

# Karakteristike fagoplazmida

---

Vrsaljko, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:047595>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Petra Vrsaljko

# **Karakteristike fagoplazmida**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Petra Vrsaljko

# **Characteristics of phage-plasmids**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće.

---

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Karakteristike fagoplazmida

Petra Vrsaljko

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Fagoplazmidi su hibridni mobilni genetički elementi koji se mogu prenositi vertikalno unutar bakterijskih linija u obliku kružnih molekula DNA ili horizontalno upakirani u virusne čestice između različitih prokariotskih stanica. Ovi elementi imaju velike genome koji sadrže mnoge gene homologne plazmidima i bakteriofagima što povećava njihovu učinkovitost prijenosa gena. Fagoplazmidi su brojni i široko rasprostranjeni u raznim bakterijskim vrstama među kojima su mnoge patogene bakterije od velikog kliničkog značaja. Dokazano je da ovi elementi sudjeluju u prenošenju raznih adaptivnih gena unutar bakterijskih populacija, uključujući gene koji kodiraju za antibiotsku rezistenciju. Zbog ovoga fagoplazmidi su predmet intenzivnog istraživanja kako bi se razumjela njihova evolucija i razvile strategije za suzbijanje širenja sojeva bakterija koji posjeduju rezistencije na antibiotike.

Ključne riječi: hibridni genetički elementi, plazmidi, bakteriofagi, izmjena gena, antibiotska rezistencija, evolucija bakterija

(24 stranica, 5 slika, 0 tablica, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

## Characteristics of phage-plasmids

Petra Vrsaljko

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Phage-plasmids are hybrid mobile genetic elements which can be transferred vertically within bacterial lineages in the form of circular DNA molecules or horizontally packaged in viral particles between different prokaryotic cells. These elements have large genomes containing many genes homologous to plasmids and bacteriophages, which increases their gene transfer efficiency. Phage-plasmids are numerous and widely distributed in various bacterial species, among which are many pathogenic bacteria of great clinical importance. It has been proven that these elements participate in the transmission of various adaptive genes within bacterial populations, including genes that code for antibiotic resistance. Because of this, phage-plasmids are subject of intensive research in order to understand their evolution and develop strategies to suppress the spread of antibiotic-resistant bacterial strains.

Keywords: hybrid genetic elements, plasmids, bacteriophages, gene exchange, antibiotic resistance, evolution of bacteria

(24 pages, 5 figures, 0 tables, 33 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

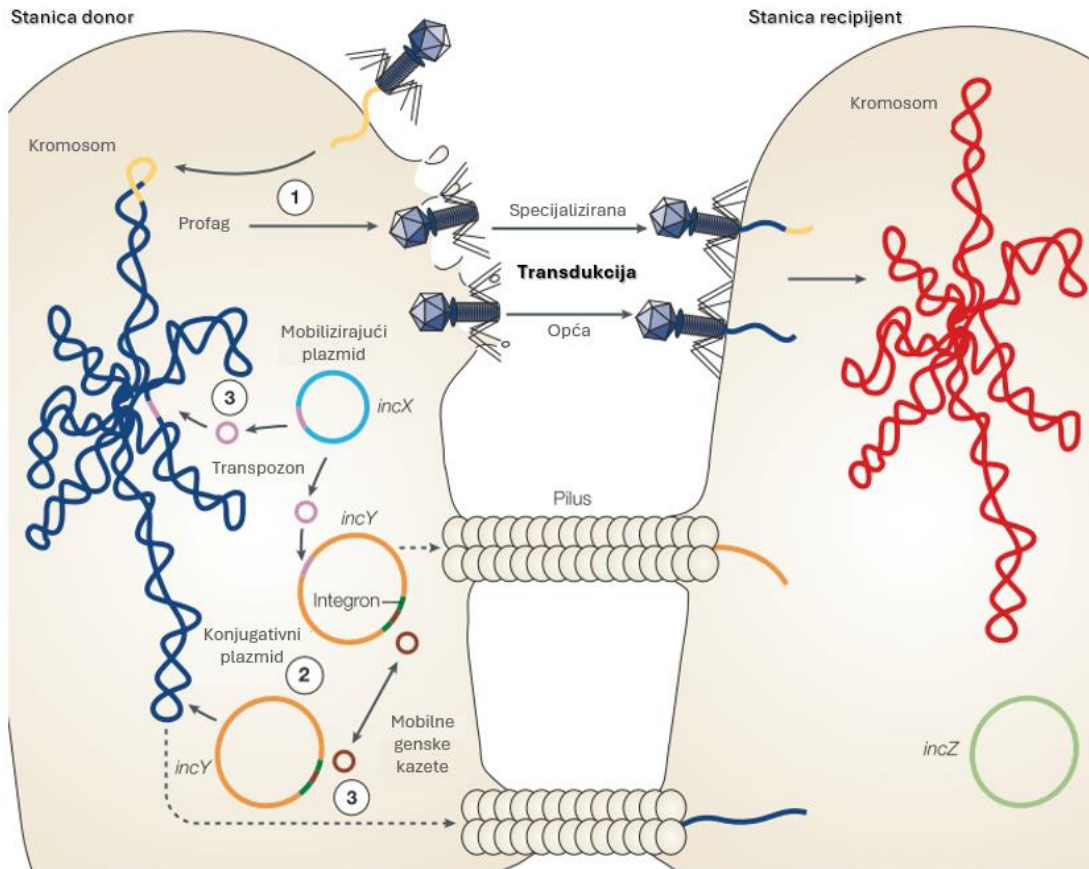
# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Povijest, rasprostranjenost i struktura fagoplazmida .....	4
2.1. Povijest, rasprostranjenost i raznolikost fagoplazmida.....	4
2.2. Veličina fagoplazmida i prednosti hibridnog načina života .....	7
3. Geni koje fagoplazmidi izmjenjuju s plazmidima i fagima te njihova uloga .....	9
3.1. Geni fagoplazmida homologni genima bakteriofaga i plazmida .....	9
3.2. Prijenos gena za antibiotsku rezistenciju i drugih medicinski značajnih gena	12
4. Mehanizmi izmjene gena fagoplazmida.....	15
5. Fagoplazmidi kao izvor novih plazmida i bakteriofaga .....	18
6. Zaključak .....	20
7. Literatura.....	21
8. Životopis.....	24

