

Plazmidy



Použitá literatura:

- ▣ Molecular Genetics of Bacteria, Snyder and Champness, 2nd ed. (ASM Press)
- ▣ Plasmids, Richard P Novick, New York University School of Medicine, New York, New York, USA
Frontiers in Bioscience 3, 43-62, January 1999
(<http://www.bioscience.org>)
- ▣ Bacterial Plasmids, David Summers, University of Cambridge, Cambridge, UK
ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group / www.els.net
Plasmid Biology, Funnell and Gregory, ASM Press, 2004

Plazmidy

Přirozené plazmidy

- nezávislé nechromosomální replikony
- rozdílné velikosti (1 kb - stovky kb),
 - 2-3 % kódující kapacity chromosomu u bakterií
 - až 25 % u halofilů, megaplazmidy
 - zpravidla neobsahují esenciální geny
- většina ve formě kovalentně uzavřené DNA (cccDNA)
(lineární - *Streptomyces*, *Borrelia* a *Rhodococcus*)
- vyskytují se ve všech prokaryotech, v eukaryotech kvasinky a *Dictyostelium*)
- v hostitelských buňkách může koexistovat více plazmidů různé velikosti
- replikují se při růstu buňky, při dělení se distribuují do dceřiných buněk

Plazmidy

- obsahují geny zaručující udržení v organismu
 - iniciace a regulace replikace ($oriV$),
 - regulace počtu kopií na buňku
 - regulace rozšiřování (segregace)
- dále geny poskytující selekční výhody
 - (resistence k antibiotikům, těžkým kovům, UV záření, toxiny, degradace aromatických látek, determinanty virulence a atd.)
 - Archaea – neobsahují atb rezistentní markery, produkce vzdušných vakuol, bez zvláštních funkcí – kryptické plazmidy
- některé mají schopnost konjugativního intercelulárního přenosu
 - (mohou překonávat i mezidruhovou bariéru).

Plazmidy

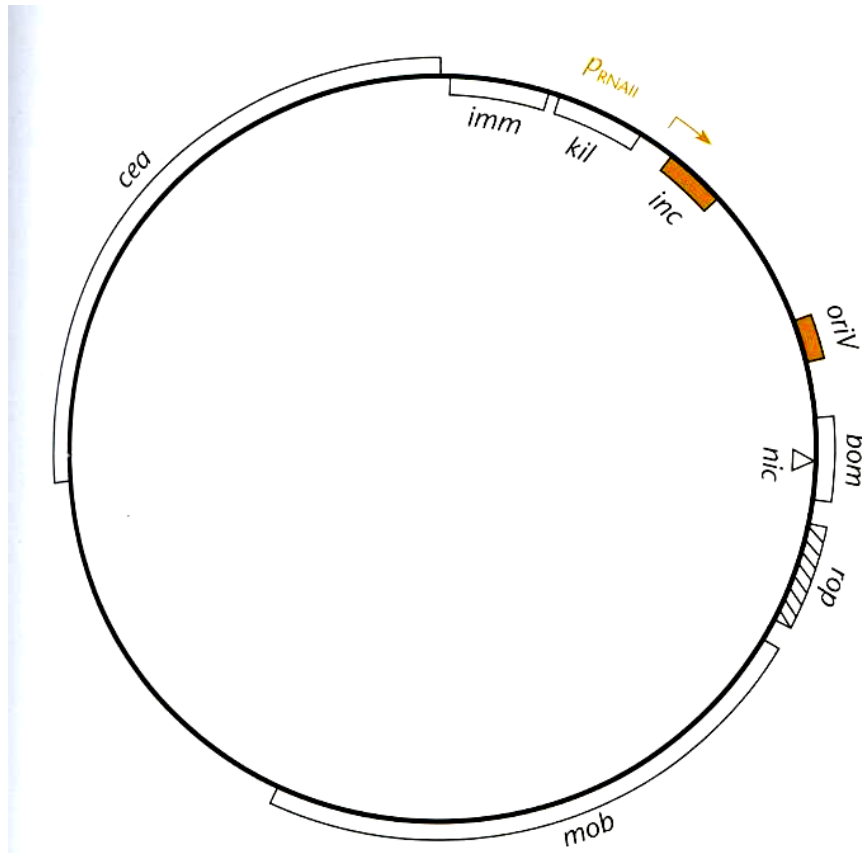
Rekombinantní plazmidy

- geny zaručující replikaci, stabilitu plazmidu popř. hostitelskou specifitu
- geny selekčních markerů (antibiotiková rezistence)
- zvláštní funkce (promotory, reportérové geny, ribosomy vázající místa atd.)
- polyklonovací místo
- Rozšířené hostitelské rozhraní – shuttle vektory

Nomenklatura plazmidů

- Není jednotná - “p“ + iniciály objevitele(konstruktéra) nebo funkce + číslo, (pBR322 (Bolivar, Rodrigez), pUC, pEX)
- přirozené plazmidy - historické názvy, bez “p“
 - antibiotiková resistance R (RK2, R100, RSF1010) (*Klebsiela aerogenes*)
 - syntéza antibiotik (SCP1 - methylenomycin) (*Streptomyces coelicolor*)
 - faktor fertility F(F, F⁻)
 - bakteriokoliciny (ColE1) (*Escherichia coli*)
 - virulentní plazmidy (Ent)
- Ti - iniciace tumorů u rostlin (*Agrobacterium tumefaciens*)
- metabolické plazmidy
 - SAL - degradace salicylátu
 - Tol - degradace toluenu (*Pseudomonas putida*)
 - virulence - geny pro invasi a adhesi v organismu (*Yersenia pestis*)

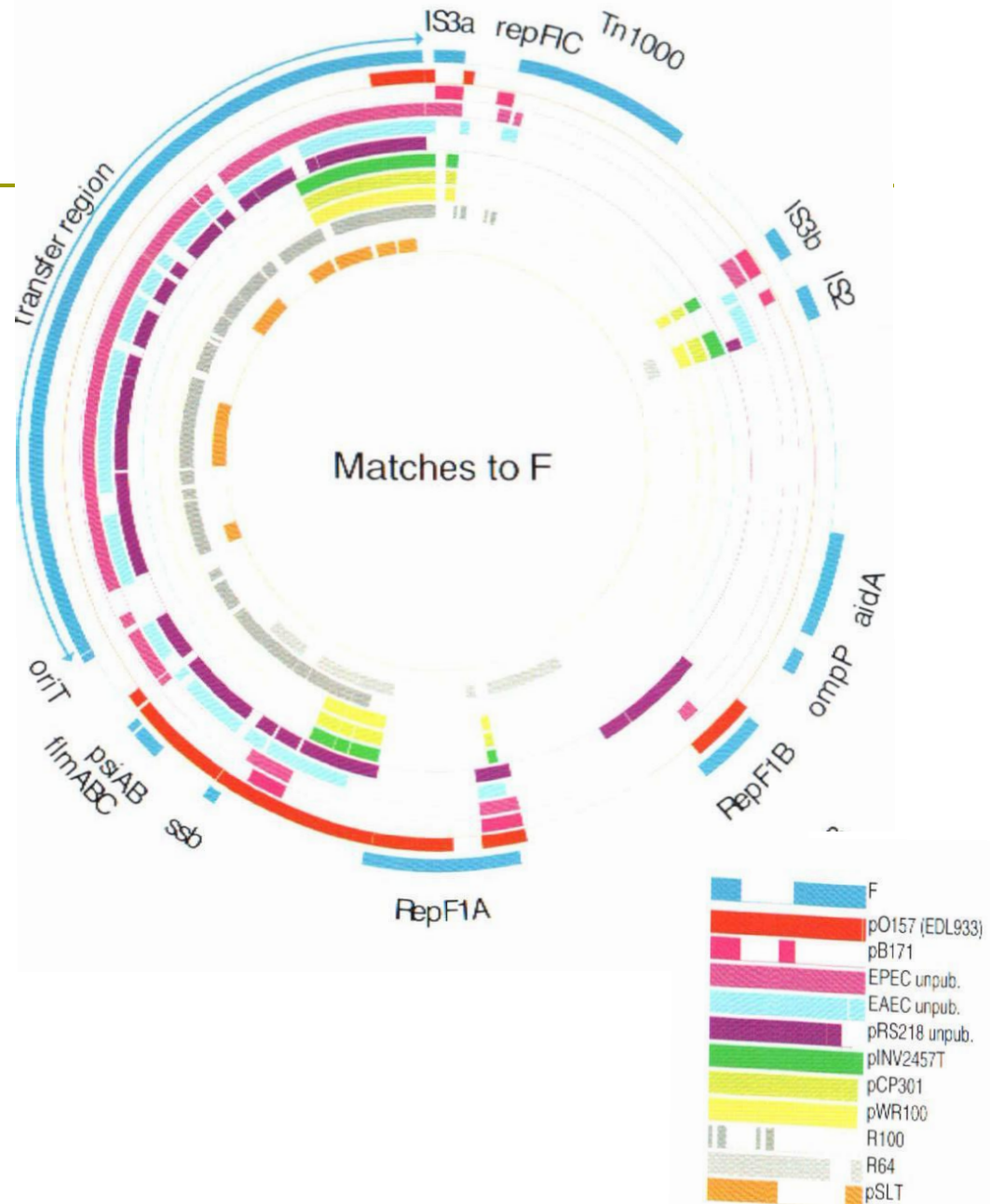
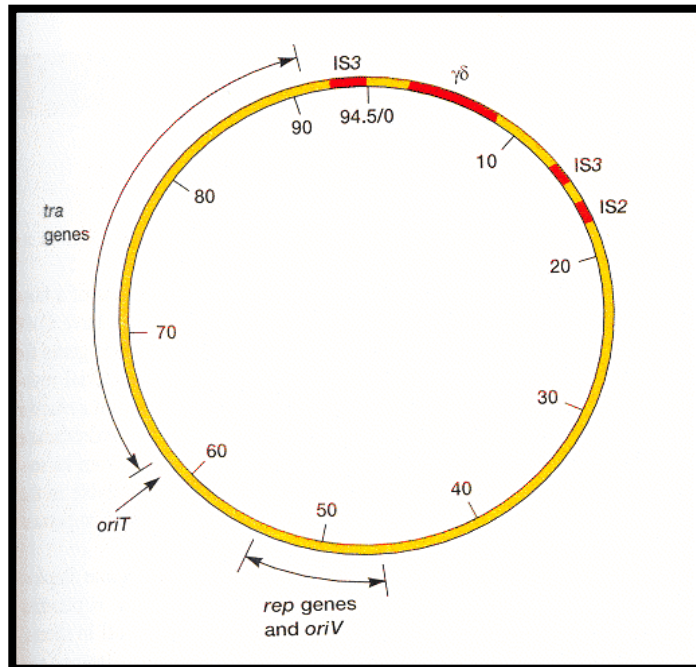
ColE1



