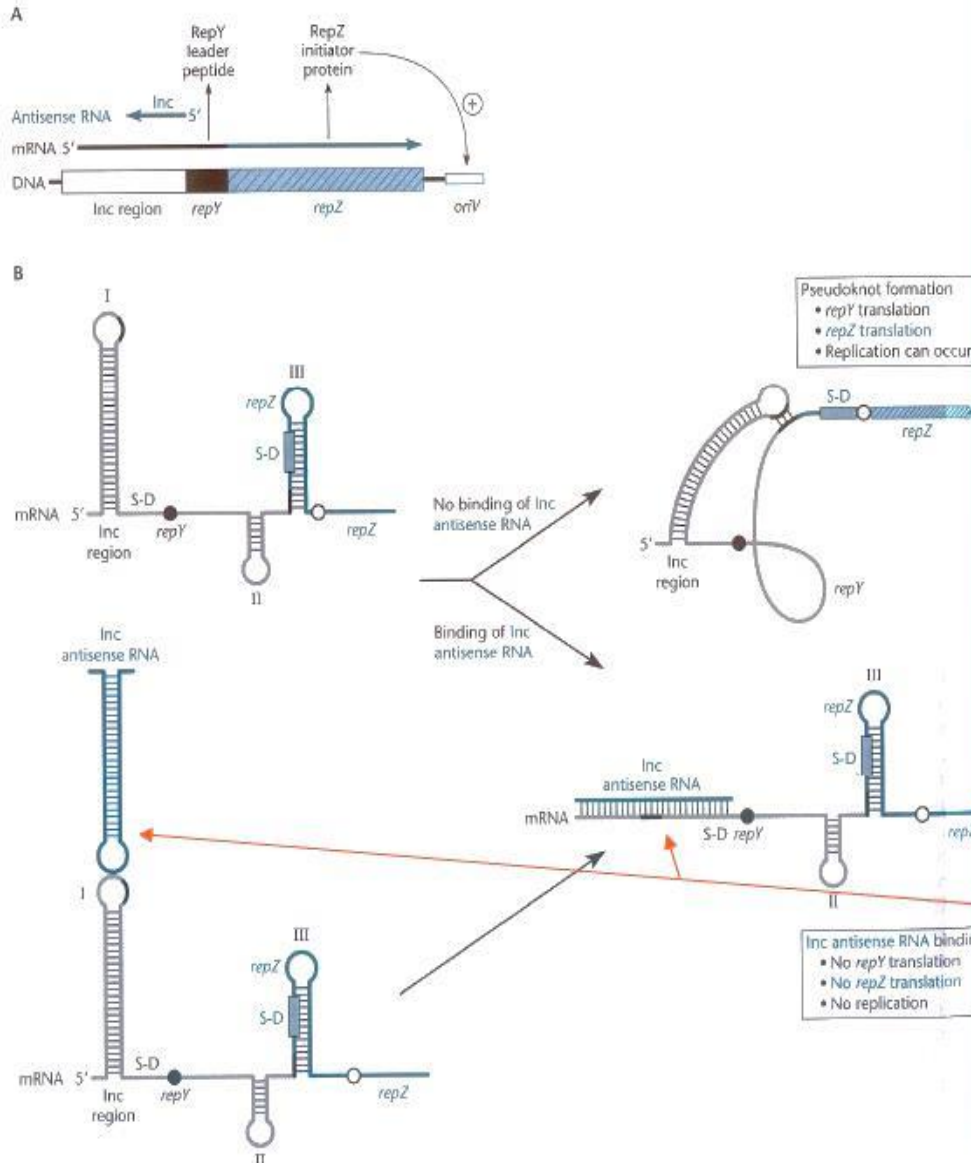
- Regulace počtu kopií plazmidu pomocí množství Rep proteinu.
- Jako u ColE1 plasmid využívá malé komplementární RNA, stejně tak tvoří tzv. kissing komplex.
- Rozdíl od ColE1:
  - Komplementární RNA molekuly inhibují tvorbu Rep proteinu nikoli primeru (ColE1) – mRNA kódující Rep se nepřekládá.

**Jakmile plasmid vstoupí do buňky, je většina RepA mRNA vytvářena z promotoru  $P_{repA}$ . Protein RepA se tvoří tak dlouho, dokud není dosaženo standardního počtu kopií.**

**Jakmile plasmid dosáhne žádaného počtu kopií, protein CopB reprimuje transkripci z promotorou  $P_{repA}$ . Nyní je *repA* transkribován jen z  $P_{copB}$ .**

**Antisense RNA CopA hybridizuje k oblasti mRNA kódující vedoucí peptid a dsRNA je je štěpena RNázou III. To zabrání translaci *repA*, která je translačně spojena s vedoucím peptidem.**

# REGULACE REPLIKACE ColIb-P9 PLAZMIDU A JEHO DERIVÁTŮ



Podobně jako u R1 plazmidu je gen kodující protein Rep (zde je to **repZ**) translatován po směru transkripce od ORF vedoucího peptidu zvaného **repY** a tyto dva jsou rovněž translačně napojeny.

Translace **repY** otevírá sekundární strukturu na RNA, která uzavírá SD sekvenci TIR (translační iniciační oblast genu **repZ**). Sekvence v sekundární struktuře se pak může párovat se smyčkou upstreamové vlásenky od genu **repY** vytvářející pseudoknot (smyčku), čímž permanentně ruší sekundární strukturu a **ponechává SD genu repZ přístupnou**.

Pak se **na TIR** genu **repZ** může navázat ribozom a překládat iniciátorový protein.

Malá komplementární Inc RNA se páruje se smyčkou upstreamové vlásenky a zabraňuje vytvoření vlásenky, ponechávajíc SD sekvenci kodující oblasti **repZ** blokovanou a zabraňující translaci **repY**.

**Vazba Inc antisense RNA na smyčku struktury I přímo inhibuje vytvoření pseudoknotu, a následně duplex IncRNA-mRNA inhibuje translaci RepY, a následně i translaci RepZ, jelikož jsou translačně spojeni.**

# KONTROLA REPLIKACE ITERONOVÝCH PLAZMIDŮ

Plazmid kóduje difuzibilní iniciační protein Rep, který se váže na řadu **17-22 bp** dlouhých přímých opakování (3-7 kopií) - **iteronů** - v oblasti *oriV* (různý počet u různých plazmidů).

**RepA protein kódovaný v oblasti *ori* má následující vlastnosti:**

- iniciuje nové cykly replikace
- může zabraňovat replikaci
- autorepresor na úrovni transkripce

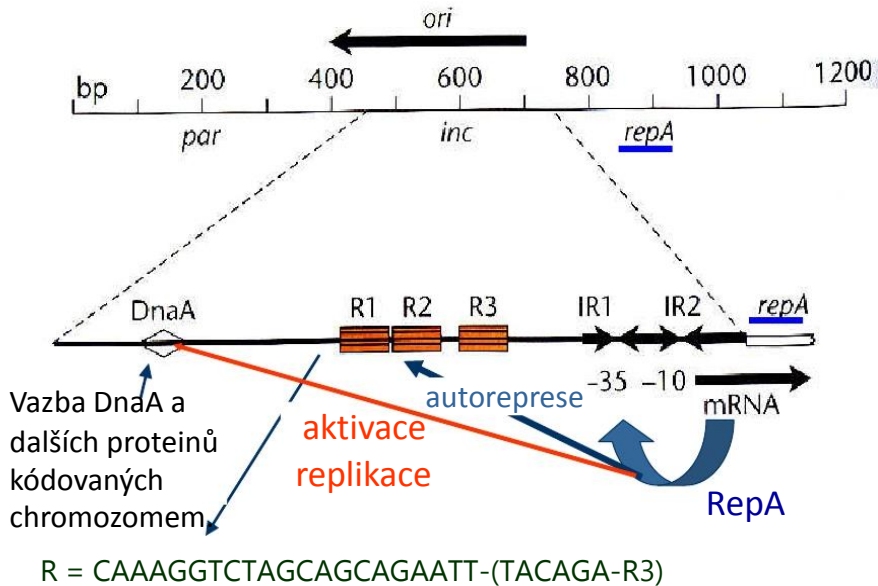
Působení Rep je závislé na jeho koncentraci, která je ovlivňována počtem plazmidových kopií (a tím i počtem iteronů) a rozdílnou afinitou Rep k iteronům (L a R) v oblasti *ori*.

**Iteronové plazmidy příklady:**

pSC101, F, R6K, P1 a RK2 příbuzné plazmidy



## Jak to funguje?



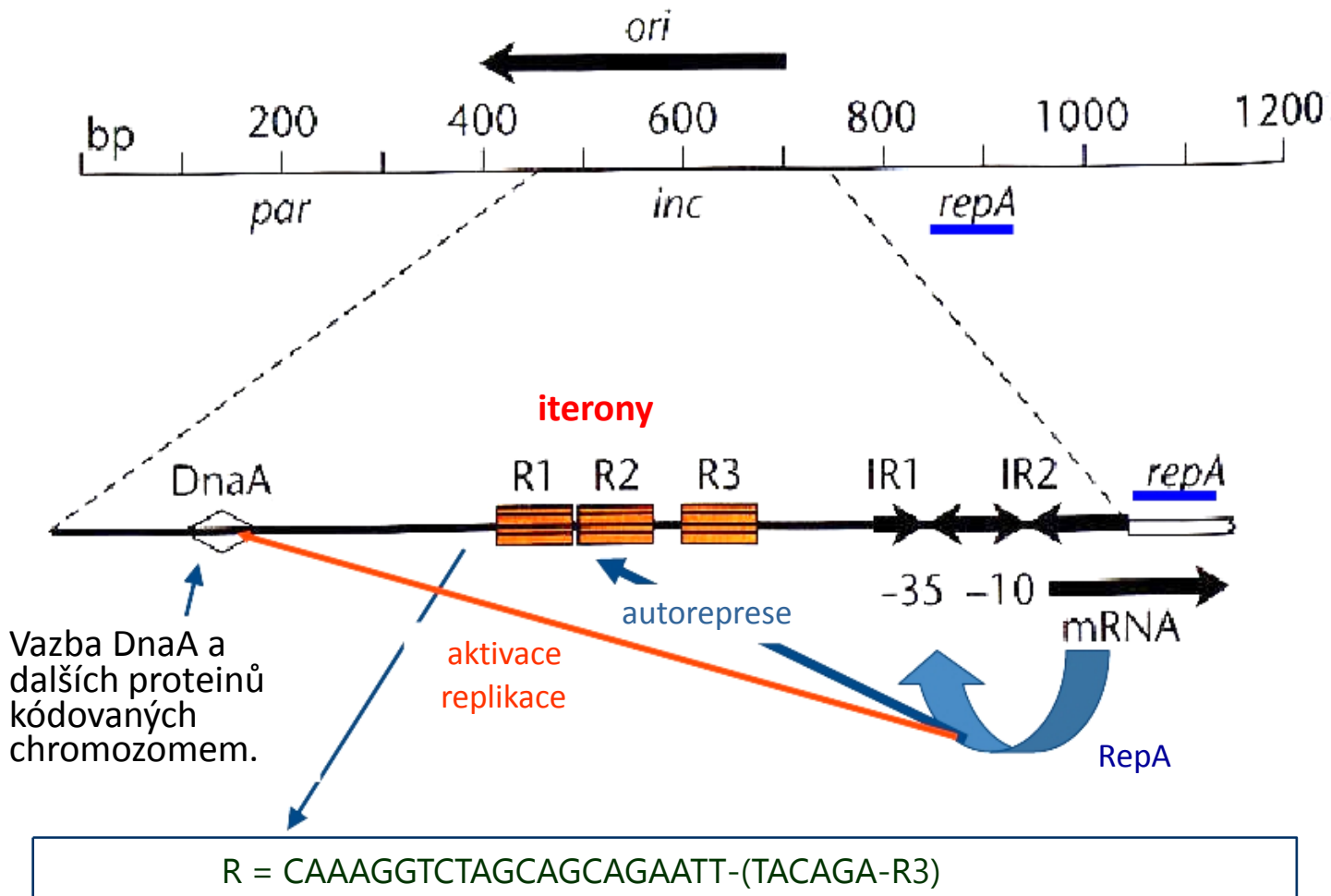
### RepA – pozitivní aktivátor replikace

- Vazba na R1, R2, R3 = regulace počtu kopií.
- Hostitelský chromozom kóduje další proteiny vázající se na tuto oblast a iniciující replikaci: DnaA-G.
- Dva mechanismy regulace:
  1. Kontrola syntézy RepA
  2. Represe transkripce genu *repA*

Vyšší koncentrace RepA = represe syntézy proteinu = **autoregulace transkripce.**

Tento mechanismus ale sám nestačí pro kontrolu počtu plazmidových kopií v buňce =  
**„Coupling“ hypotéza**