# 1. Uvod

Plazmidi su ekstrakromosomalni elementi koji imaju sposobnost samoreplikacije i sadrže gene koji u većini slučajeva nisu esencijalni za funkciju stanice. Ovi elementi su najčešće kružne kovalentno zatvorene dvolančane molekule DNA koje variraju u veličini, od malih kriptičnih plazmida koji sadrže samo gene za svoju replikaciju i nekoliko gena nepoznate funkcije do kompleksnih megaplazmida čija veličina doseže više od 350 kb (Hinnebusch i Tilly 1993; Frost i sur 2005; diCenzo i Finan 2017). Važno svojstvo plazmida je mogućnost prijenosa u druge stanice putem konjugacije što ima značajan utjecaj na genetičku raznolikost i evoluciju bakterijskih genoma (Slika 1) (Pfeifer i Rocha 2024). Konjugacija je proces u kojemu se plazmid prenosi između bakterije donora i bakterije recipijenta koje su u fizičkom kontaktu. Na ovaj način moguć je horizontalni prijenos gena koji imaju raznolike funkcije kao što je otpornost na antibiotike, simbioza, metaboličke funkcije i virulencija (Frost i sur. 2005). Osim putem konjugacije horizontalni prijenos gena se može odvijati pakiranjem bakterijske DNA u virusne čestice. Bakteriofagi odnosno fagi su virusi koji inficiraju prokariotske organizme i koriste mehanizme domaćinske stanice za vlastitu replikaciju. Ovi virusi se smatraju najbrojnijim biološkim entitetom na Zemlji (broj bakteriofaga koji posjeduju rep procjenjuje se na  $10^{31}$ ) i imaju izrazito veliku genetičku raznolikost (Pedulla i sur. 2003). Ovisno o razvojnem ciklusu, bakteriofagi se dijele na dva tipa; virulentne bakteriofage koji se uvijek repliciraju litičkim ciklusom i liziraju domaćinske stanice te temperirane bakteriofage koji imaju alternativni način replikacije pri čemu nastaju lizogene bakterije u kojima su funkcije faga utišane. U lizogenom ciklusu bakteriofag se ugrađuje u bakterijski kromosom i replicira u obliku profaga, a rjeđi je slučaj kada se bakteriofagi repliciraju autonomno kao kružni ili linearni plazmidi (Frost i sur. 2005). Podražaji iz okoliša mogu inducirati prijelaz bakteriofaga iz lizogenog u litički ciklus što dovodi do lize stanice. Tijekom ovoga bakteriofag može slučajno upakirati fragment DNA bakterije domaćina i prenijeti ga u novu bakteriju u procesu poznatom kao transdukcija (Slika 1) (Zinder i Lederberg, 1952; Frost i sur. 2005). Kod specijalizirane transdukcije zbog krivog izrezivanja profaga dolazi do pakiranja DNA bakteriofaga i susjedne DNA bakterije u istu virusnu česticu, a u općoj transdukciji dolazi do pakiranja samo bakterijske DNA u glavu bakteriofaga (Thierauf i sur. 2009). Transdukcija, kao i drugi mehanizmi prijenosa gena, je iznimno važna u istraživanjima jer omogućuje evoluciju i prilagodbu bakterija koje imaju ključnu ulogu u ekološkim procesima i izazivanju bolesti (Slika 1) (Frost i sur. 2005).





**Slika 1.** Prijenos molekula DNA između bakterija. Brojem 1 označena je transdukcija gdje se genomski DNA (žuto) integrira u kromosom (tamno plavo) u obliku profaga. Ovaj profag se kasnije replicira i ponekad pakira isključivo DNA domaćinske stanice (opća transdukcija) ili svoju DNA zajedno s DNA domaćinske stanice (specijalizirana transdukcija) te uzrokuje lizu stanice. Nakon oslobađanja bakteriofagi inficiraju stanicu recipijenta u kojoj se nova DNA rekombinacijom ugrađuje u kromosom (crveno). Brojem 2 označena je konjugacija. Veliki konjugativni plazmidi prisutni u stanici u malom broju kopija (narančasto) koriste pilus za uspostavljanje veze i vlastiti prijenos u stanicu recipijenta. Alternativno, kopija malog plazmida prisutnog u velikom broju kopija u stanici, defektivni genomski otok ili kopija cijelog bakterijskog kromosoma mogu biti preneseni u stanicu recipijenta gdje se integriraju u kromosom ili repliciraju (svjetlo zeleno). Brojem 3 je označena transpozicija gdje se transpozoni (ružičasto) integriraju u novo mjesto u kromosomu ili plazmidu putem nehomologne rekombinacije. Genetički elementi integroni (tamno zeleno) na sličan način kao transpozoni izmjenjuju genske kazete (smeđe) koje u mnogo slučajeva sadrže gene za antibiotsku rezistenciju. Preuzeto i prilagođeno iz (Frost i sur. 2005).