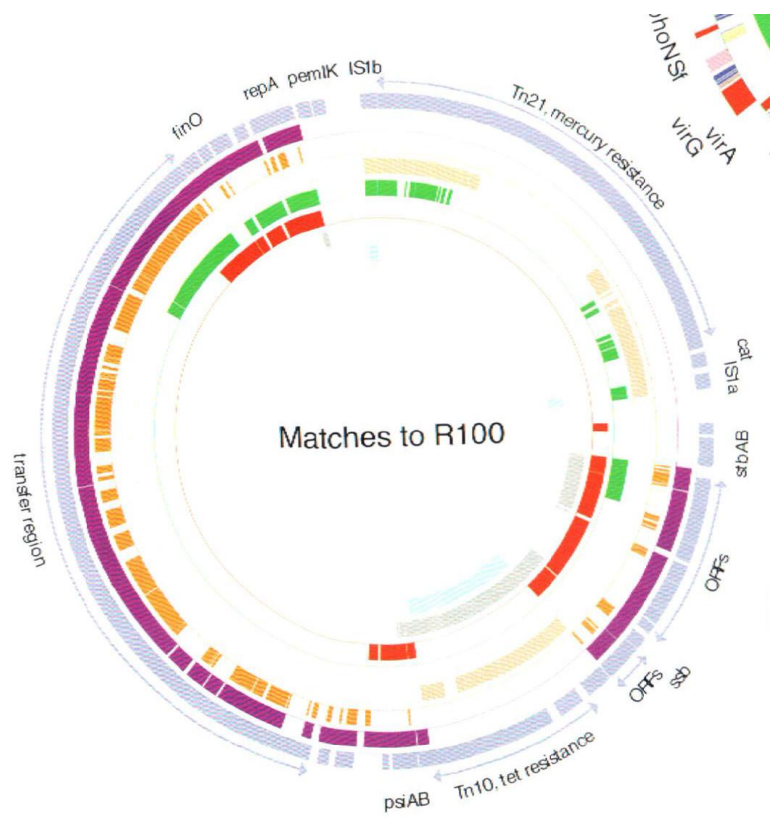
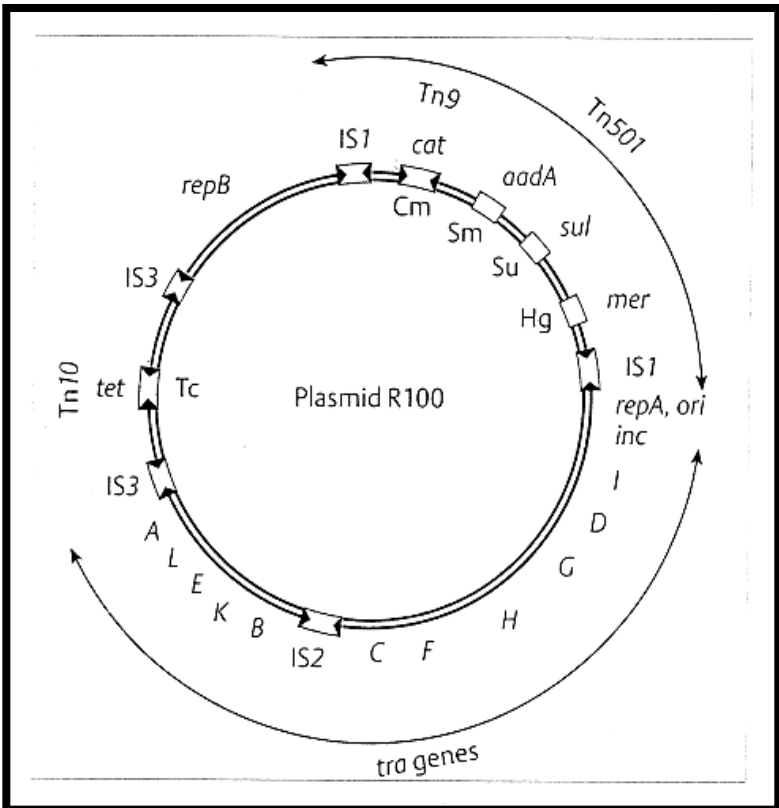
Genetická mapa ColE1.

- *oriV* – začátek replikace
- P_{RNAII} – promotor pro primer RNAII
- *inc* – koduje RNAI
- *rop* – protein , který pomáhá regulovat počet kopií
- *bom* – místo štěpení, obsahuje *nic*
- *cea* – kolicin Col1
- *mob* – funkce pro mobilizaci