# PŮSOBENÍ PROTEINU RepA NA INICIACI REPLIKACE U ITERONOVÉHO PLAZMIDU pSC101

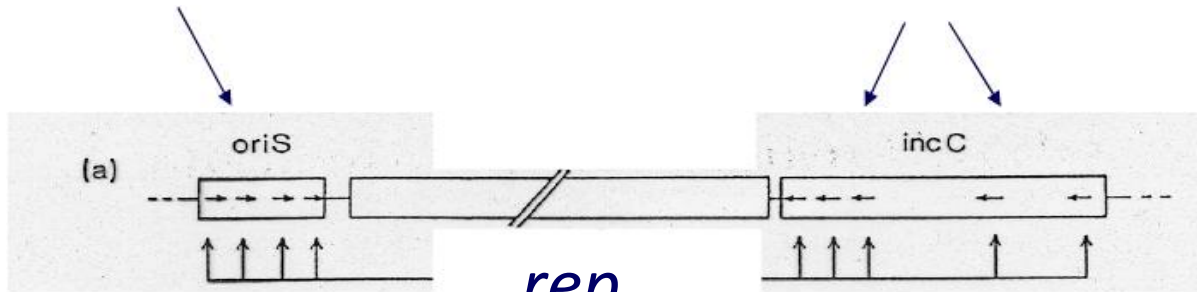


**nízká koncentrace RepA → replikace; vysoká koncentrace RepA → autoreprese**

# KONTROLA REGULACE INICIACE REPLIKACE PLAZMIDU F

čtyři L-iterony

pět R-iteronů



**Slabší vazba Rep**  
zábrana replikace při  
vyšších  
koncentracích Rep

Rep

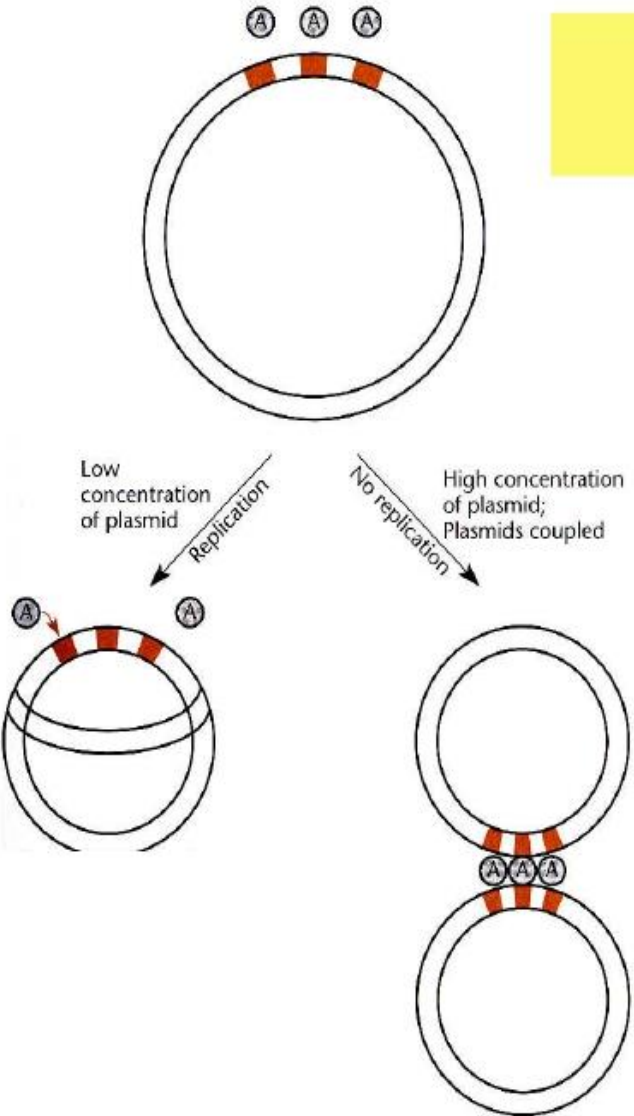
**Silnější vazba Rep**  
iniciace replikace  
při nízkých  
koncentracích Rep

---

**Experimentální pozorování: delece R-iteronů vede ke zvýšení a adice dodatečných R-iteronů ke snížení počtu kopií.**

# DVOJÍ PŮSOBENÍ RepA PROTEINU ITERONOVÝCH PLAZMIDŮ

„coupling“ model  
(spojení plazmidů)



Nízký počet  
plazmidových kopií  
v buňce

RepA se váže jen na  
jeden plazmid a iniciuje  
replikaci.

Vysoký počet  
plazmidových kopií v buňce

RepA se váže na dva  
plazmidy současně a  
spojuje je, čímž brání  
replikaci.

↓  
Důkaz EM

# MECHANISMY ZAJIŠŤUJÍCÍ STABILNÍ UDRŽENÍ PLAZMIDŮ V BUŇKÁCH (SEGREGAČNÍ STABILITA PLAZMIDŮ)

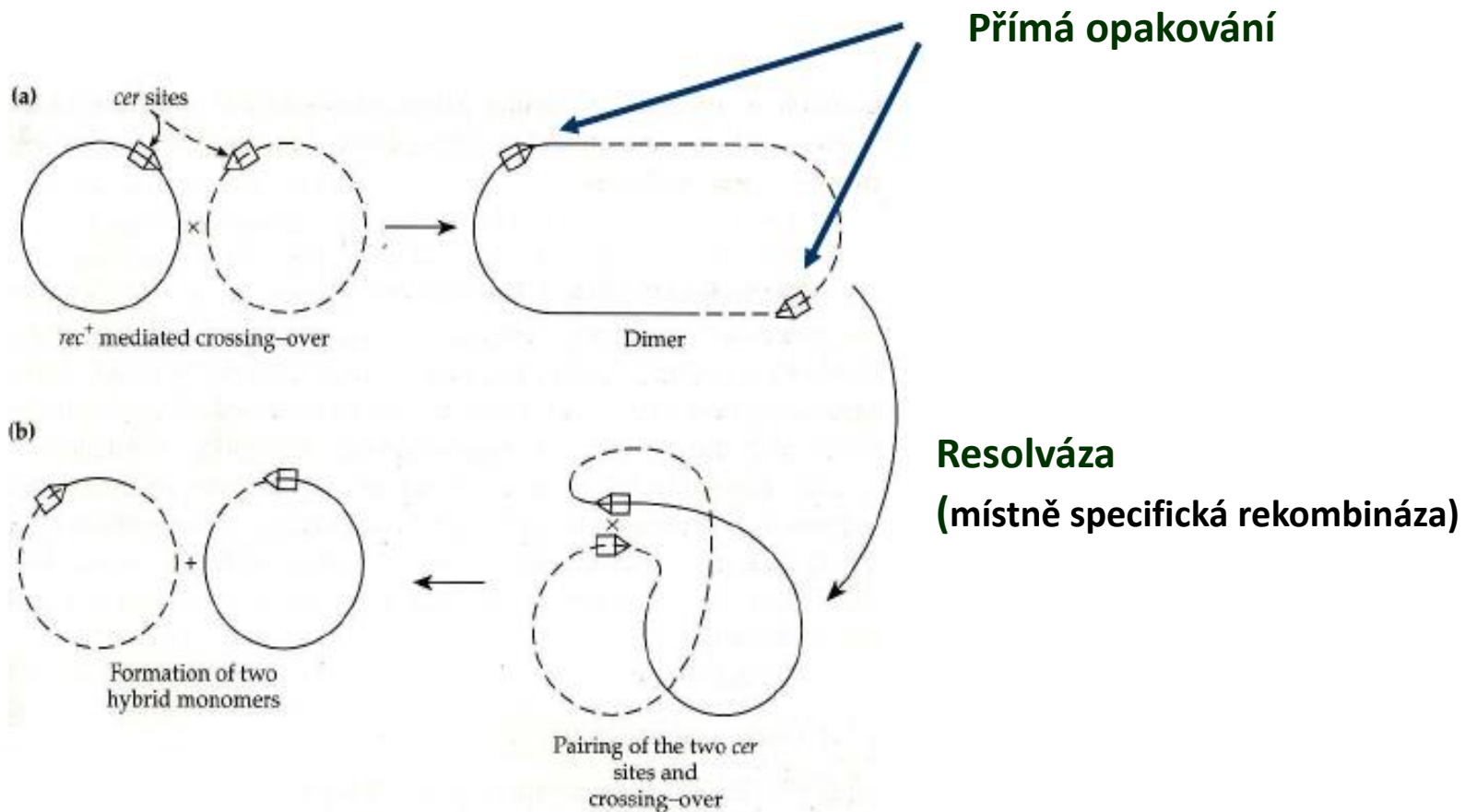
1. místně specifická rekombináza – 2. partitioning – 3. systém toxin-antitoxin

U vícekopiových plazmidů (>20) typu ColE1 je přítomen nekódující úsek (cer, 380 bp), který je cílem působení místně specifické rekombinázy (kódovaná geny *xerC* a *xerD* na chromozomu) – „Multimer resolution systems“

- u větších plazmidů jsou rekombinázy kódovány plazmidovými geny
- u nízkokopiových plazmidů jsou přítomny aktivní mechanismy rozdělování:
  - **aktivní segregace:** partitioning (lokus inc + proteiny Par(Sop))
  - **postsegregační usmrcování buněk**, které ztratily plazmid (interakce stabilního toxinu s nestabilním antitoxinem)

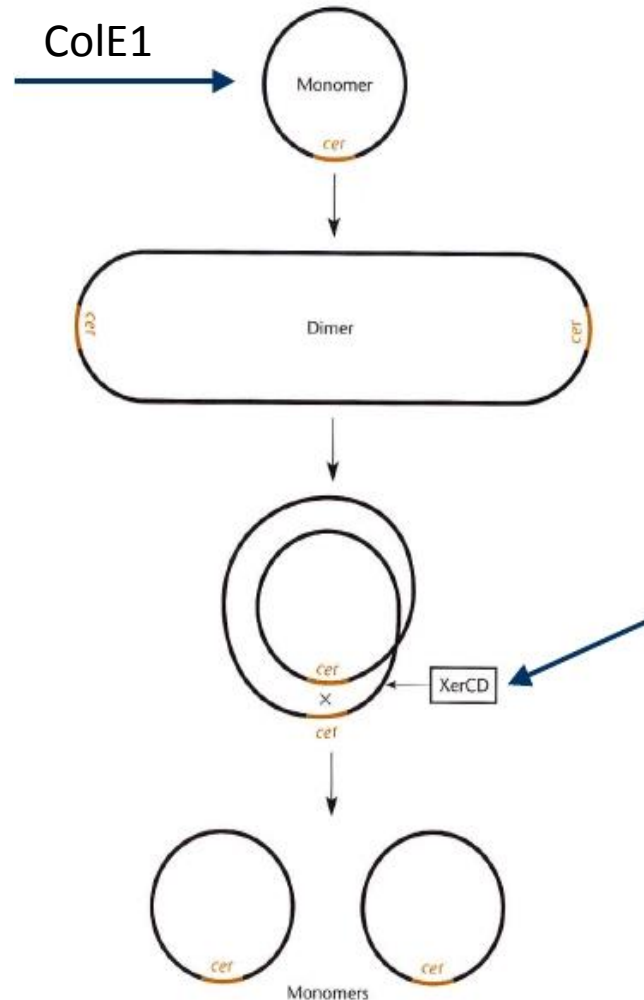
1. místně specifická rekombináza – 2. partitioning – 3. systém toxin-antitoxin

