

Povzetek

POVZETEK

Plazmidi so izvenkromosomske molekule DNA, ki jih lahko najdemo tako v prokariotnih kot eukariotnih celicah. Plazmidi se med seboj razlikujejo po velikosti, kot tudi po genetski sestavnosti. Nekateri plazmidi so zelo majhni (okoli 2 kb ali še manj), drugi plazmidi so lahko veliki 300 kb ali celo večji. Čeprav so geni, zapisani na plazmidih, zelo raznoliki, jih lahko razporedimo v nekaj skupin. Eno skupino sestavljajo geni, ki so bistveni za obstoj plazmida. To so geni potrebni za podvojevanje, stabilnost in vzdrževanje plazmida v celici. Geni z zapisi, ki niso neposredno povezani z obstojem plazmida v celici, ampak nudijo gostiteljevi celici določeno prednost, tvorijo drugo skupino. Primeri takšnih genov so geni za odpornost proti antibiotikom, geni z zapisi encimov alternativnih metabolnih poti, geni za virulence dejavnike. Tretjo skupino genov predstavljajo geni, katerih produkti sodelujejo pri razširjanju plazmidov med bakterijskimi celicami. Nekateri plazmidi, t. i. konjugativni plazmidi, so sposobni prenosa v drugo bakterijsko celico zaradi lastnih zapisov, za sintezo pilov, vzpostavitev konjugacijskega para in prenosa DNA, skratka imajo zapisano vso informacijo potrebno za konjugacijo, medtem ko imajo nekateri drugi plazmidi samo informacijo za mobilizacijo prenosa svoje DNA s pomočjo drugega konjugativnega plazmida.

Že pred več kot 50 leti so plazmidi pritegnili pozornost znanstvenikov. Raziskave na plazmidih so privedle do mnogo velikih odkritij in uporabe plazmidov kot vektorjev v molekularnem kloniranju. Plazmide se uporablja kot modele v raziskavah mehanizmov podvojevanja DNA, evolucije, prenosa genske informacije. V zadnjem času se je, zaradi možnosti učinkovitega sekvenciranja in s tem povezanega določanja celotnih nukleotidnih zaporedij tudi velikih plazmidov, zanimanje za plazmide še povečalo, saj se plazmidi razkrivajo kot pomembni prenašalci genske informacije med organizmi.

Plazmid pRK100, ki je opisan v tej doktorski disertaciji, je velik (145 kb) naravni konjugativni plazmid, ki smo ga izolirali iz uropatogenega seva *E. coli*. Veliki naravni plazmidi so pomembni razširjevalci genov za virulence dejavnike in tudi druge genske informacije med bakterijami. Namen raziskav plazmida pRK100, ki so predstavljene v tej doktorski disertaciji, je doprinesiti k razumevanju nastanka velikih naravnih plazmidov in odkriti pomembne vidike genskega uravnavanja prenosa DNA s konjugacijo, predvsem uravnavanja izražanja gena glavnega pozitivnega regulatorja konjugacije, proteina TraJ.

Genetska označitev plazmida pRK100 s hibridizacijami s sondami, ki so izvirale iz različnih znanih plazmidov, so razkrile, da ima pRK100 verjetno dve replikacijski regiji, aerobaktinski sistem za privzem železa in insercijsko zaporedje IS1. Biološki poskusi so pokazali, da ima pRK100 zapisa za dva kolicina, ColV in ColIa, in zapisa za odpornost proti antibiotikoma ampicilin in tetraciklin (Poglavje 2). Ugotovili smo tudi, da je pRK100 zelo obstojen plazmid in da se lahko s konjugacijo prenese v druge celice bakterij *E. coli* in *Klebsiella pneumoniae*. Na podlagi dobljenih podatkov smo pripravili prvo mapo, ki je prikazovala razporeditev genskih zapisov plazmida pRK100. Že hibridizacijski poskusi so nakazovali, da je plazmid pRK100 sestavljen plazmid, saj smo na njem našli tako zapise zelo podobne ali celo enake zapisom plazmidov iz skupine ColV kot tudi zapise zelo podobne ali celo enake zapisom plazmidov podobnih plazmidu F.

Da bi osvetlili izvor in evolucijo plazmida pRK100, smo določili nukleotidna zaporedja določenih predelov pRK100, ki so s hibridizacijami nakazovala, da so bodisi edinstvena ali pa podobna drugim plazmidom (Poglavje 3). S primerjavo dobljenih nukleotidnih zaporedij, smo potrdili, da je regija *tra* plazmida pRK100 najbolj podobna regiji *tra* plazmida F, medtem ko sta aerobaktinski sistem privzema železa in ColV najbolj podobna plazmidu pColV-K30. Dalje, smo na plazmidu pRK100 našli gen *rmoA*, ki je najbolj podoben genu *rmoA* plazmida R100, kot tudi še enterohelinski sistem za privzem železa, katerega nukleotidno zaporedje je bilo najbolj podobno enterohelinu zapisanem na kromosomskem otoku patogenosti, PAI III₅₃₆, uropatogenega seva 536 bakterije *E. coli*. Vsi dobljeni podatki

so pokazali, da je pRK100 resnično mozaično sestavljen plazmid iz elementov, dobljenih iz različnih drugih plazmidov in tudi kromosoma.

V poglavju 3 so prikazani tudi rezultati dobljeni z raziskavami replikacijskih regij. S pripravo minireplikonov iz fragmentov plazmida pRK100 smo potrdili, da ima pRK100 dve delujoči replikacijski regiji. S primerjavo nukleotidnega zaporedja obeh replikacijskih regij z nukleotidnimi zaporedji, deponirani v genski banki, smo ugotovili, da je ena replikacijska regija pRK100 najbolj podobna replikacijski regiji RepFIB plazmida F, druga replikacijska regija pRK100 pa je najbolj podobna replikacijski regiji RepFIIA plazmida R1. Ti rezultati so še enkrat pokazali mozaičnost plazmida pRK100.