F plasmid

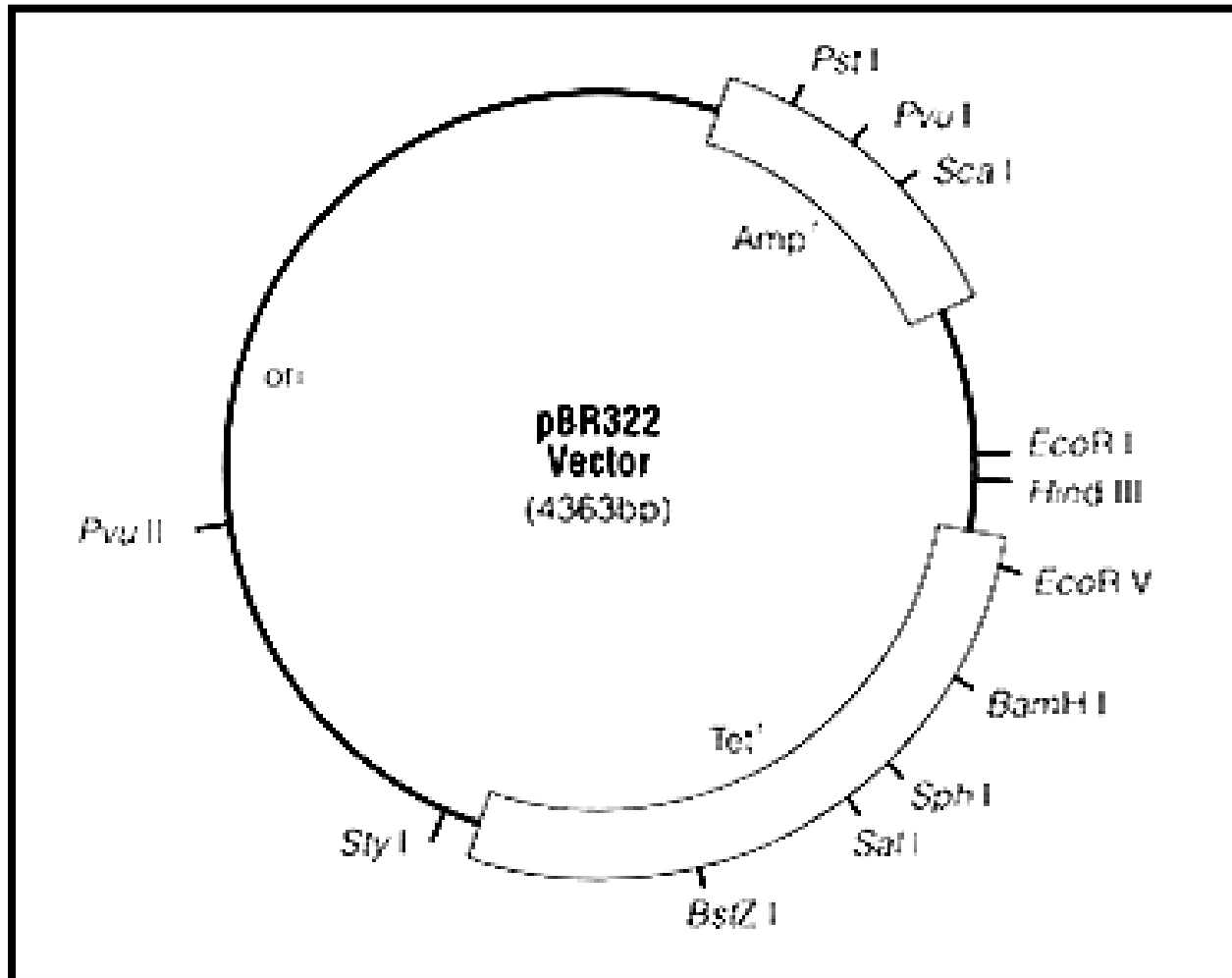


Struktura R plazmidu

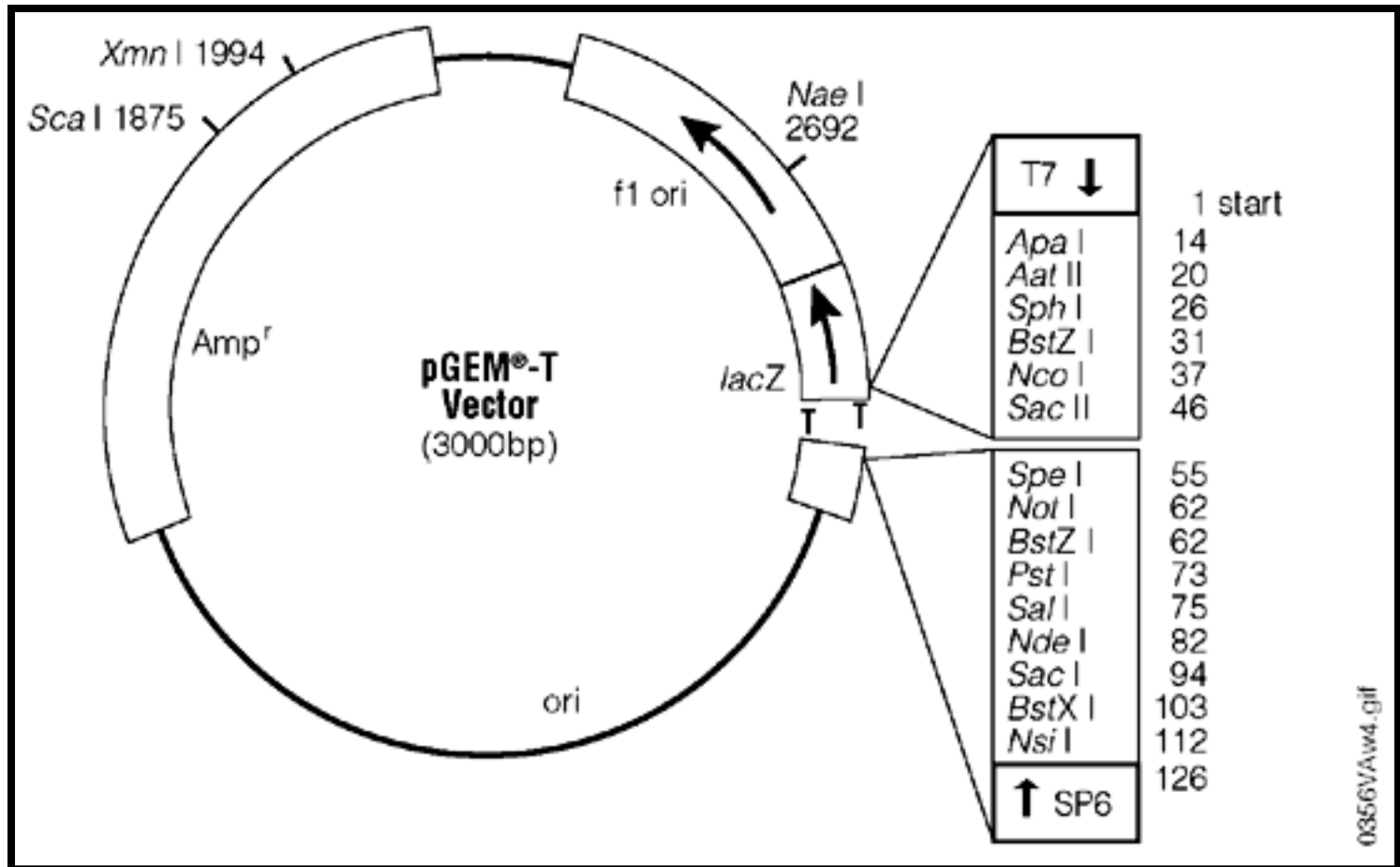


- R100
- pRS218
- pSLT
- pHCM1
- pWR501
- pO157
- R64
- R27

pBR322



pGEM[®]-T Vector Systems Promega



Hlavní skupiny plazmidů

Type	Representatives	Approximate Size (kb)	Copy Number (Copies/Chromosome)	Hosts	Phenotypic Features
Fertility Factor	F factor	95-100	1 - 3	E. coli, Salmonella, Citrobacter	Sex pilus, conjugation
R Plasmids	RP4	54	1 – 3	Pseudomonas and many other gram-negative bacteria	Sex pilus, conjugation, resistance to Ap, Km, Nm, Tc
	R1	80	1 – 3	Gram-negative bacteria	Resistance to Ap, Km, Su, Cm, Sm
	R6	98	1 – 3	E. coli, Proteus mirabilis	Su, Sm, Cm, Tc, Km, Nm
	R100	90	1 - 3	E. coli, Shigella, Salmonella, Proteus	Cm, Sm, Su, Tc, Hg
	pSH6	21		Staphylococcus aureus	Gm, Tm, Km
	pSJ23a	36		S. aureus	Pn, Asa, Hg, Gm, Km, Nm, Em, etc.
	pAD2	25		Enterococcus faecalis	Em, Km, Sm
Col Plasmids	ColEI	9	10 – 30	E. coli	Colicin E1 production
	ColE2		10 - 30	Shigella	Colicin E2
	CloDFI3			Enterobacter cloacae	Cloacin DFI3
Virulence Plasmids	Ent (P307)	83		E. coli	Enterotoxin production
	K8S plasmid			E. coli	Adherence antigens
	CoIV - K30	2		E. coli	Siderophore for iron uptake; resistance to immune mechanisms
Metabolic Plasmids	pZAIO	56		S. aureus	Enterotoxin B
	CAM	230		Pseudomonas	Camphor degradation
	SAL	56		Pseudomonas	Sa1icylate degradation
	TOL	75		Pseudomonas putida	Toluene degradation

Klasifikace plazmidů

- podle genetických determinant které nesou
 - resistance, bakteriociny, katabolické vlastnosti, virulence, kryptické
- podle velikosti a struktury
 - malé, velké
 - cirkulární, lineární
- podle způsobu replikace
 - Θ mechanismus, mechanismus valivé kružnice, mechanismus výměny vlákna (strand displacement)
- podle hostitelského rozhraní –
 - nízké, široké, promiskuitní
- podle počtu kopií
 - jednokopiové, nízkokopiové, mnohokopiové,
- podle kompatibility
 - podle schopnosti přetrvávat v různých hostitelých - skupiny inkompatibility)
- podle schopnosti konjugace
 - konjugativní, nekonjugativní

Klasifikace plazmidů - kódovaný fenotyp

- plazmidy mohou nést mnoho různých funkcí
- zvyšují schopnost buněk přežít v daném životním prostředí
- jsou koncentrované na plazmidech v důsledku selekce

I. třída:

- **kódované vlastnosti chrání hostitele před toxickými látkami a vlivy**
- resistance antibiotika, těžké kovy, toxické anionty (arzén)
- zvýšená schopnost opravy poškozené DNA (resistance k ionizujícímu záření, UV)

II. třída:

- **zvyšuje hostitelovu metabolickou kapacitu**
- syntéza bioaktivních látek (coliciny, antibiotika)
- propůjčuje hostiteli schopnost degradovat organické látky (toluen, PCB)
- nové metabolické vlastnosti (fixace dusíku, utilizace citrátu)

III. třída:

- **umožňují hostiteli osidlovat nové životní prostředí**
- propůjčují hostiteli patogenní vlastnosti kódováním toxinů a kolonizačních antigenů

Klasifikace plazmidů – hostitelské rozhraní

□ hostitelské rozhraní –

- typy bakterií v kterých je plazmid schopen replikace
- je dáno strukturou *ori* domény
- těžké stanovit – experimentálně, porovnáním sekvence *oriV*

□ nízké hostitelské rozhraní

- V jednom nebo v příbuzných kmenech bakterií
- Příklad: ColE1 plazmidy (pBR322, pET, pUC) pouze v *E. coli* a *Salmonella*

□ široké hostitelské rozhraní

- V evolučně příbuzných bakteriích G⁻ X G⁺
- RK2, RSF1010 replikace ve většině G⁻,
- plazmidy s replikačním mechanismem valivé kružnice u G⁺ (pUB110)

Replikace plazmidů

□ Klasifikace podle podobnosti replikačních mechanismů

- hybridizace s regulačními doménami již známých plazmidů
(Microbiological Rev. 1988 (375-395))

- Molekulárně genetické studie regulace jednotlivých ORF plazmidů
(Frontiers in Bioscience 4, d43-62, 1999, www.bioscience.org)

□ Pro replikaci jsou nezbytné funkce kódované jak plazmidem tak hostitelskou buňkou

■ plazmidem

- - jeden a více replikačních počátků (*oriV*), (R6K - tři nezávislé *ori* s různou rychlostí iniciace replikace)

- - jeden a více regulačních elementů (*rep*) obecně působí *in trans* na specifickém *ori*

- - gen kódující protein či RNA, které slouží jako primer pro syntézu DNA, působí většinou *in cis*

■ chromosomální funkce využívané při replikaci

- - DNA Polymerase III

- - RNA polymerasa I

- - RNase H (ribonukleasa)

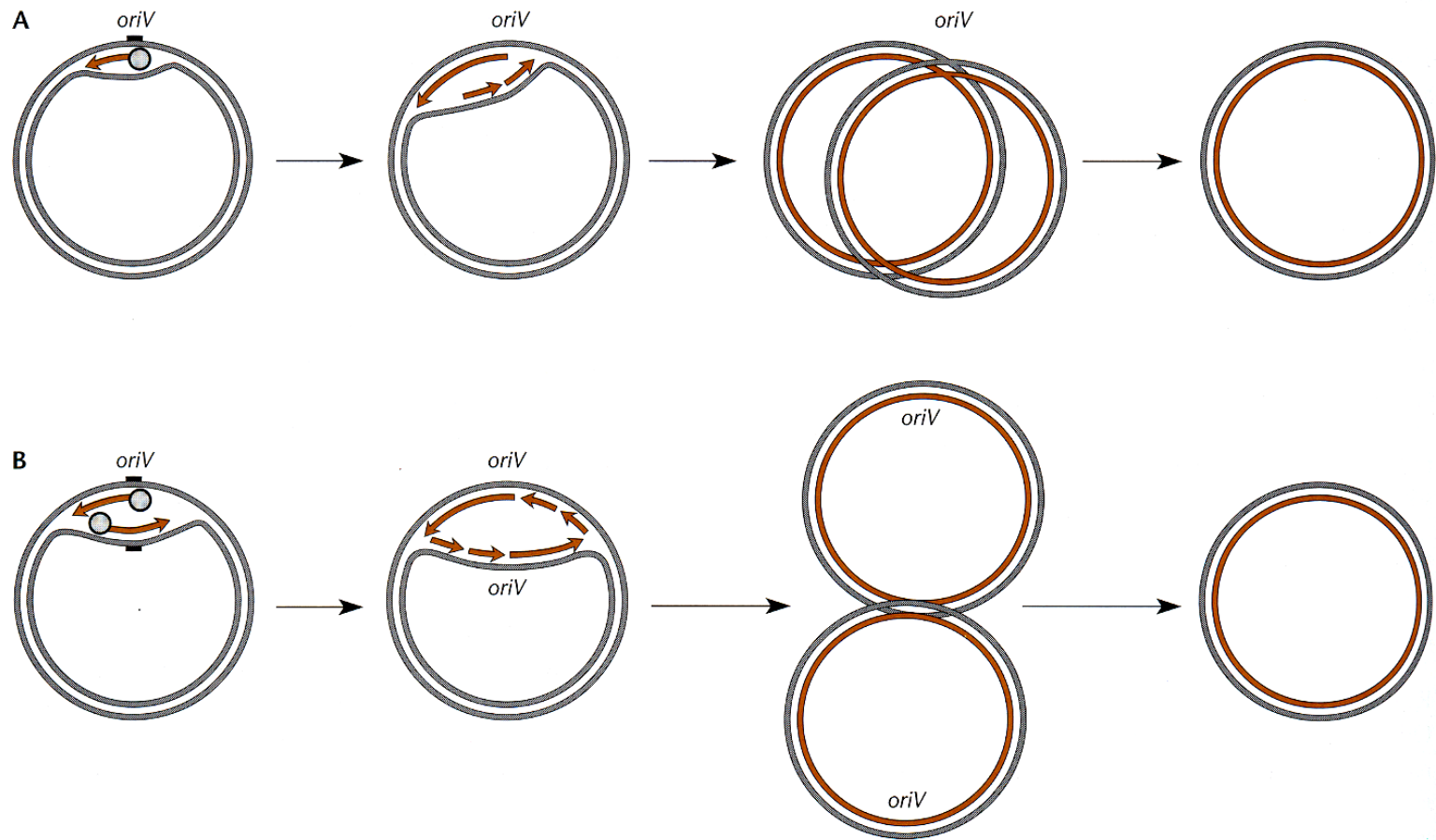
- - DnaA protein

Mechanismy replikace

□ Θ - replikace

- plazmidy gramnegativních (ColE1, RK2, F) i grampozitivních bakterií
- syntetizována jsou obě vlákna současně
- vedoucí a opožďující se vlákno
- může začínat v jednom i více počátků (*oriV* – vegetative)
- probíhat jednosměrně i dvousměrně
- vyžaduje kompletní replikační aparát buňky
- DNA polymerasa III, helikáza DnaA, primasa
- u plazmidů pSC101, P1, R1 iniciační protein kodovaný plazmidem
- plazmidy typu ColE1 jej nevyžadují
- regulace iniciace může být
- prostřednictvím iteronů (Rep protein - RK2, R6K)
- antisense RNA (ColE1 plazmidy)