# SYSTÉM PRO ROZDĚLOVÁNÍ MULTIMERNÍCH PLAZMIDOVÝCH FOREM



## Xer FUNKCE *E. coli* KATALYZUJE MÍSTNĚ-SPECIFICKOU REKOMBINACI V MÍSTECH CER PRO ROZKLAD PLAZMIDŮ

**Plazmidové dimery –**  
výsledkem chybného  
ukončení replikace nebo  
rekombinace monomerů

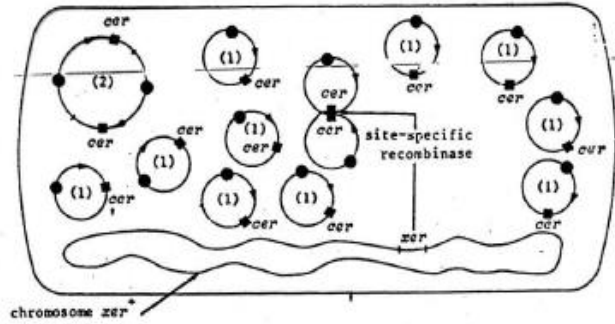


Proteiny XerC  
a XerD *E.coli*

Působí na místo  
Dif poblíž ter na  
chromozomu u  
*E. coli*

1. místně specifická rekombináza – 2. partitioning – 3. systém toxin-antitoxin

## ZAJIŠTĚNÍ POČTU KOPIÍ SYSTÉMEM CER A XER

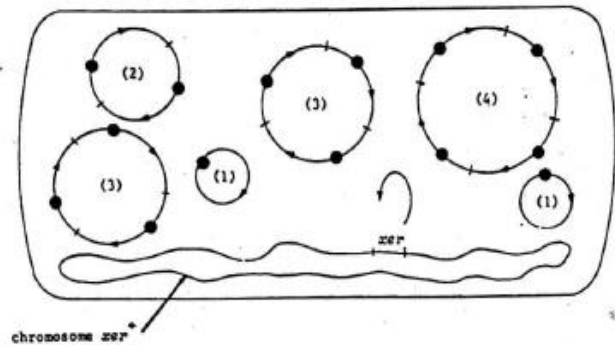


Plazmid obsahuje *cer*

a. host (*xer+*), ColE1 plasmids (*cer+*) 14 origins ~ 13 plasmid molecules

↓ Cell division

nízká pravděpodobnost vzniku bezplazmidových buněk



Plazmid neobsahuje *cer*

b. host (*xer+*), ColE1 plasmids (*cer-*) 14 origins ~ 6 plasmid molecules

↓ Cell division

vysoká pravděpodobnost vzniku bezplazmidových buněk



## MODEL AKTIVNÍ SEGREGACE (nízkokopiové plazmidy)

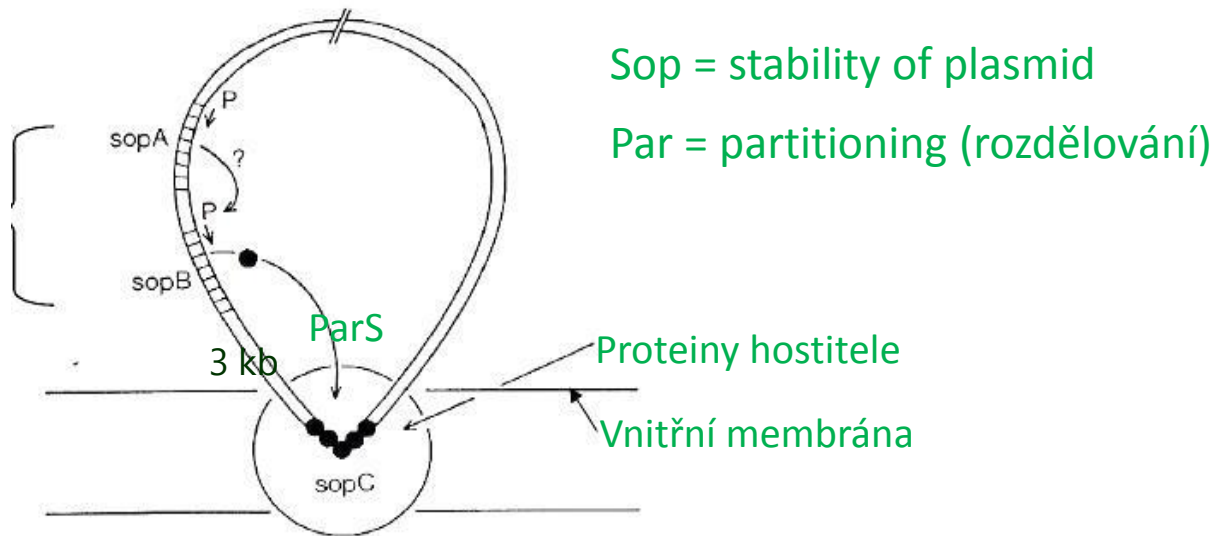
- **Plazmid** – geny kódující speciální proteiny, nekódující sekvence pro přichycení na membránu = proteiny kódujících oblastí interagují s nekódujícími sekvencemi; kódují spec. ATPázy pro rozdělení kopií
- **Buňka** – místo *par* na membráně sloužící k přichycení plazmidů

Protein (Par) na plazmidu se váže na místo par na membráně.

1. místně specifická rekombináza – **2. partitioning** – 3. systém toxin-antitoxin

## MODEL PŮSOBNÍ FUNKCE SOP (PAR) U F PLAZMIDU

zajištění distribuce plazmidových kopií do dceřiných buněk



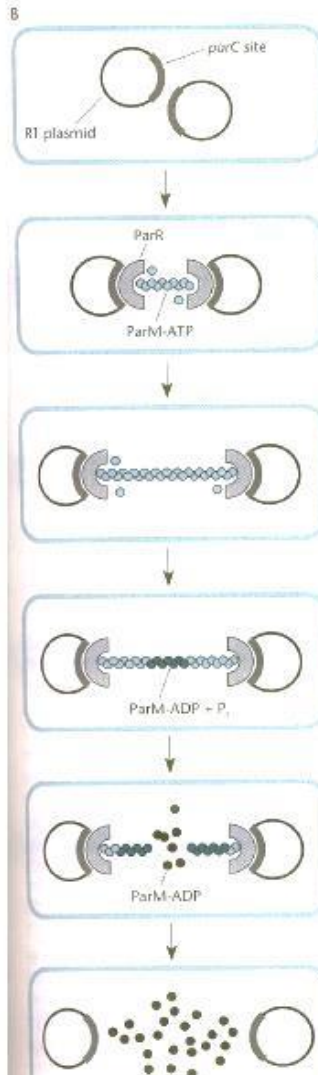
**sopA** kóduje protein, který zřejmě reguluje expresi **sopB**:

Protein SopB se váže spolu s proteiny hostitele na lokus sopC (místo parS) obsahující 12 tandemových 43 bp-repetic a je ukotven na vnitřní membránu.

# MODEL ROZDĚLOVÁNÍ PLAZMIDU R1



**A. Struktura lokusu par:** lokalizace genů parM a parR a cis-působícího místa parC.



**B. ParR se váže na místo parC,** což umožňuje navázání ParM-ATP. Filamentum se prodlužuje nasedáním dalších podjednotek ParM-ATP, což vede k pohybu plazmidových kopií k pólům buňky. Filamentum je destabilizováno, jakmile dojde k hydrolýze ParM-ATP na ParM-ADP.

1. místně specifická rekombináza – **2. partitioning** – 3. systém toxin-antitoxin

## INTRACELULÁRNÍ LOKALIZACE PLAZMIDŮ

**Metoda:** využití fluorescenčního značení proteinů vázajících se na sekvence plazmidů

### Shrnutí:

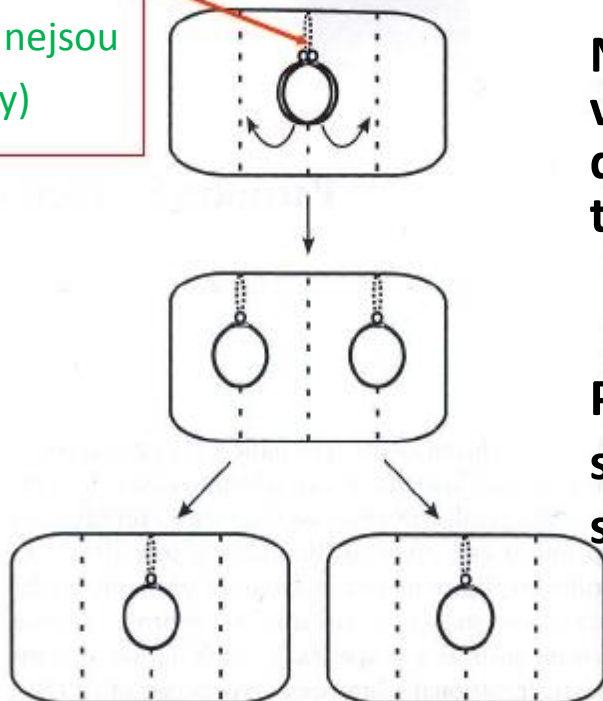
1. Plazmidy mají v buňkách **specifickou** nebo **preferovanou lokalizaci**: obvykle poblíž první a třetí čtvrtiny buňky.
2. Lokalizace plazmidu v buňce závisí na jeho **rozdělovacím systému**.
3. U rychle rostoucích buněk jsou plazmidy ve dvojicích nebo skupinách, které využívají **společné připojovací místo na membráně** (počet fluorescenčních signálů je nižší než počet plazmidových kopií).
4. Různé typy (druhy) plazmidů **využívají různá místa pro přichycení při jejich dělení a v buňce se nacházejí na různých místech**.

### Celkový závěr:

Platí obecný model, podle kterého je signál pro rozdělení plazmidu u dělících se buněk uprostřed a po rozdělení buňky se přesunuje do první a třetí čtvrtiny buňky.

# OBECNÉ SCHÉMA ZNÁZORŇUJÍCÍ ROZDĚLOVÁNÍ PLAZMIDŮ

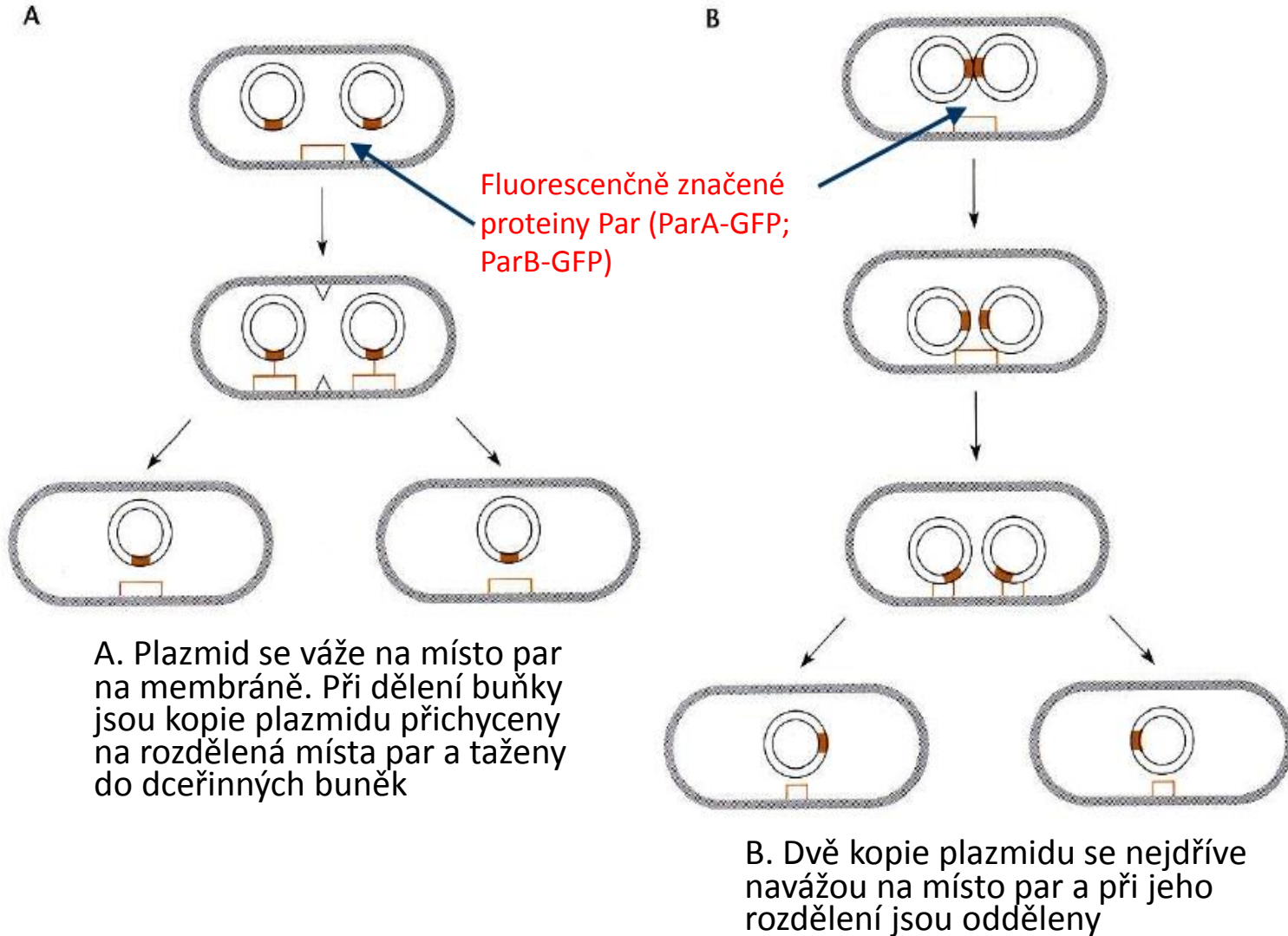
Rozdělovací aparát  
(jeho složky nejsou  
dosud známy)



