

MOLEKULARNE MECHANIZMY ODPOWIEDZIALNE ZA STABILNE DZIEDZICZENIE ORAZ ROZPRZESTRZENIANIE PLAZMIDÓW NIOSĄCYCH SYSTEMY RESTRYKCYJNO-MODYFIKACYJNE TYPU II

Olesia Werbowy

Plazmidy są to pozachromosomalne elementy genetyczne posiadające zdolność do autonomicznej replikacji. Występują powszechnie u organizmów prokariotycznych (bakterie i archea), lecz można je również znaleźć u eukariotów takich jak np. drożdże. Niektóre z nich mają zdolność do samodzielnego transferu do nowego gospodarza poprzez koniugację czy mobilizację. Pomimo tego, że plazmidy nie są elementami genetycznymi niezbędnymi do życia drobnoustrojów, mogą one zawierać determinanty genetyczne, które mogą wpływać na adaptację gospodarza do zmieniających się warunków środowiska. Spośród wielu cech charakterystycznych dla plazmidów, dwie zasługują na szczególne wyróżnienie: (i) zdolność do autonomicznej replikacji, oraz (ii) zdolność do trwałego utrzymywania się w komórce gospodarza bez presji selekcyjnej przy znaczącym obciążeniu metabolizmu gospodarza. Ostatnia cecha jest szczególnie trudna do analizy, ponieważ oprócz ogólnych mechanizmów zaangażowanych w utrzymywanie się plazmidów takich jak (i) losowa segregacja, (ii) aktywna partycja i (iii) systemy addykcyjne, istnieją również inne czynniki odgrywające w tym procesie istotne role. Zalicza się do nich: horyzontalny transfer genów, pozytywną selekcję plazmidów kodujących ważne geny, oraz kompensacyjną adaptację. Wszystko to sprawia, że trwałe utrzymywanie się i rozprzestrzenianie plazmidów jest zjawiskiem o dużym stopniu złożoności, które należy analizować przy użyciu różnorodnych podejść badawczych.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej była analiza mechanizmów utrzymywania się oraz rozprzestrzeniania naturalnego plazmidu pEC156 kodującego system restrykcyjno-modyfikacyjny (RM) EcoVIII niesionego przez szczep *Escherichia coli* E1585-68 o serotypie O156. Plazmid pEC156 należy do grupy plazmidów ColE1 podlegających losowej dystrybucji do komórek potomnych. Stabilne utrzymywanie tego plazmidu jest zależne w głównej mierze od dwóch mechanizmów molekularnych. Pierwszy to system miejscowo-specyficznej rekombinacji zależny od maszynarii Xer/cer zaangażowany w rozdział multimerów, zaś drugi to system restrykcyjno-modyfikacyjny EcoVIII uczestniczący z kolei w eliminowaniu komórek bezplazmidowych na drodze ich post-segregacyjnej śmierci. W ramach przedstawionej pracy poszukiwano odpowiedzi na pytanie: w jakim stopniu każdy z tych mechanizmów wpływa na stabilność plazmidu pEC156 w komórkach *E. coli* oraz innych enterobakterii?

W celu zbadania wpływu poszczególnych systemów na stabilne utrzymywanie się plazmidu oraz relacje pomiędzy plazmidem, a niosącym go gospodarzem, na bazie plazmidu pEC156 skonstruowano jego pochodne różniące się między sobą elementami genetycznymi istotnymi z punktu jego stabilnego utrzymywania w komórkach gospodarza. Były to: pIB8 (R⁺M⁺cer⁺rom⁺), pIB9 (R⁻M⁻cer⁺rom⁺), pRB1 (R⁺M⁺cer⁻rom⁺), pRB2 (R⁻M⁻cer⁻rom⁺), pRB3 (R⁻M⁺cer⁻rom⁺), pRB4 (R⁻M⁺cer⁺rom⁺), pOB9 (R⁺M⁺cer⁺rom⁻), pOB12B (HindIII R⁺M⁺cer⁺rom⁺). Plazmidy te zostały zdeponowane w Kolekcji Plazmidów i Drobnoustrojów Uniwersytetu Gdańskiego.