Mechanismy replikace - Θ replikace

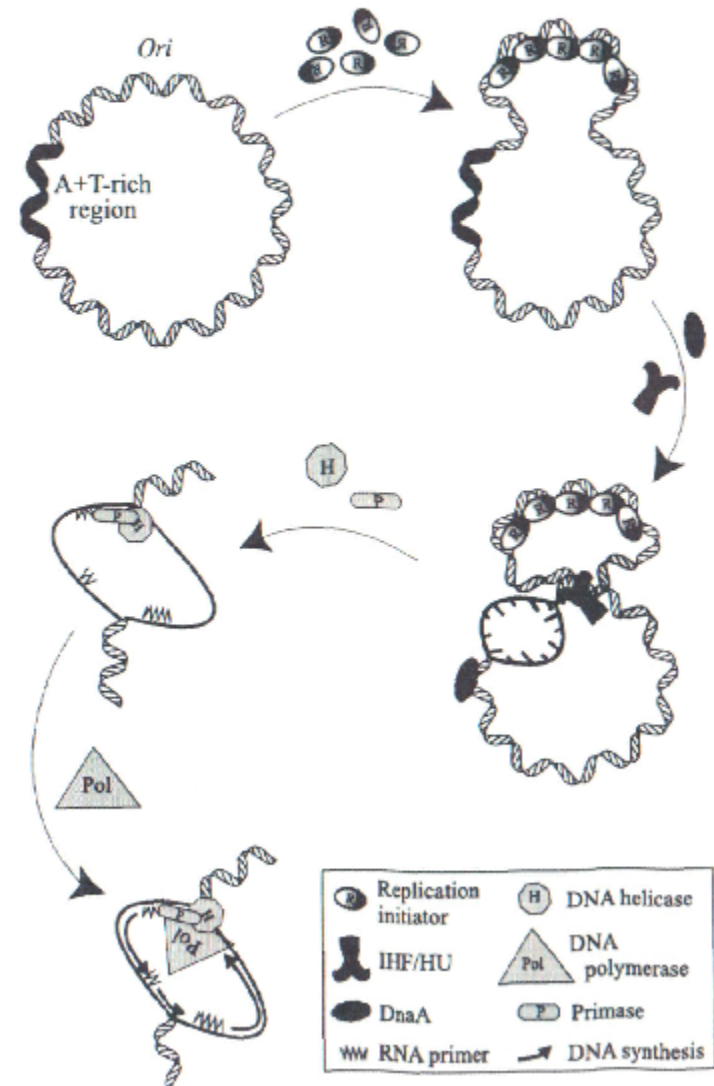


Klepněte pro vložení titulu

□ Iniciaci replikace

-Rep protein

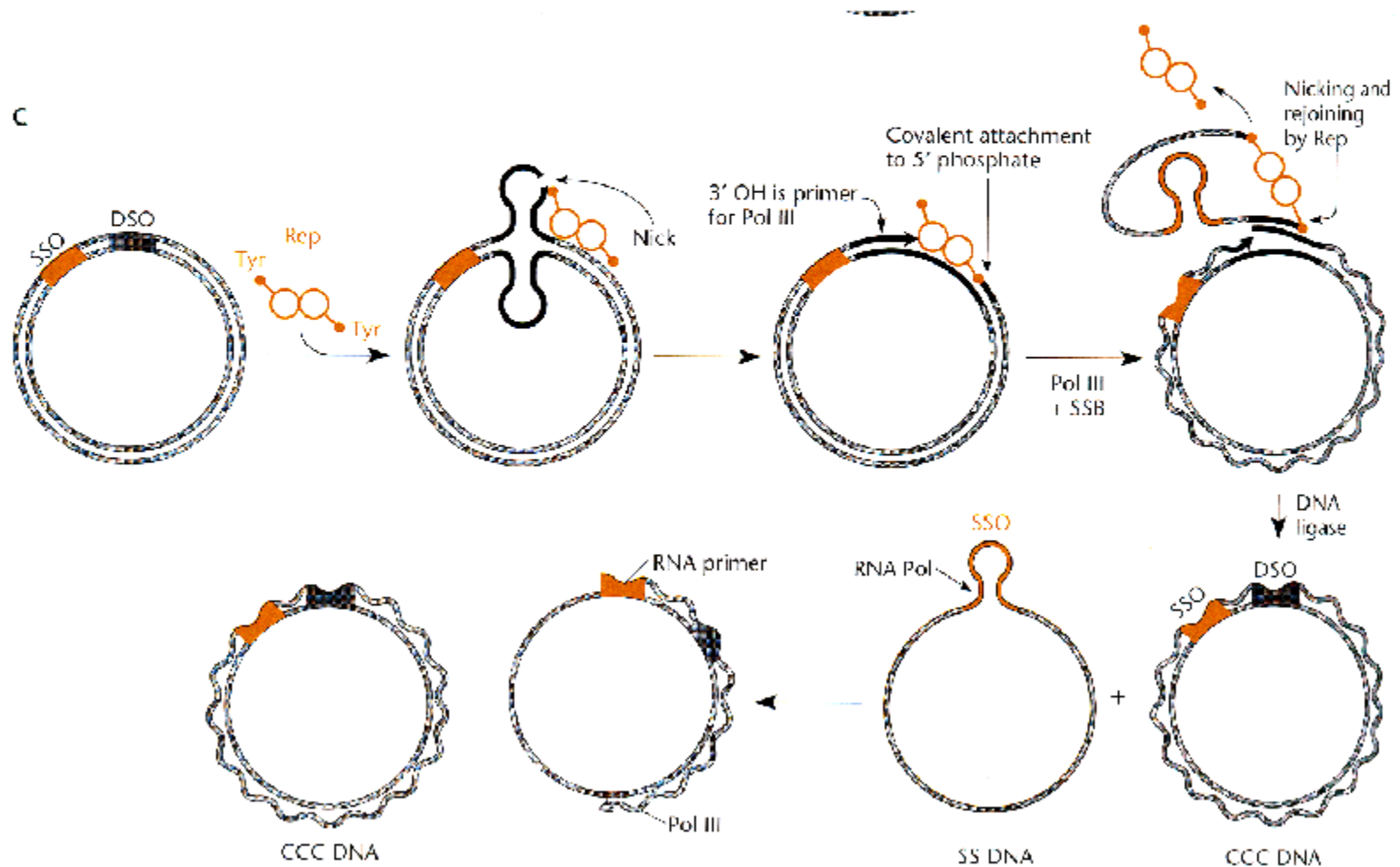
- Rep - rozeznává ori váže se
- Hostitelské proteiny rozvolní DNA v AT bohatých místech
- Helikasa a primasa zahájí replikaci
- Polymerasa – replikace \ominus mechanismem



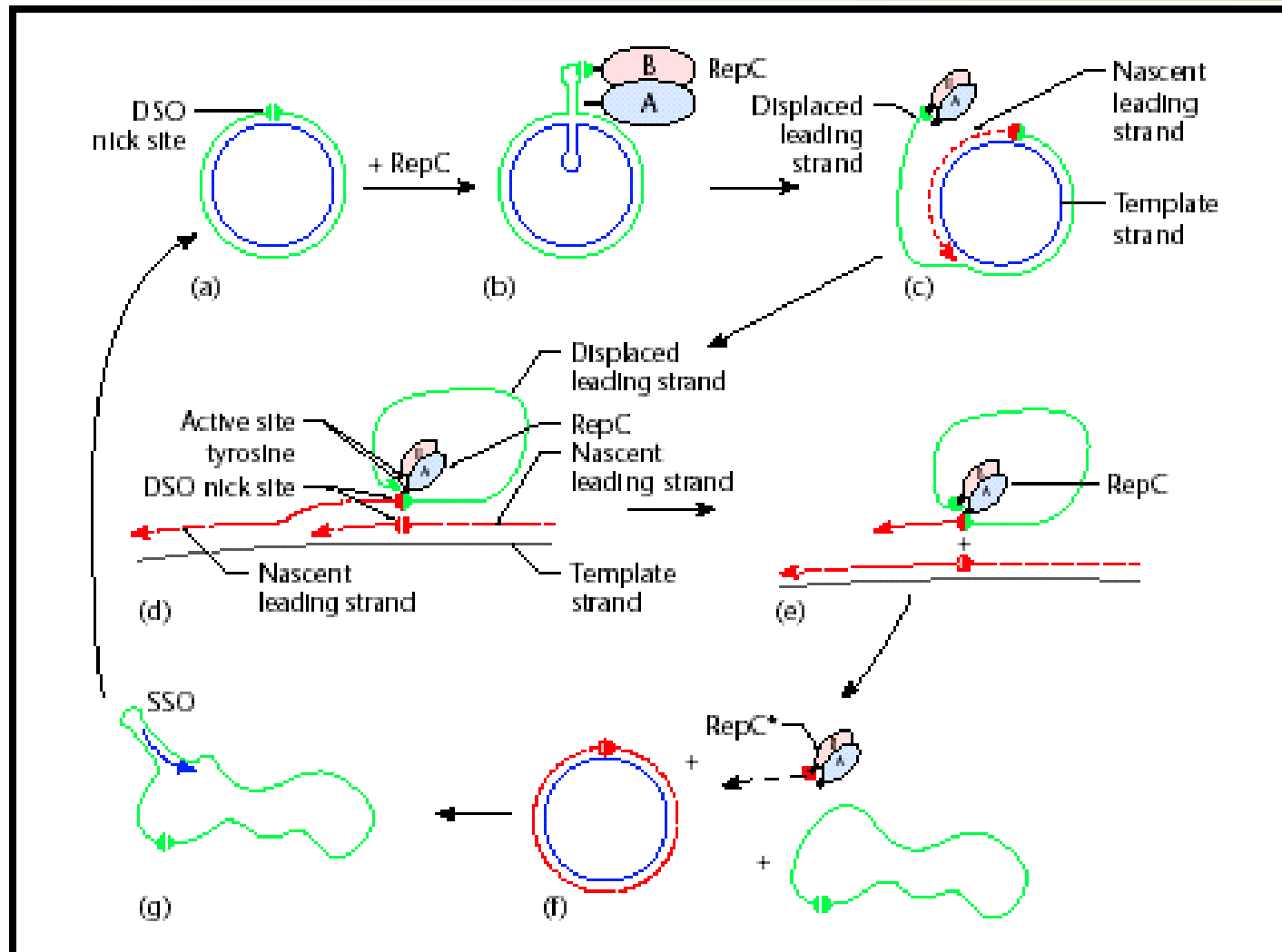
Mechanismy replikace - mechanismus valivé kružnice RCR

- původně pouze u bakteriofágů
- malé vysokokopiové plazmidy G+ bakterií dnes i G-, sinice a *Archea*
- studováno u stafylokokových (pT181) a streptokokových (pMV158) plazmidech
- mají pouze jednu esenciální oblast s počátkem replikace
 - *dso* (double-stranded origin) s místem *nic*
 - *rep* gen- zahajuje replikaci, dimer, též helikázová aktivita
 - elementy regulující replikaci (LIC - leading strand initiation and control region)
- replikace obou vláken je oddělena,
 - nejprve replikace vedoucího vlákna
 - poté replikace ssDNA odstraněného vlákna

Mechanismus valivé kružnice



Mechanismus valivé kružnice



Klasifikace plazmidů - skupiny inkompatibility

Inkompatibilita

- neschopnost dvou plazmidů stabilně existovat v jedné buněčné linii
- členové těchto párů patří do stejné skupiny inkompatibility
- plazmidy se stejnou kontrolou replikace jsou inkompatibilní
- způsobená kříženou reaktivitou inhibitorů iniciace replikace u příbuzných plazmidů (neschopnost být rozeznán ve stadiu důležitém pro udržení v buněčné linii)
- kompatibilní plazmidy - represory působí nezávisle a plazmidy mají své normální počty kopií
- inkompatibilní plazmidy - produkují inhibitory, které reprimují vlastní replikaci - dříve či později dochází ke ztrátě plazmidu v buněčné linii

Skupiny kompatibility

Microbiol.Rev. (1988), **52**, p. 375

■ **stanovována** - transformací různých plazmidů do stejného hostitele a měřena stabilita koexistence -

nepřesné - metodické i technické chyby

■ v 70. letech intenzivní studie a stanoveno 30 skupin plazmidů enterobakterií a 7 u staphylococců

■ IncFI (F plazmid),

■ IncP (RK2),

■ IncX (R6K),

■ IncQ (RSF 1010)

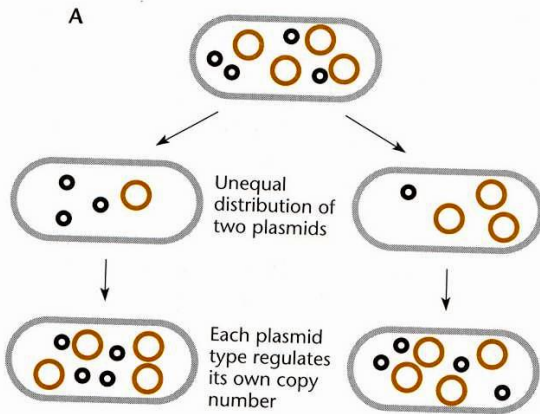
Table 7.1 Some Common Broad Host Range Plasmids and Vectors

