

## 1.2. PLASMIDE BACTERIENE

### Structura, clasificarea și conformațiile moleculare ale plasmidelor

În prezent, plasmidele sunt definite ca fiind repliconi neesențiali, capabili să se replice fizic independent de cromozom și transmiși în formă extracromosomală, pe verticală (de la o generație de indivizi la alta) sau pe orizontală (de la un individ la altul în cadrul aceleiași generații). În general, plasmidele reprezintă un fenomen al lumii procariote. Cu toate acestea, au fost descrise structuri genetice plasmidiale și la unele grupuri de eucariote inferioare (drozdii, fungi, mușcăiuri) și chiar și la eucariote superioare (plasmidele din mitocondrii și cloroplaste la unele celule vegetale).

Există cercetători care încadrează plasmidele în categoria organismelor acelulare. În contrast cu această teorie, alți cercetători consideră plasmidele ca nefiind organisme, ci alături de virusuri, transposoni și secvențe de inserție, ar aparține unor specii moleculare speciale, de elemente genetice mobile (ADN accesoriu) (P. Sykora 1992).

### Principalele categorii de gene codificate de plasmide

Fiind repliconi fizic independenți, toate plasmidele poartă gene implicate în propria **replicare**, **stabilitate** și **partiție**. În afară de acestea, majoritatea genelor codificate de plasmide conferă caractere adaptative, avantajoase gazdelor bacteriene. Cele mai frecvente categorii de gene purtate de plasmide sunt :

#### - *gene de rezistență la antibiotice*

Plasmidele de rezistență au fost descoperite în Japonia în anii 50 la izolate clinice de *Shigella dysenteriae* și s-a constatat că aceste gene nu erau plasate pe cromosomul bacterian. Au fost denumite factori R. Folosirea abuzivă și/sau incorectă a antibioticelor au determinat, pe de o parte, răspândirea în populațiile de bacterii patogene a determinantilor de antibioretistență, iar pe de altă parte, dezvoltarea unor mecanisme de antibioretistență extrem de eficiente.

În ceea ce privește originea genelor de antibioretistență, au fost emise 2 ipoteze majore:

a-genele de antibioretistență existente în prezent în foarte multe bacterii patogene ar avea originea în gene similare prezente în bacteriile ce produc antibiotice (și care, de regulă, sunt bacterii din sol); în această situație se presupune că ar fi avut loc evenimente de transfer de gene pe orizontală între bacterii din sol și bacterii patogene;

**b**-genele de antibioretistență ar fi evoluat din gene "house-keeping" (de exemplu: proteinele ce efluxează tetraciclina ar putea să fi evoluat din proteinele de transport al nutrienților).

- gene de toleranță la metale grele (ioni mercurici, derivați organomercurici, nichel, cobalt, plumb, cadmiu, bismut, antimoniu, zinc, argint)
- gene de rezistență la agenți intercalanți, radiații UV, radiații X, bacteriofagi, bacteriocine
- gene ce codifică factori de patogenitate și de virulență
- gene ce codifică bacteriocine
- gene ce codifică antibiotice
- gene implicate în metabolismul opinelor (plasmidele **Ti** de la *Agrobacterium*)
- gene ce codifică capacități metabolice deosebite, de exemplu folosirea unor substanțe xenobiotice ca sursă unică de carbon și energie la specii de *Pseudomonas*
- gene fixatoare de azot (genele **nif** de la *Rhizobium* și *Bradyrhizobium*)
- gene ce codifică enzime proteolitice, amilolitice etc
- gene ce codifică transferul plasmidelor pe orizontală prin proces de conjugare bacteriană (regiunea **tra**)

Deci, în afară de genele implicate în propria replicare, stabilitate și partiție, plasmidele mai pot purta și gene ce codifică caractere - unele esențiale, altele neesențiale pentru bacteria gazdă. **Caracterele esențiale** reprezintă căi metabolice centrale ale celulei bacteriene, plasmidele purtătoare fiind prezente la marea majoritate a izolatelor naturale ale unor tulpini bacteriene (de exemplu, unele plasmide mari de la *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*).

