

Plazmidy – podstatná složka genomu bakterií

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 molekulárněbiologických procesů v bakteriálních buňkách a horizontálního přenosu genů
3. Jsou prakticky a široce využívány v metodách MB a GI, zejména jako vektory

CHARAKTERISTIKA PLAZMIDŮ

dsDNA – kružnicová nebo lineární, velikost: 1-1000 kb

Objev: spojen s konjugací u *E. coli*, později ColE1 a R-plazmidy

Základní typy 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)
tvorba proteinů s antibiotikovým charakterem (*Enterobacteriaceae*)
- Virulenční plazmidy
- Ti-plazmidy (tumory indukující)
tvorba nádorů u dvouděložných rostlin (*Agrobacterium tumefaciens*)
- Plazmidy odbourávající organické sloučeniny (*Pseudomonas*)
- Plazmidy podílející se na fixaci vzdušného dusíku (*Rhizobium*).
- Plazmidy používané jako vektory pro přenos DNA (pBR322, pUC, Ti)

PLAZMIDY

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>

Plazmidy 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

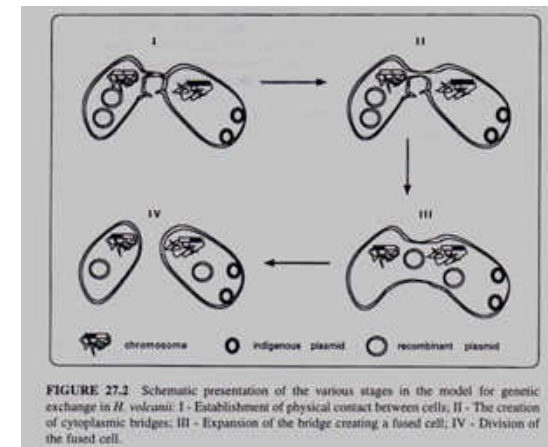


Table 3.1 Some of the best-known plasmids.

Plasmid designation (host)	Velikost	Počet kopií	počet oriV	jedno/dvou směrná replikace	proteiny hostitele pro replikaci	pozitivně působící plazmidové proteiny	regulace
ColE1 (CloDF13, P1517, RSF1050, pMB1 . . .) (<i>E. coli</i>)	6.4	High	1	Unidir.	Poll PolIII, RNA polymerase DnaE, B, C, Z RNase H	None	Negative regulation of primer RNA synthesis by a protein and an RNA complementary to the preprimer RNA
R6K (<i>E. coli</i>)	38	13–40	3 (α , β , γ) direct repeats	Bidir. and asymmetric (terminus) (direct repeats)	RNA polymerase	Pi protein (<i>pir</i> gene) binds to <i>oriV</i>	Pi protein binds to the direct repeats of <i>oriV</i> and is an autoregulated protein. At low concentration it regulates replication positively; at high concentration it exerts a negative regulation
IncFI: F (<i>E. coli</i>)	94.5	1	2 direct repeats	Bidir. (direct repeats)	DnaB, C, E and Λ	Protein E binds to <i>oriV</i>	Negative autoregulation of protein E synthesis. Protein E might be titrated down by the direct repeats near or in <i>oriV</i> , which are responsible for both copy number and incompatibility (<i>copB</i> or <i>incC</i>)
IncP: RK2, RP4 RP1, R68, R18 (Gram-negative, promiscuous)	60	4–7 in <i>E. coli</i> 3 in <i>P. aeruginosa</i>	1 direct repeat	Unidir.	DnaA	TrfA protein binds to <i>oriV</i>	Complex negative regulation of the TrfA protein by several genes also involved in cell killing or rescue (<i>kilA</i> , B, C, D or <i>kilABCD</i>)
IncQ: RSF1010 (Gram-negative, promiscuous)	8.7	10–12	1 direct repeat	Bidir.		RepA, RepB, RepC. RepC binds to <i>oriV</i>	Negative regulation of <i>repC</i> . <i>repC</i> has two promoters, negatively regulated by the product of a small gene located downstream of each of them
IncFII: R1 (R100, R6-5) (<i>E. coli</i>)	100	2	1	Unidir.	DnaB, C, E, F and G	RepA1 (<i>rif^r</i> RNA polymerase)	Negative regulation of <i>repA1</i> expression at two levels. The protein product of <i>copB</i> represses transcription of <i>repA1</i> , the RNA product of <i>copA</i> (or <i>repA2</i>) prevents translation of <i>repA1</i> mRNA and negatively regulates <i>copB</i>
PT181 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	4.4	20–25	1 (<i>repC</i>)	Unidir.	Unknown	RepC (313 aa) binds to a region within the origin	Negative regulation of <i>repC</i> by attenuation at the transcriptional level, and by two RNAs at the translational level. These RNAs are complementary to the leader region of the <i>repC</i> mRNA
pIJ101 (<i>Streptomyces</i>)	8.9	High	1		Unknown		Comments: broad host-range, no incompatibility system, conjugative, no active partition

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, 9 u stafylokoků atd.**

Důkaz přítomnosti plazmidu v bakteriálních buňkách

1. **Elektroforéza po izolaci plazmidové DNA**
2. **Průkaz CCC DNA v elektronovém mikroskopu.**
3. **Centrifugační metody:**
 - důkaz satelitního pruhu v sacharozovém gradientu podle S.
 - důkaz v CsCl-EB podle konformace CCC, LIN a OC.

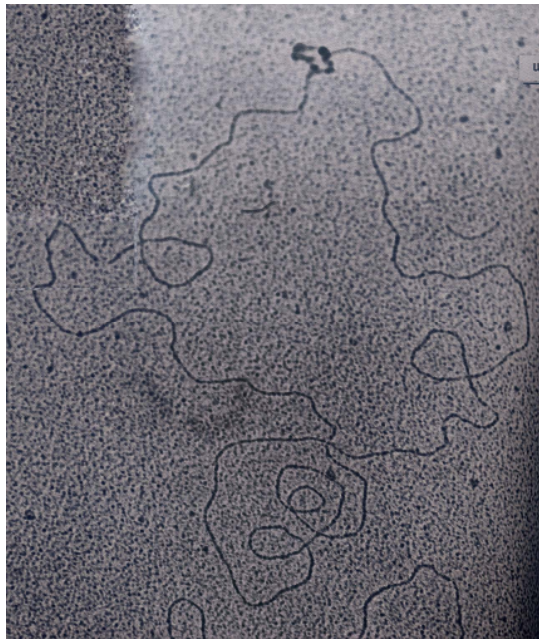
Charakterizace plazmidů

- 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.

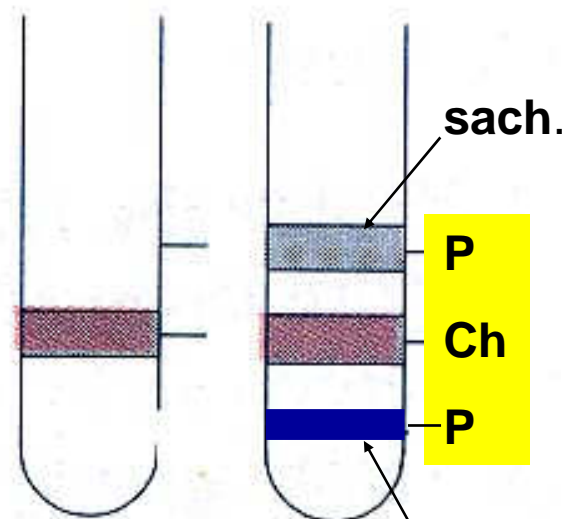
Důkaz přítomnosti plazmidu v bakteriálních buňkách

1. Průkaz DNA v elektronovém mikroskopu
2. Centrifugační metody: důkaz satelitního pruhu po centrifugaci
3. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

1.



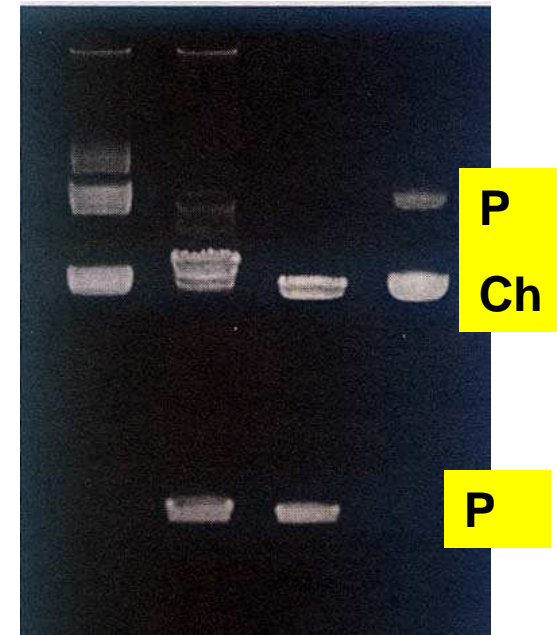
2.



CsCl

(CsCl-EB)

3.



DŮKAZ PROTEINŮ KÓDOVANÝCH PLAZMIDEM (*E. coli*)

- **A. Systém využívající minibuňky:** není přítomen chromozom, ale plasmidy (inkubovány v minimálním mediu za přítomnosti značených aminokyselin (35S-metionin). Proteiny jsou detekovány na SDS-PAGE a prokázány autoradiograficky.
- **B. Systém využívající maxibuňky.** Po ozáření UV-světlem se chromozomové geny v důsledku poškození neexprimují, většina plasmidů 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), který se skládá z testované plasmidové 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.

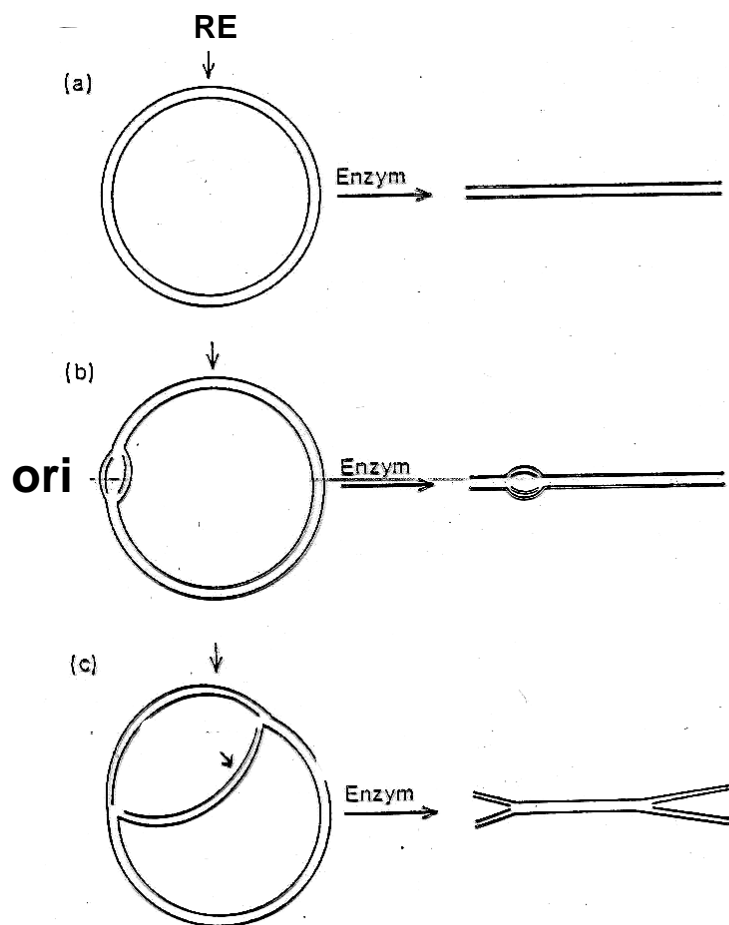
ODSTRAŇOVÁNÍ PLAZMIDŮ („plasmid CURING“, LÉČENÍ)

změna fenotypu = důkaz, že určitá funkce je spjata s přítomností plazmidu

- **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 b. membráně
- **E: Další metody:**
Zvýšená teplota, skladování kultur, regenerace protoplastů

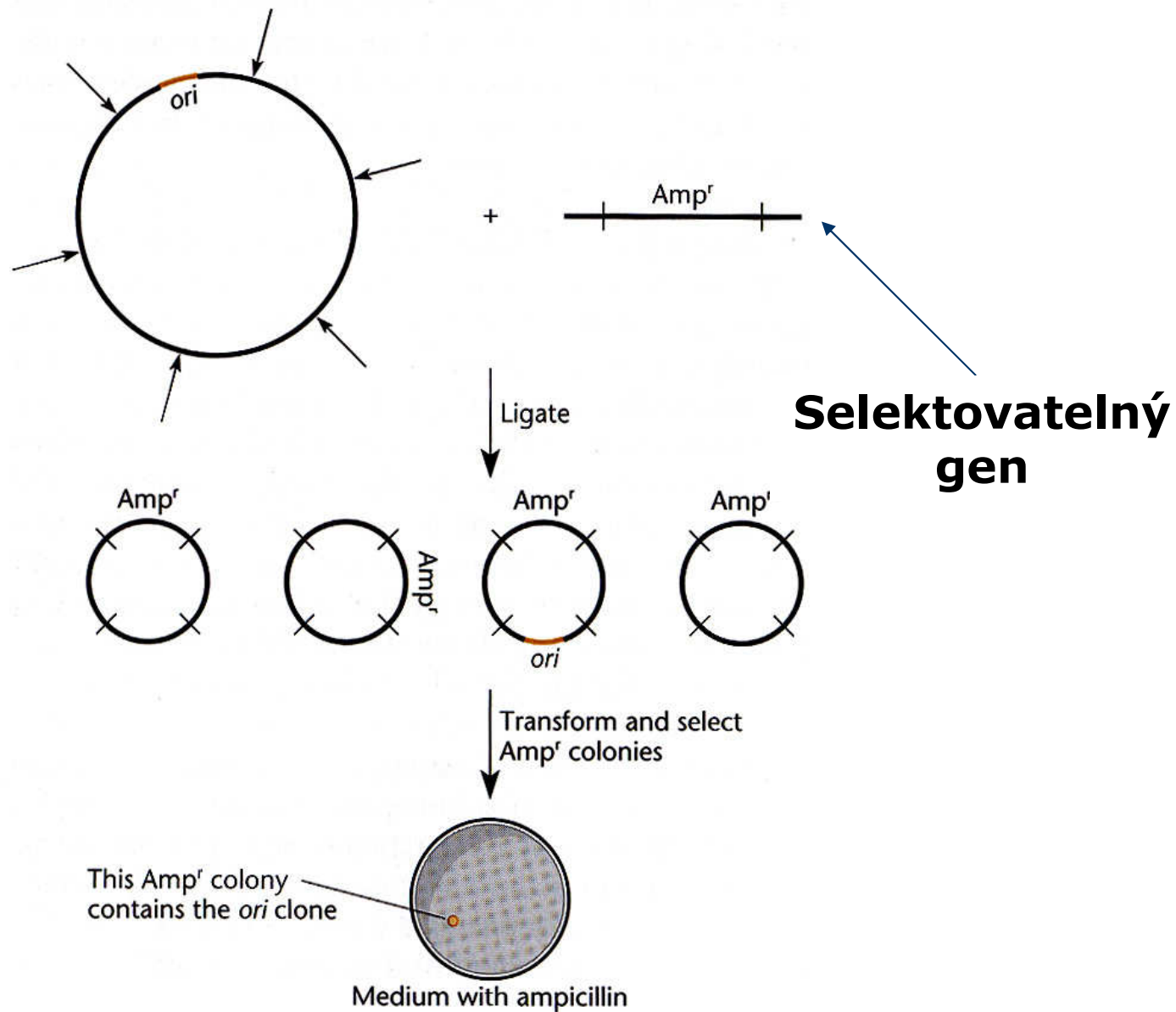
Komplementární přístup: přenos plazmidu do bezplazmidových buněk

LOKALIZACE ORI NA PLAZMIDOVÉ MOLEKULE, STANOVENÍ ZPŮSOBU REPLIKACE



Štěpení plazmidů
v různých stádiích
replikace restričním
enzymem, sledování
struktury v EM

VYHLEDÁVÁNÍ (IZOLACE) POČÁTKU REPLIKACE (ORI) NA PLAZMIDU



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)

Plasmid	Approximate copy number
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.