Plazmidi i bakteriofagi tradicionalno su smatrani potpuno odvojenim genetičkim elementima, ali otkrićem fagoplazmida koji spajaju karakteristike ovih elemenata to se promijenilo

(Pfeifer i Rocha 2024). Fagoplazmidi su vrsta mobilnih genetičkih elemenata koji se mogu prenositi horizontalno između prokariotskih stanica u obliku virusnih čestica (bakteriofaga) i vertikalno kroz stanične linije kao plazmidi (Ravin 2015; Gilcrease i Casjens 2018). Ovi elementi sadrže mnogo gena koji su homologni genima bakteriofaga i plazmida, a kao rezultat toga fagoplazmidi vjerojatno igraju ključnu ulogu u izmjeni gena između različitih mobilnih genetičkih elemenata koji se mogu istovremeno naći u nekoj stanici. Naime, bakteriofagi i plazmidi imaju potpuno različite načine horizontalnog i vertikalnog prijenosa zbog čega oni u mnogo slučajeva nemaju dovoljan broj jako sličnih sekvenci koje su neophodne za provođenje izmjene gena homolognom rekombinacijom. Fagoplazmidi na ovaj način služe kao most između dva različita tipa genetičkih elemenata, a osim toga oni mogu posredovati i u pretvorbi jednog elementa u drugi (Pfeifer i Rocha 2024).

Iako je u nedavnim istraživanjima otkriveno da su fagoplazmidi jako zastupljeni u bakterijama i čine čak 5-7% svih sekvenciranih plazmida i bakteriofaga njihov točan broj, srodnost i genski sadržaj i dalje su slabo istraženi (Pfeifer i sur. 2021). Fagoplazmidi se obično svrstavaju u različite skupine poput fagoplazmida sličnih P1, N15, D6 i SSU5 na temelju sličnosti sekvenci s drugim genetičkim elementima (Ravin 2015; Gilcrease i Casjens 2018). Iako postoje značajne razlike u veličini, strukturi i funkciji između pojedinih fagoplazmida, ovi elementi prosječno posjeduju veće genome od plazmida i bakteriofaga što je rezultat njihovog prijelaznog načina života (Pfeifer i sur. 2021; Pfeifer i Rocha, 2024). Veći hibridni genomi fagoplazmida omogućuju veću plastičnost i bolju sposobnost rekombinacije što može objasniti njihovu veliku učestalost u bakterijskim populacijama. Nadalje, zbog svojih hibridnih karakteristika ovi elementi imaju važnu ulogu u horizontalnom prijenosu gena između plazmida i bakteriofaga, prilikom čega često prenose gene koji kodiraju za antibiotsku rezistenciju, obrambene sustave, faktore virulencije i druge funkcije važne za adaptaciju bakterija (Figueroa i sur. 2024). Iz ovoga razloga proučavanje karakteristika fagoplazmida i njihovih mehanizama prijenosa gena je važno za bolje razumijevanje bakterijske evolucije koja ima veliki značaj za medicinu (Pfeifer i Rocha 2024).

## 2. Povijest, rasprostranjenost i struktura fagoplazmida

### 2.1. Povijest, učestalost i raznolikost fagoplazmida

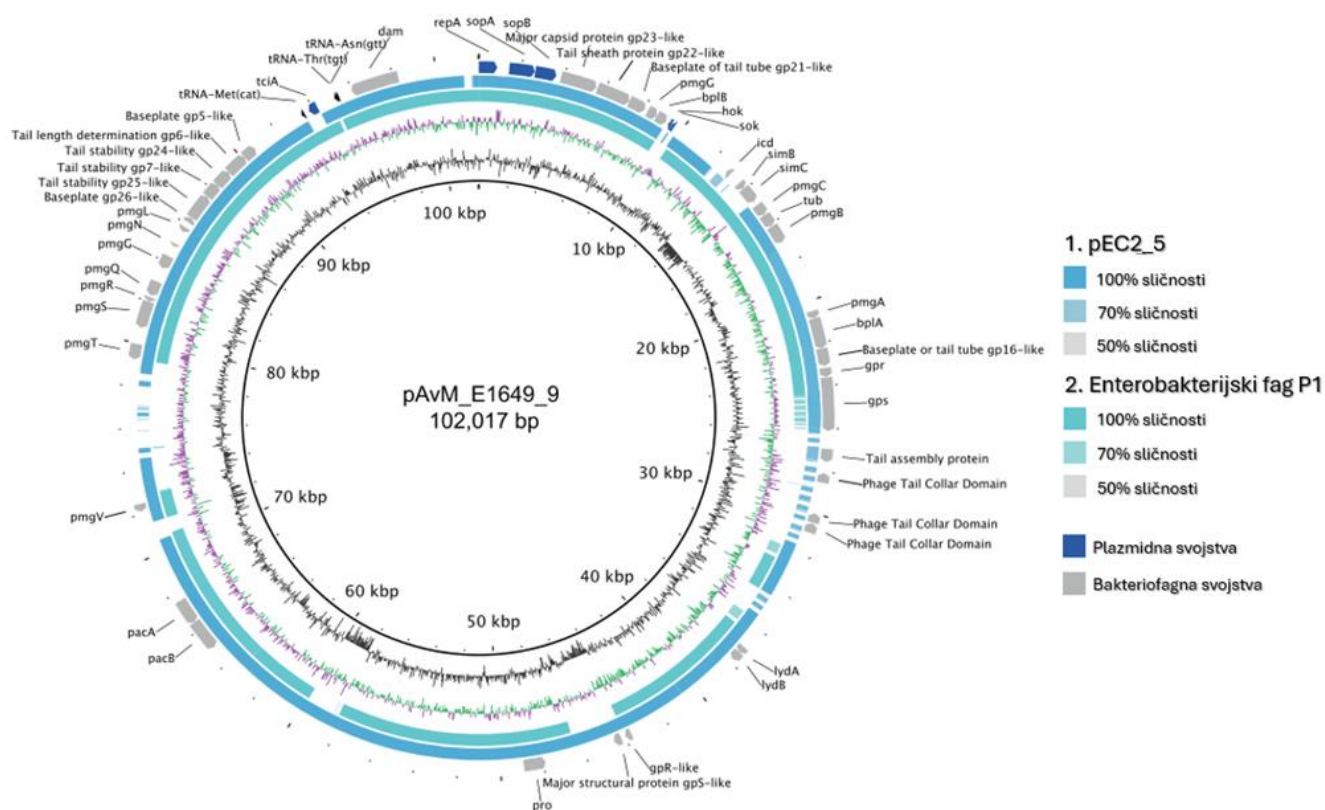
Prvi poznati fagoplazmidi P1 i N15 izolirani su iz bakterije *Escherichia coli* prije više od 50 godina. Iako su neki fagoplazmidi poznati već nekoliko desetljeća i detaljno su proučavani, većina ih do danas ostaje relativno neistražena (Łobocka i sur. 2004; Ravin 2011; Pfeifer i sur. 2021). Iako su slabo istraženi, ovi elementi se smatraju evolucijski jako starima jer se mogu grupirati u nekoliko velikih skupina koje se međusobno razlikuju, ali svaka od njih sadrži određene ključne gene (Pfeifer i sur. 2021). Primjerice Pfeifer i suradnici (2021) su pronašli da određene skupine fagoplazmida sadrže međusobno homologne gene koji kodiraju za esencijalne funkcije bakteriofaga. Ovi geni, iako se razlikuju u sekvencama, su prisutni u svim skupinama i to ukazuje njihovu evolucijsku povezanost. Na temelju ovih pronalazaka sa sigurnošću se može reći da fagoplazmidi nisu samo kratkoživući genetički elementi nastali nedavnom rekombinacijom između bakteriofaga i plazmida, već su neki od njih vjerojatno evoluirali davno u prošlosti. Nažalost mnoge skupine fagoplazmida ostaju neistražene do danas, ali daljnje istraživanje ove raznolike i potencijalno važne vrste elemenata mogla bi obasjati svjetlost na njihovo evolucijsko porijeklo (Pfeifer i sur. 2021).