Unele **caractere neesențiale** conferă avantaje selective gazdelor purtătoare, permițând supraviețuirea acestora în anumite condiții de mediu. În această categorie intră genele plasmidiale ce codifică rezistența la antibiotice și toleranța la metale grele (asemenea gene sunt prezente la multe tulpini de bacterii patogene). În absența antibioticelor sau a metalelor grele ca factori de presiune selectivă, procesele de replicare, menținere și partiție a plasmidelor reprezintă un efort metabolic suplimentar pentru celulele bacteriene. Ca urmare, în doar câteva pasaje, aceste plasmide sunt eliminate din populația bacteriană prin subreplicare. Ele se mențin doar într-o proporție scăzută a populației bacteriene, fapt ce ar putea fi considerat o "economie" metabolică la nivelul întregii populații bacteriene.

Există însă și așa-numite **plasmide "criptice"**, care nu par să ofere gazdei nici un caracter avantajos. Interesant este faptul că, deși pot fi încadrate în categoria "*selfish DNA*" ("*ADN egoist*"), totuși și aceste plasmide sunt menținute într-o anumită proporție din populațiile bacteriene.

În ansamblu, genomul bacterian se caracterizează printr-o **intensă circulație pe orizontală** a genelor, între diverși indivizi bacterieni (H.Tschape 1994). Această circulație se desfășoară prin trei procese centrale - **conjugare, transformare și transducție** - dintre care, plasmidele sunt implicate în primele două.

Acest flux continuu de gene pare să fie o caracteristică definitorie a lumii bacteriene și să fi contribuit esențial la extrema versatilitate metabolică a bacteriilor în aproape toate mediile naturale.

### Clasificarea plasmidelor

Plasmidele pot fi clasificate funcție de diverse criterii :

**a) criteriul autotransferabilității.** Autotransferabilitatea reprezintă capacitatea unui element genetic (în speță, un plasmid) de a se autotransfera de la un individ bacterian la altul. De regulă, genele implicate în autotransferabilitate sunt grupate într-un operon (denumit operon **tra**), iar elementul genetic purtător este denumit **conjugon**. Conform acestui criteriu există 3 clase de plasmide :

- 1) **plasmide conjugative** – sunt plasmidele care prezintă întreg operonul **tra** și sunt autotransferabile, putând genera proces de conjugare bacteriană;
- 2) **plasmide non-conjugative** – sunt plasmidele ce nu prezintă operonul **tra**, nu sunt autotransferabile (nu pot genera conjugare bacteriană) și nici mobilizabile;
- 3) **plasmide mobilizabile** – sunt plasmidele ce nu prezintă operonul **tra** (și, ca atare, nu sunt autotransferabile), dar au gene **mob** care le permit mobilizarea în evenimente de conjugare inițiate de alte plasmide ce sunt conjugative.

**b) criteriul structurii moleculare.** Marea majoritate a plasmidelor sunt formate din ADN dublu catenar. Mai mult decât atât, din punct de vedere al structurii moleculare, există două clase de plasmide :

- 1) **plasmide circulare.** Plasmidele circulare sunt alcătuite din ADN d.c. circular, iar forma *in vivo* pare să fie CCC ("*circular covalently closed*"); foarte rar și temporar se întâlnește forma CO ("*circular open*"), în care una din cele două catene nu

este continuă având o legătură fosfodierica lipsă. Tot *in vivo* se mai întâlnesc și concatemi (oligo/multimeri).

2) **plasmide lineare**. Asemenea plasmide sunt alcătuite din ADN d.c. linear (L). Au fost descrise două tipuri de plasmide lineare :

1. Plasmide lineare cu telomere hairpin (telomere în ac-de-păr). Acestea sunt întâlnite cu precădere la plasmidele lineare de la *Borrelia*. Spirochetele din genul *Borrelia* au structură genomică lineară: toate speciile de *Borrelia* examinate au un cromosom linear de 950-1000 kb și mai multe plasmide lineare cu dimensiuni cuprinse între 5 și 200 kb (unele au și plasmide CCC). Toate plasmidele lineare de la *Borrelia* descrise până în prezent au telomere de tip *hairpin*.

Telomerele *hairpin* se caracterizează prin palindroame terminale bogate în A/T, la capete existând o continuitate în legatura de tip covalent între cele 2 catene.