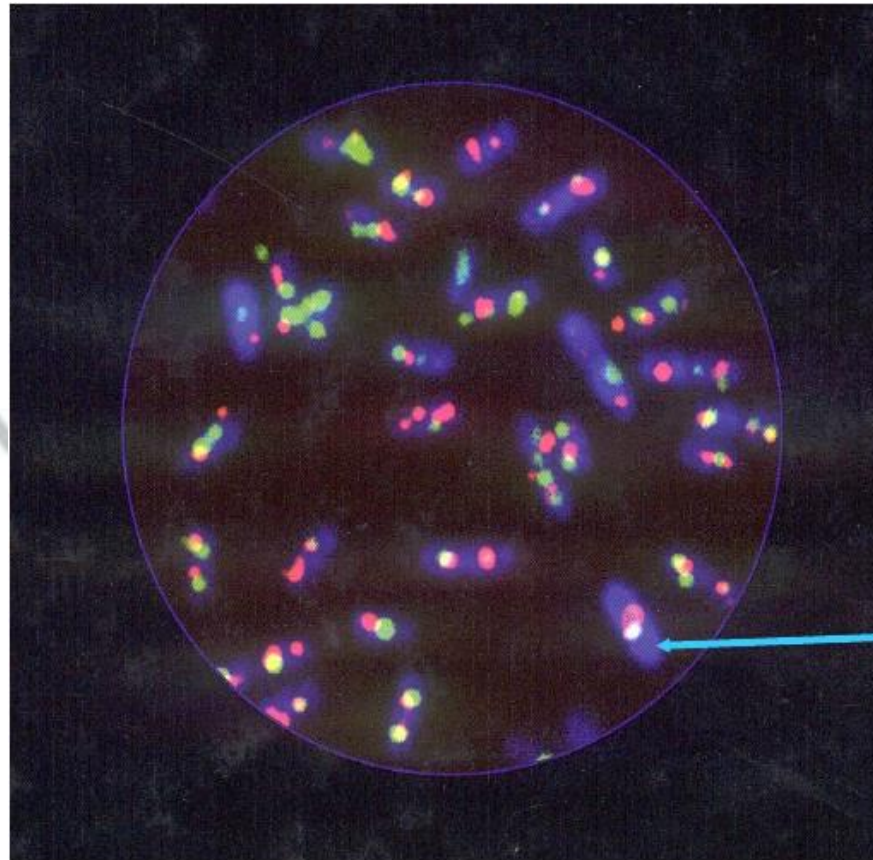
**Nově zreplikované plazmidy umístěné ve středu buňky se oddělí a přesunou do první a třetí čtvrtiny ještě před tvorbou septa.**

**Po rozdělení buňky se tyto polohy stávají v dceřiných buňkách opět středovými.**

# MODELY ZNÁZORŇUJÍCÍ FUNKCI MÍST PAR U PLAZMIDŮ F A RP1



**Vizualizace polohy plazmidů F a P1 uvnitř buněk *E. coli* pomocí fluorescenčního barvení – různé plazmidy se nacházejí v různých místech**



F - červená

P1 - zelená

Membrána  
- modrá

1. místně specifická rekombináza – 2. partitioning – 3. systém toxin-antitoxin

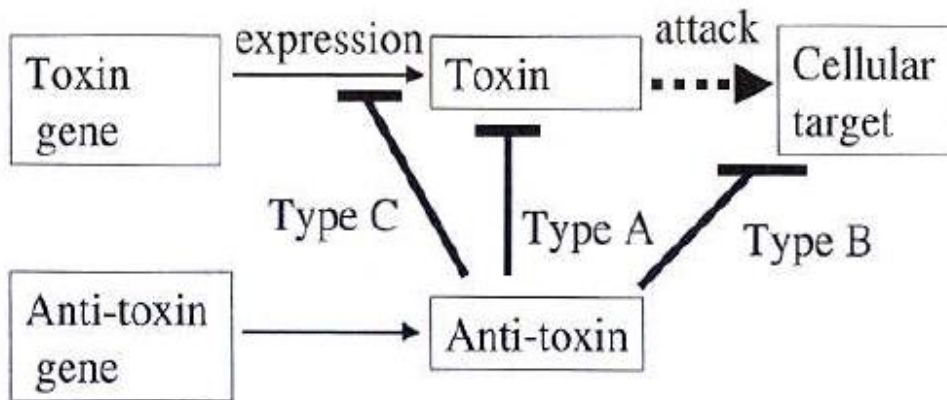
## OBECNÝ MECHANISMUS „GENETICKÉHO DONUCOVÁNÍ“

(závislosti, addiction systems) – udržování plazmidu v populaci buněk

Na plazmidu jsou přítomny dva geny, kódující dva produkty:

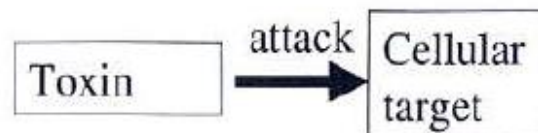
1. toxin (killer) - stabilnější
2. antitoxin (antidot, antikiller) - nestabilní

A. In the presence of toxin/anti-toxin gene complex



Plazmid je přítomen, antitoxin inhibuje toxin, buňka přežívá

B. After loss or disturbance of toxin/anti-toxin gene complex



Plazmid není přítomen, toxin usmrtí buňku



1. místně specifická rekombináza – 2. partitioning – 3. systém toxin-antitoxin

Table 1. Classification of genetic addiction systems based on the action of the antitoxin

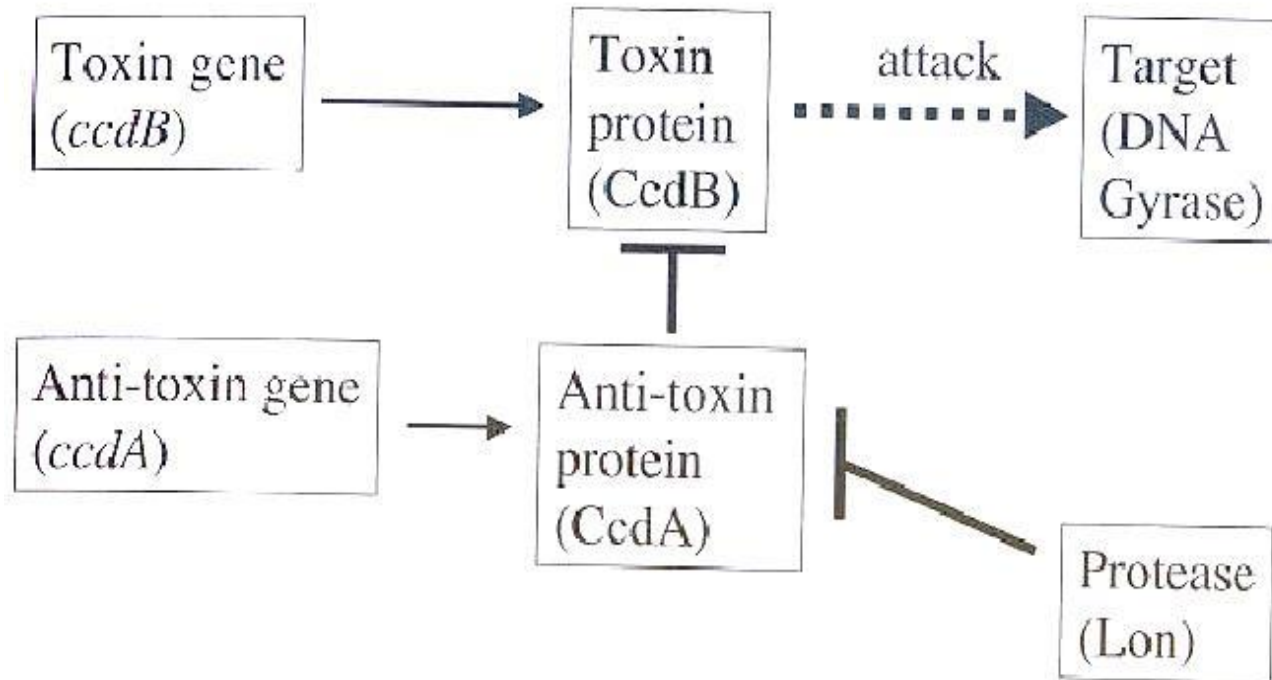
Type	Action of antitoxin <sup>a</sup>	Known subtype	Example of gene complexes	Reference
A	Interaction with toxin	Classical proteic killer systems	<i>ccd</i>	99
B	Protection of toxin's target	Restriction-modification systems	<i>ecoRI</i>	164
C	Inhibition of toxin's expression	Antisense-RNA-regulated systems	<i>hok/sok</i>	69

<sup>a</sup>Classification based on that of Michael Yarmolinsky (267, 268).