Fagoplazmidi su učestali u bakterijskim stanicama, čineći otprilike 7% sekvenciranih plazmida i oko 5% svih sekvenciranih bakteriofaga, ali njihov točan broj i zastupljenost u prirodi su još uvijek relativno neistraženi. Ovi genetički elementi pronađeni su u mnogim bakterijskim rodovima kao što su *Bacillus* i *Clostridium* iz koljena Firmicutes i *Mycobacterium* iz koljena Actinobacteria. Također su identificirani u alfa, beta i gama enterobakterijama iz rodova *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Zymomonas* i *Burkholderia* koljena Proteobacteri. U rodovima *Escherichia* i *Klebsiella* od 2900 poznatih bakteriofaga i plazmida čak oko 7,3% otpada na fagoplazmide. Fagoplazmidi su također česti u mikobakterijskim bakteriofagima gdje su plazmidne funkcije, od kojih su najčešći sustavi particije, pronađene u 6,3% od 365 mikofaga. Dokazano je da najintenzivnije proučavane bakterijske skupine u bazama podataka, enterobakterije i rod *Bacillus*, imaju ukupno više fagoplazmida u usporedbi s prosječnim bakterijama i da ovi fagoplazmidi imaju jasne sličnosti s već identificiranim fagoplazmidima. U nekim skupinama s manjim brojem uzoraka bakterija, primjerice rodovima *Arsenophonus*, *Bacillus*, *Clostridia* i *Piscirickettsia*, zastupljenost

fagoplazmida među plazmidima i bakteriofagima je velika i doseže čak do 50%, ali je apsolutan broj fagoplazmida mali. S obzirom na to da je u rodovima *Bacillus* i *Clostridia* sekvenciran velik broj genoma, visoka učestalost fagoplazmida ovih skupina ne može se pripisati maloj veličini uzorka. Sve ovo upućuje na mogućnost da je stvaran broj fagoplazmida podcijenjen (Pfeifer i sur. 2021).