STANOVENÍ POČTU PLAZMIDOVÝCH KOPIÍ

POČET KOPIÍ =

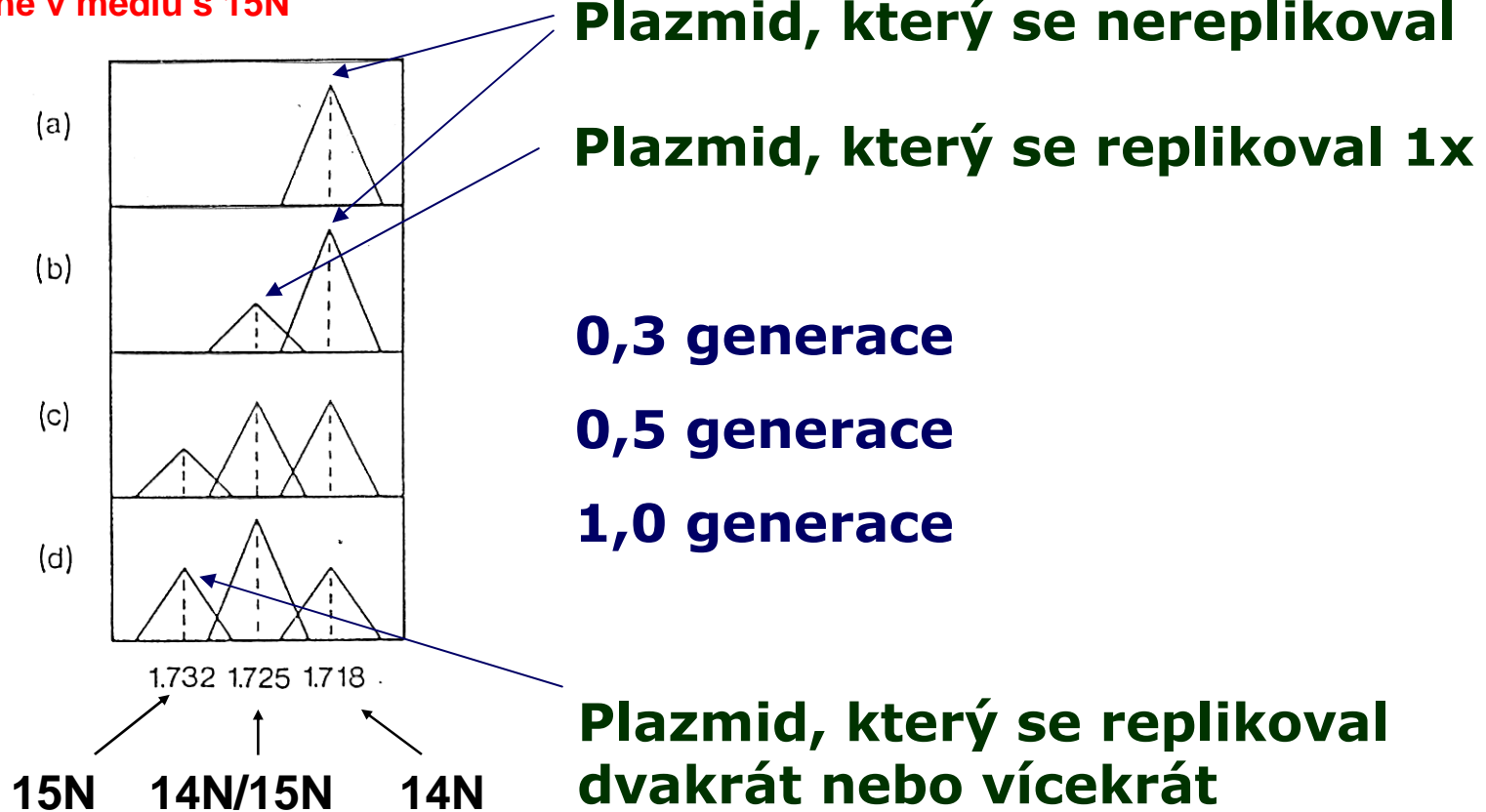
$$\frac{\text{velikost chromozomu (kb)}}{\text{velikost plazmidu (kb)}} \times \frac{\text{radioaktivita plazmidu (cpm)}}{\text{radioaktivita chromozomu (cpm)}}$$

-Ultracentrifugace v CsCl-EB s radioaktivně značenou DNA, stanovení radioaktivity v jednotlivých frakcích (pruzích)

-Elektroforéza v gelu, stanovení množství DNA (densitometricky)

STANOVENÍ ČETNOSTI REPLIKACE PLAZMIDŮ CENTRIFUGACÍ V GRADIENTU CsCl

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



MECHANISMY REPLIKACE PLAZMIDŮ

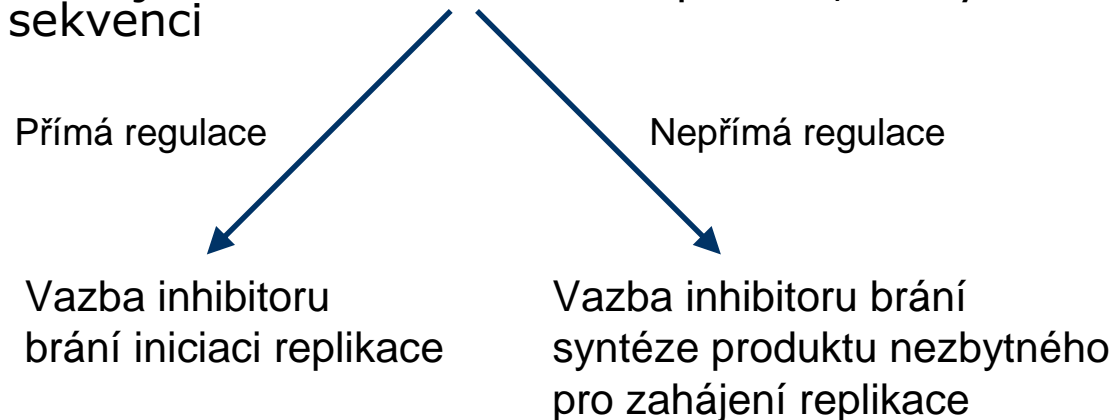
Začíná ve specifickém místě (*oriV*)(n. *oriT*)
vytvořením volné 3' OH skupiny (buď
RNA-primer, nebo zlom DNA)

- malé plazmidy:
 - mechanismus otáčivé kružnice (**RC-plazmidy**)
- velké plazmidy: (**theta mechanismus**)
 - mechanismus podobný replikaci chromozomu
 - je vyžadován 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

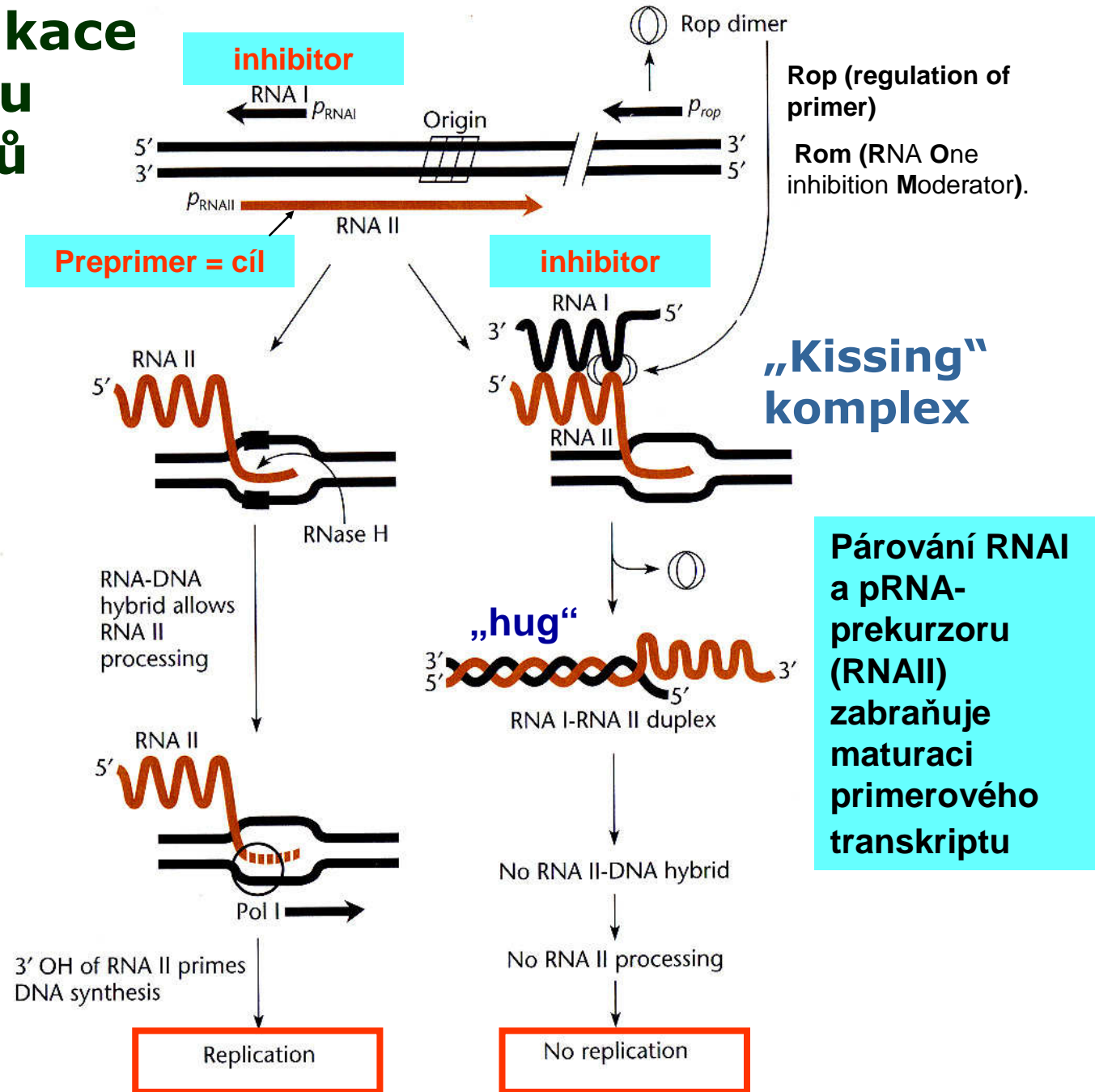
- Plazmid kóduje difuzibilní inhibitor replikace, který se váže na cílovou sekvenci



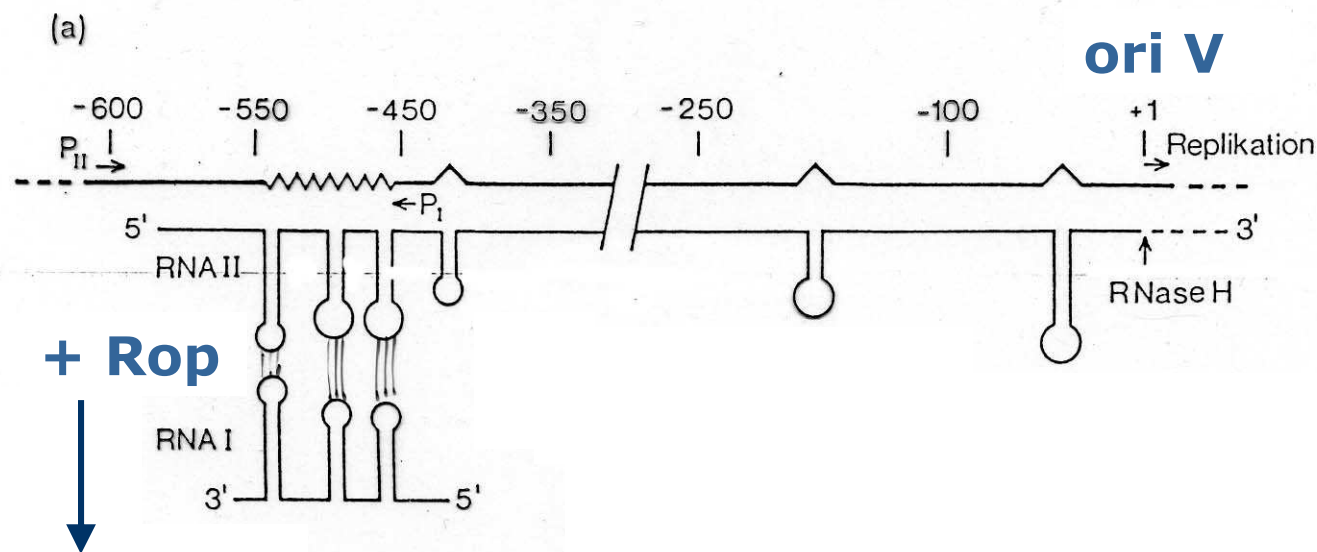
□ Iteronová strategie

- 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 ColE1 plazmidu a jeho derivátů

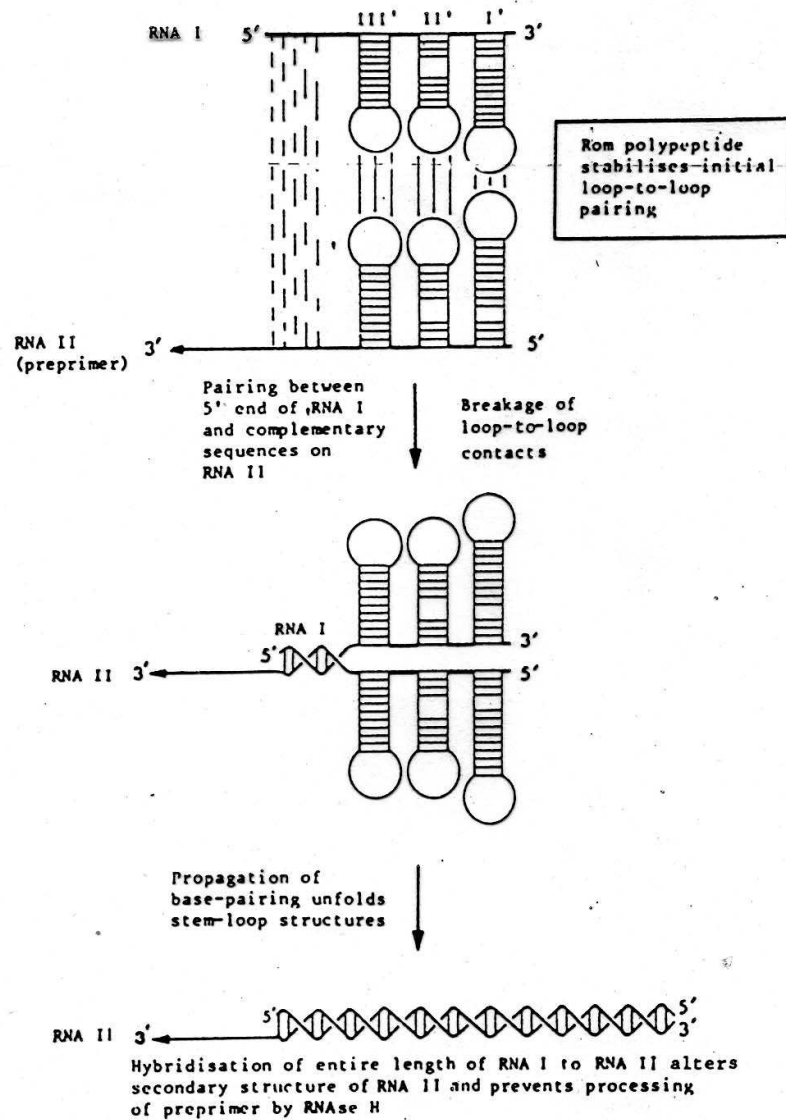


INTERAKCE RNAI S RNAII PŘI INCIACI REPLIKACE ColE1



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

Po spárování RNAI a RNAII se změjí sekundární struktura RNAII (preprimeru), který pak není RNázou H upraven na primer



