

Samenvatting

SAMENVATTING

Plasmiden zijn extrachromosomale DNA elementen met een grootte die kan variëren van 2 kb tot meer dan 300 kb en die zowel in prokaryote als eukaryote cellen kunnen voorkomen. Ofschoon de genen die op plasmiden kunnen voorkomen zeer divers van aard zijn, kunnen ze op basis van hun functionele eigenschappen in verschillende groepen worden ingedeeld. Eén functionele groep bestaat uit genen die essentieel zijn voor het voortbestaan van het plasmide zoals genen die nodig zijn voor plasmide replicatie en stabiliteit. Een tweede groep vormen de genen die op zich niet essentieel zijn voor het zich kunnen handhaven van het plasmide maar die indirect bijdragen aan hun voortbestaan door een gunstig effect te hebben op de overlevingsmogelijkheden van de gastheercel, bijvoorbeeld door hun gevoeligheid voor antibiotica en andere toxische stoffen te verminderen. Een derde groep bestaat uit genen die bijdragen aan de overdracht van het plasmide naar andere gastheercellen. Sommige plasmiden, de conjugatieve plasmiden, bezitten alle genetische informatie die nodig is voor de overdracht van erfelijk materiaal via conjugatie. Deze informatie is gelegen in de zgn. *tra* regio.

Onderzoek naar de structuur en het functioneren van plasmiden heeft geleid tot vele belangrijke ontdekkingen en toepassingen. Een van de meest bekende toepassingen van plasmiden is hun gebruik in de moleculaire biologie als cloneringsvector, maar ook bij het ontrafelen van de mechanismen van DNA replicatie, de overdracht van DNA en de verspreiding van genetische eigenschappen spelen plasmiden een belangrijke rol. De evolutionaire betekenis van deze processen wordt in toenemende mate in volle omvang duidelijk met het bekend worden van de complete DNA volgorde van plasmiden en van die van het volledige genoom van een reeks van micro-organismen.

Het plasmide pRK100, het onderwerp van studie in dit proefschrift, is een groot (145 kb) natuurlijk voorkomend conjugatief plasmide dat voor het eerst werd geïsoleerd uit een uropathogene *E. coli* stam. Grote, natuurlijke conjugatieve plasmiden worden in toenemende mate herkend als belangrijke elementen in de snelle verspreiding onder bacteriële populaties van specifieke kenmerken, met name van virulentiegenen en resistentie-inducerende genen. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek had als doel om aan de hand van pRK100 de evolutie van grote natuurlijke plasmiden beter te kunnen begrijpen en om belangrijke stappen in de regulatie van het proces van conjugatie, essentieel voor de verspreiding van het plasmide, te leren kennen. Hierbij werd in het bijzonder aandacht besteed aan de regulatie van de expressie van het TraJ eiwit dat een centrale rol vervuld in het initiëren van het conjugatieproces.

Karakterisering van pRK100 door middel van DNA hybridisatie met probes gebaseerd op DNA sequenties die voorkomen in andere plasmiden toonde aan dat pRK100 waarschijnlijk twee DNA replicatie regio's bezit en daarnaast genen bevat die coderen voor een aerobactine ijzeropname systeem. Bovendien, bleek uit biologische assays dat op pRK100 waarschijnlijk ook genen aanwezig zijn die coderen voor twee *colicines*, ColV and ColIa, en voor ampicilline en tetracycline resistentie (Hoofdstuk 2). Ook kon worden vastgesteld dat pRK100 een zeer stabiel plasmide is dat door middel van conjugatie overgedragen kan worden op andere *E. coli* stammen en op *Klebsiella pneumoniae*. Op basis van de verkregen gegevens was het mogelijk een plasmidekaart te construeren van de genetisch opbouw van pRK100 (Hoofdstuk 2). Op grond van de grote overeenkomsten in hybridisatieresultaten met pRK100 en het ColV plasmide, werd pRK100 vooralsnog als een plasmide behorende de ColV groep van plasmiden aangemerkt. Een belangrijke verschil met deze groep van plasmiden leek echter de *tra* regio te zijn. In pRK100 bleek deze groep van genen het meest verwant met soortgelijke genen gelegen op een ander natuurlijk conjugatief plasmide, het F plasmide.