Szczegółowe badania doświadczalne obejmowały: (i) analizę stabilności pochodnych plazmidu pEC156 w różnych gospodarzach przy braku presji selekcyjnej (brak antybiotyku w pożywce); (ii) monitorowanie obecności endonukleazy restrykcyjnej w komórkach z użyciem faga *λcb2* lub test *in vitro* polegający na analizie aktywności enzymatycznej w lizatach komórkowych; (iii) określenie liczby kopii pochodnych pEC156 za pomocą kropek digital-PCR i qPCR; (iv) określania wielkości multimerów plazmidowych; (v) analizę uwalniania plazmidowego DNA do środowiska; (vi) pobieranie plazmidowego DNA na drodze naturalnej transformacji komórek *Escherichia coli*; (vii) transfer pochodnych pEC156 na drodze mobilizacji przez plazmidy koniugacyjne. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wyciągnięto wnioski na temat wpływu różnych czynników na stabilne utrzymywanie się plazmidu pEC156 w komórkach gospodarza oraz dróg jego transferu pomiędzy bakteriami.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy wskazują na trzy główne czynniki mające wpływ na stabilne utrzymywanie się plazmidu: (i) obecność locus *cer* odpowiedzialnego za rozdział plazmidowych multimerów, (ii) genu kodującego endonukleazę restrykcyjną, (iii) oraz kopijność plazmidu pEC156 [Werbony i in., 2015]. Najmniej stabilnie utrzymywane były pochodne pEC156 pozbawione miejsca *cer*. Podobnie niską stabilność obserwowano w przypadku szczepów *E. coli* niosących mutacje w genach kodujących białka zaangażowane w rozdział multimerów (XerC, XerD, ArgR i PepA).

W kolejnym etapie pracy zbadano spektrum gospodarzy dla plazmidu pEC156. Przeanalizowano stabilność pochodnych pEC156 w bakteriach z rodziny *Enterobacteriaceae* takich jak: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens* i *Proteus vulgaris*. Wykazano, że plazmid ten stabilnie utrzymuje się we wszystkich badanych bakteriach. Dodatkowo stwierdzono, że stabilność poszczególnych pochodnych jest podobna do tej obserwowanej w *E. coli*. Najwyższą stabilność zaobserwowano w przypadku *Enterobacter cloacae* i *Klebsiella oxytoca*, w pozostałych bakteriach stabilność spadła po 100 generacjach do

50%. W przypadku tych szczepów pochodne pEC156 zawierające locus *cer* były również bardziej stabilnie utrzymywane niż warianty pozbawione tego miejsca [Werbowsy i in., 2015].

Uzyskane wyniki stały się podstawą do zaproponowania modelu teoretycznego, który by umożliwiał analizę stabilności plazmidów w populacji bakterii. Przystępując do pracy nad tym modelem założono, że powinna go cechować prostota i zależność od jak najmniejszego zbioru intuicyjnych parametrów dających się łatwo zinterpretować. W oparciu o przedstawione zasady przygotowano model matematyczny, którego zastosowanie umożliwiło uzyskanie wyników dotyczących stabilności pochodnych pEC156 wykazujących zgodność z analizą eksperymentalną [Werbowsy i in., 2017]. Założenia wprowadzone do modelu były następujące: (i) wszystkie komórki na początku doświadczenia posiadają plazmid, (ii) rozdział plazmidów podczas podziału komórki macierzystej zachodzi losowo, (iii) podczas podziału komórkowego cząsteczka plazmidu replikują się tylko raz, (iv) po podziale komórkowym każda komórka potomna dziedziczy określoną liczbę cząsteczek plazmidu od komórki macierzystej. Jedynym wyjściowym parametrem była średnia liczba kopii plazmidu w komórce na samym początku doświadczenia (w tak zwanej zerowej generacji). Ze względu na dużą złożoność analizowanego układu składającego się z bakterii niosących plazmidy, zastosowano uniwersalne stochastyczne podejście dla rozwiązania złożonych problemów analitycznych metodę symulacji Monte Carlo. Polega ona na losowym wielokrotnym wykonywaniu doświadczenia teoretycznego według z góry ustalonych reguł i obliczeniu średniej ze wszystkich prób jako wynik końcowy będący ekstrapolacją do układu z bardzo dużą liczbą elementów. Takie podejście umożliwia stwierdzenie w jakim tempie losowe zdarzenia związane z replikacją i segregacją plazmidów prowadzą do stopniowego zmniejszania się ilości cząstek plazmidowych w komórce gospodarza, co w efekcie może prowadzić do powstania komórek bezplazmidowych. Model matematyczny został udostępniony w postaci programu komputerowego jako załącznik do artykułu opublikowanego w czasopiśmie PLoS One [Werbowsy i in., 2017].