**Toxin:** napadá životně důležité molekuly v buňce

**Antitoxin:** eliminuje působení toxinu

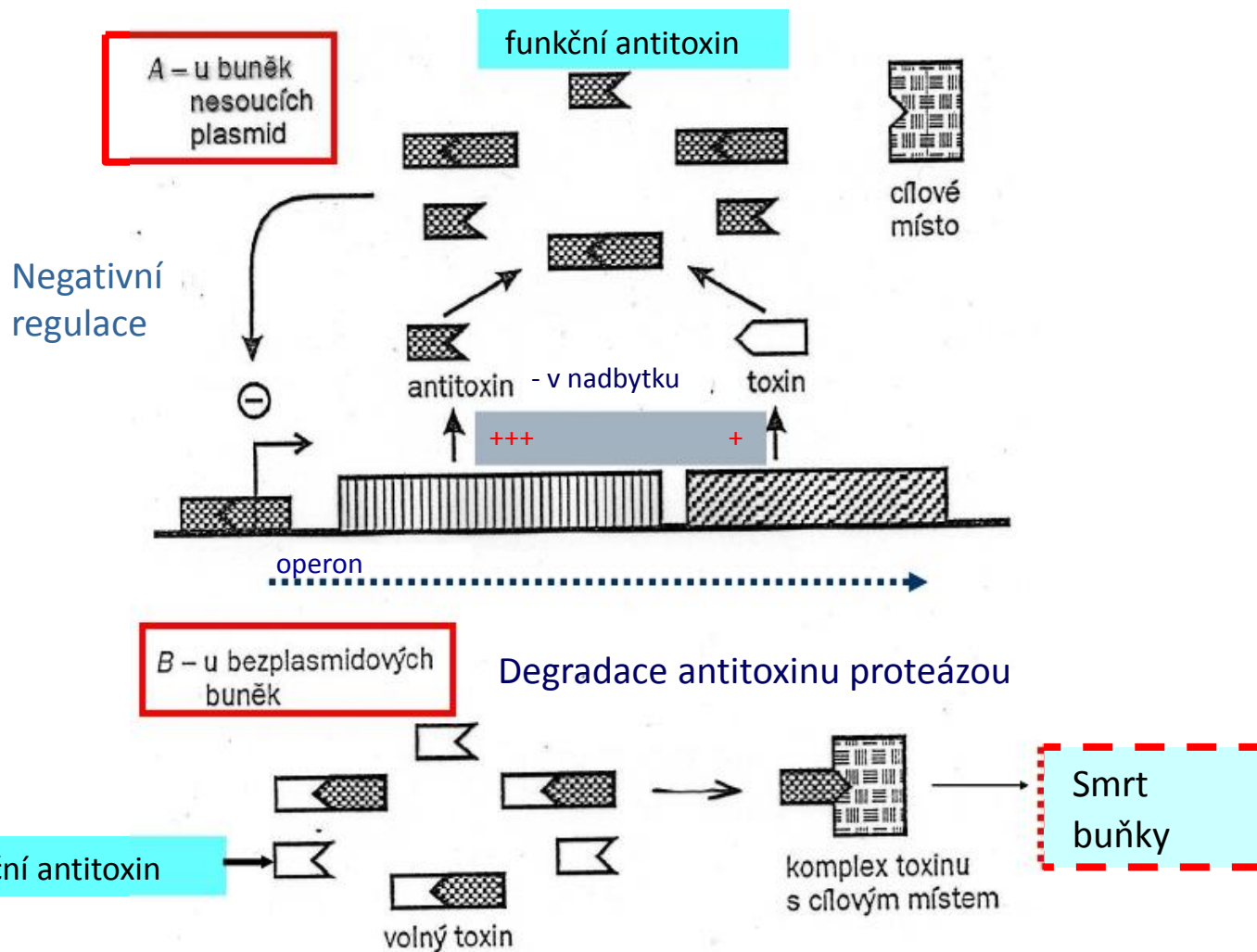
## A. Classical proteic system



Odbourá **antitoxin** po ztrátě plazmidu

**Ccd = couples cell division (geny týkající se buněčného dělení - replikace DNA )**


## POSTSEGREGAČNÍ USMRCOVÁNÍ BEZPLAZMIDOVÝCH BUNĚK PŮSOBENÍM PROTEINOVÝCH SYSTÉMŮ



1. místně specifická rekombináza – 2. partitioning – 3. systém toxin-antitoxin

## SLOŽKY PROTEINOVÝCH SYSTÉMŮ PRO UDRŽENÍ PLAZMIDU V BUŇCE

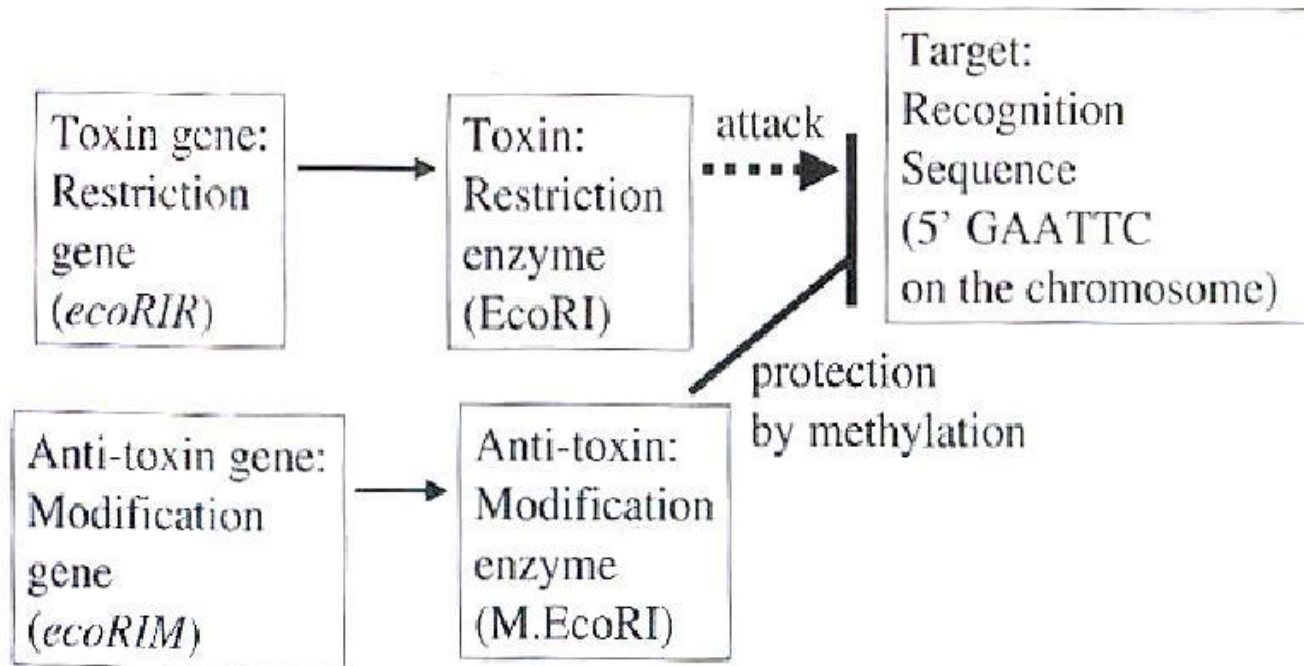
Plasmid	Systém	Toxin	Antitoxin	Místo působení toxinu	Proteinasa degradující antitoxin
F	<i>ccd</i>	CcdB (101 AK)	CcdA (72 AK)	gyrasa	Lon
R1	<i>parD</i>	Kid (110 AK)	Kis (84 AK)	DnaB	Lon
RK2	<i>parDE</i>	ParE (103 AK)	ParD (83 AK)	?	?
P1	<i>phd/doc</i>	Doc (126 AK)	Phd (73 AK)	?	CipXP



Proteiny pro replikaci chromozomu buňky

1. místně specifická rekombináza – 2. partitioning – 3. systém toxin-antitoxin

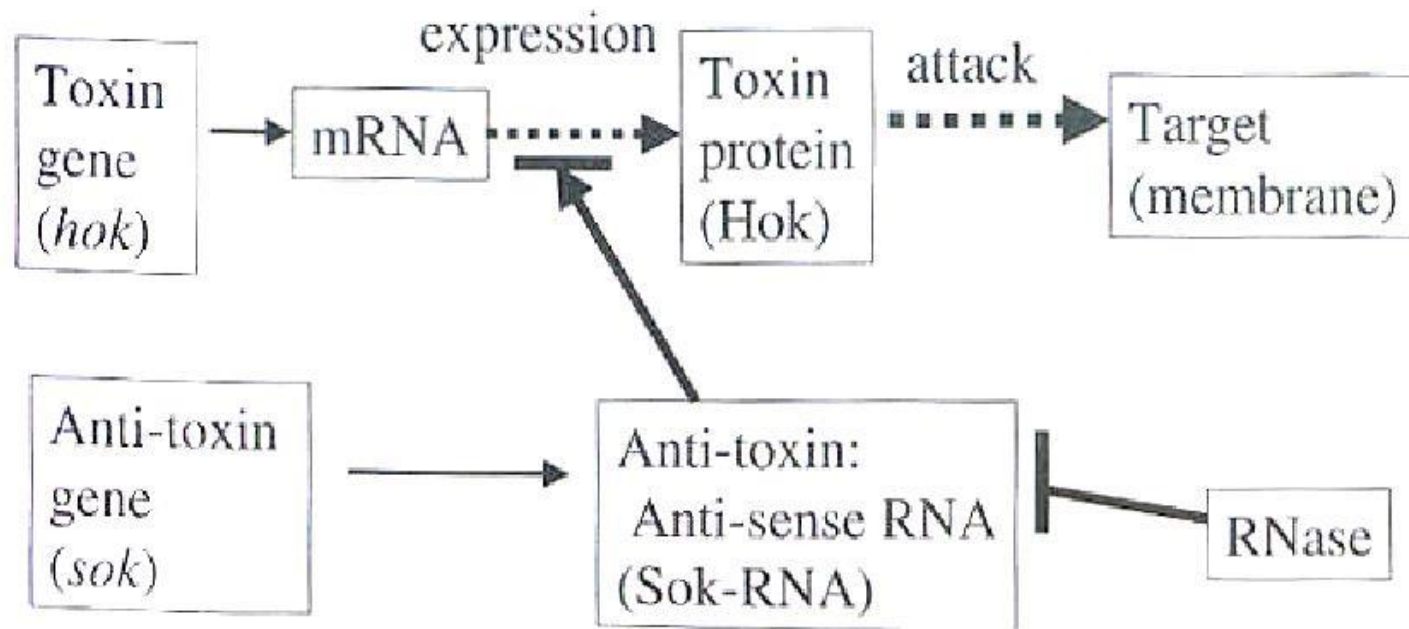
## B. Restriction-modification system



**RM-systémy typu II nesené na plazmidu (např. *EcoRI*)**

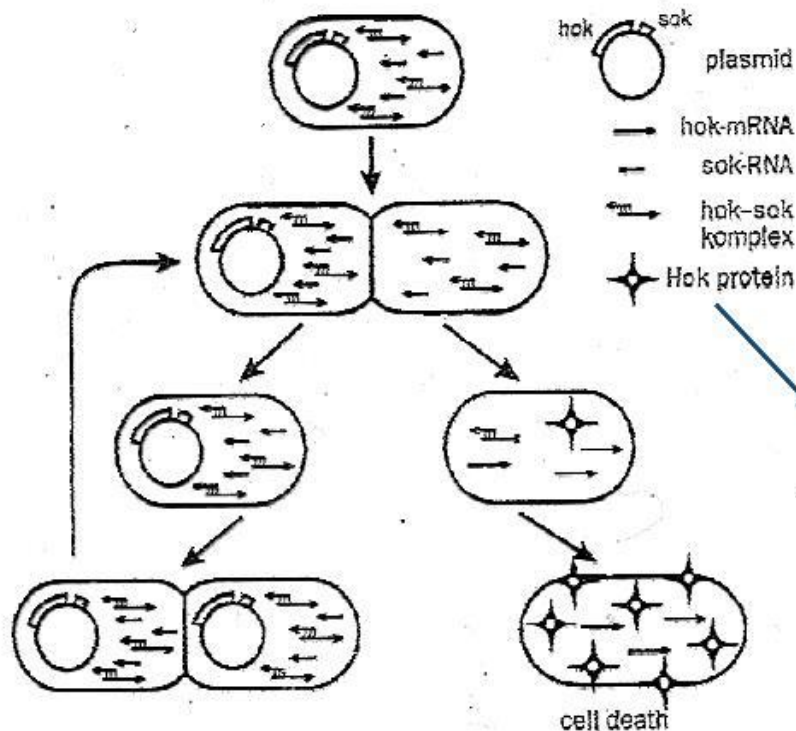
1. místně specifická rekombináza – 2. partitioning – 3. systém toxin-antitoxin

### C. Anti-sense-RNA-regulated systems



# POSTSEGREGAČNÍ ZABÍJENÍ BEZPLAZMIDOVÝCH BUNĚK PŮSOBENÍM SYSTÉMU HOK/SOK U PLAZMIDU R1

hok = host killing (**toxin**); sok = suppression of killing (**antitoxin**)



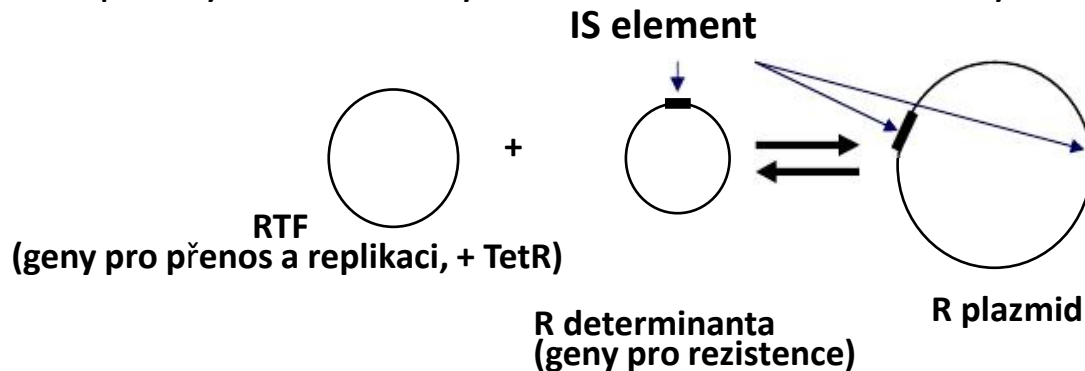
Antisense sok-RNA je nestabilní a po ztrátě plazmidu z buněk rychle zmizí

Hok protein je stabilní a po ztrátě plazmidu z buněk navodí kolaps membránového potenciálu

# R-plazmidy

## SLOŽKY R-PLAZMIDŮ

1. **Resistance transfer factor (RTF)** – nese geny regulující DNA replikaci a počet kopií, geny pro přenos a někdy geny pro rezistenci k tetracyklinu.
2. **R determinanta** – má různou velikost a nese další geny pro rezistenci k antibiotikům – obvykle ampicilinu, chloramfenikolu, streptomycinu, kanamycinu, sulfonamidu – v různých kombinacích.

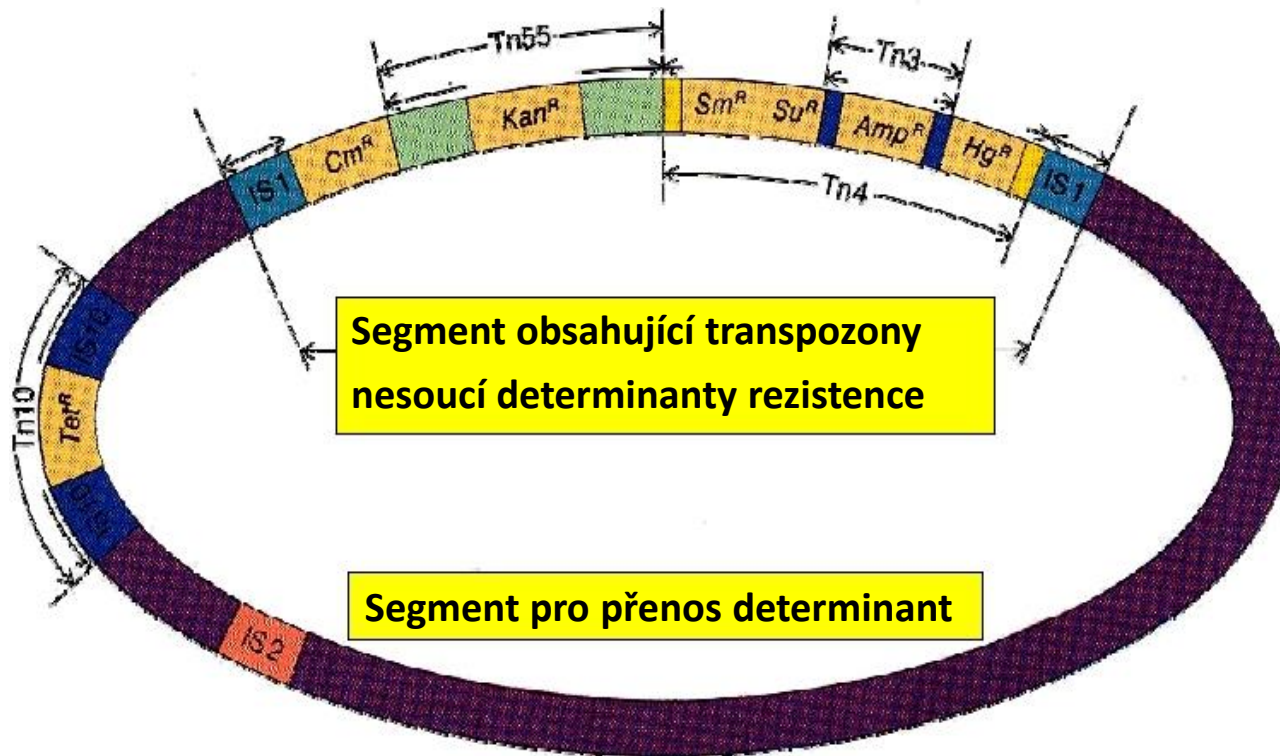


Vystavením buněk antibiotiku dochází k amplifikaci R-složky a zvětšuje se velikost celého plazmidu.