Konjugacija plazmida F in plazmidu F podobnih plazmidov se proučuje že več kot 50 let in je najbolj preučen konjugacijski prenos, ki velja za paradigmo. Odkrili so, da je glavni pozitivni regulator konjugacije, ki je zapisan na konjugativnem plazmidu, protein TraJ. Nadalje so tudi odkrili, da je TraJ uravnan s sistemom FinOP, ki ga sestavljata dva elementa: protein FinO in protiprepisna molekula RNA, FinP. Sistem FinOP deluje tako, da prepreči prepisovanje mRNA *traJ* v protein TraJ in posledično ne pride do aktivacije konjugacijskega prenosa.

Ker smo predvidevali, da mora biti TraJ uravnan tudi še kako drugače in ne samo s sistemom FinOP, smo pripravili transkripcijsko gensko fuzijo *traJ-lacZ* in ugotavljali aktivnost te fuzije v različnih pogojih (Poglavje 4). Ti poskusi so pokazali, da raven glukoze v gojišču vpliva na izražanje genske fuzije *traJ-lacZ* in nadaljnji β -galaktozidazni poskusi z mutantami v genu *cya* oziroma *crp* so razkrili, da kompleks cAMP-CRP na prepisovanje promotorja *traJ* pozitivno vpliva. Pozitivni vpliv kompleksa cAMP-CRP smo potrdili tudi s kompetitivnim RT-PCR. Vežavni poskusi DNA-protein so pokazali, da se protein CRP veže na promotor *traJ*. Poskusi z DNazoI so razkrili, da je vezavno mesto za CRP na promotorju *traJ* razporejeno okoli mesta -67.5 , glede na predviden začetek prepisovanja mRNA za *traJ*. Da je najdeno vezavno mesto za CRP dejansko pomembno za izražanje gena *traJ*, smo preverili z β -galaktozidaznimi testi, s katerimi smo merili aktivnost promotorja *traJ* z mestno specifično mutiranim vezavnim mestom za CRP. Vsi ti poskusi *in vitro* so torej nakazovali vpliv kompleksa cAMP-CRP na izražanje gena *traJ*. Da bi preverili ali kompleks cAMP-CRP tudi resnično vpliva na konjugacijo, smo izvedli poskuse tudi *in vivo*. Ugotavljali smo frekvence konjugacijskega prenosa plazmida pRK100 iz seva divjega tipa in iz mutant *crp* oziroma *cya*. Glede na dobljene rezultate, frekvence konjugacijskega prenosa pRK100 iz mutant so namreč nižje od frekvenc prenosa pRK100 iz seva divjega tipa, lahko sklepamo, da kompleks cAMP-CRP vpliva na konjugacijo.

Ker ima CRP nenavadno pozicijo vezavnega mesta, -67.5 , na promotorju *traJ*; in se zato verjetno CRP veže na nasprotno stran DNA kot DNA-polimeraza, ki se veže na promotorska zaporedja -10 in -35 , smo predvidevali, da pri uravnavanju izražanja *traJ* sodelujejo tudi še drugi regulatorni proteini. To hipotezo smo preverili (Poglavje 5) z β -galaktozidaznimi poskusi, s katerimi smo merili aktivnost genske fuzije *traJ-lacZ* v sevih z mutacijami v genih za različne globalne regulatorje. Rezultati dobljeni s sevi z mutacijami v *lrp*, *hns*, *cpx*, *himA*, *rpoS*, *relA* *spoT* so pokazali, da Lrp in H-NS pozitivno vplivata na izražanje *traJ*, kar so potrdili tudi rezultati dobljeni s kompetitivnim RT-PCR. Promotor *traJ* ima nukleotidna zaporedja, ki se skladajo s konsenzusnimi vezavnimi zaporedji Lrp in H-NS, in vezavni poskusi DNA-protein so pokazali, da se oba proteina, Lrp in H-NS, vežeta na promotor *traJ*, a da je njuna vezava manj specifična kot vezava CRP. Poskusi konjugacijskega prenosa plazmida pRK100 iz sevov z mutacijami *lrp* in *hns* so potrdili, da sta Lrp in H-NS tudi pomembna za konjugacijo in ne samo za izražanje *traJ*. Primerjava nukleotidnega zaporedja z vezavnimi mesti za CRP, Lrp in H-NS promotorja *traJ* plazmida pRK100 z nukleotidnimi zaporedji promotorjev *traJ* drugih plazmidu F podobnih plazmidov, je pokazala, da imajo tudi ti plazmidi v promotorju *traJ* vezavna mesta za CRP, Lrp in H-NS, kar nakazuje, da so ti trije proteini pomembni za konjugacijo tudi pri drugih plazmidu F podobnih plazmidih.

Delo predstavljeno v tej doktorski disertaciji je pokazalo, da je plazmid pRK100 v svoji evoluciji pridobil elemente iz različnih virov in se tako razvil v velik, mozaično sestavljen plazmid, ki je v svoji osnovi podoben plazmidu F, a ima zapise privzete tudi od drugih plazmidov in celo kromosoma. Zaradi izrazite mozaičnosti je plazmid pRK100 zelo lep primer dinamične zgradbe plazmidov in podpira vlogo plazmidov pri razširjanju genske informacije v in med bakterijskimi populacijami. Razkritje dejavnikov, ki vplivajo na konjugacijski prenos preko uravnavanja izražanja *traJ*, je lahko pomembno za razvoj novih strategij, ki so usmerjene v omejevanje razširjanja virulencnih dejavnikov.