Teneinde de oorsprong en evolutie van pRK100 nader te kunnen vaststellen werd, aan de hand van de hybridisatieresultaten, van delen van het plasmide de DNA sequentie bepaald (Hoofdstuk 3). Vergelijkende sequentieanalyse bevestigde dat de *tra* regio van pRK100 inderdaad de meest

overeenkomsten vertoont met de *tra* regio van het F plasmide, terwijl de aerobactine en ColV regio's de meeste verwantschap vertoonden met pColV-K30. Bij nader onderzoek van delen van pRK100 die bij hybridisatie schijnbaar uniek voor dit plasmide leken, werd een gen ontdekt dat het meest verwant was met het *rmoA* gen van plasmide R100 en ook een tweede ijzeropname systeem. Dit (enterocholine) systeem vertoonde qua DNA volgorde de meeste overeenkomst met genen gelegen op het pathogeniteitseiland, PAI III₅₃₆, dat aanwezig is op het chromosoom van de uropathogene *E. coli* stam 536. Het geheel van deze bevindingen wees erop dat pRK100 een echte mozaiekstructuur heeft met genetische elementen die afkomstig zijn van diverse andere plasmiden, maar ook van het chromosoom.

De oorsprong van pRK100 werd tevens onderzocht door een gedetailleerde bestudering van de replicatie genen van pRK100 (Hoofdstuk 3). Constructie van minireplicons bestaande uit fragmenten van pRK100 bevestigde dat het plasmide twee replicatie regio's bezit en dat beide regio's functioneel zijn in *E. coli*. Nadat de volledige DNA sequentie van beide replicatie regio's was verkregen en werd vergeleken met die van andere plasmiden bleek dat, anders dan de hybridisatie resultaten deden vermoeden, één van de replicatie regio's sterk verwant aan de RepFIB regio van plasmid F en de andere aan de RepFIIA regio van plasmid R1. De aanwezigheid van twee replicatie regio's schijnbaar afkomstig van twee verschillende plasmiden bevestigde het mozaiekkarakter van pRK100.

De overdracht via conjugatie van plasmid F and F-gelijkende plasmiden naar andere micro-organismen is al gedurende meer dan 50 jaar onderwerp van studie. In deze periode werd ontdekt dat het TraJ eiwit de belangrijkste positieve regulator is bij het op gang komen van het conjugatieproces. Het TraJ eiwit wordt gereguleerd door het zgn. fertiliteits inhibitie systeem, dat uit twee elementen bestaat: het eiwit FinO en het antisense RNA molecule FinP. Interactie van deze twee elementen voorkomt de translatie van *traJ* mRNA en aldus de vorming van het conjugatieapparaat en de overdracht van plasmide.