# ÚLOHA TRANSPOZONŮ PŘI EVOLUCI R-PLAZMIDŮ

každý transpozon může být přenášen nezávisle



# KOLICINOGENNÍ PLAZMIDY

## – PRODUKUJÍ LÁTKY S ANTIBIOTICKÝCH CHARAKTEREM

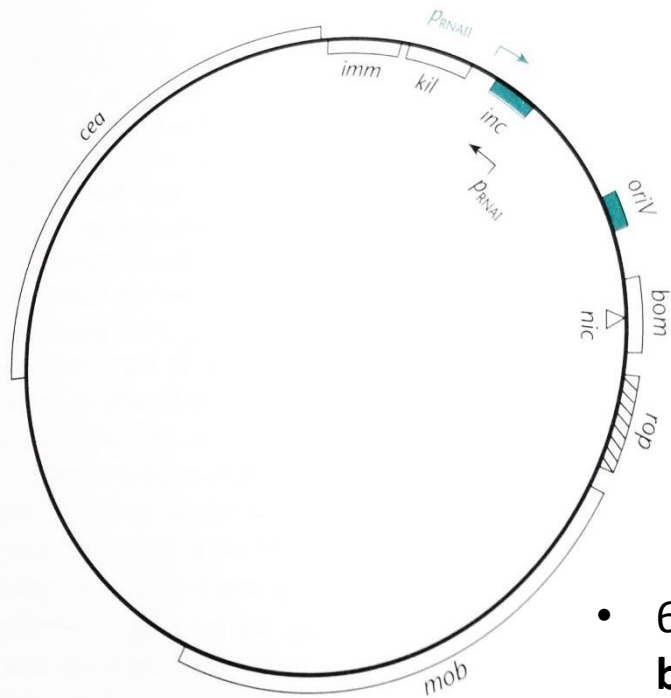
PŘÍKLADY BAKTERIÁLNÍCH DRUHŮ PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIOCINY

<b>Bakteriální druh</b>	<b>Název bakteriocinu</b>	<b>Chemická podstata</b>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Streptocin A	Protein 8 kD
<i>Streptococcus sanguis</i>	Sanquicin	Protein 280 kD
<i>Bacteriodes fragilis</i>	Bf-1	Protein 15 kD
<i>Propionibacterium acne</i>	Aknecin	Glykoprotein 60 kD
<i>Bacillus megaterium</i>	Megacin	Protein
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Stafylokocin	Lipoglykoprotein 150-400 kD
<i>Enterobacter cloacea</i>	Kloacin	Protein 56 kD

**Bakteriociny inhibují jednu nebo více základních funkcí (replikace, transkripce nebo translace, nebo energetický metabolismus).**

Na nárůstu citlivých buněk vytvářejí sterilní zóny – **lakuny**.  
Pravé koliciny x defektní fágové částice (fágové bičíky, lytické enzymy)

# PLASMID ColE1



## Struktura plazmidu:

- $P_{RNAI}$  – promotor pro primer RNAI
  - *oriV* – počátek replikace
  - *inc* – kóduje RNAI
  - *bom*
  - *cea* – oblast kódující kolicin
  - *mob* – oblast pro mobilizaci
  - *rop* – protein pro regulaci počtu kopií
- 6646 bp velký plasmid, kódující **koliciny** – **bakteriocinogenní plasmid**
- Koliciny** – proteiny s antibiotickým účinkem, působí na jiné kmeny *E. coli*, detekce podobná jako citlivost k fágům – tvoří **lakuny** podobně jako **plaky** u fágů
- Koliciny se váží na povrchové receptory na buněčných stěnách, produkce kolicinů indukovaná faktory poškozujícími DNA
  - Koliciny jsou inaktivní vzhledem k buňkám, kt. obsahují kolicin = **imunita**

# STRUKTURA F PLAZMIDU (100 kb, 49% GC)

## 60 genů rozdělených podle funkce do 5 oblastí

### 1. Tranferová oblast

33 kb, 31 genů všechny funkce nezbytné pro přenos.

Biosyntéza a sestavování F pilu (traA,B,C,E,F,G,H,L,K,Q,U,V,W)

Stabilizace párujících se buněk (traG,N)

Konjugativní metabolismus DNA (traD,I,M,Y,Z)

Regulace přenosu (traJ,finO,finP)

Povrchová exkluze (traS,T)

### 2. Vedoucí oblast

Oblast, která je při přenosu DNA přenášena jako první. 13 kb.

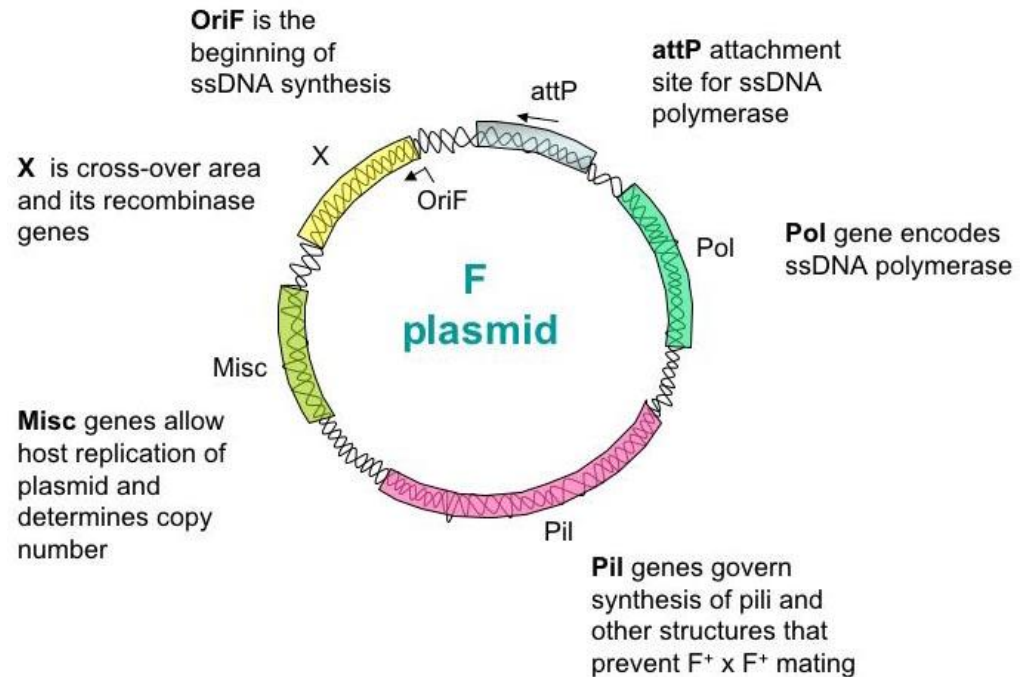
### 3. Oblast replikace

Tři oblasti s geny a sekvencemi podílejícími se na replikaci.

4. Oblast s inzerčními sekvencemi  
(IS3a,b, IS2, Tn1000)

### 5. Pif oblast

Pif (phage inhibition by F). Tři geny pifC.



# HLAVNÍ FUNKČNÍ OBLASTI F-PLAZMIDU

1. Transferová oblast
2. Vedoucí oblast
3. Oblast replikace
4. Oblast s IS sekvencemi
5. Pif oblast

## F-factor Plasmid

- Genes for conjugation

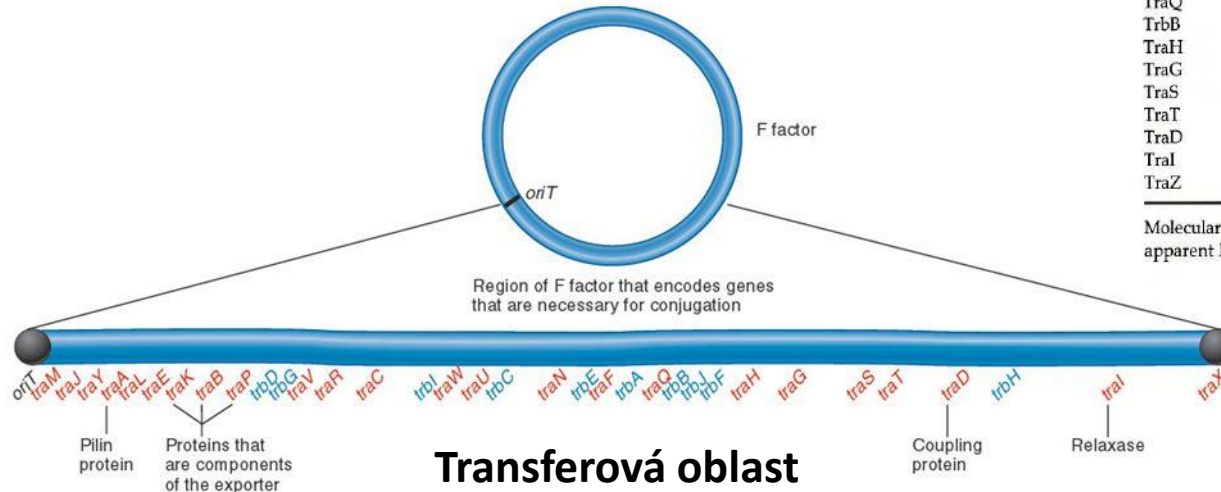


Table 3.2 Products of the transfer region of the F plasmid, as ordered on the DNA molecule.

Product	MW (KD)	Function
TraM	14.491	DNA transfer
FinP		Fertility inhibition; TraI repressor if FinO is present
FinO		Fertility inhibition; mutated by IS3 insertion in F; present in F-like plasmids
TraJ	27.031	Positive regulator for the transcription of all other <i>tra</i> and <i>trb</i> genes
TraY	13.846	DNA transfer, <i>OriT</i> nicking exonuclease
TraA	13.200	F pili
TraL	10.350	F pili
TraE	21.200	F pili
TraK	(24)	F pili
TraB	(55–64)	F pili
TraP	(21.5–23.5)	Unknown
TraV	(21)	F pili
TraR	(9)	Unknown
TraC	(48–85)	F pili
TraW	(23)	F pili
TraU	(20)	F pili
TraN	(66)	Stabilization of mating pairs
TrbC	(21.5)	Unknown
TrbD	(23.5)	Unknown
TrbE	(10)	Unknown
TraF	(25–26)	F pili
TrbA	12.947	Unknown
TraQ	10.867	F pili (pilin maturation)
TrbB	(18.4)	Unknown
TraH	(39–45)	F pili
TraG	(100–116)	F pili + stabilization of mating pairs
TraS	16.861	Surface exclusion protein
TraT	26.017	Surface exclusion protein
TraD	(77–90)	DNA transfer
TraI		Helicase
TraZ		<i>OriT</i> exonuclease

Molecular weights were either deduced from DNA sequencing data or determined as the apparent MW from SDS-PAGE analysis (SDS-PAGE figures in parentheses).

# CHARAKTERISTIKA Ti-PLAZMIDŮ (tumory indukující; 150-200 kb)

## Hostitel:

*Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium rubi*

*Agrobacterium rhizogenes* (Ri-plazmidy)

## Geny na plazmidu:

T-DNA (15-45 kb) – syntéza opinů a fytohormonů

Geny pro virulenci

Geny pro katabolismus opinů

Ori

Geny pro konjugaci

## Typy Ti-plazmidů (podle typu opinu)

nopalinový

oktopinový

agropinový

sukcinamopionový

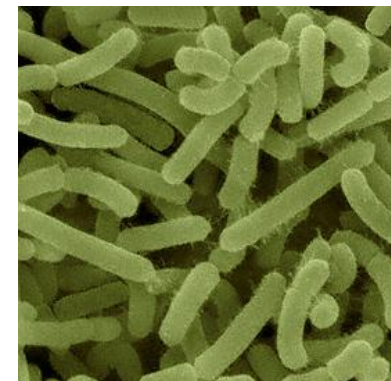
## Typy Ri-plazmidů

manopinový

agropinový

Ti – způsobuje krčkové nádory (crown galls)

Ri – způsobuje vlasaté kořeny (hairy roots)



*Agrobacterium tumefaciens* G-

# Struktura opinů

## 1. Rodina oktopinů

Vznik kondenzací pyruvátu s některou aminokyselinou:

- Pyruvát + arginin: **oktopin**
- Pyruvát + lyzin: lyzopin
- Pyruvát + histidin: histopin
- Pyruvát + ornitin: kys. oktopinová

## 2. Rodina nopalínů

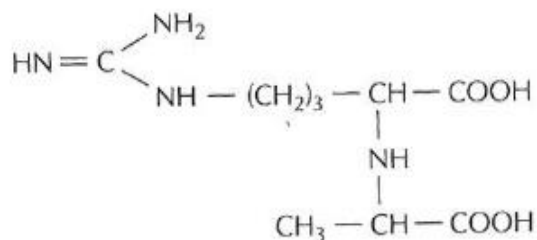
Vznik kondenzací a-ketoglutarátu s aminokyselinami