U istraživanjima fagoplazmidi se često dijele na različite skupine na temelju sličnosti njihovih gena s drugim elementima. Takve su primjerice skupine nalik na bakteriofage P1, N15, D6 i SSU5 koje su učestale i lako prepoznatljive unutar bakterijskog reda Enterobacteriales (Ravin 2015; Gilcrease i Casjens 2018). Skupina fagoplazmida sličnih P1 bakteriofagu značajno je zastupljena u bakteriji *Escherichia coli*, gdje je pronađena u približno 7% sojeva (Slika 2) (Venturini i sur. 2019). Moguće je da je ova raširenost u velikom broju sojeva povezana s neobično širokim rasponom domaćina fagoplazmida sličnih P1 bakteriofagu (Pfeifer i sur. 2022). Nair i suradnici (2024) otkrili su fagoplazmide slične P1 u online bazama podataka koji imaju značajnu podudarnost sa sekvencama iz njihove kolekcije (Slika 2). Sekvence fagoplazmida u online bazama podataka potiču iz raznih izvora i obuhvaćaju više godina, kontinenta te vrsta domaćina. Ovo upućuje da se fagoplazmidi mogu prenositi kroz velike udaljenosti i čak prijeći između različitih vrsta domaćina (Nair i sur. 2024). U bakterijama *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* identificirano je nekoliko plazmida sličnih P1 bakteriofagu, kao što su pRCS47, p0111\_2 i pSJ46 i dokazano je da takvi plazmidi imaju sposobnost prenošenja gena za antibiotsku rezistenciju (Slika 2). Fagoplazmid D6 je temperirani bakteriofag iz porodice Myoviridae čiji je genom dug otprilike 90 kpb i koji se u stanici može nalaziti u obliku kružnoga plazmida. Ovaj virus ima sposobnost opće transdukcije i posjeduje dugački kontraktilni rep, strukturno sličan bakteriofagu P1 čiji je daleki srodnik (Gilcrease i Casjens 2018). Bakteriofag SSU5 koji je istovremeno fagoplazmid, pripada virusnoj porodici Siphoviridae i inficira samo sojeve roda *Salmonella* te ima potencijalnu primjenu kao sastojak koktela bakteriofaga (Kim i sur. 2014; Pfeifer i sur. 2021). U skupinu fagoplazmida sličnih bakteriofagu N15 spadaju bakteriofagi  $\phi$ KO2 i pY54 i članovi virusne porodice Myoviridae  $\Phi$ HAP-1, VHML, VP882, Vp58.5 te vB\_VpaM\_MAR koji inficiraju morske gama proteobakterije. Genomi ovih bakteriofaga sadrže međusobno slične gene za kontrolu lizogenog ciklusa, protelomerazu i replikaciju (poput gena *repA*) (Ravin 2015). N15 i njemu srodni fagoplazmidi imaju vrlo neobičan način replikacije među temperiranim bakteriofagima. Nakon infekcije, njihova DNA se ne integrira u bakterijski kromosom, već ostaje u stanici u obliku

linearnog plazmida s kovalentno zatvorenim krajevima. Važnu ulogu u ovome ima enzim protelomeraza, koja je odgovorna za cijepanje DNA i spajanje krajeva. Osim fagoplazmida sličnih N15 bakteriofagu poznato je samo nekoliko primjera replikona koji se repliciraju kao linearna DNA s kovalentno zatvorenim krajevima. Tu spadaju linearni plazmidi i kromosomi spiroheta roda *Borrelia* te jedan od dva kromosoma bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (Gilcrease i Casjens 2018). Jedinstvena organizacija genoma i sličnost gena fagoplazmida sličnih N15 upućuju da ova skupina vjerojatno potječe od zajedničkog pretka. Ovaj predak je mogao nastati iz linearnog plazmida koji je stekao virusne gene ili iz bakteriofaga koji je stekao gene *telN* (kodira za protelomerazu) i *repA*. Daljnjom izmjenom gena između bakteriofaga i plazmida moglo je doći do pojave novih funkcija i evolucije ove skupine zbog čega N15 i srodni fagoplazmidi predstavljaju vrijedne modele za proučavanje interakcija fagoplazmida s drugim genetičkim elementima te razumijevanje njihove evolucije (Ravin 2015).



**Slika 2.** Usporedba fagoplazmida sličnog P1 pAvM\_E1649\_9 identificiranog u enterotoksigenoj bakteriji *Escherichia coli* i fagoplazmida pEC2\_5 te enterobakterijskog faga P1. Dva unutarnja prstena prikazuju GC sadržaj u crnoj boji te GC Skew- u ljubičastoj i GC Skew+ u zelenoj boji. Određene funkcije faga i plazmida prikazane su u vanjskom prstenu. Preuzeto i prilagođeno iz (Mentzer i sur. 2021).

Genetički elementi koji nalikuju na hibride između virusa i plazmida pronađeni su i u arhejama. Iz roda *Haloarcula* sp. i vrste *Natrialba magadii* izolirana su dva arhealna plazmida koji imaju svojstva fagoplazmida što dokazuje da arheje također mogu sadržavati ove hibridne elemente (Arnold i sur. 1999; Siddaramappa i sur. 2012; Iranzo i sur. 2016). Osim toga, sve veći broj podataka ukazuje da arhealni virusi često dijele gene s plazmidima pa je vjerojatno da će u budućnosti izolacijom novih arhealnih virusa doći i do otkrića novih fagoplazmida (Iranzo i sur. 2016).

U suvremenoj znanosti neki fagoplazmidi imaju veliku ulogu kao alati. Primjerice, umjereni bakteriofag P1 služi kao vektor za prijenos DNA između bakterijskih stanica zbog sklonosti njegove replikacijske mašinerije transdukciji, odnosno svojstva da ponekad upakira domaćinsku DNA u virusnu česticu umjesto vlastite (Lennox 1955; Pfeifer i sur. 2021). Bakteriofag P1 također kodira za mjesno specifičnu rekombinazu Cre koja bakteriofagu pomaže ciklizaciju DNA stvaranjem kohezivnih krajeva koji se povezuju i razdvajaju multimera, a moguće je da također sudjeluje u održavanju broja kopija plazmida u stanici (Łobocka i sur. 2004). U istraživanjima Cre rekombinaza se koristi kao dio Cre/loxP rekombinacijskog sustava koji je jedan od najvažnijih alata u genetičkom inženjerstvu eukariota zbog svoje jednostavnosti i svestranosti (Yarmolinsky i Hoess 2015). Nadalje, u fagoplazmidu D6, koji je daleko srodan bakteriofagu P1, pronađen je homolog P1 Cre rekombinaze koji se naziva „Dre rekombinaza“ i posjeduje različitu specifičnost za mjesto rekombinacije, a kao takav ima potencijalnu primjenu u uvođenju delecijских mutacija genetičkim inženjerstvom (Gilcrease i Casjens 2018). Bakteriofag N15 služi kao model u molekularnoj biologiji, a njegov enzim protelomeraza koristi se u sintetskoj biologiji i biotehnologiji te za proučavanje nastajanja, razrješavanja i raznolikosti linearnih replikona u bakterijama (Knott i sur. 2019; Pfeifer i sur. 2021).