Zastosowanie przedstawionego powyżej modelu teoretycznego umożliwia ilościowe określenie częstości występowania wad replikacji (parametr α), stopnia nierównomiernej segregacji dostępnych cząsteczek plazmidów pomiędzy komórkami potomnymi w trakcie podziału (parametr δ), czy wpływu postsegregacyjnej śmierci komórek w przypadku analizy stabilności plazmidów niosących systemy RM (parametr β). Na podstawie tych trzech parametrów (które mogą być uwzględniane oddzielnie) model jest w stanie zanalizować stabilność plazmidu w populacji bakterii na przestrzeni wielu generacji, rozkład ilości cząsteczek

plazmidów w bakteriach, czy średnią liczbę kopii plazmidów w populacji. Jest to o tyle istotne, że wielkości te mogą być badane doświadczalnie w różnych układach.

Przedstawiony teoretyczny model został wykorzystany do analizy przebiegów stabilności (w niektórych układach analizowano stabilność nawet przez 600 generacji) pochodnych pEC156 takich jak: pIB8 (EcoVIII R⁺M⁺cer⁺), pRB1 (EcoVIII R⁺M⁺cer⁻) i pRB2 (EcoVIII R⁻M⁻cer⁻) w szczepach *E. coli* MG1655 (typ dziki), MG1655 *pcnB*, oraz w hiper-rekombinogennym szczepie JC8679 (*sbcA*). Z użyciem tego modelu określono częstości występowania wad replikacji i stopnia nierównomiernego podziału plazmidów pomiędzy komórki potomne. Uzyskane wyniki były zgodne z danymi eksperymentalnymi.

Dzięki analizie teoretycznej udało się wykazać, że stabilność plazmidów jest ściśle uzależniona od równomiernej segregacji nowo powstałych cząsteczek plazmidu i że nawet niewielkie losowe fluktuacje przy rozdziale plazmidów pomiędzy komórkami potomnymi bardzo skutecznie zmniejszają ilość dostępnych do segregacji cząsteczek plazmidu, co zwiększa prawdopodobieństwo utraty plazmidów przez komórki potomne. Dane te w sposób ilościowy potwierdziły wcześniejsze obserwacje odnośnie większego znaczenia locus *cer* od obecności endonukleazy restrykcyjnej dla stabilnego utrzymywania plazmidu. Przyczyną nierównomiernej segregacji plazmidów do komórek potomnych mogą być losowe fluktuacje w trakcie segregacji plazmidów lub spontaniczne powstawanie multimerów i/lub splątanie niezależnych cząsteczek plazmidowych, które później podlegają nierównomiernemu rozdziałowi do komórek potomnych.

Analiza symulacji komputerowych skłania do konkluzji, że stabilne utrzymywanie się pochodnych pEC156 takich jak: pIB8, pRB1 i pRB2 zależy wyłącznie od genetycznego tła gospodarza (*E. coli* MG1655, MG1655 *pcnB* i JC8679 *sbcA*). Silną nierównomierną segregację plazmidowych multimerów można wytłumaczyć poprzez wzrastającą liczbę kopii plazmidów po 600 generacjach wzrostu bakterii [Werbowsy i in., 2017].