## 3. Rodina agropinů

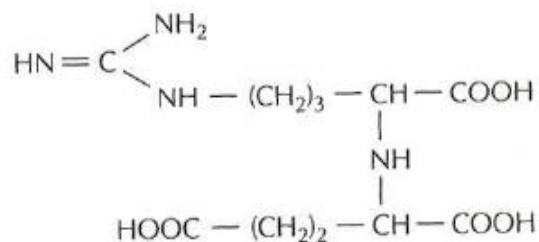
Vznik kondenzací kys. glutamové s aminokyselinami

# CHEMICKÁ STRUKTURA OPINŮ (zdroj C, příp. N)

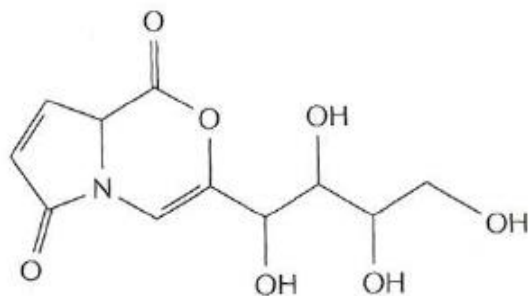
## Aminokyselina + Pyruvát



Octopine



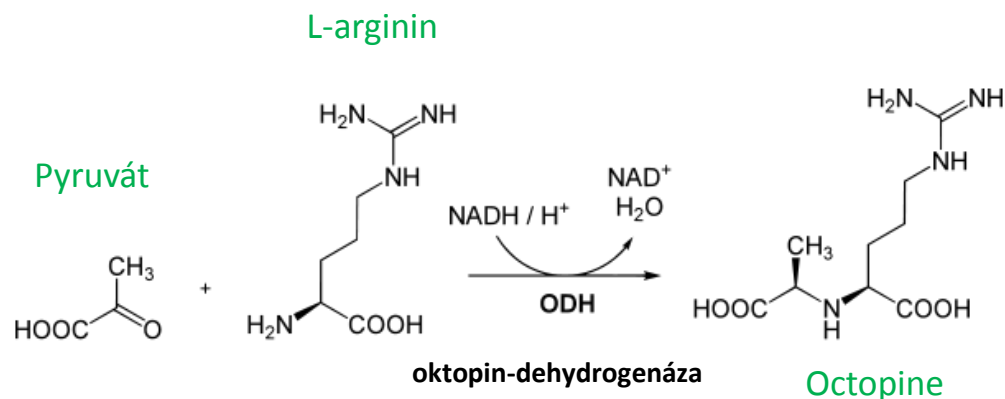
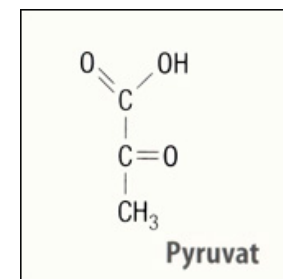
Nopaline



Agropine

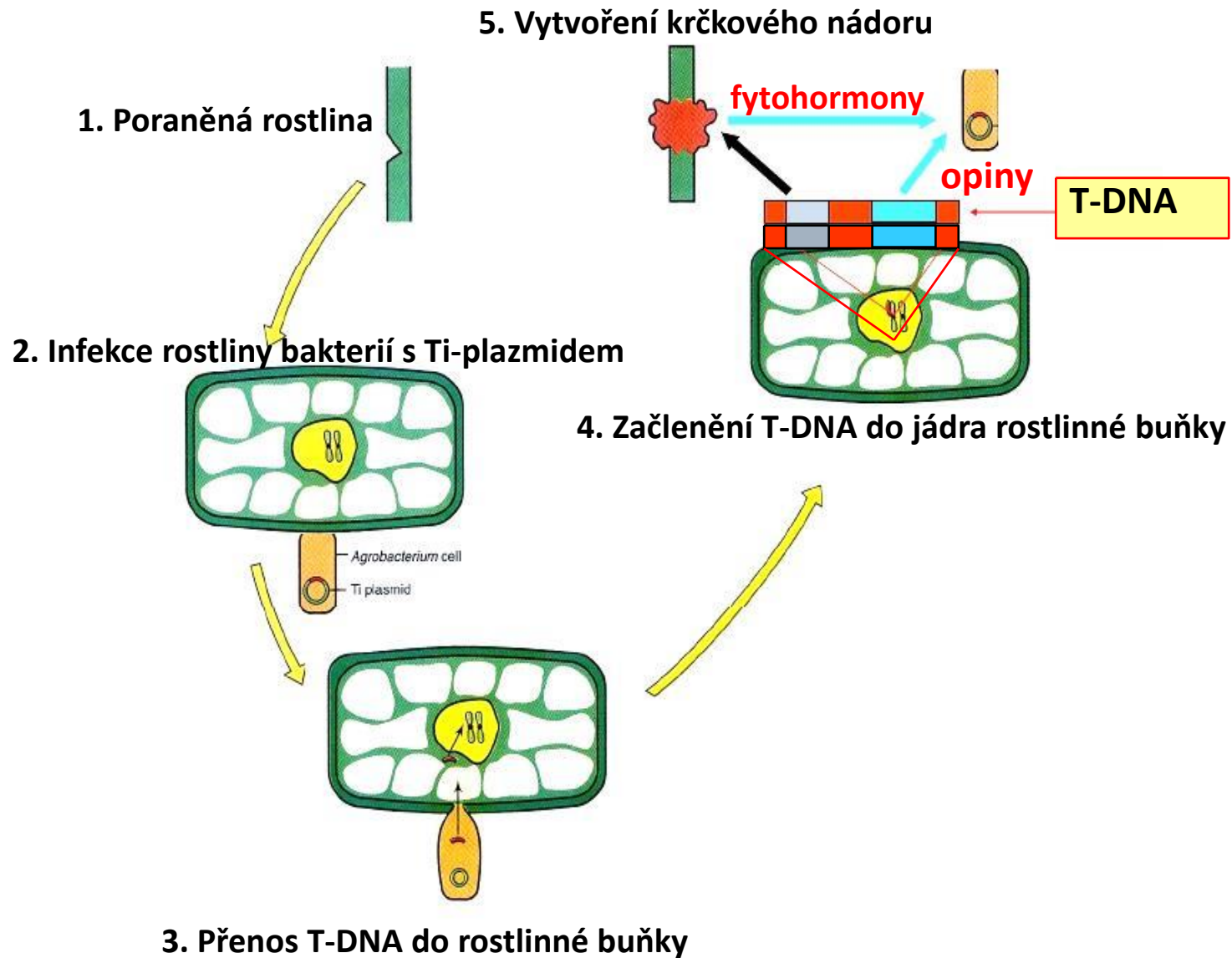
## Pyruvát

- jeden z nejvýznamnějších metabolitů, vznik v závěrečné fázi glykolýzy, z jedné molekuly glukózy vznikají 2 molekuly pyruvátu.
- je metabolitem alkoholového i mléčného kvašení, transaminací přechází na alanin, je konečným produktem katabolismu uhlíkového řetězce cysteinu, serinu, glycinu, treoninu a hydroxyprolinu.
- enzymatickou reakcí je metabolizován na kyselinu oxaloctovou nebo na acetyl-CoA (substráty Krebsova cyklu, který tvoří „palivo“ buňky).