Incompatibility group/ Replicon	Plasmid	Phenotype characteristics	References
IncFI	F	Tra ⁺	Bukhari et al. (1977)
IncP1	RK2/RP4/RP1/R68	Ap ^r , Km ^r , Tc ^r , Tra ⁺	Burkhardt et al. (1979)
	pRK290	Tc ^r , Mob ⁺	Ditta et al. (1980)
	pLAFR series	Tc ^r , Mob ⁺ cosmids, multiple cloning sites, <i>lacZα</i> for pLAFR3	Friedman et al. (1982)
	pPH1JI	Gm ^r , Sp ^r , low level Sm ^r , Tra ⁺	Ruvkun and Ausubel (1981)
IncP1/ ColE1	pR68.45	Tc ^r , Km ^r , Ap ^r , tandem duplication of IS21, broad host range unstable Hfr formation	Haas and Halloway (1976, 1978)
	pME487	pR68.45ts	Haas et al. (1987)
	pRK2013	Km ^r , Tra ⁺ , mobilizer replicon	Figurski and Helinski (1979)
IncQ	RSF1010	Su ^r , Sm ^r , Mob ⁺	Guerry et al. (1974)
	pMMB66EH/HE	Ap ^r , tac promoter expression vector	Furste et al. (1987)
IncX	R6K	Ap ^r , Sm ^r	Kontomichalou et al. (1970)
	pGP704	OriR6K cis region, MobRP4, Ap ^r , multiple cloning site, suicide vector requires R6K κ	Miller and Mekalanos (1988)
pMB1	pBR322	Ap ^r , Tc ^r , Mob ⁺	Bolivar et al. (1977)
	pBR327	Ap ^r , Tc ^r , Mob ⁻	Bolivar (1978)
	pUC series	Ap ^r , <i>lacZα</i> , Mob ⁻	Yanisch-Perron et al. (1985)
P15A	pACYC177	Ap ^r , Km ^r	Chang and Cohen (1978)
	pACYC184	Tc ^r , Cm ^r	

Abbreviations: Tra⁺, self-transmissible; Mob⁺, can be mobilized with a helper plasmid or strain; Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Gm, gentamicin; Km, kanamycin, Sm, streptomycin; Su, sulfonamides; Tc, tetracycline.

Kompatibilní a inkompatibilní plazmidy

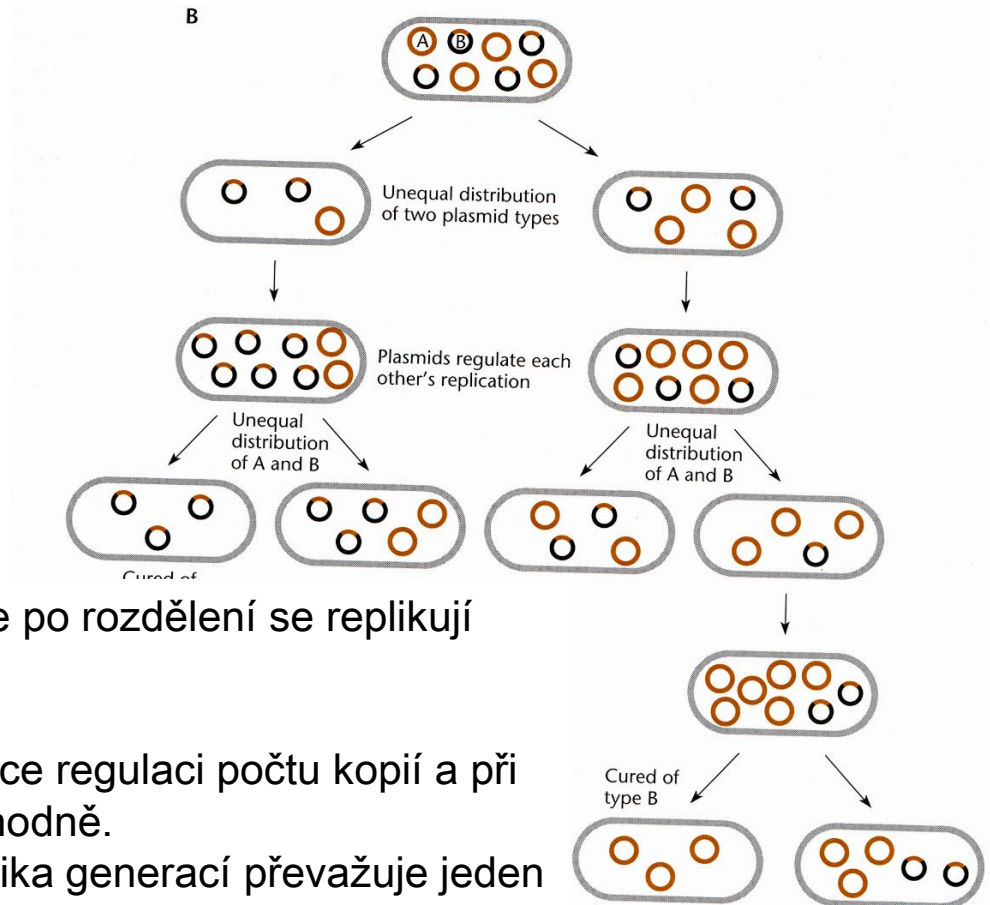
□ A) schema kompatibilních



Kompatibilní plazmidy se dělí náhodně, ale po rozdělení se replikují podle svých kopií. Udržuje se stálý počet

Inkompatibilní plazmidy sdílejí v jedné buňce regulaci počtu kopií a při dělení se distribují do dceřiných buněk náhodně. Dělí se a opět náhodně distribují. Po několika generacích převažuje jeden typ plazmidu

□ B) schema nekompatibilních



Inkompatibilní skupiny

Experimentální zjištění inkompatibility plazmidů

- Experimentální zjištění zda mohou dva plazmidy koexistovat v jedné buňce
 1. Měření frekvence „vyléčení“ od jednoho plazmidu, pokud jsou vpraveny do jedné buňky
 2. Pěstování na obou markerech – buňky s oběma plazmidy
 3. Pěstování bez jakéhokoliv markeru
 4. Vyšetří na plotny jen s jedním antibiotikem.
- Plazmidy nepatří do stejné inkompatibilní skupiny (jsou kompatibilní) pokud procento vyléčených buněk od jednoho plazmidu není větší než „vyléčení“ pokud je plazmid v buňce sám.
- Nutnost existence rozdílných selekčních markerů
- Udržení inkompatibilních plazmidů –
 - Pěstování na obou markerech současně – částečně vyléčené buňky hynou -zůstávají jen s oběma plazmidy.

Regulace iniciace replikace plazmidů

- Počet kopií plazmidu v buňce je stanoven mechanismem regulace iniciace replikace plazmidu
- **Relaxované plazmidy** – inhibice iniciace replikace, když počet plazmidů dosáhne určité úrovně
- **Stringentní plazmidy** – nízkokopiové plazmidy, replikují se jednou nebo několikrát
- Iniciace replikace plazmidů může být řízena
 - regulací množství dostupného primeru k iniciaci replikace DNA,
 - regulací množství esenciálního replikačního proteinu
 - regulací funkce esenciálního replikačního proteinu
- Existují tři hlavní mechanismy regulace iniciace replikace plazmidů, závislé na negativně působících regulačních mechanismech
 - antisens RNA, která hybridizuje s esenciální RNA (ColE1)
 - antisens RNA spolupůsobící s proteinem (R1, pMV158)
 - návazáním iniciátorových proteinů (Rep) na iterony (18 - 22 bp velké repetice (F, P1, RK2, R6K

Regulace působením antisens RNA (ColE1)

□ ColE1 - malé multikopiové plazmidy

□ Iniciací replikace u ColE1

- syntéza transkriptu RNA II z konstitutivního promotoru (555 bp upstream od *ori*)

- RNA II se formuje do aktivní konfigurace a vytváří stabilní komplex s komplementární DNA s replikačním začátkem

- RNA řetězec je v komplexu s DNA štěpen RNAsouH

- vytvoření primeru pro syntézu vedoucího řetězce (Poll)

□ Inhibice prostřednictvím antisens RNA

- RNA I je komplementární k 5' konci RNA II na který se váže

- RNA II se stáčí do neaktivní formy, která není štěpena RNAsouH

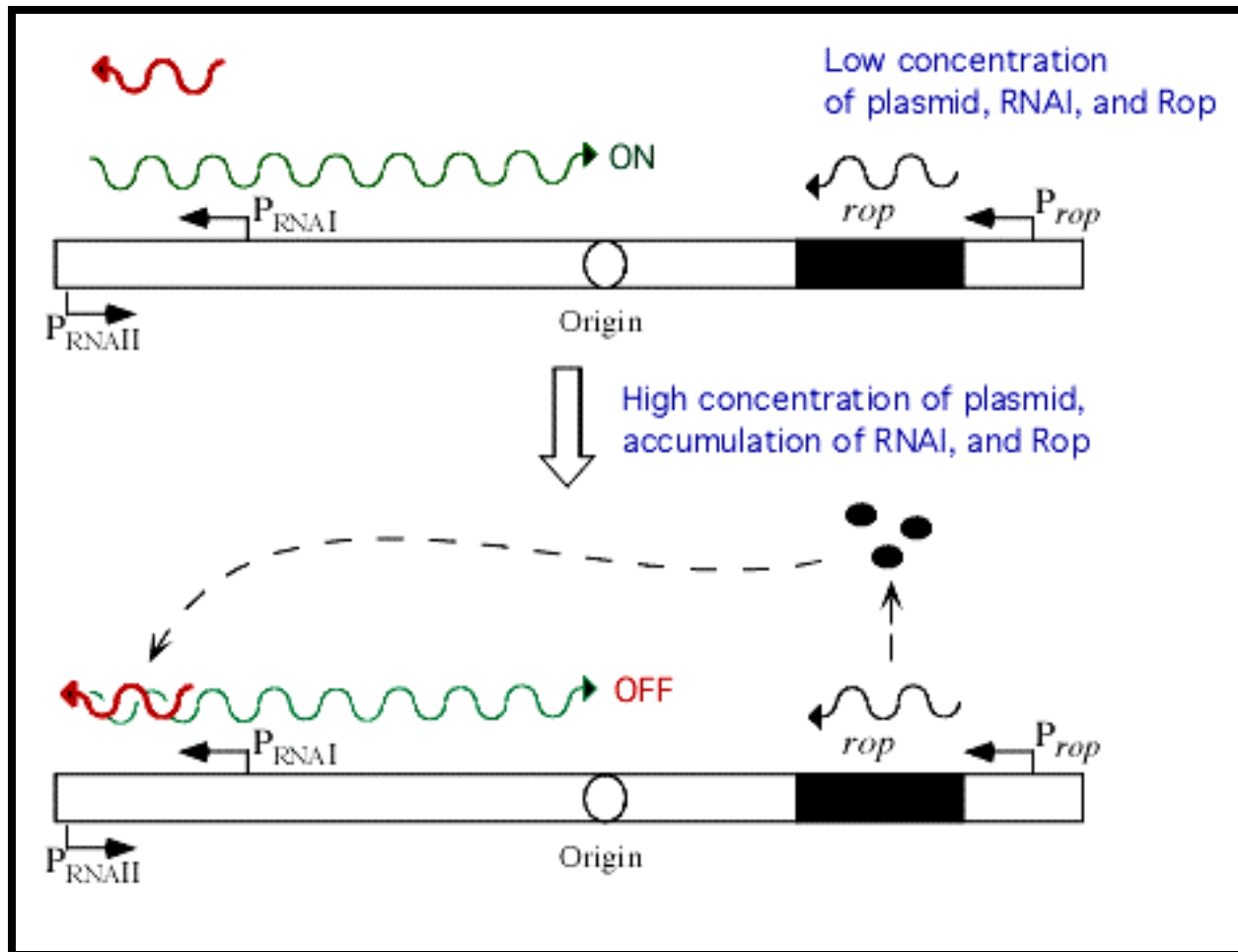
- další gen (*rop*), jehož produkt zvyšuje efektivnost RNA I (rychlost s jakou se váže na RNA II)