## **2.2. Veličina fagoplazmida i prednosti hibridnog načina života**

Prosječna veličina fagoplazmida veća je od tipične veličine bakteriofaga i plazmida. Ova razlika vjerojatno potječe od činjenice da fagoplazmidi sadrže gene koji kodiraju ključne funkcije bakteriofaga i plazmida kao što su geni za virusne čestice i mehanizme njihovog pakiranja te geni inicijacije replikacije i sustave particije koji su važni za održavanje plazmida u stanici (Pfeifer i sur. 2021; Pfeifer i Rocha 2024). Ipak, između pojedinih fagoplazmida postoje značajne razlike u organizaciji i veličini genoma te funkciji gena (Pfeifer i sur. 2021). Fagoplazmidi čija se veličina

kreće između 90 i 120 kbp opisani su u rodovima *Citrobacter*, *Enterobacter* i *Pantoea* (Greig i sur. 2022). U svojem istraživanju Nair i suradnici (2024) su otkrili da je veličina većine detektiranih fagoplazmida sličnih P1 iznosila od 85,8 do 98,2 kbp s prosječnom veličinom od 92,1 kbp (Slika 2). Ograničeni raspon veličine ovih fagoplazmida vjerojatno je posljedica toga što se, poput bakteriofaga, veličina fagoplazmida ne može naglo povećati jer se genomi ovih elemenata moraju smjestiti unutar virusne kapside. Unatoč tome, također su pronađeni fagoplazmidi slični P1 čija veličina može doseći čak do 155 kbp (Nair i sur. 2024).

U novom istraživanju otkriveno je da jedan od najbrojnijih bakteriofaga u ljudskom crijevu, p-crAssphage, koristi hibridni životni stil fagoplazmida. S obzirom na njegovu uspješnost preživljavanja u ovako složenom okolišu, javlja se pitanje koje potencijalne prednosti nudi fagoplazmidni način života u usporedbi s isključivo plazmidnim ili bakteriofagnim životnim stilom (Smith i sur. 2023; Figueroa i sur. 2024). Jedna od potencijalnih prednosti prijelaznog životnog stila fagoplazmida je veća plastičnost u usporedbi s bakteriofagima koja je rezultat veće prosječne veličine i dodatnih rekombinacijskih svojstava koje fagoplazmidi dobiju stjecanjem transpozona ili integrona. Fagoplazmidi također imaju povećani potencijal za rekombinaciju s plazmidima i na taj način mogu akumulirati gene koji im omogućuju širenje u bakterijskoj populaciji putem konjugacije. Osim toga, jedna od velikih prednosti fagoplazmida je mogućnost prelaska u drugi tip genetičkog elementa (Figueroa i sur. 2024). Ova sposobnost im potencijalno omogućava izbjegavanje obrambenih sustava bakterija, smanjenje metaboličkog opterećenja za stanicu te izbjegavanje problema inkompatibilnosti s drugim genetičkim elementima (Pfeifer i Rocha 2024). U konačnici, fagoplazmidni način života omogućuje bolju sposobnost prijenosa i veću stabilnost među različitim bakterijskim vrstama, kao što je slučaj s fagoplazmidom P1 koji ima posebno širok spektar domaćina (Pfeifer i sur. 2022; Figueroa i sur. 2024).

### **3. Geni koje fagoplazmidi izmjenjuju s plazmidima i fagima te njihova uloga**

#### **3.1. Geni fagoplazmida homologni genima bakteriofaga i plazmida**

Genomi fagoplazmida sadrže mnoge sekvence koje su homologne bakteriofagima i plazmidima, što ih vjerojatno čini ključnim intermedijerima u izmjeni gena između ovih dvaju elemenata. Inače, bakteriofagi i plazmidi smatraju se potpuno odvojenim tipovima genetičkih elemenata s drukčijim mehanizmima propagacije koji ne posjeduju mnogo zajedničkih sekvenci, a koje su neophodne za izmjenu gena homolognom rekombinacijom. Postojanje fagoplazmida omogućuje prijenos gena između ovih elemenata čime se ubrzava njihova evolucija (Pfeifer i Rocha, 2024).

Genomi fagoplazmida su veliki u usporedbi s bakteriofagima ili plazmidima i u prosjeku sadrže malo veći udio gena homolognih bakteriofagima nego plazmidima (Pfeifer i sur. 2021). Ipak, ovo nije slučaj za sve fagoplazmide, primjerice neki od ovih genetičkih elemenata koji su izolirani iz rodova *Bacillus* i *Mycobacterium* imaju više homologa bakteriofagima, dok drugi poput fagoplazmida sličnih cp32 koji su izolirani iz roda *Borrelia* imaju više homologa plazmidima (Pfeifer i Rocha 2024). Za ključne bakteriofagne gene otkriveno je da su sačuvani i lokalizirani unutar karakterističnih skupina u genomu dok su plazmidni geni mnogo varijabilniji i većinom uključuju neesencijalne gene. Ovo je u skladu s očekivanjima s obzirom na to da je minimalni broj gena potreban za potpuno funkcionalan dvolančani DNA bakteriofag znatno veći nego što je slučaj za funkcionalni nekonjugativni plazmid. Iako fagoplazmidi sadrže više gena homolognih bakteriofagima, više varijabilni plazmidni geni vjerojatno su odgovorni za veći udio funkcija korisnih za domaćina (Pfeifer i sur. 2021).