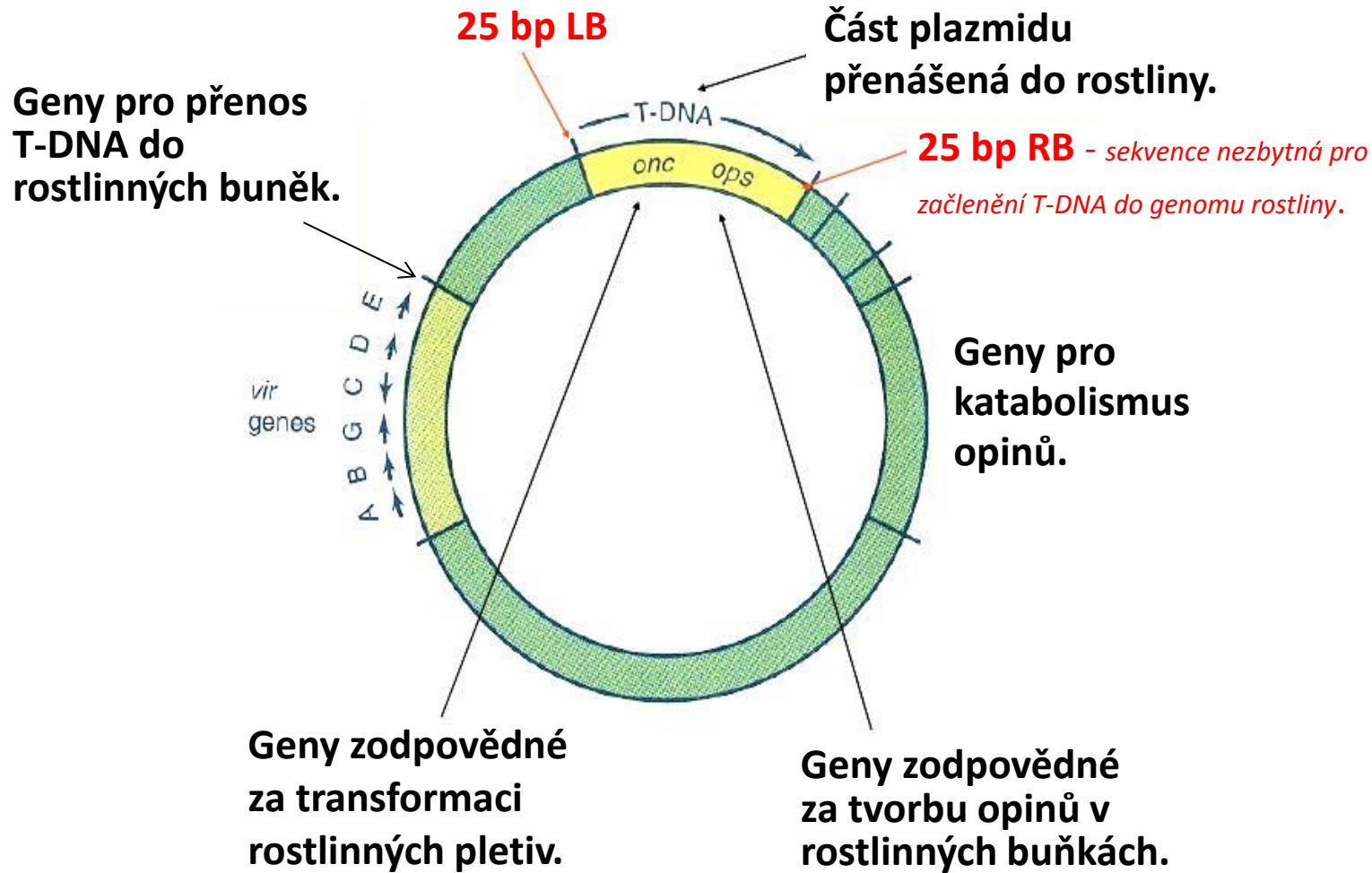




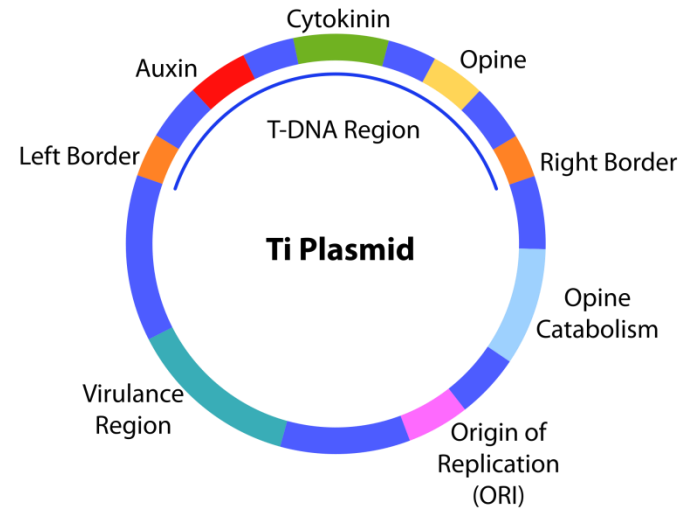
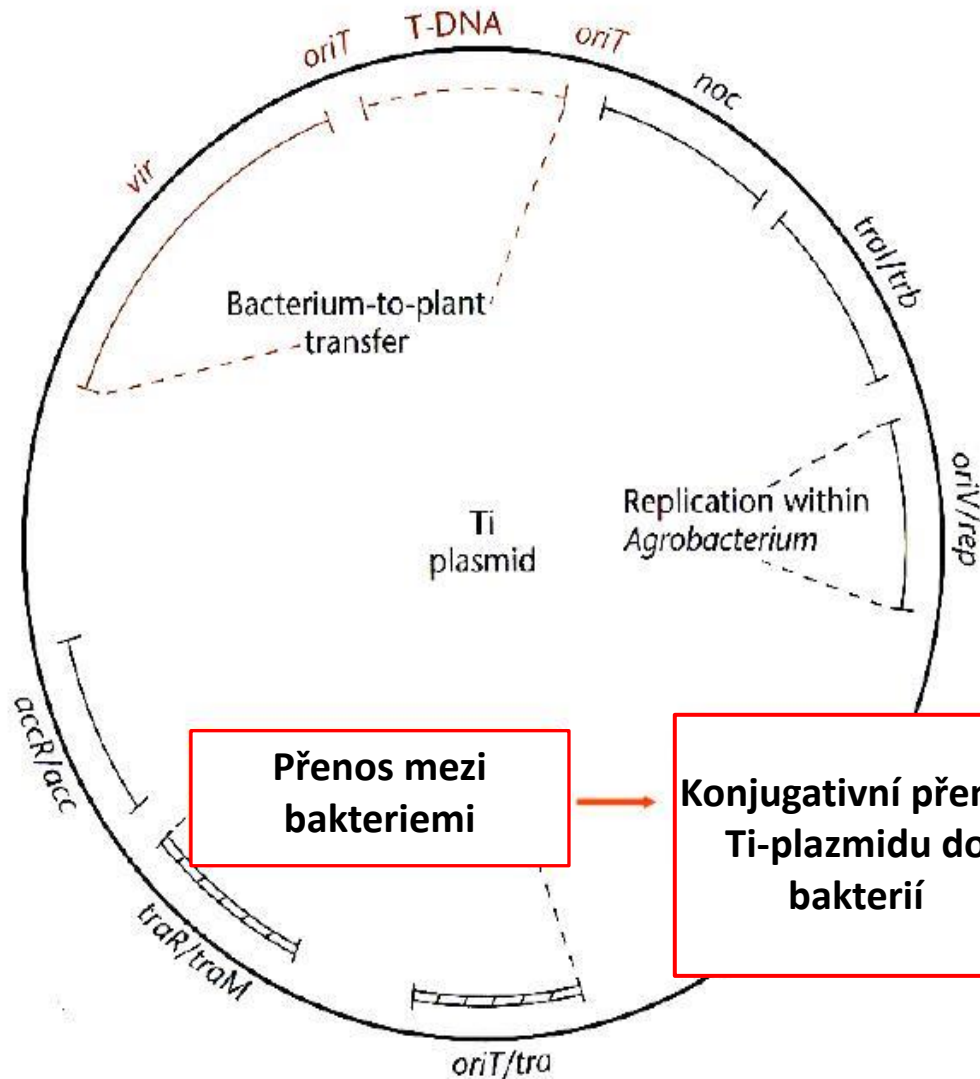
# Transformace rostlin navozená Ti-plazmidem *Agr. tumefaciens*



# Struktura Ti-plazmidu *A. tumefaciens*



# MOZAIKOVITÁ STRUKTURA TI-PLAZMIDU

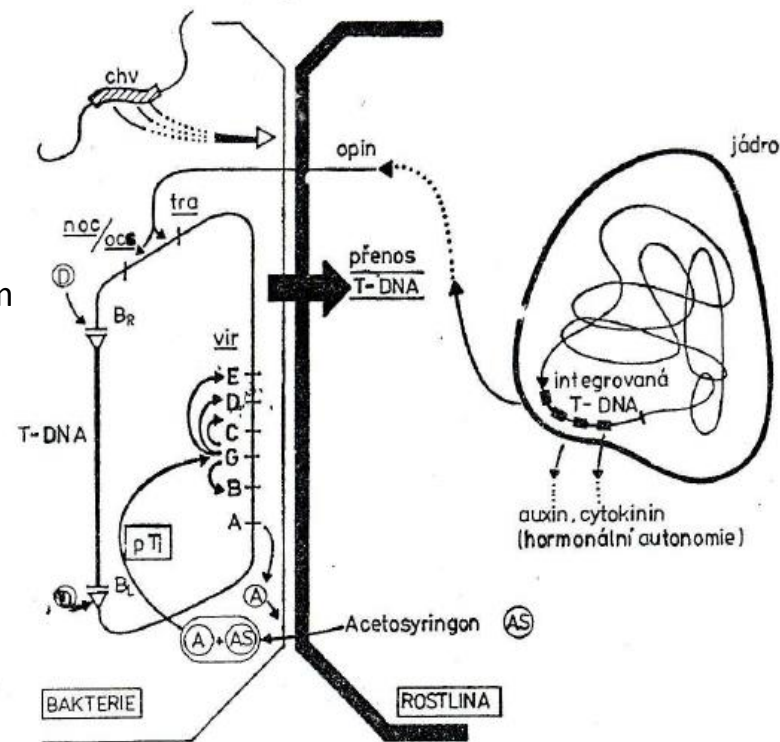


**Přenos mezi bakteriemi**

**Konjugativní přenos Ti-plazmidu do bakterií**

# PRŮBĚH PŘENOSU Ti-PLAZMIDU DO ROSTLINNÉ BUŇKY

- 1. Poranění rostliny, sekrece fenolických látek do prostředí** (typu *acetosyringonu*: acetovanilon, hydroxyacetofenon aj.)
- 2. Reakce bakterií *A. tumefaciens* na fenolické látky** (pozitivní chemotaxe)
  - Aktivace genů *vir* na Ti-plazmidu; připojení bakterií k rostlinným buňkám (spolupůsobení chr. genů *chvA*, *chvB*, *pscA*)
- 3. Aktivace transkripce genů *virB*, *C*, *D* a *E* prostřednictvím proteinu kódovaného genem *virG*.**
- 4. Působení produktů genů *vir*:**
  - vznik jednovláknových zlomů na Ti-plazmidu (produkt genu *virD*) + tvorba jednovláknových kopií T-DNA
- 5. Vytvoření přenosového komplexu T-DNA a polypeptidů *virD* a *virE***
- 6. Přenos komplexu T-DNA do rostlinné buňky**
- 7. Přenos T-DNA do jádra rostlinné buňky**
- 8. Integrace T-DNA do chromozomu** (různá místa, částečná homologie sekvencí RB a LB s místy začlenění)



# Ti-plazmid - shrnutí

## FUNKCE PLAZMIDOVÝCH GENŮ VIRULENCE

**Geny *vir*** = skupina genů v úseku asi 35 kb, velmi podobném u různých Ti-plazmidů. Celkem asi **25 *vir* genů (7 operonů)**: *virA,B,C,D,E* a *G*, vytvářejících 20 polypeptidů.

Funkce genů *vir*:

- a) tvorba jednovláknových zlomů na T-DNA: *virD1*, *virD2*
- b) odkrucování jednovláknové T-DNA: *virD1*, *virD2* a *virE2*
- c) vytvoření přenosového komplexu T- DNA/proteiny: *virD1*, *virD2* (*virB*)
- d) rozmezí hostitelů: *virC*

## HLAVNÍ RYSY PŘENOSU T-DNA DO ROSTLINNÉ BUŇKY

1. Do rostlinné buňky je z Ti-plazmidu přenášena **pouze T-DNA**, ve formě **ssDNA**.
2. Při **integraci T-DNA** do rostlinného genomu dojde k **definovanému začlenění** 5' konce (1-2 bp BR), začlenění 3' konce je variabilní (vznik delecí 3-100 bp).
3. Do rostlinného genomu se **může začlenit více kopií T-DNA**, i tandemově (vznik tandemů není jasný).
4. Pro přenos je **nutná pouze 25 bp RB**.
5. Místo **integrace je náhodné**, nejsou vyžadovány úseky homologie – preferenčně probíhá do **transkripčně aktivních oblastí** (často místa bohatá na AT páry).
6. Vlastní **proces integrace T-DNA** do genomu rostliny **není jasný** – účast reparačních enzymů rostliny? Nebo produkty genů na T-DNA.
7. V **místě integrace** dochází k **přeskupením** (delece, přeskupení apod.).

# Symbiotické plazmidy *Rhizobiaceae* (*pSyn*)

**Diazotrofie:** klíčový proces v biosféře – přeměna  $N_2$  na redukované formy (amoniak)

- volně žijící bakterie uskutečňují tento proces pro svou potřebu při omezeném množství amoniaku nebo nitrátů
- symbiotické mohou fixovat dusík jen po vytvoření mutualistických interakcí s leguminózami

**Předpoklady pro ustavení účinné symbiozy mezi bakteriemi a rostlinou:**

- chemotaktická invaze bakterií do kořenových buněk, kde se vytvoří specializovaný rostlinný orgán: **nodula**
- bakterie mají 20 různých nodulačních (nod) genů – ty se podílejí na syntéze nebo sekreci nodulačních faktorů (= silné mitogeny, přetvářející rostlinné buňky)
- uvnitř rostlinných buněk vytvářejí bakterie **bakteroidy**, což jsou specializované buňky určené k fixaci dusíku. **Bakteroidy dodávají rostlině fixovaný dusík a od rostliny odebírají fotosyntézou vytvářený uhlík.**

## Lokalizace symbiotických genů u rhizobií

- Symbiotická fixace dusíku vyžaduje asi 60 genů
- Geny pro symbiozu jsou na 150 kb až 1683 kb plazmidech (megaplazmidy), které představují 25-50% velikosti genomu
- většina genů pro nodulaci a fixaci dusíku je na jediném symbiotickém plazmidu pSyn, v některých případech na konjugativním transpozonu (502 kb) – symbiotický ostrov
- ztráta plazmidu vede k neschopnosti fixovat dusík

**Bakterie příbuzné rhizobiím byly zjištěny i u mravenců ve specializovaném orgánu pro recyklování dusíku.**

- Evoluce: přenos plazmidů nebo ostrovů vede k novým druhům

## Degradativní plazmidy

Nesou geny propůjčující bakteriím schopnost biologicky degradovat organické sloučeniny, které se běžně v přírodě nevyskytují. Ve většině případů kódují část degradační dráhy včetně regulačních elementů.

***Pseudomonas:***

**salicylát, naftalen, kafr, octan, toluen, fenoly, xylen, dichlorfenoxyaceton, chlorbenzen.**

**TOL plazmidy (prototyp degradativních plazmidů)**

Plazmidy nesou geny pro degradaci **toluenu, xylenu, benzylalkoholů, benzylaldehydů**

Příbuzné plazmidy: schopnost růst na salicylátu nebo naftalenu jako jediném zdroji C a E.

**2,4-D-plazmid = model pro studium degradace chlorovaných aromatických látek (např. (2,4-D = dichlorfenoxyoctové kyseliny používané jako herbicid)**



## Virulenční plazmidy

- nesou geny zodpovědné za patogenitu a virulenci bakteriálních kmenů

Obecné rysy virulenčních plazmidů enterobakterií

- velikost 60-200 kb, nízkokopiové (1-2 kopie)
- podobné buď F plazmidu nebo R100
- v jedné buňce může být i více různých virulenčních plazmidů
  
- např. *Yersinia* má tři různé plazmidy, z nichž každý přispívá výrazně k virulenci

## Geny virulence na plazmidech

**Faktory virulence pro kolonizaci buněk a tkání**

- **toxiny pro adhezi na epitel a invazi,**
- **tvorba biofilmu**
- **průnik bakterií buněčnou membránou hostitele,**
- **systemické šíření do dalších tkání**
- **intracelulární přežívání v mikrofágách.**

Mikrofág, též neutrofilní granulocyt, druh bílé krvinky, leukocyt – fagocytující buňka schopná pohlcovat drobné cizorodé částice, např. bakterie.

Virulenční geny obecně zvyšují přežívání v hostiteli, adhezi a invazivitu do buněk a někdy interferují s imunitními funkcemi hostitele

# Virulenční plazmidy gramnegativních bakterií

Výskyt: Čeleď *Enterobacteriace*

A. Normální mikroflóra gastrintestinálního traktu člověka *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*

B. Patogeny: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*

Patogenní kmeny *Escherichia coli*:

Enterotoxigenní (ETEC)

Enteroinvazivní (EIEC)

Enterohemorhagické (EHEC)

Enteropatogenní (EPEC)

Enteroagregativní (EaggEC)

Spektrum chorob odráží obsah genů virulence lokalizovaných na plazmidech, bakteriofágách, ostrovech patogenity (PAI), které nejsou u komensálů.

## Virulenční plazmidy nesporelujících G+ patogenů

G+ bakterie: nejzávažnější nosokomiální patogeny jsou stafylokoky a enterokoky

Řada z nich je multirezistentní k antibiotikům.

**Virulenční plazmidy *Staphylococcus aureus***

Extracelulární proteiny: toxiny vázané k určitým typům chorob

Enterotoxiny - ETB: potravinové otravy, TSST – syndrom toxického šoku, exfoliatin – syndrom opařené kůže

**Virulenční plazmidy *Enterococcus faecalis***

Identifikováno 18 různých plazmidů (prototyp: pAD1, 60 kb plasmid)

Faktory virulence: adhesin, matrix binding proteiny, kapsulární polysacharidy, cytolyziny (lyze erytrocytů), želatinázy a proteázy schopné poškodit tkáň a buňky.