- RNA II z konstitutivního promotoru a má krátký poločas života

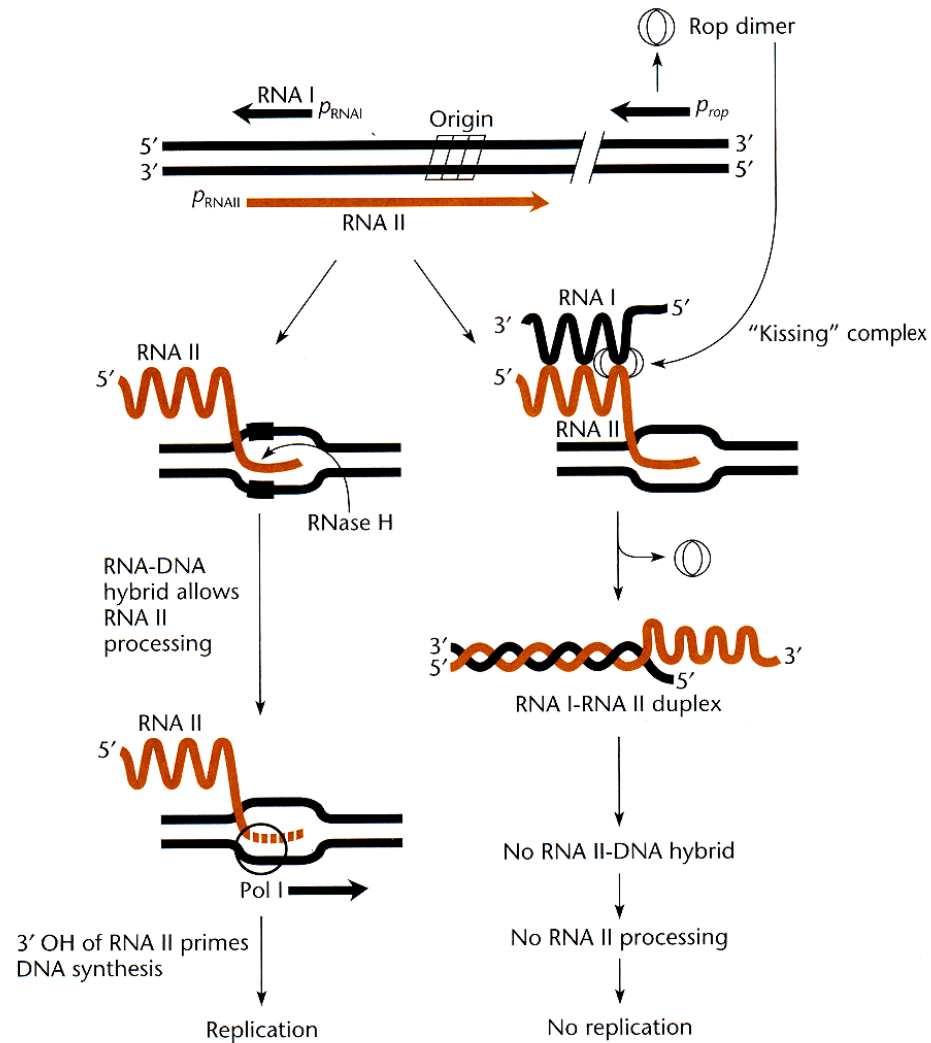
- do této skupiny patří dále přirozené plazmidy - pMB1, p15A

- dále rekombinantní klonovací plazmidy - pBR22, pUC, pET, pBluescript

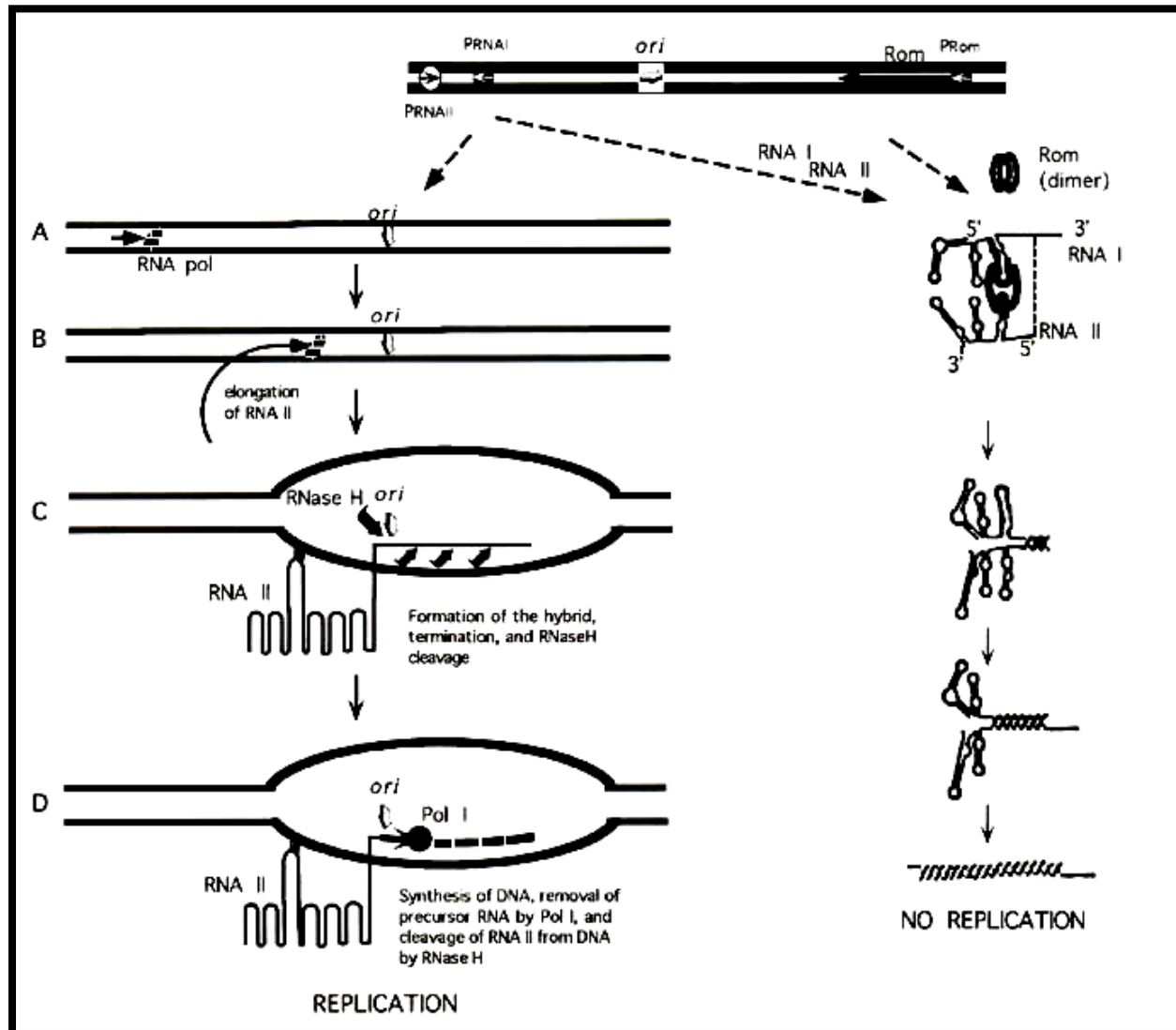
Regulace působením antisens RNA (ColE1)



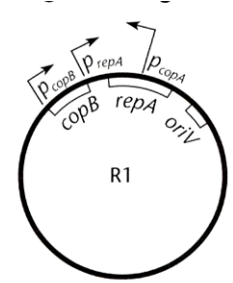
Regulace působením antisens RNA (ColE1)



Regulace působením antisens RNA (ColE1)