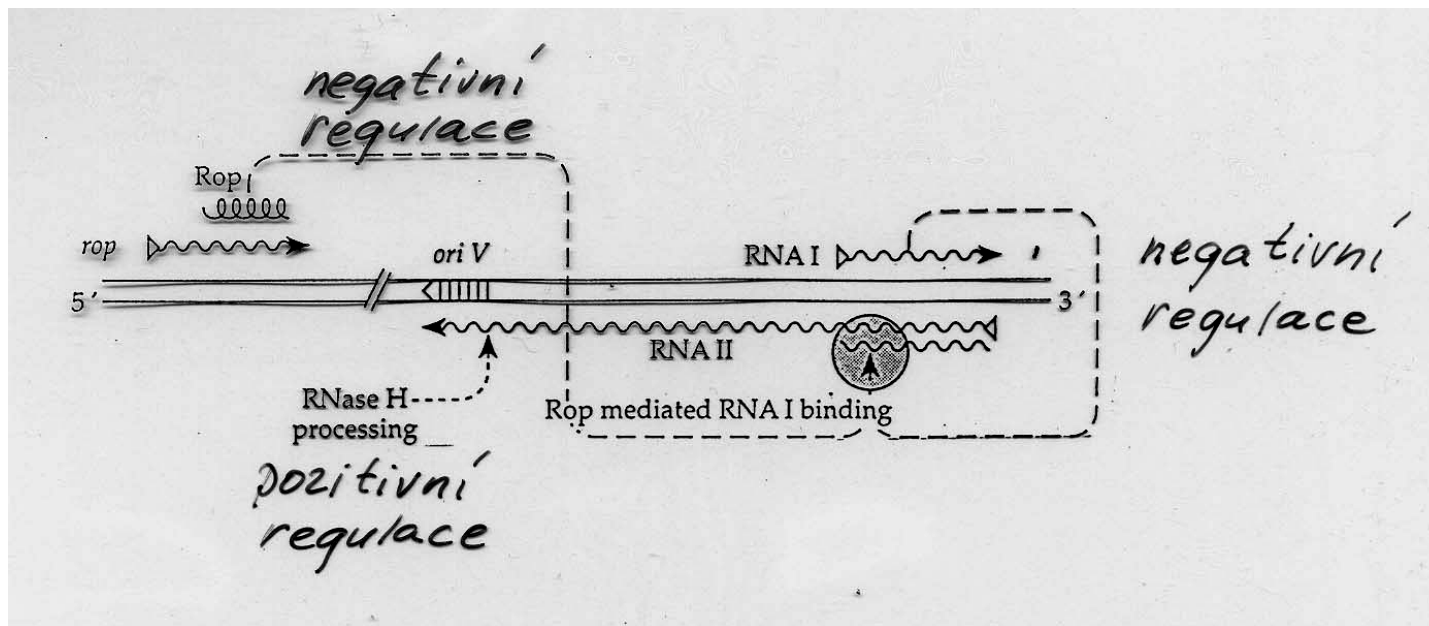
**Interakce RNAI, RNAII
a proteinu Rom (~Rop)
při iniciaci replikace
ColE1 plazmidu**



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

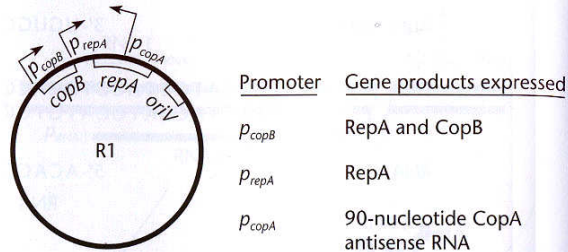
REGULACE REPLIKACE PLAZMIDU CoIE1

- RNAI (inhibitor) je syntetizován konstitutivně a ve vyšší koncentraci než než preprimerová RNAII. **Rostoucí bakterie zvětšuje objem, čímž se snižuje pravděpodobnost interakce RNAI a RNAII a dochází k zahájení replikace.** Další možnost regulace je dána působením proteinu Rop, jehož množství v buňkách může kolísat (regulace na úrovni transkripce nebo translace, případně jeho stabilita)

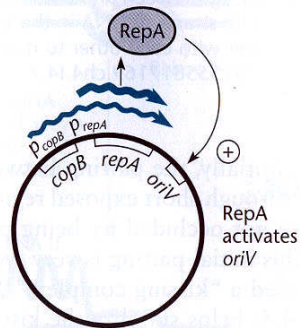


Regulace replikace plazmidu R1 (IncFII) – antisense RNA je využívána k potlačení translace mRNA pro RepA protein

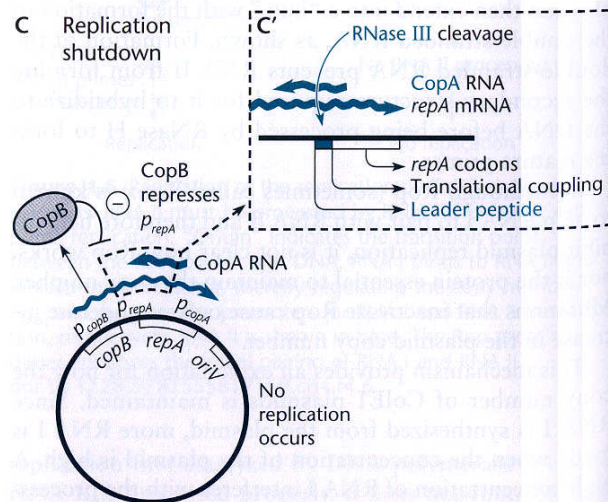
A Plasmid genetic organization



B Replication occurs after plasmid enters cells



C Replication shutdown



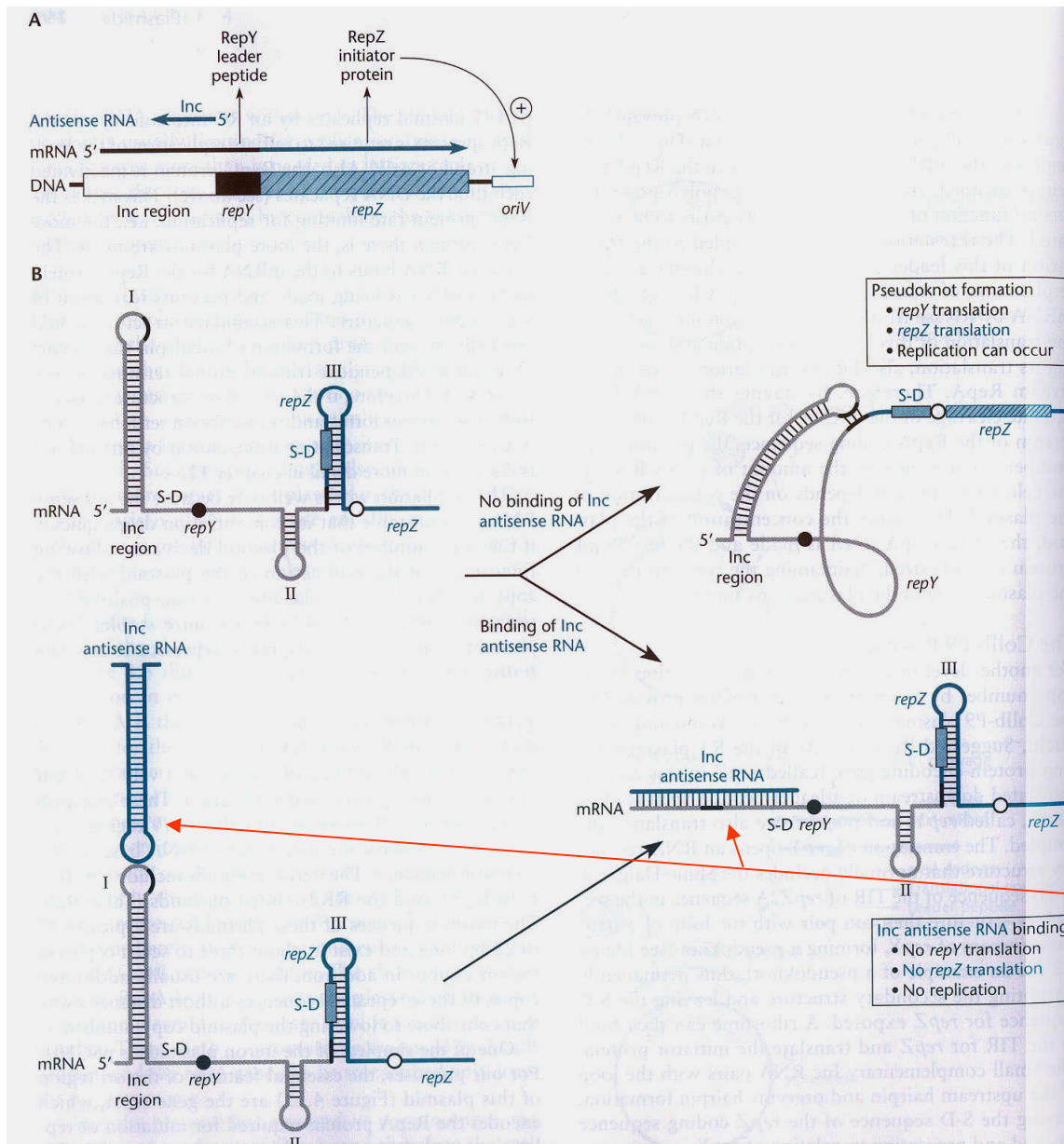
Umístění promotorů, genů a genových produktů týkajících se replikace

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 štěpena RNázou III. To zabrání translaci RepA, která je translačně spojena s vedoucím peptidem.

Regulace replikace prostřednictvím komplementární RNA u plazmidu colIP9

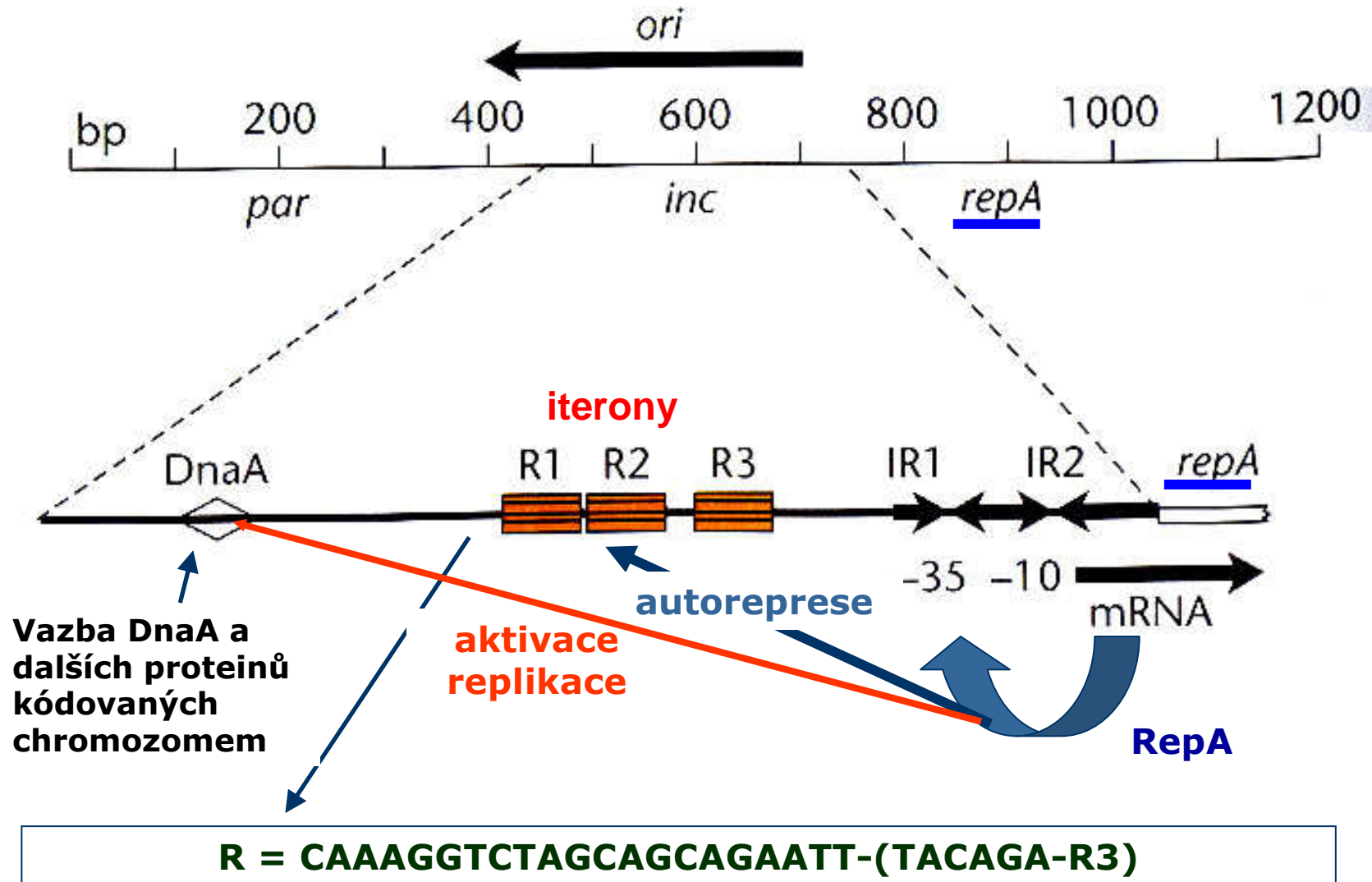


Podobně jako u R1 plazmidu je gen kodující protein Rep (zde je to repZ) translatován po směru transkripce od ORF vedoucího peptidu zvaného repY a tyto dva jsou rovněž translačně napojeny. Translace repY otevírá sekundární strukturu na RNA, která uzavírá SD sekvenci TIR (translační iniciační oblast genu repZ). Sekvence v sekundární struktuře se pak může párovat se smyčkou vlásenky upstream 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, ponechávající 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 spojeny.**

KONTROLA REPLIKACE ITERONOVÝCH PLAZMIDŮ

- Plazmid kóduje difuzibilní iniciační protein Rep, který se váže na řadu **17-22 bp dlouhých přímých opakování - iteronů v oblasti oriV** (různý počet u různých plazmidů).
- **Tento protein má následující vlastnosti:**
 - iniciuje nové cykly replikace
 - může zabraňovat replikaci
 - funguje jako 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.**

PŮSOBENÍ PROTEINU RepA NA INICIACI REPLIKACE U ITERONOVÉHO PLAZMIDU pSC101

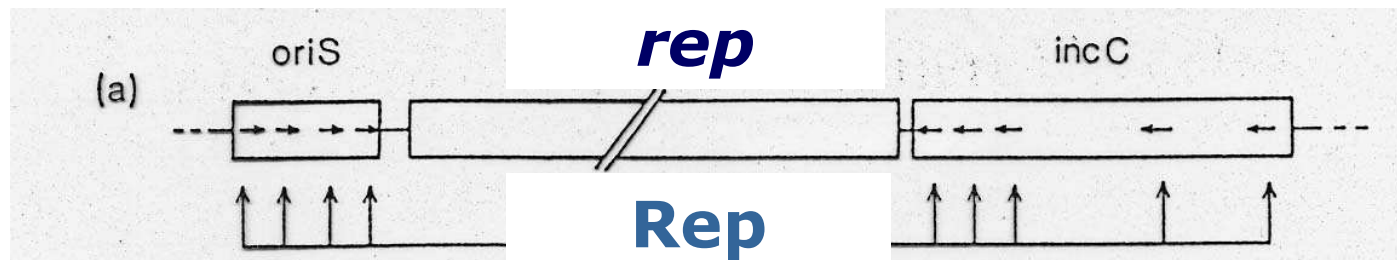


nízká koncentrace RepA → replikace; vysoká koncentrace RepA → autoreprese

KONTROLA REGULACE INICIACE REPLIKACE PLAZMIDU F

čtyři L-iterony

pět R-iteronů



Slabší vazba Rep
iniciace replikace při vyšších koncentracích Rep

Silnější vazba Rep
zábrana replikace při nízkých koncentracích Rep

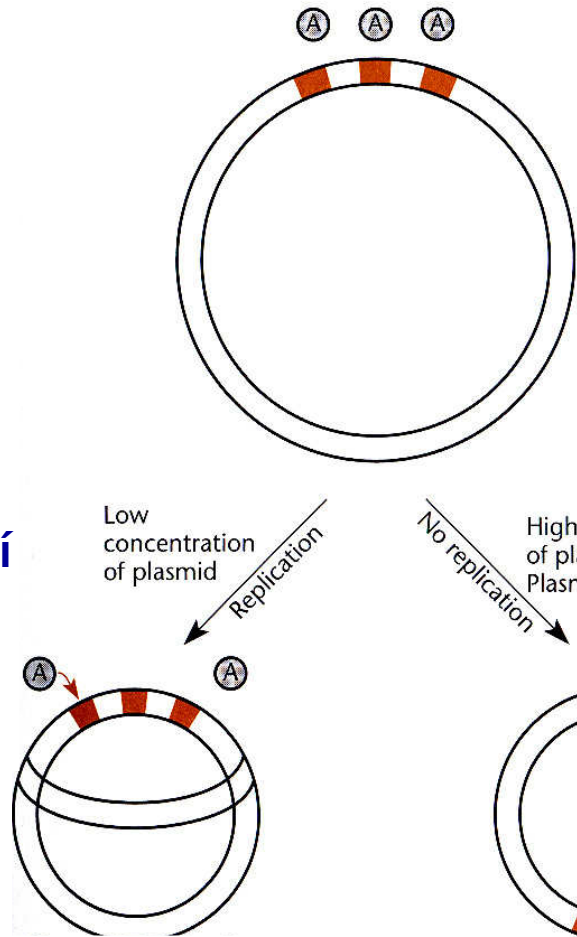
Experimentální pozorování: delece R-iteronů vede ke zvýšení a adice dodatečných R-iteronů ke snížení počtu kopií