Fagoplazmidi posjeduju funkcije replikacije i segregacije tijekom svake stanične diobe što je karakteristika koja se obično povezuje s plazmidima. Iako se neki plazmidi manje veličine s velikim brojem kopija oslanjaju samo na pasivnu difuziju za segregaciju između stanica kćeri, ovo vjerojatno nije slučaj za fagoplazmide (Pfeifer i sur. 2021). Poznata su dva glavna mehanizma koji osiguravaju stabilno nasljeđivanje bakterijskih plazmida u stanicama kćerima. Prvi mehanizam je aktivna particija gdje plazmidi segregiraju u stanice kćeri prije same diobe bakterijskih stanica. Drugi mehanizam je sustav ovisnosti koji osigurava smrt stanica koje nisu naslijedile plazmide.



Kod fagoplazmida N15 pronađen je particijski sustav, koji predstavlja ključni mehanizam za stabilno nasljeđivanje ovog elementa (Ravin 2015). Različiti tipovi fagoplazmida mogu se naći u istoj domaćinskoj stanici u obliku plazmida ako pripadaju različitim grupama inkompatibilnosti (Pfeifer i sur. 2021). Primjerice fagoplazmid D6 i P1 imaju različiti način inicijacije replikacije zbog čega spadaju u različite grupe inkompatibilnosti te mogu opstati u istoj stanici (Gilcrease i Casjens 2018).

Pfeifer i Rocha (2024) su utvrdili da samo 11,2% gena koji se izmjenjuju između fagoplazmida i drugih genetičkih elemenata kodira za tipične plazmidne funkcije, kao što su replikacija plazmida i particija te funkcije koje su karakteristične za bakteriofage, primjerice geni za lizu, pakiranje i strukturu virusne čestice (Slika 3). Ovi geni su važni za održavanje genetičkih elemenata, ali slični sistemi mogu uzrokovati probleme u propagaciji. Ipak, njihova izmjena može pomoći fagoplazmidima i plazmidima da izbjegnju inkompatibilnost s već prisutnim elementima u stanici. Nadalje, izmjena gena koji kodiraju za različite repove bakteriofaga može proširiti raspon domaćina bakteriofaga i fagoplazmida. Mali udio ključnih bakteriofagnih i plazmidnih gena u genskoj izmjeni dokazuje da većina gena koji se izmjenjuju nisu esencijalni za fagoplazmide i da kodiraju za razne funkcije (Pfeifer i Rocha 2024). Kod fagoplazmida P1 dokazano je da je samo mali udio od njegovih 112 gena potreban za litički ciklus i održavanje plazmida što govori da ovaj fagoplazmid ima veliku mogućnost izmjene gena (Slika 3) (Szczebankowska i Łobocka 2024). Među genima uključenim u gensku izmjenju, a koji nisu esencijalni za mobilne genetičke elemente identificirani su geni za obrambene i protuobrambene sustave, faktore virulencije i antibiotsku rezistenciju (Figuroa i sur. 2024; Pfeifer i Rocha 2024). Prisutnost ovih gena je očekivana jer oni, iako kodiraju za svojstva koja su nevezana za samu biologiju genetičkih elemenata, mogu povećati šanse preživljavanja domaćinske stanice što će dovesti i do povećanja broja tih elementa u bakterijskoj populaciji. Na primjer, stjecanje obrambenih sustava može zaštititi domaćina i fagoplazmide od drugih genetičkih elemenata, poput virulentnih bakteriofaga, dok stjecanje protuobrambenih sustava može zaštititi mobilne genetičke elemente od degradacije unutar bakterijske stanice (Pfeifer i Rocha 2024). Nadalje, geni za antibiotsku rezistenciju povećavaju vjerojatnost preživljavanja bakterija u okolišu gdje su prisutni antibiotici (Nair i sur. 2024). Mnogim izmijenjenim genima nije moguće odrediti funkciju što ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se otkrile uloge ovih gena koji potencijalno mogu biti važni u bakterijskoj evoluciji (Pfeifer i Rocha 2024).



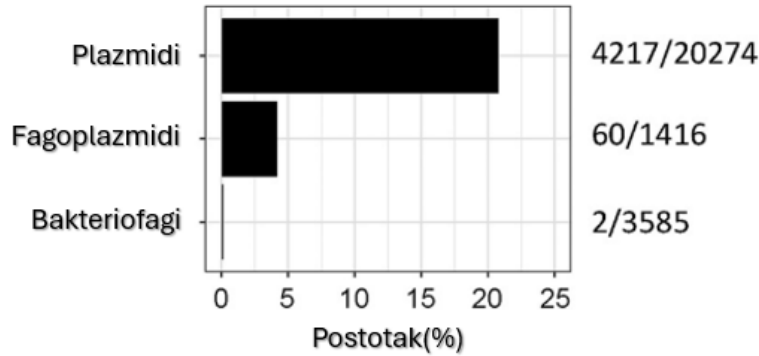
degradacije (Pfeifer i Rocha 2024). Osim toga, vrlo je važno u kojem se tipu genetičkog elementa nalazi određeni gen jer to ne utječe samo na njegovo širenje u populaciji, već i na njegovu razinu ekspresije. Geni u bakteriofagima i fagoplazmidima mogu biti pretjerano eksprimirani tijekom litičkog ciklusa, a jedan od poznatih primjera je gen za shiga toksin u bakteriji *Escherichia coli* (Paton i Paton 1998; Pfeifer i Rocha 2024). Kada se ovaj gen nalazi u bakteriofagu on pokazuje znatno jači fenotip nego ako se nalazi u plazmidu. S druge strane, većina plazmida i fagoplazmida je prisutna u više kopija unutar stanice i dokazano je da ova poliploidija pospješuje širenje mutiranih alela unutar populacije što omogućuje veću brzinu evolucije (Pfeifer i Rocha 2024).