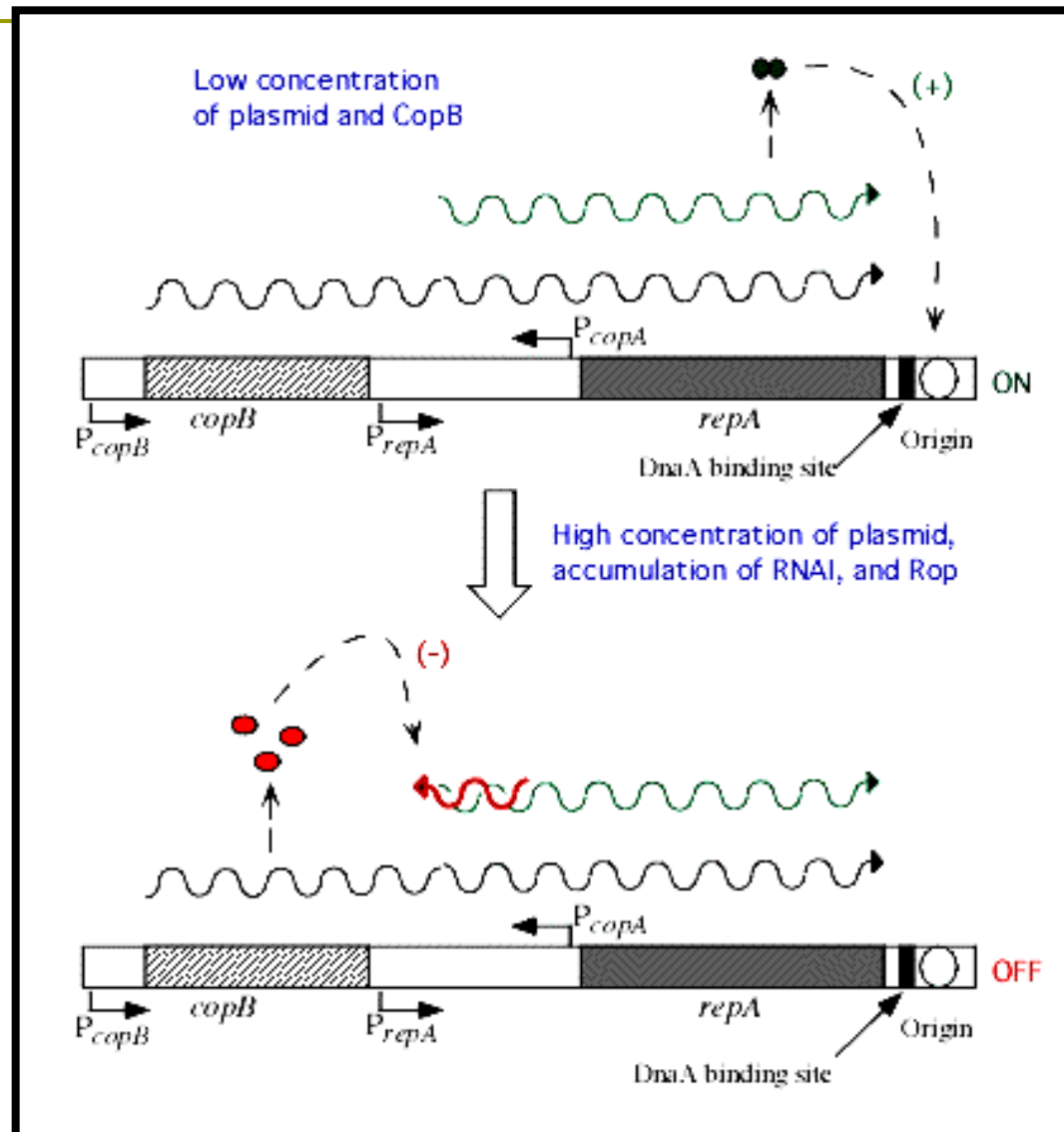


Regulace počtu kopií u R1 plazmidů



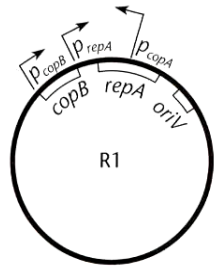
- Regulace počtu kopií R1 plazmidu je dána hladinou syntézy proteinu RepA – iniciace replikace -
- ta je modulována produkty genů *copA* a *copB*
- inhibice vazbou antisens RNA na RNA proteinu RepA
 - produktem *copA* je nestabilní RNA
 - komplementární k vedoucí oblasti *repA* mRNA
 - hybrid inhibuje syntézu proteinu RepA –
- vytváří se sekundární struktura terminátoru, který ukončuje transkripci RepA
- dsRNA je štěpena RNasou III
- protein CopB reprimuje transkripci genu *repA* z promotoru P_{repA}
 - při standardním počtu plazmidů v buňce - CopB zcela reprimuje transkripci z promotoru P_{repA}
 - *repA* mRNA je syntetizována jako *copB-tap-repA*
 - při poklesu počtu plazmidů represe není efektivní - P_{repA} je dereprimován
 - *repA* transkribován jako *tap-repA* mRNA
- též u skupiny plazmidů replikující se mechanismem valivé kružnice - pT181, pMV158, pC194, pSN2- složitější

Regulace počtu kopií u R1 plazmidů



Regulace počtu kopií u R1 plazmidů

A Plasmid genetic organization

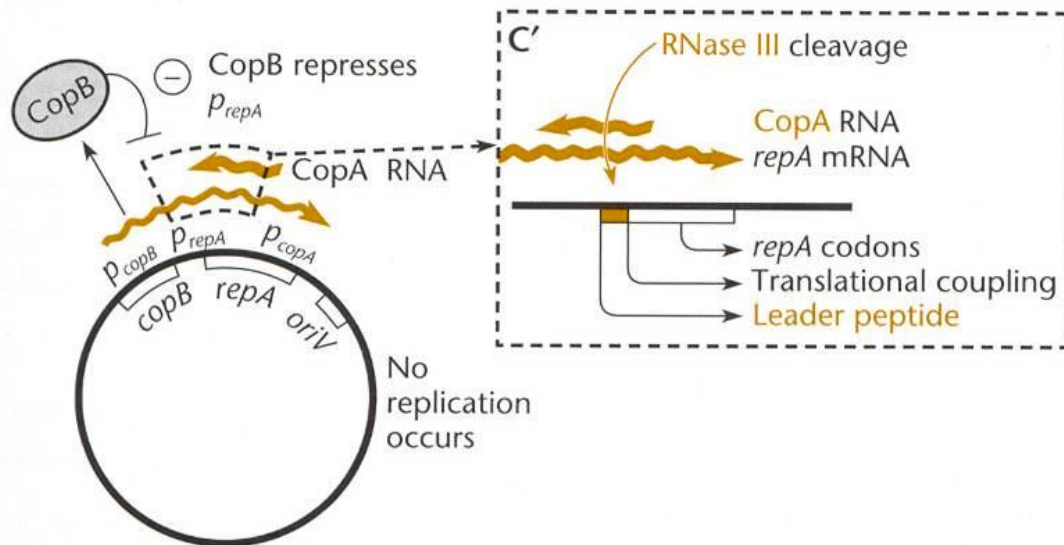


Promoter	Gene products expressed
P_{copB}	RepA and CopB
P_{repA}	RepA
P_{copA}	CopA antisense RNA

I. typ

1. Před repA je kódován leader peptide
2. Translace repA je spřažena s translací leader peptidu
3. dsRNA štěpena RNase III
4. Rozrušen leader peptid – nepřepisuje se ani zpražené repA

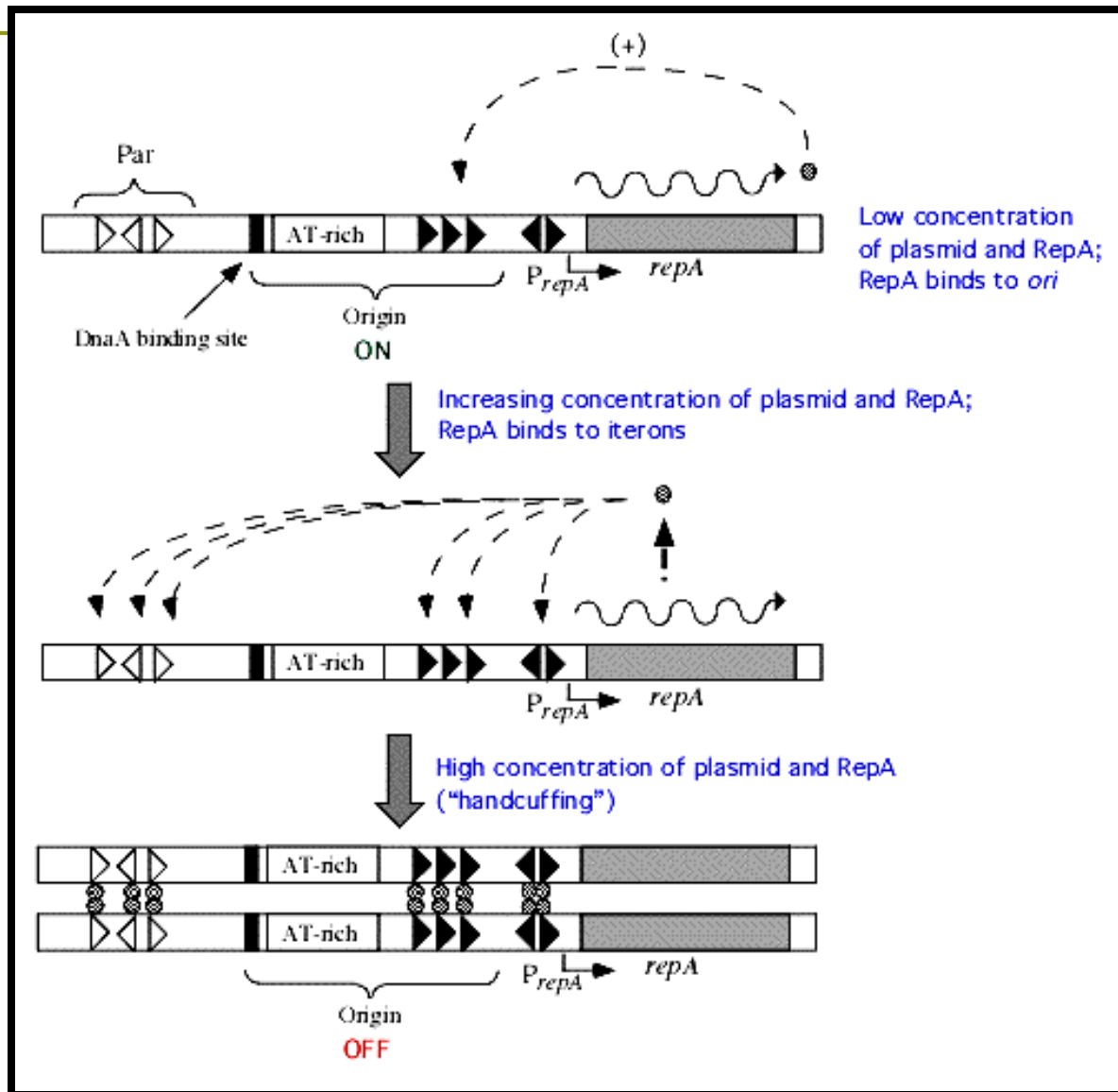
C Replication shutdown



Kontrola replikace a počtu kopií iterony

- v okolí *ori* krátké DNA repetice - iterony
- váže se na ně Rep protein (F1 plazmidy)
- po replikaci Rep vyvolá párování s dceřinou molekulou DNA
- to blokuje další iniciaci replikace
- po rozdělení buňky jsou plazmidy odděleny a jsou schopny se opět replikovat
- tato skupina dále obsahuje R6K, pSC101, P1, pMJ101, RK2

Kontrola replikace a počtu kopií iterony



Stabilita plazmidů

□ U plazmidů lze rozlišovat dva typy stability :

■ stabilita strukturní a segregační

□ strukturní stabilita

■ dána celistvostí plazmidové molekuly

■ přítomností přímých či inverzních repetit - homologní rekombinace a delece částí plazmidů

□ segregační stabilita

■ předpokladem je pravidelná distribuce jeho kopií do dceřiných buněk

■ při náhodné distribuci 2^{-n} (n je počet kopií plazmidu)

■ u plazmidů s vysokým počtem kopií je jediná podmínka dostatečný počet kopií v monomerní formě

□ specifický systém rekombinace, přeměňující plazmidové multimery na monomery – *par* systém

Rekombinace plazmidových multimerů

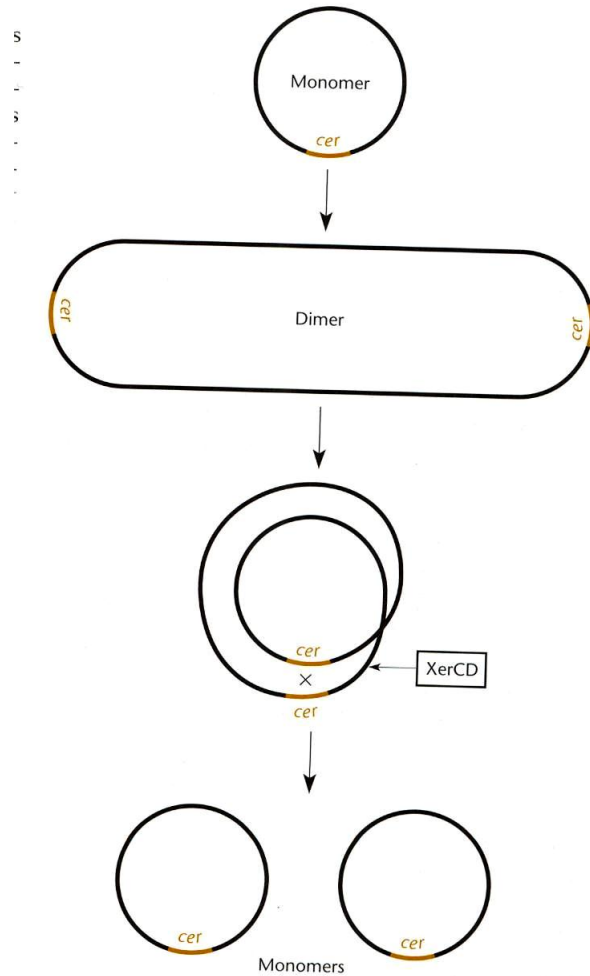


Figure 4.11 The Xer functions of *E. coli* catalyze site-specific recombination at the *cer* site to resolve plasmid dimers.