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**

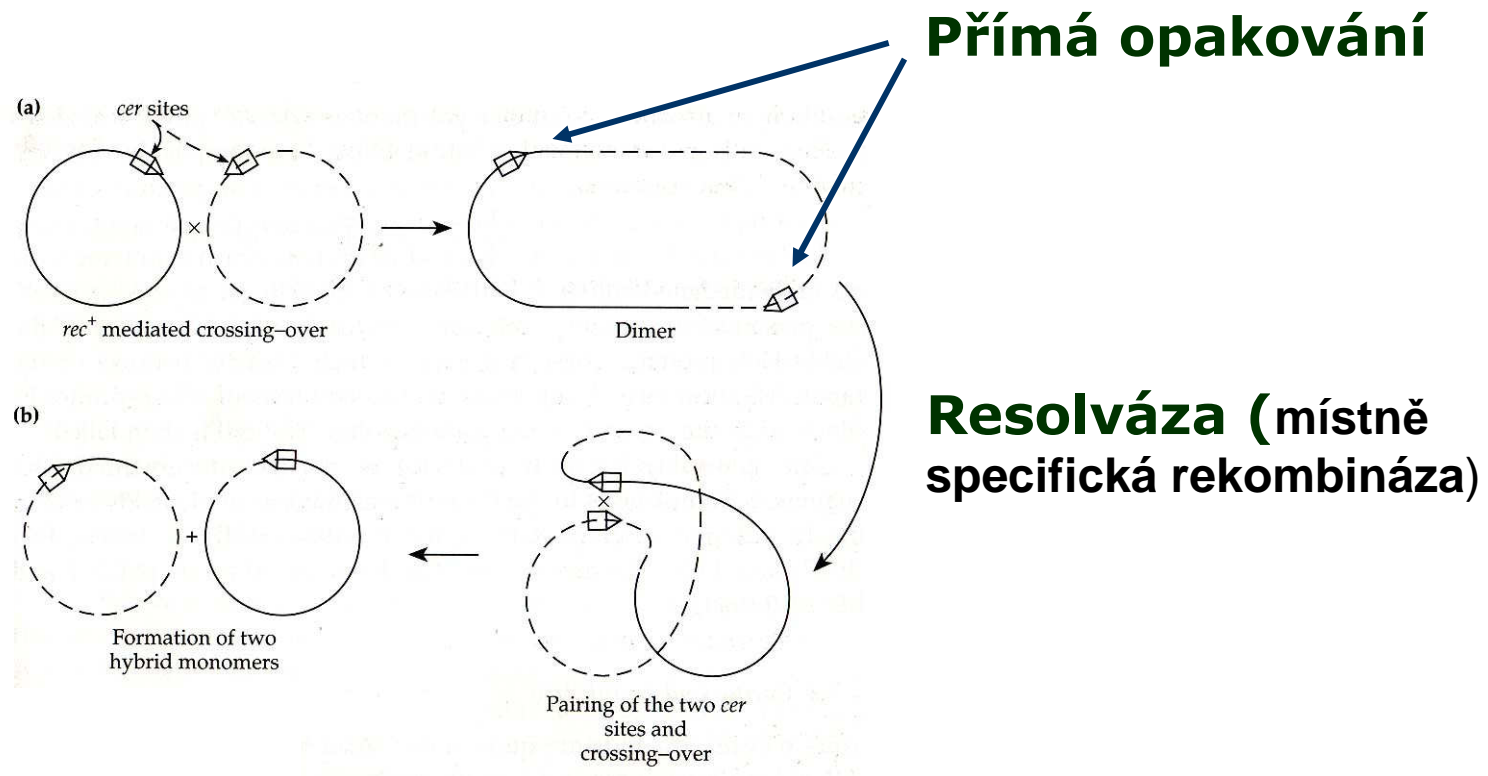
RepA se váže na
dva plazmidy
současně a spojuje
je, čímž brání
replikaci

↓
Důkaz EM

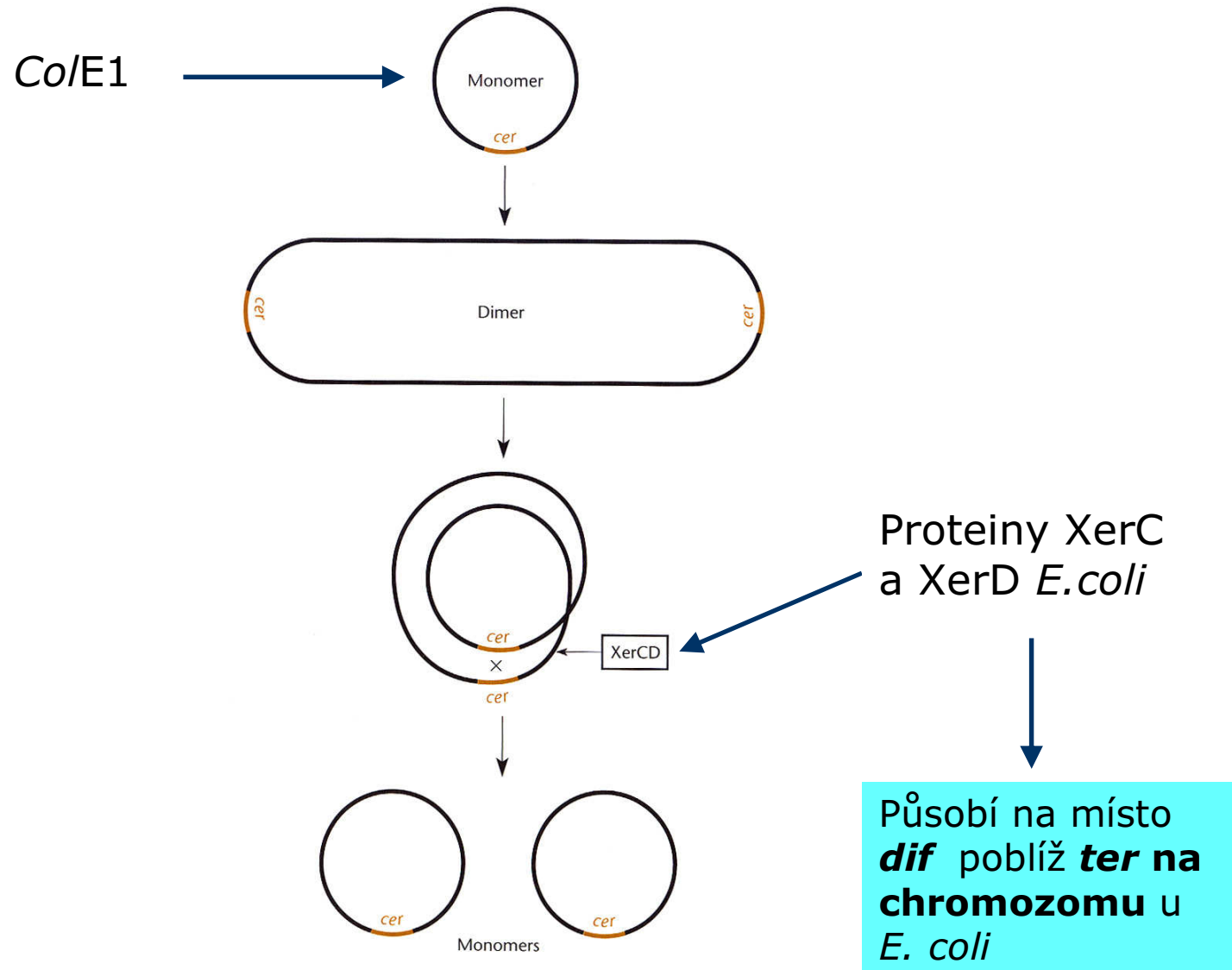
MECHANISMY ZAJIŠŤUJÍCÍ STABILNÍ UDRŽENÍ PLAZMIDŮ V BUŇKÁCH (SEGREGAČNÍ STABILITA PLAZMIDŮ)

- 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)

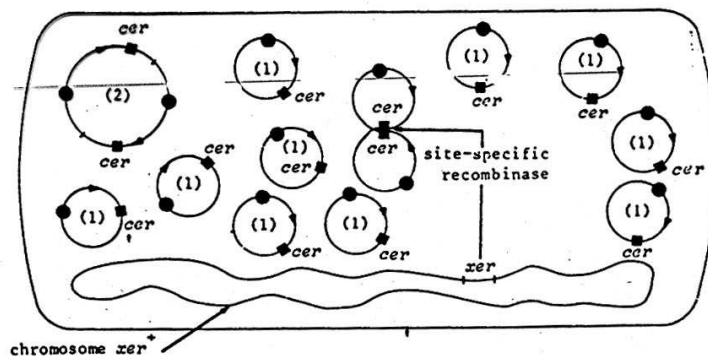
SYSTÉM PRO ROZDĚLOVÁNÍ MULTIMERNÍCH PLAZMIDOVÝCH FOREM



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



ZAJIŠTĚNÍ POČTU KOPIÍ SYSTÉMEM CER A XER

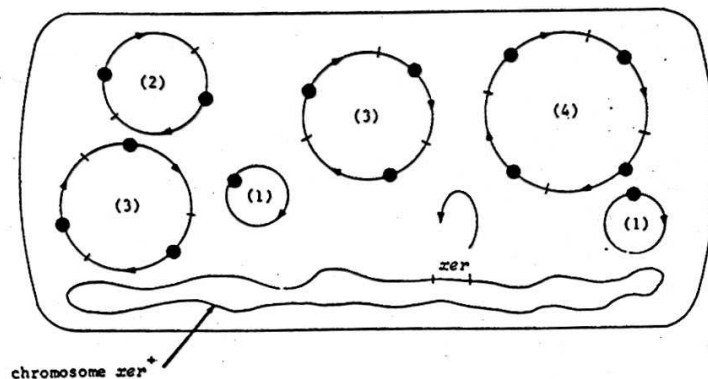


Plazmid
obsahuje cer

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

↓ Cell division

nízká pravděpodobnost vzniku bezplazmidových buněk



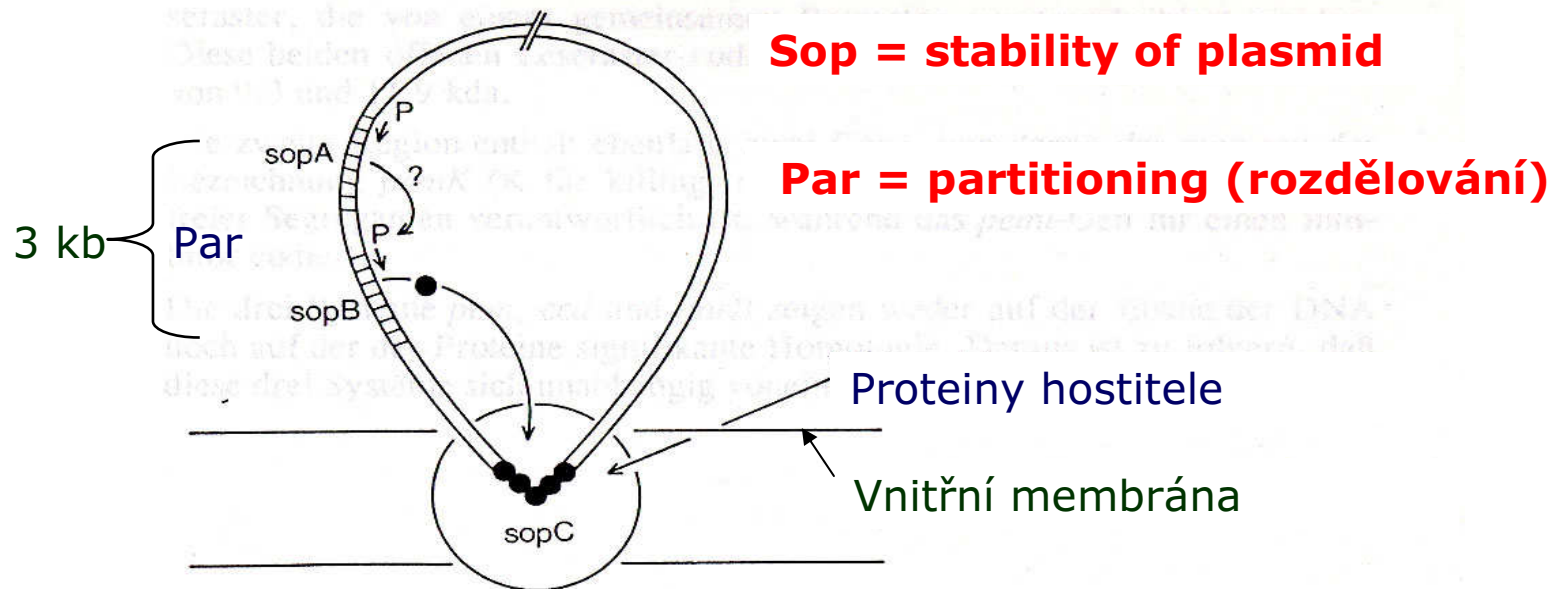
Plazmid
neobsahuje cer

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

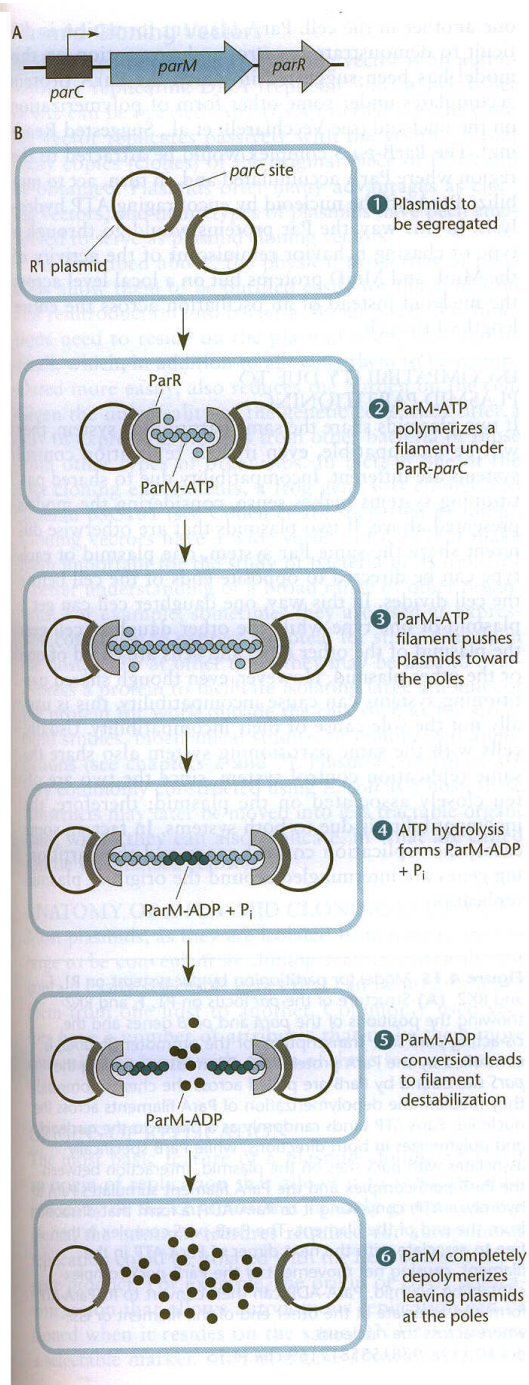
↓ Cell division

vysoká pravděpodobnost vzniku bezplazmidových buněk

MODEL PŮSOBENÍ 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 hydrolyze *ParM*-ATP na *ParM*-ADP.