Gezien de centrale positie van het TraJ eiwit in de regulatie van conjugatie werd in het onderzoek beschreven in dit proefschrift de mogelijkheid onderzocht of er naast de reeds bekende regulatie op translatie niveau door het FinOP systeem wellicht een tweede vorm van regulatie van conjugatie zou kunnen bestaan, en wel door het reguleren van de activiteit van de *traJ* promoter. Aangezien regulatie van de *traJ* promoter nog nooit eerder was beschreven, werd eerst de activiteit van de promoter onder verschillende omgevingsomstandigheden bepaald met behulp van een *traJ-LacZ* reporter systeem. Deze experimenten (beschreven in Hoofdstuk 4) wezen erop dat de hoeveelheid glucose in het groeimedium van invloed is op de mate van expressie van de *traJ-lacZ* genfusie. Daaropvolgende β -galactosidase assays met *cya* and *crp* mutanten toonden aan dat de vorming van het cAMP-CRP complex noodzakelijk is voor een sterke transcriptie vanaf de *traJ* promoter. Deze bevinding werd bevestigd met een competitive RT-PCR. Bovendien kon met mobility shift assays (EMSA) worden aangetoond dat het eiwit CRP, onderdeel van het cAMP-CRP complex, aan de *traJ* promoter regio bindt. DNaseI protectie assays (DNA footprinting) toonde aan dat CRP bond aan het DNA rondom positie -67.5 van de plaats waar waarschijnlijk de transcriptie van *traJ* begint. Gerichte mutagenese van de gevonden CRP bindingsplaats bevestigde dat deze sequentie van invloed is op de activiteit van de *traJ* promoter. De waarde van deze *in vitro* bevindingen werd verder onderzocht in conjugatie-experimenten. In deze experimenten bleken stammen met een defect in het *crp* and *cya* gen, en dus in de vorming van het CRP-cAMP complex, een duidelijk verminderd conjugatievermogen te hebben vergeleken met de wild-type stam (Hoofdstuk 4).

De aanwezigheid van de CRP bindingsplaats rondom positie -67.5 was opvallend aangezien deze positie wordt voorspeld zich aan de andere kant van de DNA helix te bevinden dan de -10 en -35 promoter sequenties. Dit bracht ons er toe te postuleren dat er naast het cAMP-CRP complex wellicht andere DNA regulator eiwitten betrokken waren bij de regulatie van de *traJ* transcriptie. Deze hypo-

these werd nader onderzocht door het meten van de *traJ* promoter activiteit in een reeks stammen met mutaties in bekende DNA regulerende eiwitten. De resultaten verkregen met *lrp*, *hns*, *cpx*, *himA*, *rpoS*, *relA* *spoT* mutanten in *traJ-lacZ* reporter assays en in de competitive RT-PCR (beschreven in Hoofdstuk 5) wezen erop dat zowel H-NS and Lrp als positieve modulators van de *traJ* transcriptie kunnen fungeren. EMSA toonde aan dat H-NS and Lrp binden aan de *traJ* promoter regio, maar ook dat deze binding veel minder specifiek is dan de binding van CRP. Conjugatie experimenten met *hns* and *lrp* mutanten bevestigden dat H-NS and Lrp van belang zijn voor conjugatie *in vivo*. Een vergelijking van de CRP, H-NS and Lrp bindingsplaatsen in de *traJ* promoter regio van pRK100 met plasmid sequenties in de database gaf aan dat vergelijkbare bindingsmotieven aanwezig waren in de *traJ* promoter regio's van ander F-gelijken plasmids. Dit zou erop kunnen wijzen dat CRP, H-NS en Lrp niet alleen in pRK100, maar ook in andere F-like plasmiden een regulerend effect op conjugatie hebben.

Concluderend kan worden gezegd dat het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft aangetoond dat het grote natuurlijke plasmide pRK100 tijdens zijn evolutie DNA elementen van diverse bronnen heeft verworven wat heeft geleid tot een groot plasmide met een sterke mozaiekstructuur. Deze mozaiekstructuur maakt pRK100 een voorbeeld bij uitstek van de dynamische structuur van plasmiden en ondersteunt de veronderstelde rol van deze plasmiden in de verspreiding van genetische informatie onder bacterie populaties. De ontdekking van een nieuw mechanisme van regulatie van de belangrijke initiator van conjugatie, TraJ, geeft inzicht in de mechanismen waarlangs omgevingsfactoren de overdracht van erfelijke materiaal tussen bacteriën kunnen beïnvloeden. Deze kennis zou kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van methoden gericht op beperking van de verspreiding van de virulentie- en antibiotica-resistentiegenen die op deze plasmiden liggen.