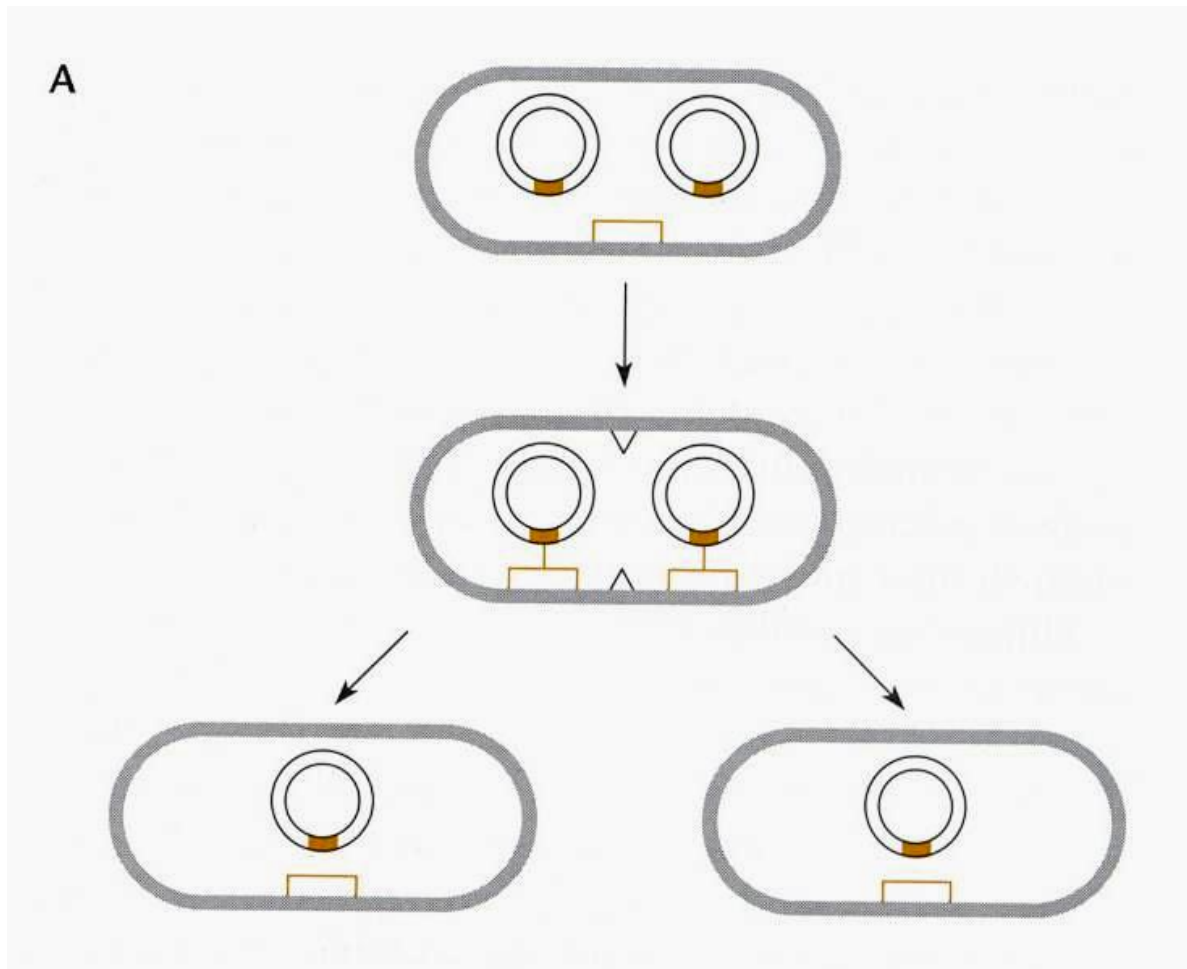
Stabilita plazmidů - nízkokopiové

□ nízkokopiové plazmidy

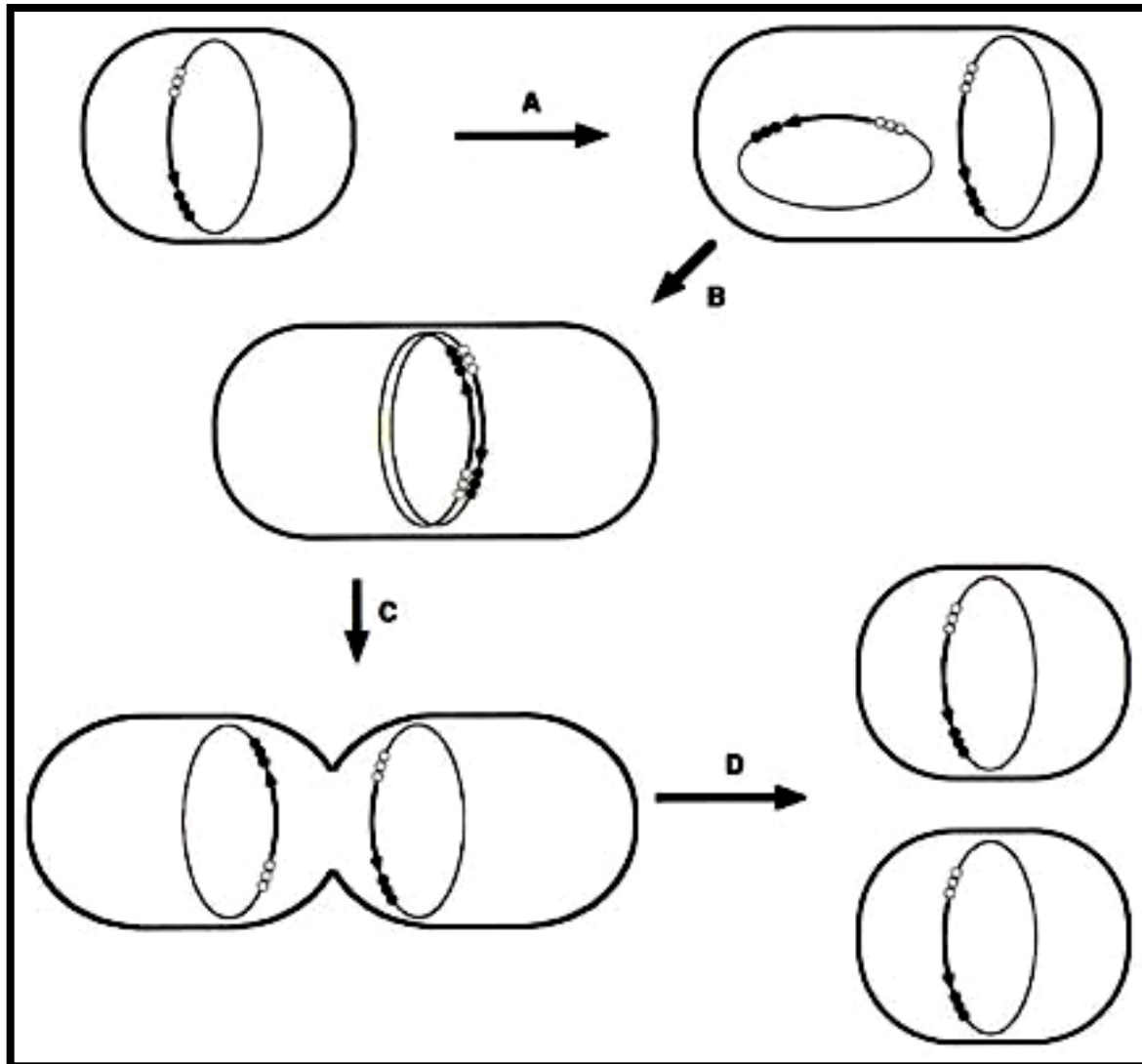
- mechanismus aktivní segregace plazmidů
- partitionig systém (*par* geny), u F, P1 a R1 plazmidů

- systém „postsegregačního zabíjení“ buněk bez plazmidu
- princip syntézy stabilního toxinu a nestabilního antitoxinu - díky nestabilitě antitoxinu je toxin aktivní pouze v buňkách, které ztratily plazmid
- antitoxin je nestabilní antisense RNA - reguluje mRNA toxinu R1 plazmid

Model mechanismu aktivní segregace plazmidů



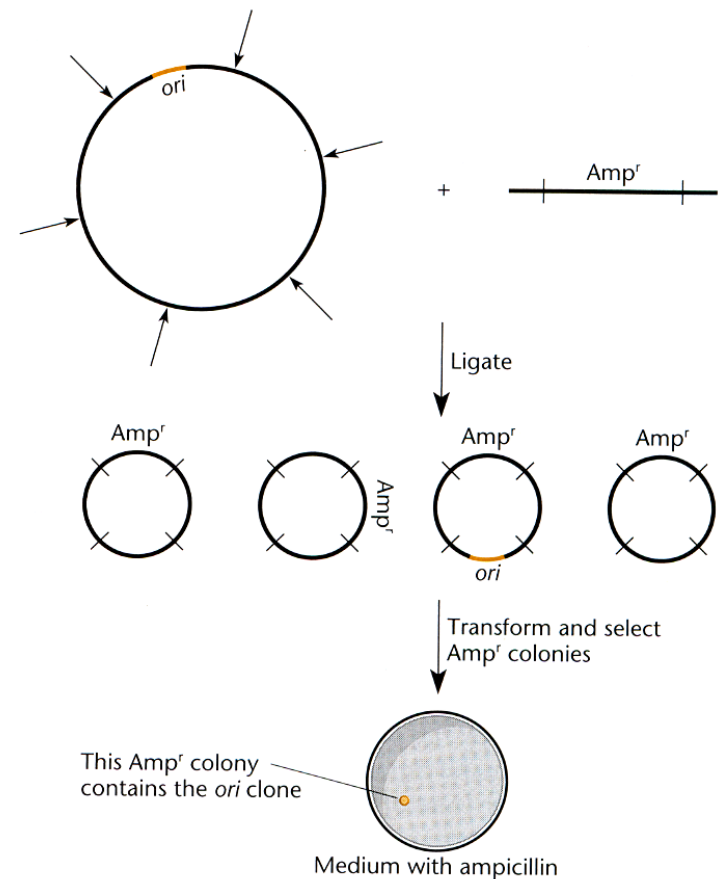
Aktivní segregace plazmidů



Nalezení místa *ori* plazmidu

Ori místo je zodpovědné za hlavní vlastnosti plazmidu

- ❑ Rekombiantní techniky
- ❑ Plazmid je nastříhán restriktivním enzymem
- ❑ Kusy jsou ligovány s antibiotikovou resistencí
- ❑ Transformace do buněk a selekce na dané antibiotikum
- ❑ Vyrostou pouze ty transformanty, které mají *ori* místo – jsou schopny replikovat DNA s antibiotikovou resistencí



Užitečné typy plazmidů

- Plazmidy se širokým spektrem hostitelů
 - Obecné klonovací vektory (odvozené od Col1, úzké spektrum hostitelů, *E. coli* a příbuzné druhy)
 - Vektory odvozené od plazmidů ze širokým spektrem hostitelů RSF1010, RK2 (ve většině G- bakterií, *mob* místo)
- Shuttle vektory
 - Pokud je potřeba replikace ve dvou hostitelích
 - plazmidy se dvěma *ori* pro oba hostitele
 - Nezbytný selekční marker fungující v obou hostitelích
 - Je možné i mezi bakteriemi a kvasinkami
- Mobilizovatelné plazmidy
 - Pokud není vypracovaný nebo obtížný transformační systém
 - *mob* místo umožňuje konjugativní přenos v přítomnosti konjugativního plazmidu.