Intracelulární lokalizace plazmidů

Metoda: využití fluorescenčního značení proteinů vázajících se na sekvence plazmidů

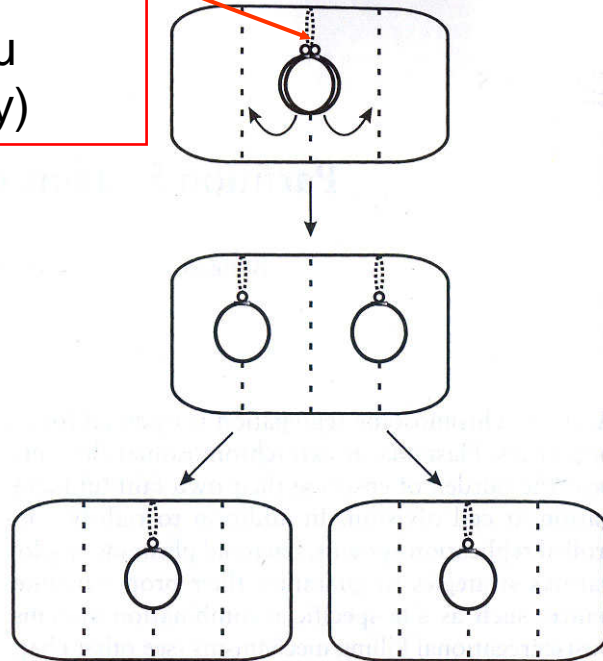
Závěry:

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)

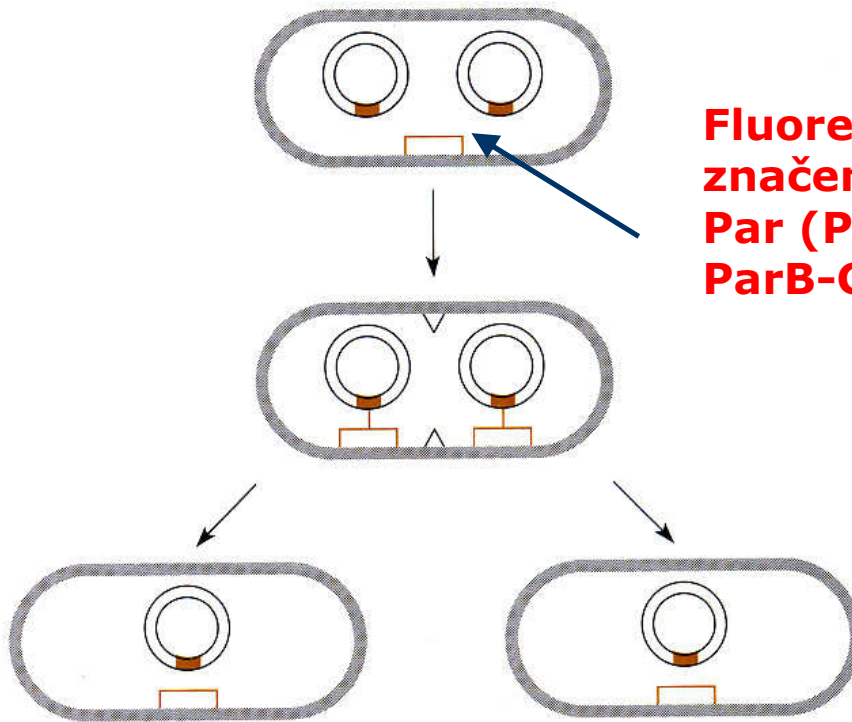


Nově zreplikované plazmidy umístěné ve středu buňky se oddělí a přesunou do první a třetí čtvrtiny ještě před tvorbou septa

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

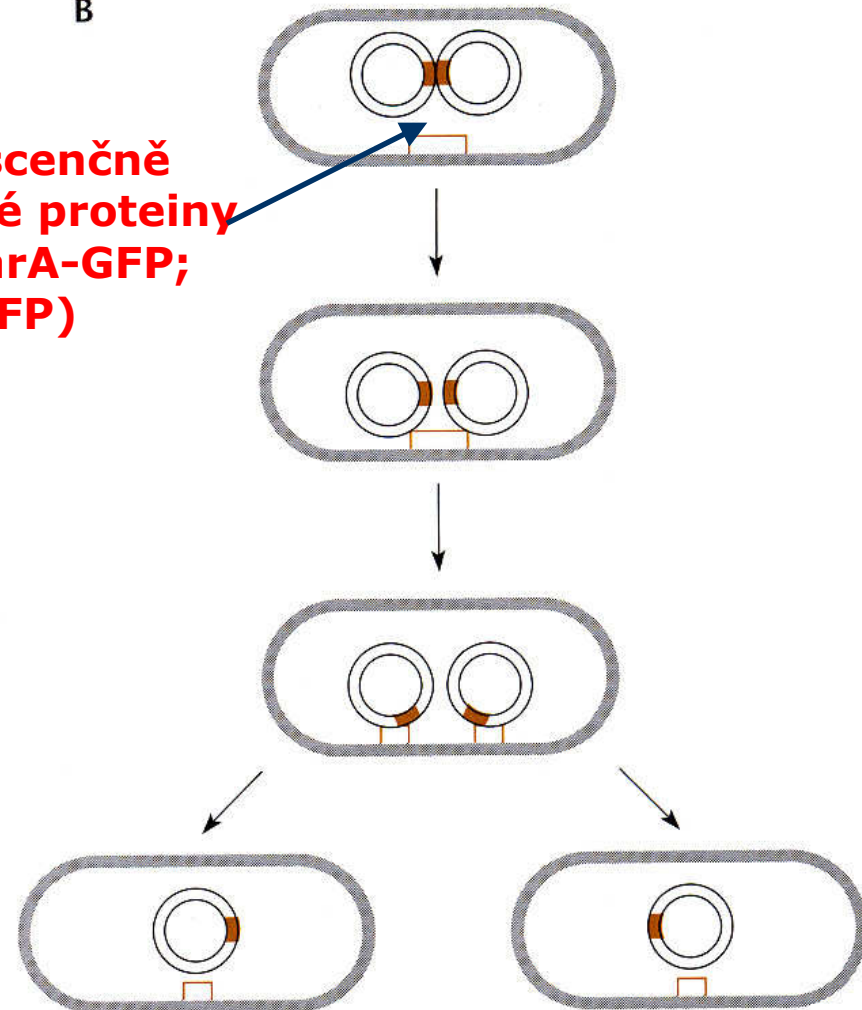
MODELY ZNÁZORŇUJÍCÍ FUNKCI MÍST PAR U PLAZMIDŮ F A RP1

A



A. Plazmid se váže na místo par na membráně. Při dělení buňky jsou kopie plazmidu přichyceny na rozdělená místa par a taženy do dceřinných buněk

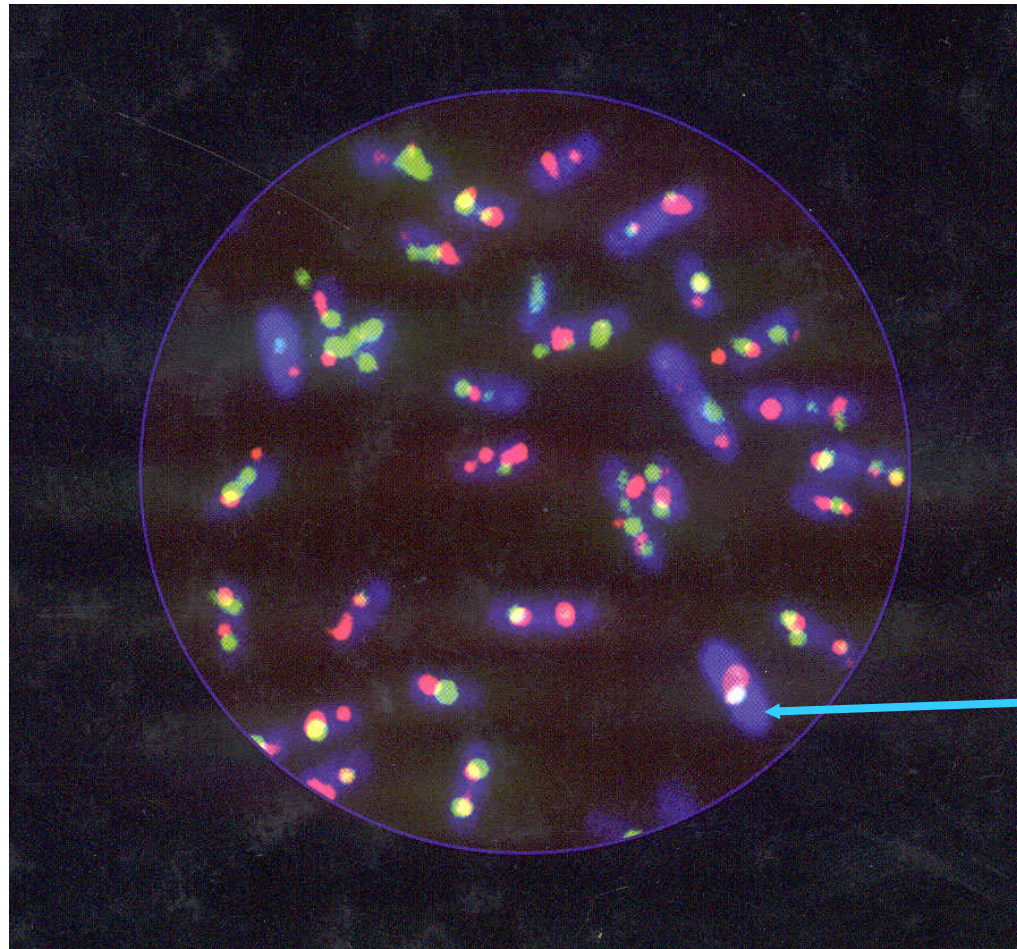
B



B. Dvě kopie plazmidu se nejdříve navážou na místo par a při jeho rozdělení jsou odděleny

Fluorescenčně
značené proteiny
Par (ParA-GFP;
ParB-GFP)

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



F - červená

P1 - zelená

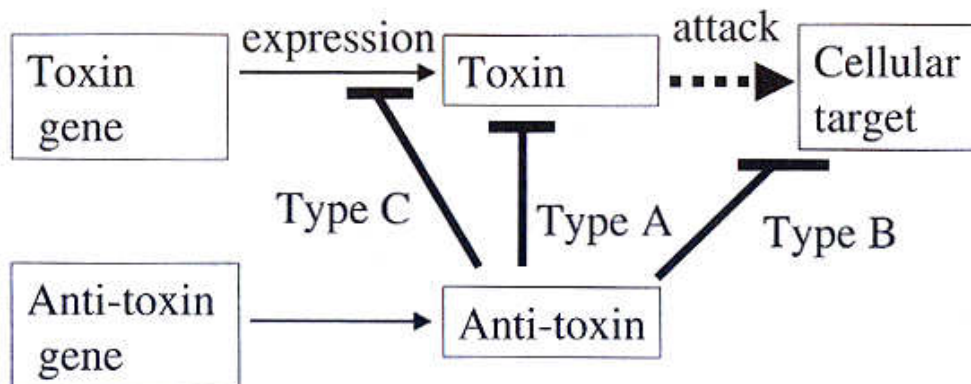
Membrána
- modrá

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

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

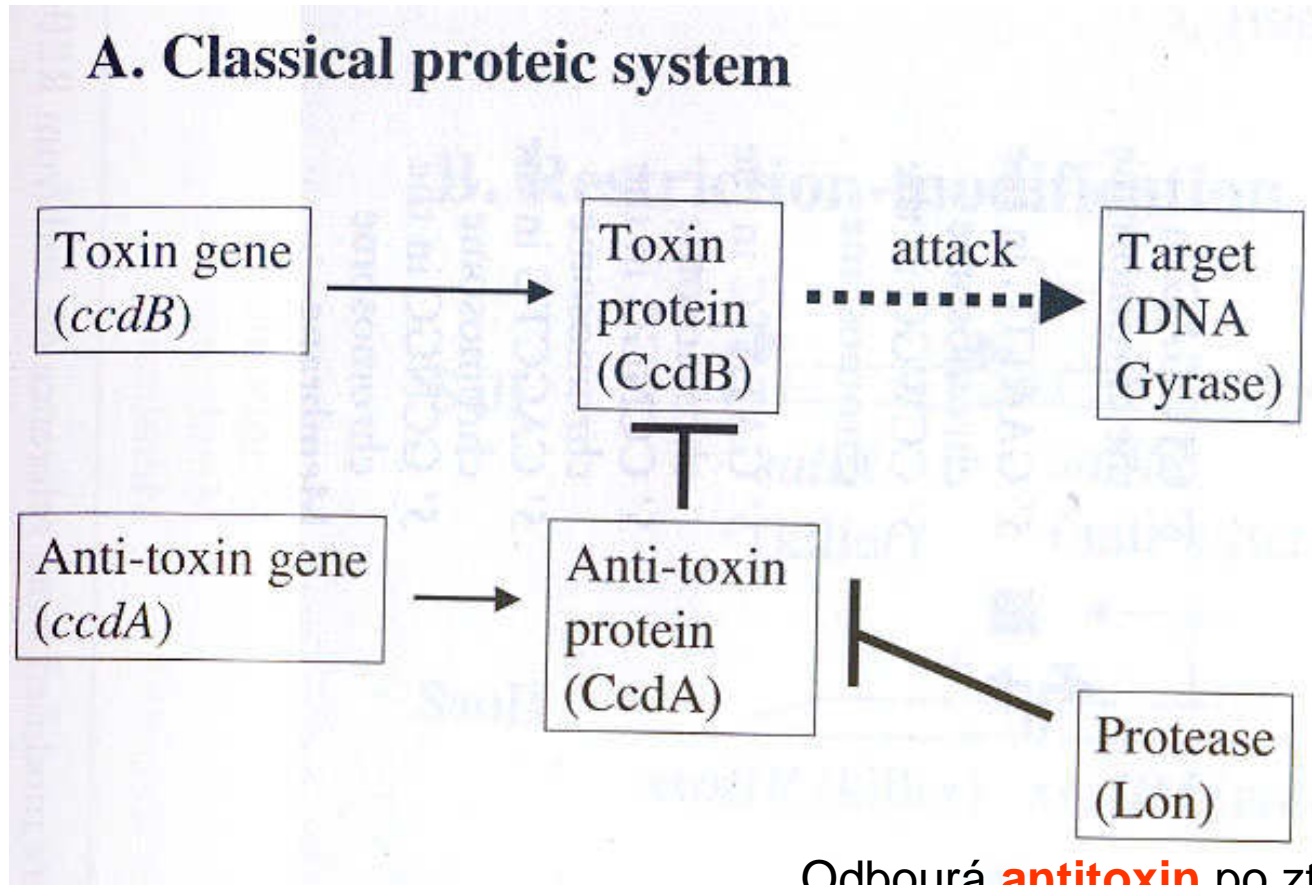
Type	Action of antitoxin ^a	Known subtype	Example of gene complexes	Reference
A	Interaction with toxin	Classical proteic killer systems	<i>ccd</i>	99
B	Protection of toxin's target	Restriction-modification systems	<i>ecoRI</i>	164
C	Inhibition of toxin's expression	Antisense-RNA-regulated systems	<i>hok/sok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

^aClassification based on that of Michael Yarmolinsky (267, 268).