Fig.1.10. Structura telomerelor *hairpin* la *Borrelia* (dupa H.Hinnebusch et al 1992).

Asemenea structuri (ADN d.c. L cu telomere de tip *hairpin*) mai există și la ADNmt de la reprezentanții genului *Pichia*, la poxvirusuri și la plasmidele lineare din mitocondriile de la fungi.

2. Plasmide cu telomere invertroni Asemenea telomere sunt întâlnite la plasmidele lineare de la genul *Streptomyces* – plasmide cu dimensiune cuprinsă între 9 și 600 kbp.



Fig.1.11. Structura telomerelor invertroni la *Streptomyces* (dupa H.Hirochika et al 1982 și K.Sakaguchi et al 1985).

Ca și cele *hairpin*, telomerele *invertroni* prezintă și ele palindroame terminale bogate în A/T. Diferența constă însă în faptul că nu există legătura covalentă între capetele celor 2 catene, și, ca urmare, capetele 5' și 3' sunt libere. La capul 5' al fiecărei catene este atașată covalent o moleculă proteică denumită **proteina TP** ("**Telomeric Protein**").

Asemenea structuri ADN, cu palindroame terminale bogate în A/T și cu proteina TP atașată covalent la capul 5' au fost definite de K.Sakaguchi (1990) ca fiind elemente genetice mobile cu replicare autonomă și denumite INVERTRONI, similare funcțional cu transposonii.

Telomerele *invertroni* sunt caracteristice repliconilor lineari de la eucariote, în mod special la plasmidele lineare din mitocondriile de fungi și plante și din citoplasma de fungi. Asemenea structuri genetice au mai fost identificate și în genomul unor adenovirusuri.

### c) **criteriul incompatibilității plasmidiale**

Procesul de "**gene-flow**" în lumea bacteriană ar putea avea un rol important în evoluția bacteriilor. Cu toate acestea, procesele de transfer de material genetic pe orizontală nu par să afecteze stabilitatea speciilor taxonomice bacteriene.

Din acest punct de vedere, plasmidele se găsesc într-o situație total diferită: "gene-flow"-ul între plasmide neînrudite pare să fie atât de ridicat și de răspândit, încât nu se poate alcătui o identificare taxonomică a plasmidelor doar pe baza unei liste a caracterelor pe care le codifică. Se pare că biologia plasmidelor nu implică mecanisme de izolare taxonomică asemănătoare cu speciile de plante și animale. În contrast, în lumea plasmidelor se observă un fenomen total diferit: izolarea plasmidelor individuale sau foarte asemănătoare. Acest fenomen este cunoscut ca fenomenul de incompatibilitate plasmidială.

De-a lungul anilor, **conceptul de incompatibilitate plasmidială** a ridicat foarte multe probleme. Actualmente, acest concept este definit ca fiind incapacitatea a două sau mai multe plasmide de a se menține și propaga stabil în aceeași linie celulară. Plasmidele din același grup de incompatibilitate ce conțin origini de replicare similare (deci, au același **replicon-type**), nu sunt moștenite stabil în descendență și segregă una de cealaltă. Cel mai probabil acest proces se datorează unei competiții moleculare între plasmide cu același **replicon-type** pentru aceleași proteine implicate în replicarea respectivelor plasmide – proteine codificate cromozomal.

La *Enterobacteriaceae* au fost descrise peste 30 de grupuri de incompatibilitate plasmidială. Un tip de incompatibilitate s-ar baza pe competiția între secvențele repetate RS (la care se atașează proteina **RepA**), dintre diferite plasmide existente în celula bacteriană.

Bazându-se pe tipul de replicon a fost imaginată o metodă nouă de identificare plasmidială folosind o colecție de sonde *rep* (Sykora P. 1992).

**d) criteriul numărului de copii plasmidiale**

Numărul de copii ale unui plasmid reprezintă o rezultată a mecanismelor de reglaj a numărului de evenimente de replicare plasmidială per ciclu celular. Astfel, există 2 mari categorii de plasmide:

(a) plasmide ce se găsesc în număr mare de copii per celulă, între 10 și câteva sute; aceste plasmide sunt denumite generic plasmide "*high-copy*";

(b) plasmide ce se găsesc în număr mic de copii per celulă, între 1-10 (*plasmide "low-copy"*).