W następnym etapie pracy podjęto próbę określenia dróg rozprzestrzeniania się plazmidu pEC156 pomiędzy bakteriami. W przypadku małych plazmidów, które nie posiadają zdolności do autotransferu, ich mobilność często jest związana z obecnością *oriT* (origin transferu), genów *mob* oraz wspomagającej transfer maszynerii koniugacyjnej. Odpowiednie systemy koniugacyjne pozwalają na transfer materiału genetycznego nawet pomiędzy bakteriami wykazującymi niski stopień pokrewieństwa filogenetycznego. W kolejnej pracy [Werbowsy i Kaczorowski, 2016] zostały przeanalizowane mechanizmy rozprzestrzeniania się plazmidu pEC156, takie jak mobilizacja i naturalna transformacja.

Plazmid pEC156 nie posiada genów *mob*, natomiast posiada on dwa *oriT* za pomocą których może być mobilizowany przez takie plazmidy koniugacyjne jak F'_{ts114lac::Tn5} oraz

R64drd11 [Werbawy i Kaczorowski, 2016]. Funkcjonalność tych sekwencji została zbadana z wykorzystaniem pochodnej plazmidu pEC156 pOB9 pozbawionej obydwu *oriT* (*oriTF*-*oriTR64drd11*-R⁺M⁺). Każdy z tych obszarów jest obsługiwany przez specyficzny dla niego plazmid koniugacyjny. Z racji tego, że plazmid pEC156 pochodzi z *E. coli*, do badań nad mobilnością plazmidu pEC156 wśród bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* został wybrany plazmid koniugacyjny F[']_{ts114lac::Tn5}.

W pracy po raz pierwszy przedstawiono tak dokładne dane doświadczalne dotyczące częstości mobilizacji plazmidu nietransmisyjnego typu ColE1 przez plazmid koniugacyjny o wąskim spektrum gospodarza (plazmid F). Analizowano mobilność plazmidu nietransmisyjnego wśród enterobakterii. Wykazano, że obecność systemu RM EcoVIII obniża częstość tak koniugacji jak i mobilizacji. Dotyczyło to zwłaszcza takich bakterii jak: *K. oxytoca*, *C. freundii* i *S. enteritidis*. Natomiast nie stwierdzono takiego wpływu w przypadku analizy mobilności analizowanych plazmidów pomiędzy szczepami *E. coli* [Werbawy i Kaczorowski, 2016].

Zbadano również możliwość spontanicznego pobierania pEC156 przez bakterie. Do tego celu zaadoptowano protokół pobierania DNA bez wykorzystania komórek poddanych traktowaniu chlorkiem wapnia i szoku termicznego. W *E. coli* mechanizm pobierania DNA jest bardzo słabo poznany. Najprawdopodobniej związany jest on z występowaniem maszynerii białkowej związanej z IV typem pili, co udowodniono w przypadku naturalnie kompetentnych komórek bakterii takich jak *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* czy *Vibrio cholerae*. W pracy udało się uzyskać transformanty przy wprowadzaniu pochodnych pEC156 do szczepu *E. coli* HB101, natomiast nie wykazano, aby wpływ systemu RM EcoVIII na wydajność transformacji był istotny statystycznie.

Istotnym wynikiem uzyskanym w ramach niniejszej pracy doktorskiej była obserwacja dotycząca uwalniania przez bakterie plazmidu pEC156 do środowiska. Fakt ten tłumaczyć można śmiercią komórek w wyniku zakłócenia równowagi funkcjonowania systemu RM EcoVIII na skutek wrażliwości MTazy EcoVIII na jony Mg²⁺. Co istotne, uwolnione plazmidy miały zdolność do naturalnej transformacji komórek *E. coli* [Werbawy i Kaczorowski, 2016].

Podsumowując, w pracy wykazano jakie elementy genetyczne odpowiadają za stabilne utrzymywanie się plazmidu pEC156 niosącego geny systemu RM EcoVIII. Przedstawiono również możliwe drogi przekazywania plazmidu przy pomocy mechanizmu uwalniania-pobierania DNA oraz możliwość jego dalszego rozprzestrzeniania się w obrębie enterobakterii na drodze mobilizacji przy udziale plazmidu koniugacyjnego.