Toxin: napadá životně důležité molekuly v buňce

Antitoxin: eliminuje působení toxinu

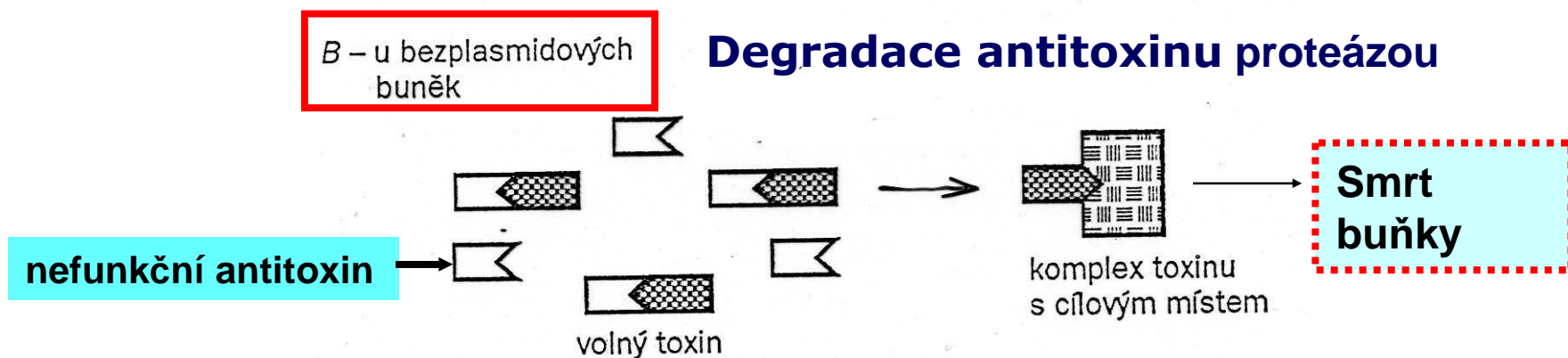
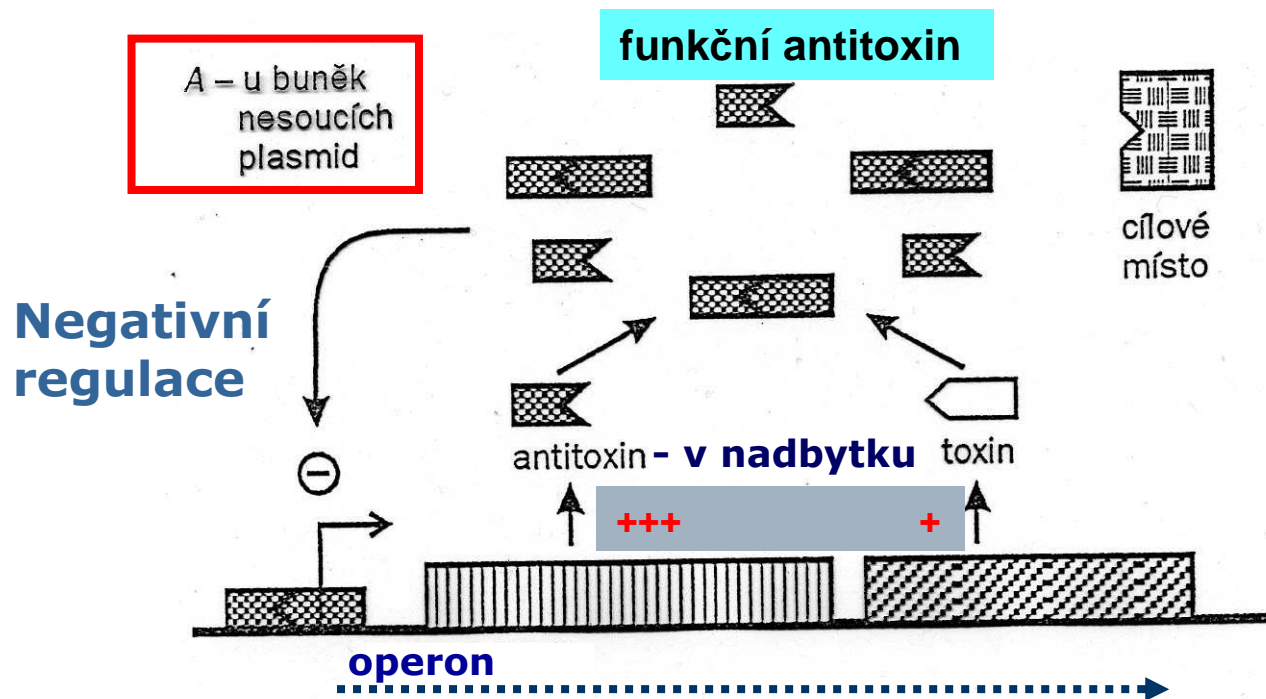
A. Classical proteic system



Odbourá **antitoxin** po ztrátě plazmidu

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

POSTSEGREGAČNÍ USMRČOVÁNÍ BEZPLAZMIDOVÝCH BUNĚK PŮSOBENÍM PROTEINOVÝCH SYSTÉMŮ

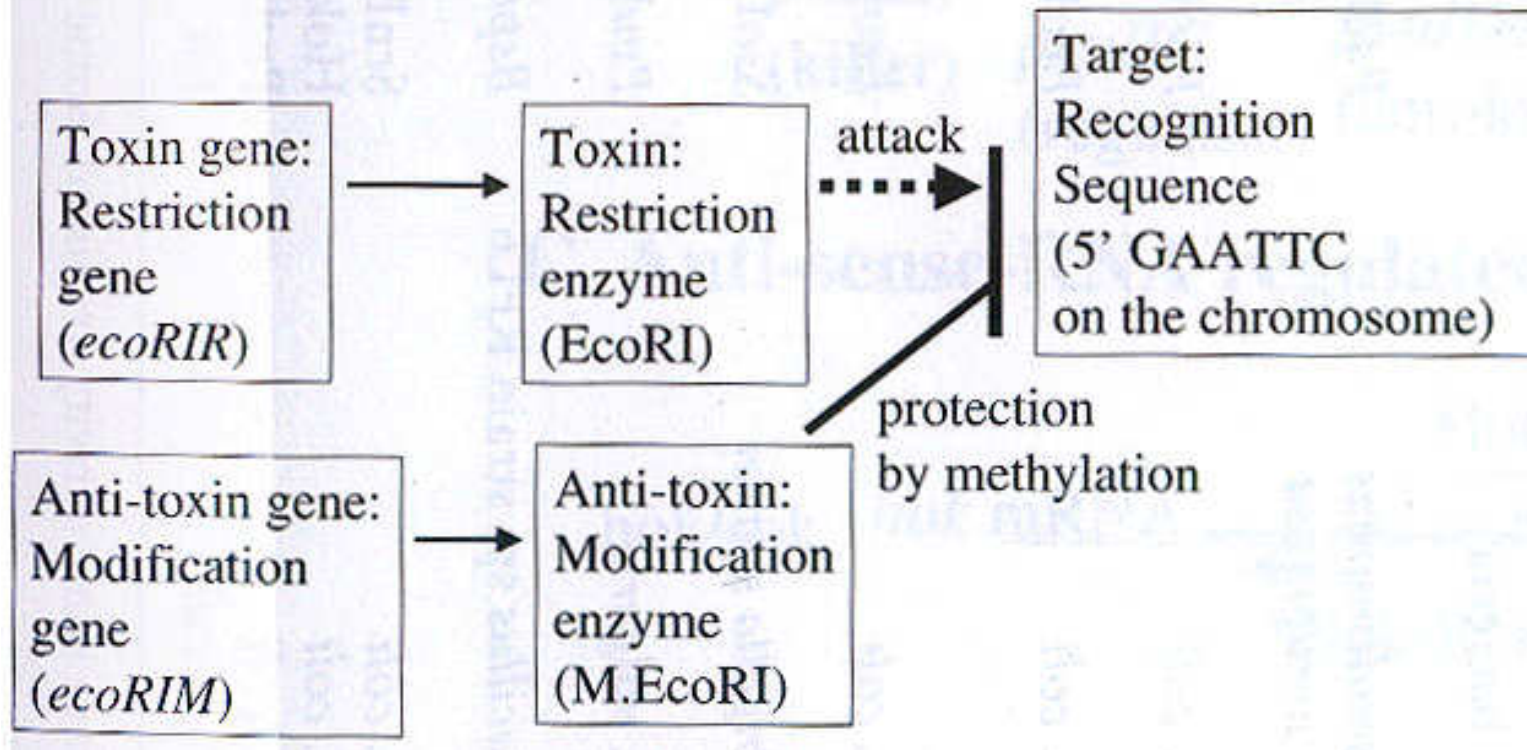


SLOŽKY PROTEINOVÝCH SYSTÉMŮ PRO UDRŽENÍ PLAZMIDU V BUŇCE

Plasmid	System	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)	?	ClpXP

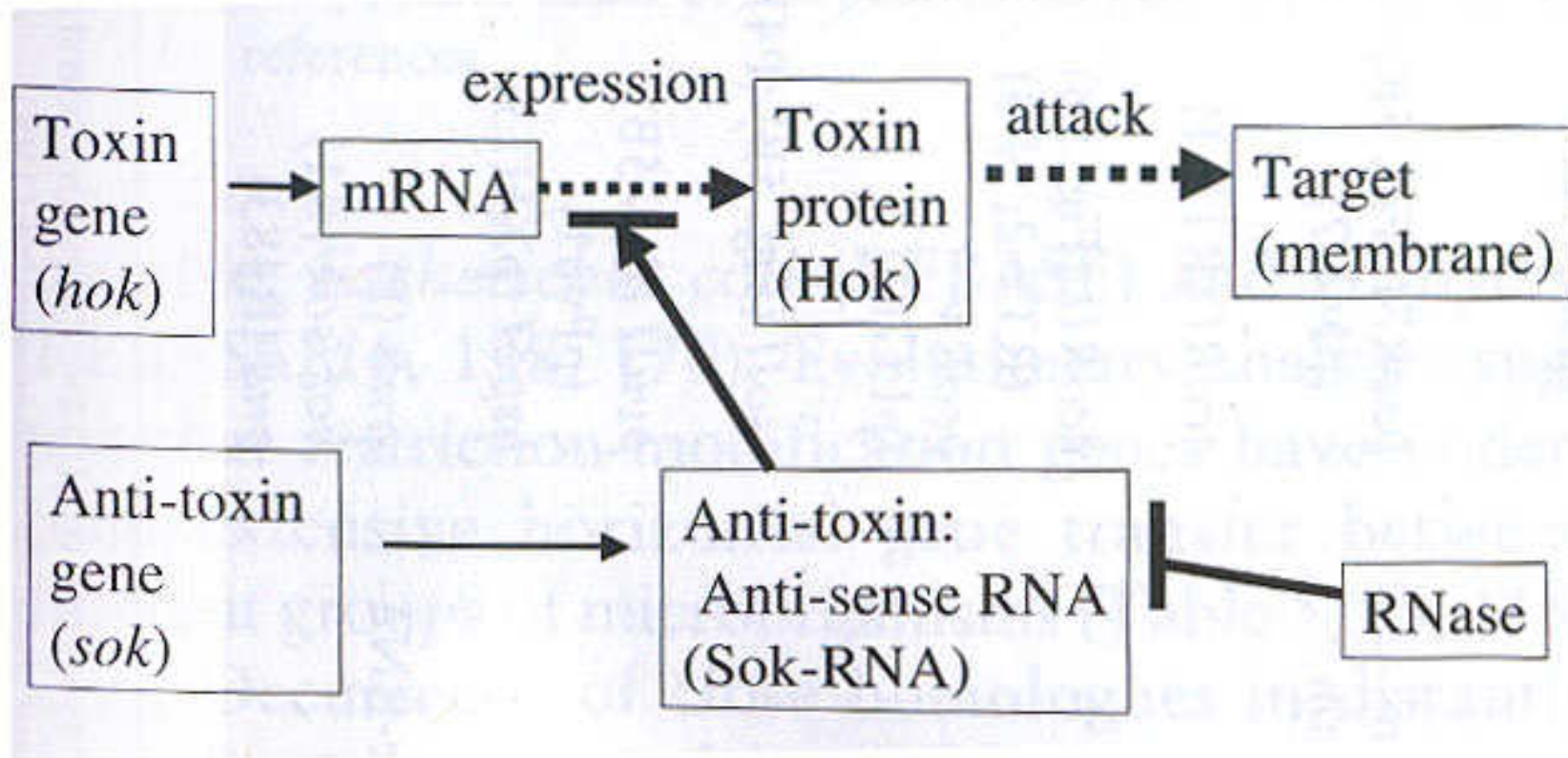
- Proteiny pro replikaci chromozomu buňky

B. Restriction-modification system



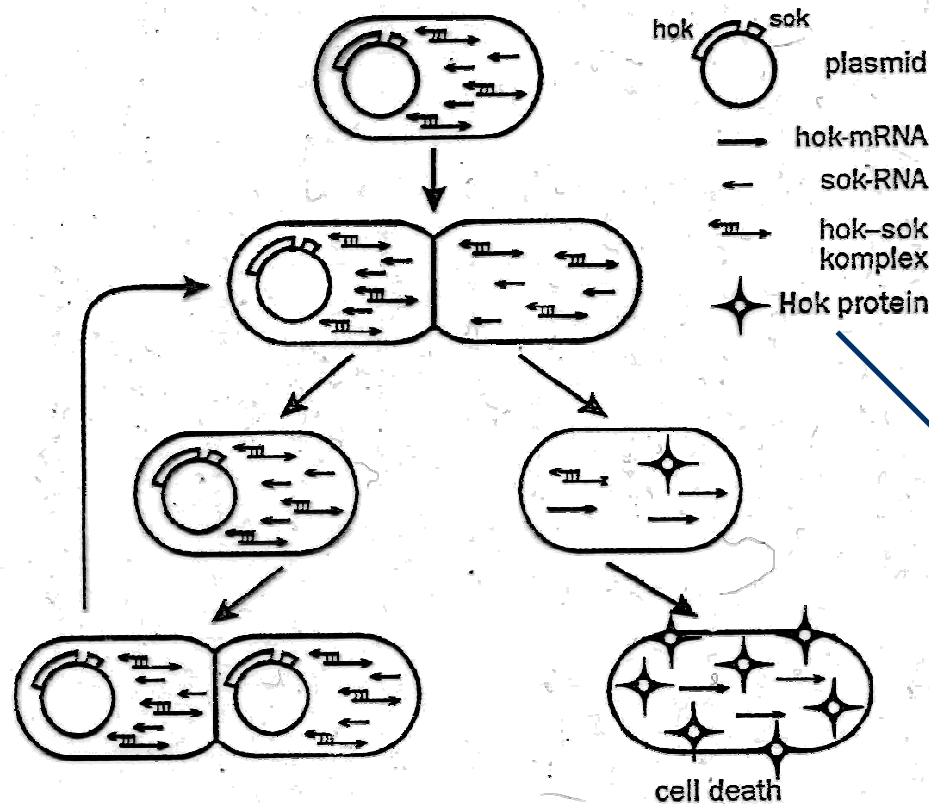
- RM-systémy typu II nesené na plazmidu (např. *EcoRI*)

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**)



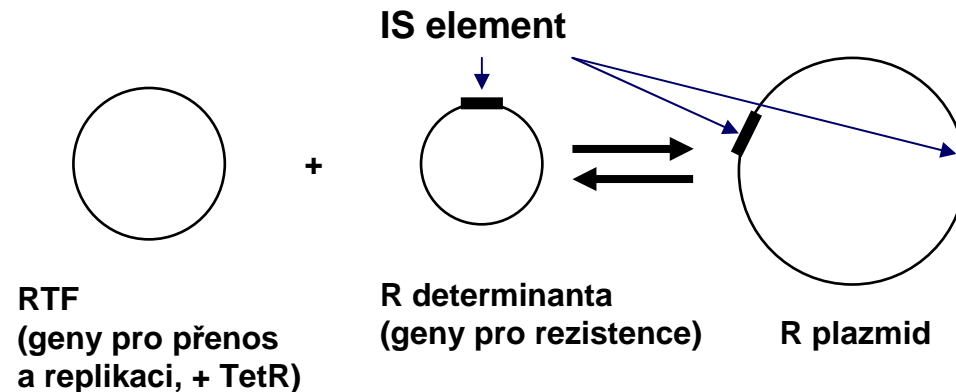
Antisense sok-RNA je nestabilní a po ztrátě plazmidu z buněk rychle zmizí

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

Plazmidy zodpovědné za rezistenci bakterií k antibiotikům (R-plazmidy)

SLOŽKY R-PLAZMIDŮ

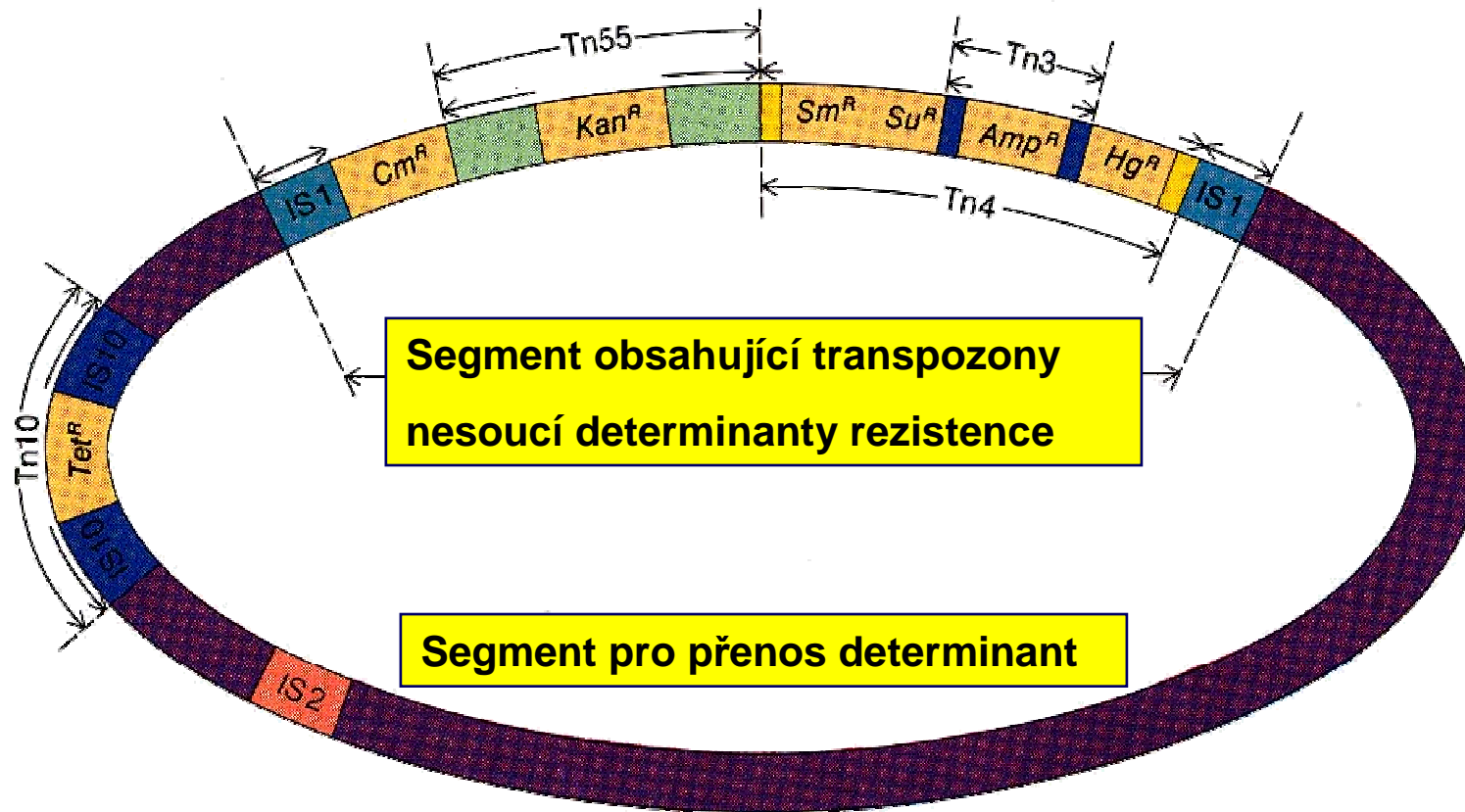
- 1. **Resistance transfer factor (RTF)** – nese geny regulující DNA replikaci a počet kopií, geny pro přenos a někdy geny pro rezistenci k tetracyklinu.
- 2. **R determinanta** – má různou velikost a nese další geny pro rezistenci k antibiotikům – obvykle ampicilinu, chloramfenikolu, streptomycinu,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

PŘÍKLADY BAKTERIÁLNÍCH DRUHŮ PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIOCINY

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

STRUKTURA F PLAZMIDU (100 kb, 49% GC)

60 genů rozdělených podle funkce do 5 oblastí

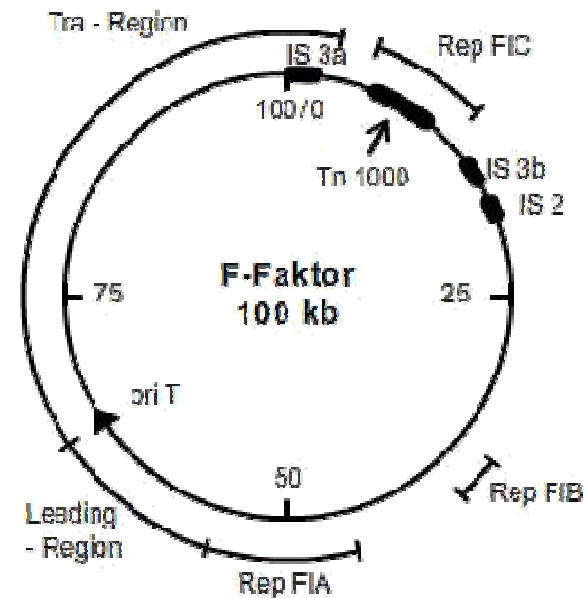
- **1. Tranferová oblast**
33 kb, 31 genů všechny funkce nezbytné pro přenos.
 - Biosyntéza a sestavování F pilu (traA,B,C,E,F,G,H,L,K,Q,U,V,W)
 - Stabilizace párujících se buněk (traG,N)
 - Konjugativní metabolismus DNA (traD,I,M,Y,Z)
 - Regulace přenosu (traJ,finO,finP)
 - Povrchová exkluze (traS,T)

- **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

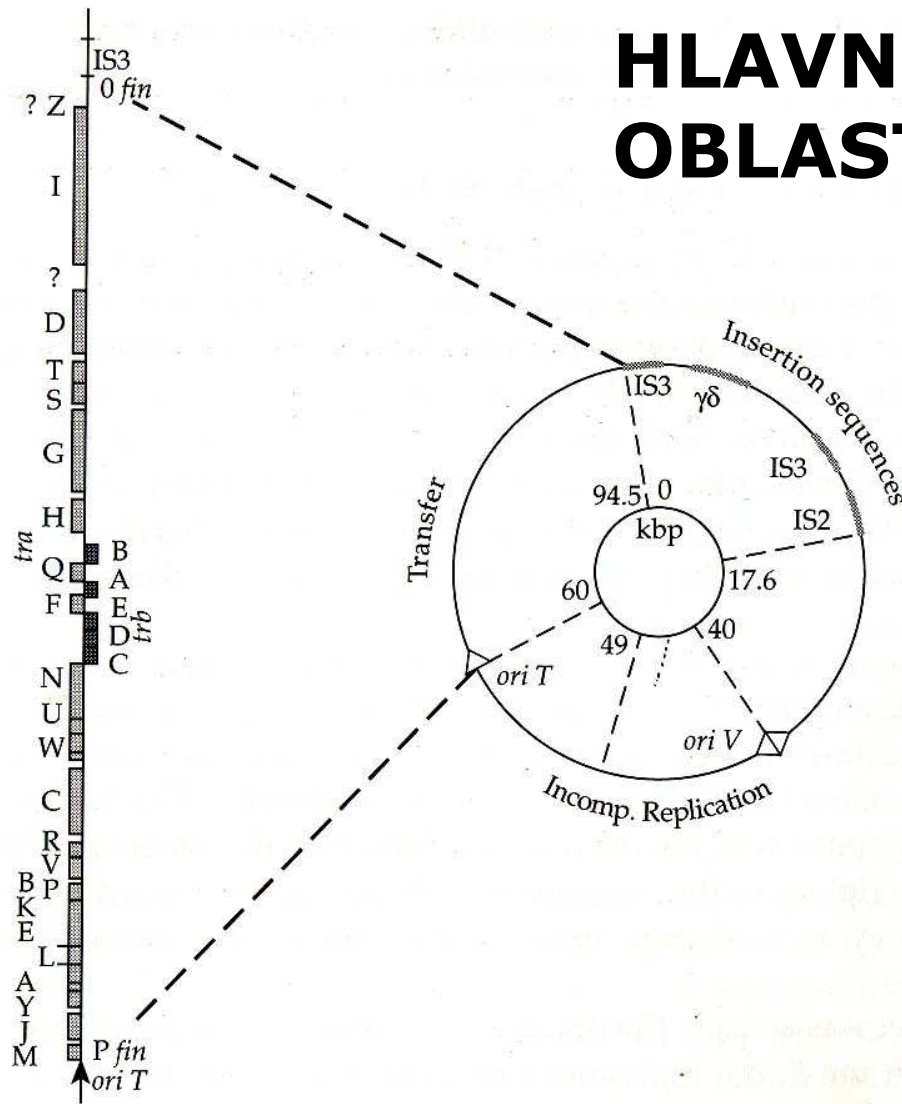


Fig. 3.3 Map of the F plasmid, showing the main functional regions.

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)
- Ti – způsobuje krčkové nádory (crown galls)
- Ri – způsobuje vlasaté kořeny (hairy roots)

- **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

Struktura opinů

1. Rodina oktopinů

Vznik kondenzací pyruvátu s některou aminokyselinou:

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

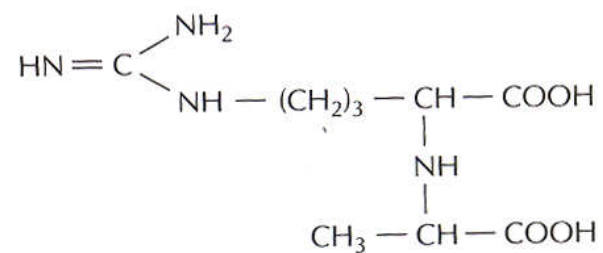
2. Rodina nopalínů

Vznik kondenzací α -ketoglutarátu s aminokyselinami

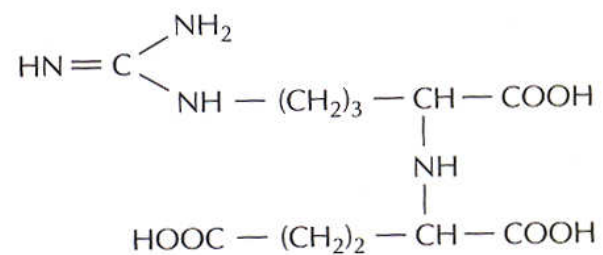
3. Rodina agropinů

Vznik kondenzací kys. glutamové s aminokyselinami

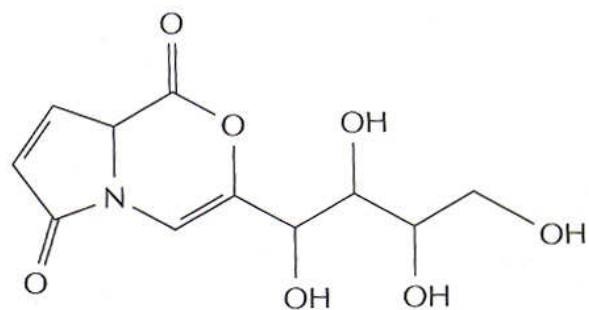
Chemická struktura opinů (zdroj C, příp. N)



Octopine

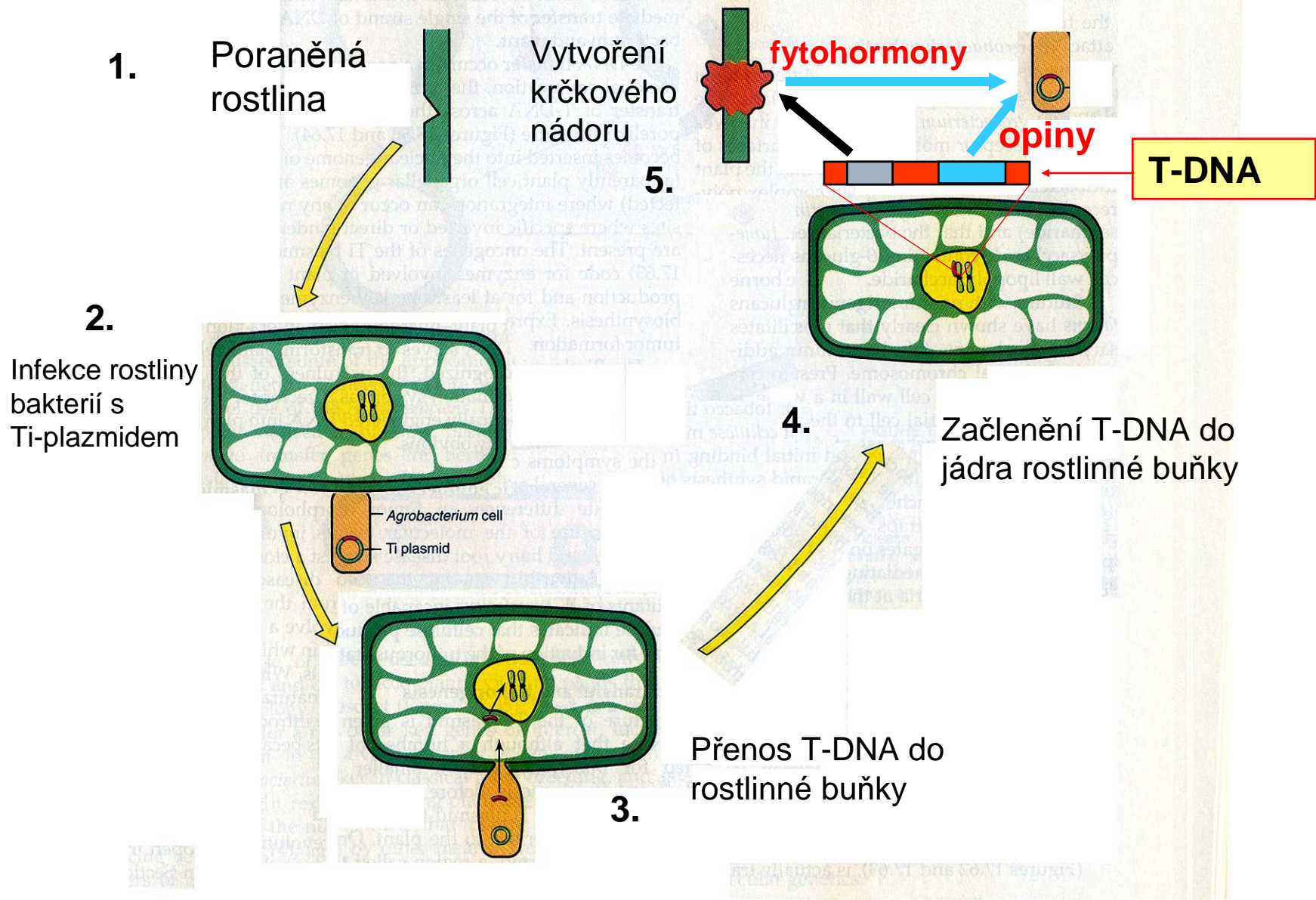


Nopaline

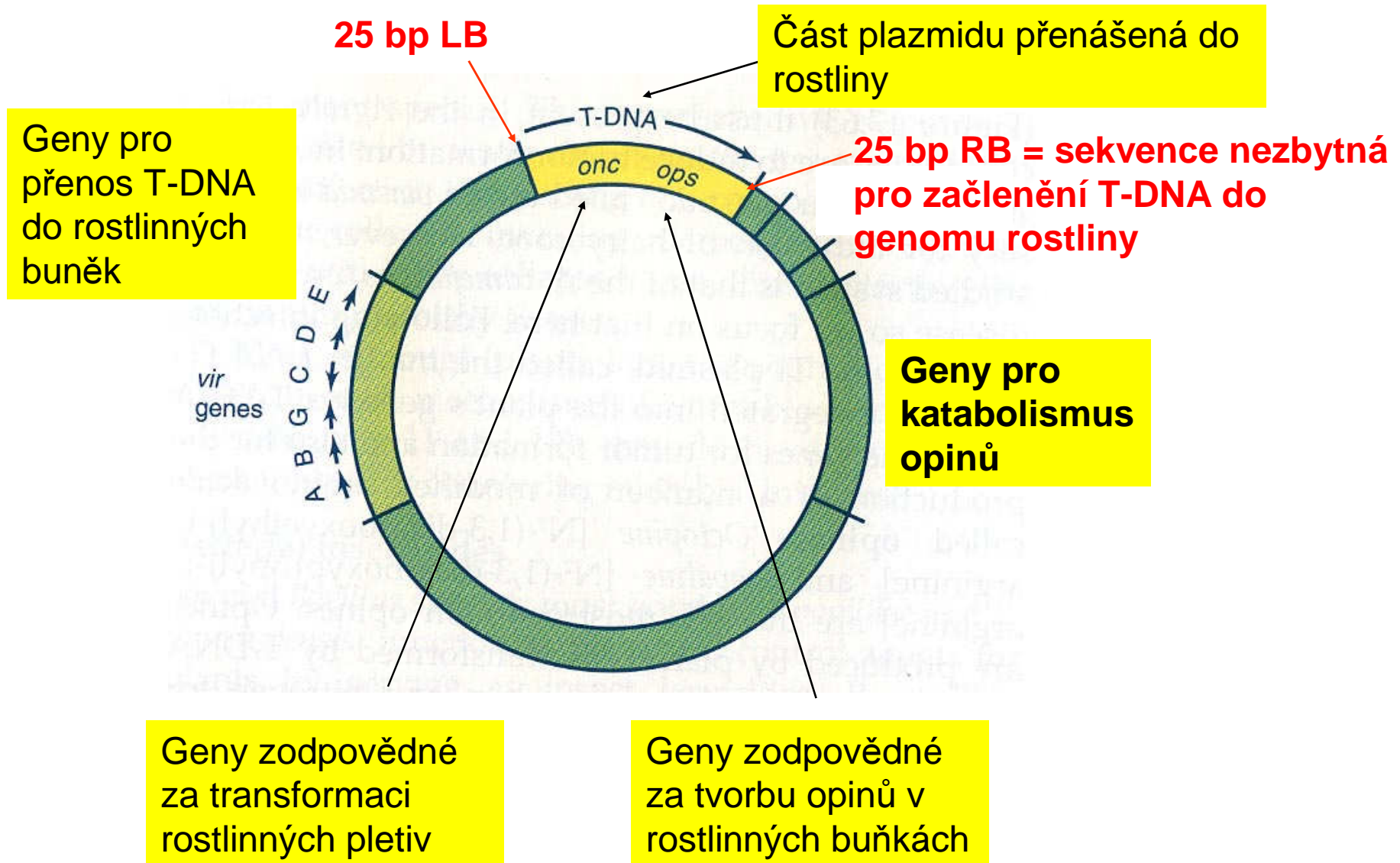


Agropine

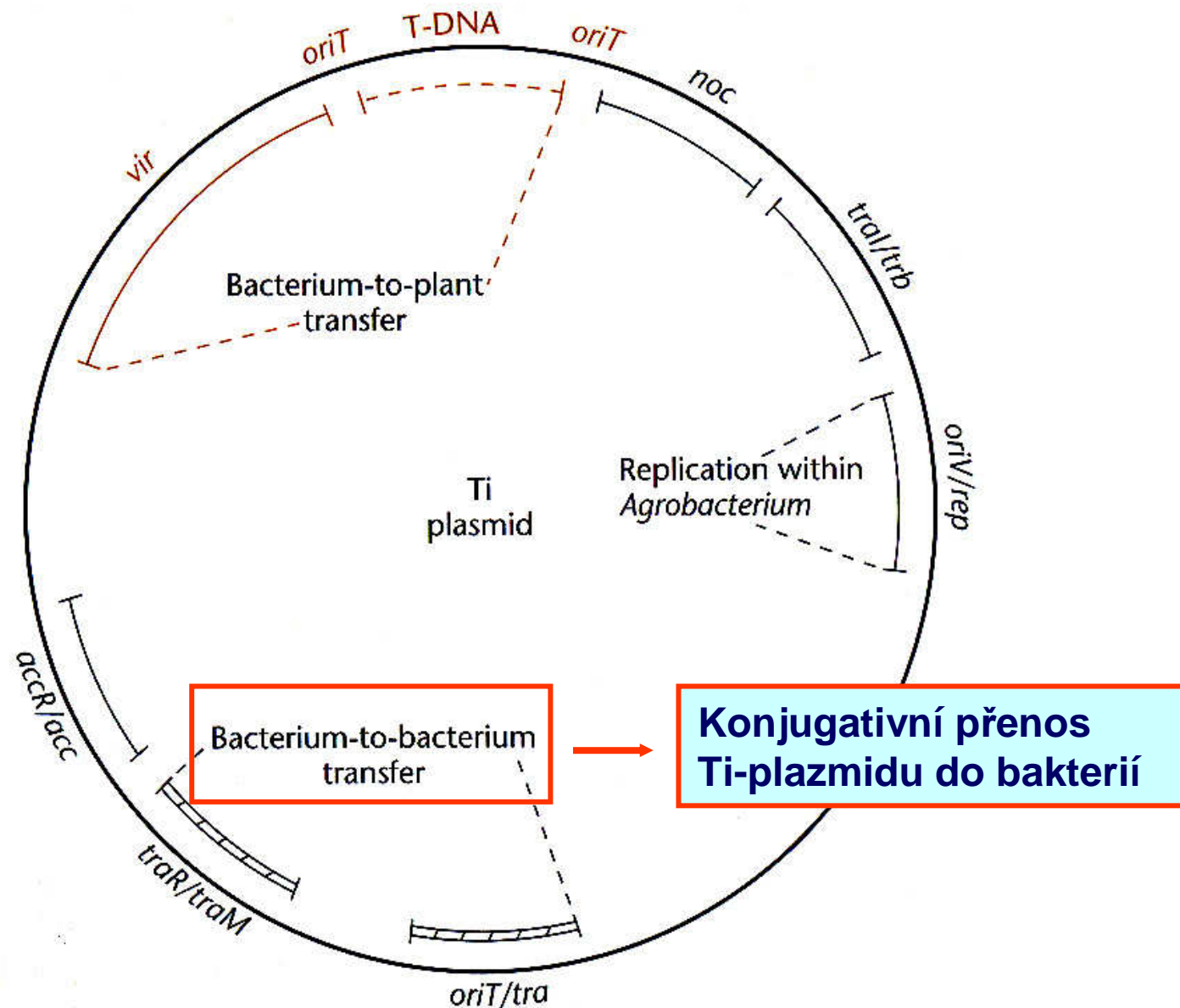
Transformace rostlin navozená Ti-plazmidem *Agr. tumefaciens*



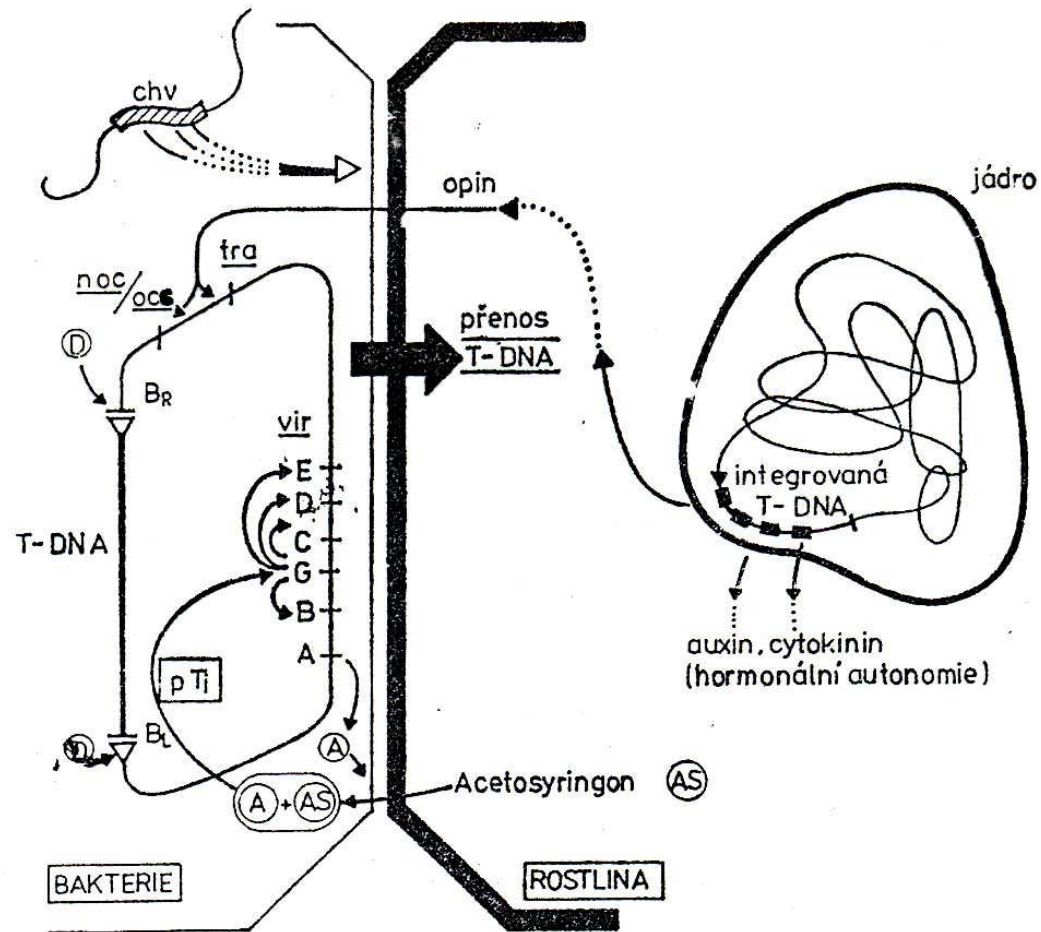
Struktura Ti-plazmidu *A. tumefaciens*



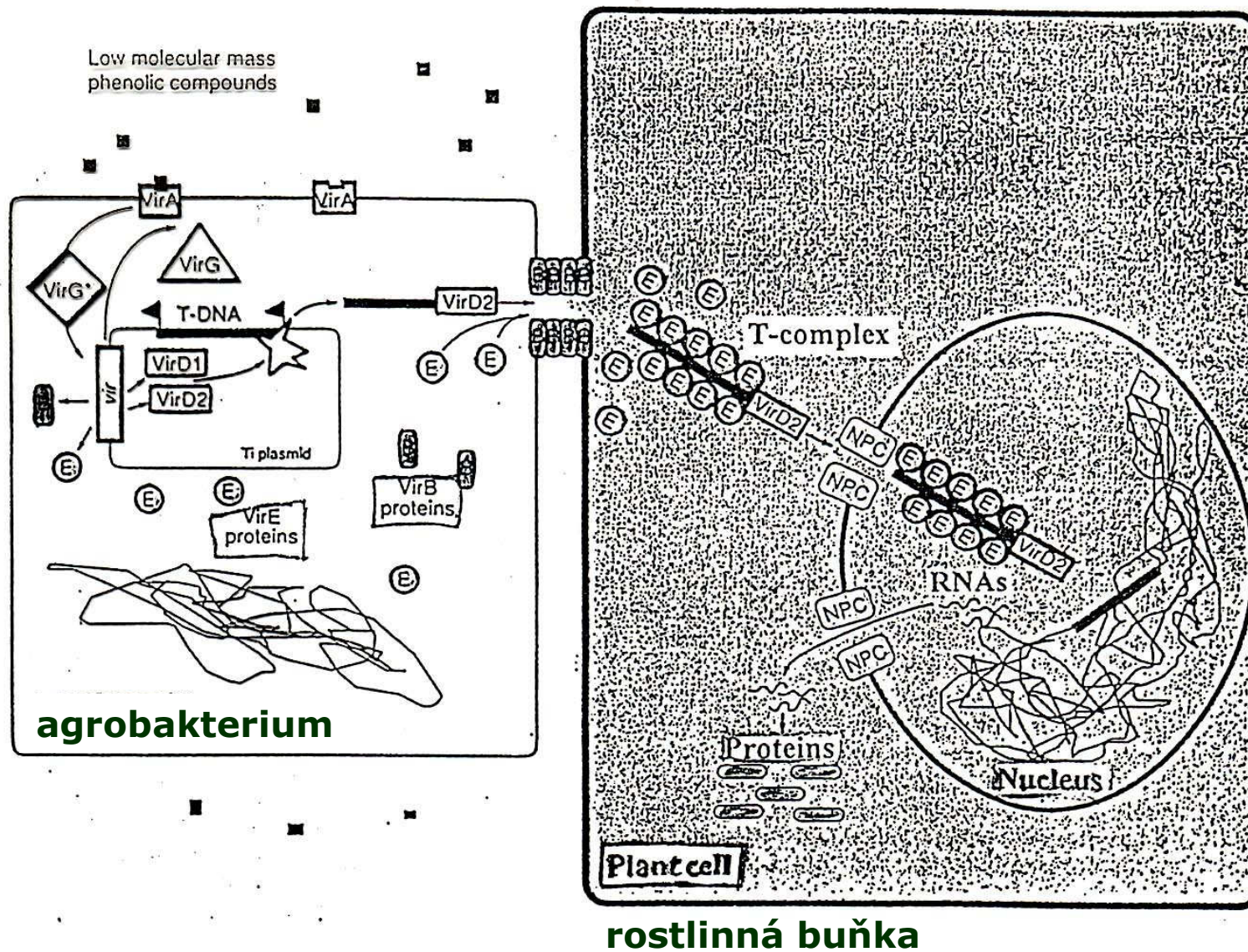
Mozaikovitá struktura Ti-PLAZMIDU



PRŮBĚH PŘENOSU Ti-PLAZMIDU DO ROSTLINNÉ BUŇKY



PŘENOS T-DNA Z AGROBAKTERIA DO ROSTLINNÉ BUŇKY



PRŮBĚH PŘENOSU T-DNA Z AGROBAKTERIÍ DO ROSTLIN

- 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 chromozomových 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**)

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
 - a) tvorba jednovláknových zlomů na T-DNA: virD1, virD2
 - b) odkrucování jednovláknové T-DNA: virD1, virD2 a virE2
 - c) vytvoření přenosového komplexu DNA/proteiny: virD1, virD2 (virB) T-
 - 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 BR
- 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, ?
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, adherenci a invazivitu do buněk a někdy interferují s imunitními funkcemi hostitele

Virulenční plazmidy gramnegativních bakterií

Výskyt: Čeleď *Enterobacteriace*

- A. normální mikroflóra gastrointestinálního 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

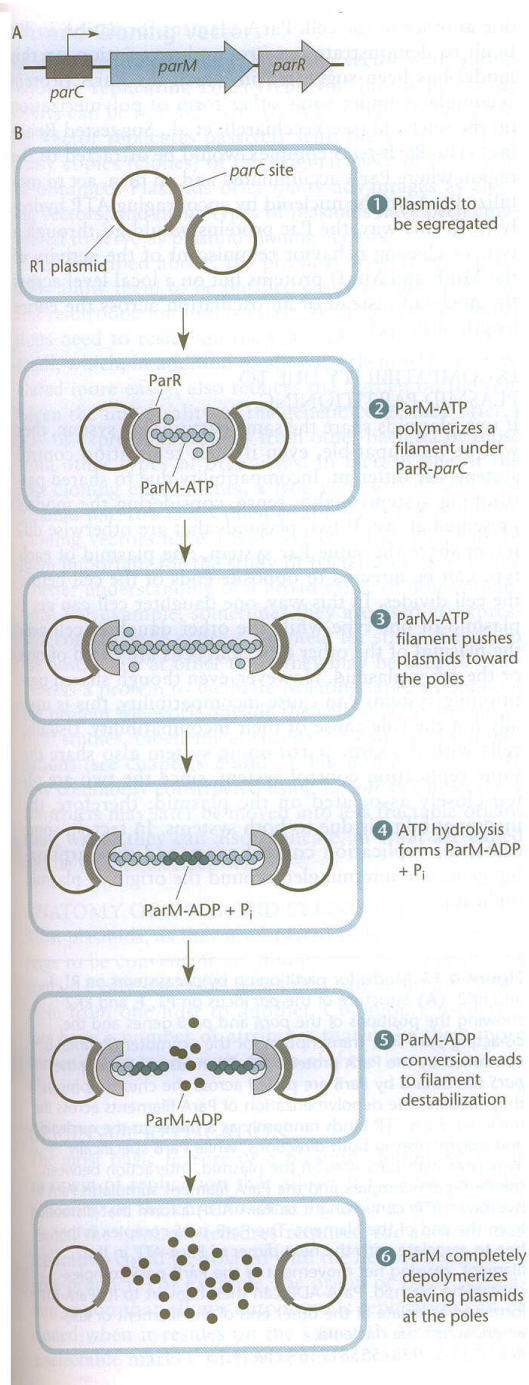
TSST – syndrom toxického šoku

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.



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 hydrolyze *ParM*-ATP na *ParM*-ADP.