### **3.2. Prijenos gena za antibiotsku rezistenciju i drugih medicinski značajnih gena**

Poznato je da su fagoplazmidi uključeni u horizontalnu izmjenu gena za antibiotsku rezistenciju, rezistenciju na antiseptike te faktore virulencije. Funkcije kodirane ovim genima daju selektivnu prednost domaćinskim stanicama i važne su za njihovo preživljavanje. Skupina fagoplazmida sličnih P1 je najčešća skupina fagoplazmida koja sadrži ove gene s učestalosti koja se nalazi između vrijednosti za bakteriofage i plazmide (Slika 2) (Nair i sur. 2024). U patogenim sojevima bakterije *Escherichia coli* geni za antibiotsku rezistenciju i faktore virulencije uglavnom su lokalizirani na velikim plazmidima u kompleksnim lokusima rezistencije skupa s transpozonima i insercijskim sljedovima, ali se također mogu pronaći u bakteriofagima te fagoplazmidima (Venturini i sur. 2019).

U svojem istraživanju Pfeifer i Rocha (2024) utvrdili su da su sekvence nekoliko skupina gena za antibiotsku rezistenciju jako slične u bakteriofagima, plazmidima i fagoplazmidima što upućuje na njihovu nedavnu izmjenu. Takvi rezultati su u skladu s nalazima da se geni za rezistenciju na antibiotike često izmjenjuju između mobilnih genetičkih elemenata (Pfeifer i Rocha 2024). Iako su plazmidi primarni pokretači izmjene ovih gena, nekoliko integrativnih bakteriofaga također nosi gene za antibiotsku rezistenciju (Slika 4). Fagoplazmidi, kao hibridni mobilni genetički elementi, posjeduju veliku genetičku plastičnost nalik na plazmide i sposobnost primanja gena od drugih plazmida, a istovremeno su sposobni inficirati bakterije koje su vremenski i prostorno udaljene od izvornog domaćina poput bakteriofaga te zbog ovoga mogu više doprinijeti širenju antibiotske rezistencije nego bakteriofagi. Ovo je zabrinjavajuće jer prijenos

fagoplazmidima eliminira potrebu za staničnim kontaktom koji je nužan za prijenos plazmida konjugacijom, a postoji mogućnost da fagoplazmidi također posreduju u prijenosu svojih gena u druge tipove bakteriofaga (Pfeifer i sur. 2022). Bakterijski red Enterobacterales identificiran je kao najkritičnija skupina protiv koje je potrebno razviti nove antibiotike, a različite skupine fagoplazmida su česte u ovom redu i poznato je da oni služe kao prijenosnici gena za antibiotske rezistencije (Slika 4) (Gilcrease i Casjens 2018; Pfeifer i sur. 2022). Ovo ukazuje da su fagoplazmidi djelomično odgovorni za učestalo širenja antibiotskih rezistencija unutar reda Enterobacterales. Bakterije mogu postati rezistentne na određene antibiotike različitim mehanizmima kao što su detoksifikacija antibiotika, promjena mete antibiotika, promjena ulaza i izlaza antibiotika i zaobilazanje metaboličkog bloka sintezom izoenzima. Primjer antibiotske inaktivacije je rezistencija protiv većine  $\beta$ -laktama u koje spadaju penicillin i cefalosporini, a koja se pojavljuje u redu Enterobacterales zbog sinteze enzima  $\beta$ -laktamaza širokog spektra (Pfeifer i sur. 2022). Fagoplazmidi nose raznolike relevantne gene za antibiotsku rezistenciju od velike kliničke važnosti. U svojem radu Pfeifer i suradnici (2022) identificirali su 60 fagoplazmida koji sadrže čak 184 gena za rezistenciju na antibiotike koji omogućuju otpornost na cefalosporine širokog spektra, karbapaneme, aminoglikozide, fluorokinolone i kolistine. Ovi geni su vjerojatno kotranslocirani s transpozonomima i nalaze se unutar integrona klase 1 (Pfeifer i sur. 2022). Integroni se tipično nalaze u plazmidima i transpozonomima te se sastoje od jedne integraze i nekoliko genskih kazeta koje su okružene rekombinacijskim mjestima te često sadrže gene za antibiotsku rezistenciju. Ovi genetički elementi mogu ubrzati pojavu bakterijskih sojeva otpornih na veliki broj antibiotika poznatih kao “superbugs” jer integroni imaju sposobnost primanja novih kazeta od drugih integrona i miješanja već postojećih kazeta (Slika 1) (Deng i sur. 2015; Pfeifer i sur. 2022). Integroni koji nose gene za antibiotske rezistencije često su prisutni u fagoplazmidima, osobito u skupini sličnoj P1 (Slika 2). U svojem istraživanju Pfeifer i suradnici (2022) otkrili su više od 1400 potpunih integrona klase 1 u plazmidima. Nasuprot ovome, analizom 3585 bakteriofaga za koje ne postoje dokazi da su fagoplazmidi nije otkriven niti jedan integron, dok je u fagoplazmidima identificirano 27 integrona. U ovim integronima, koji se sastoje od dvije do pet kazeta, otkriveno je da gotovo svi geni unutar kazeta kodiraju za antibiotsku rezistenciju (Pfeifer i sur. 2022).



**Slika 4.** Udio mobilnih genetičkih elemenata s genima za antibiotičku rezistenciju dobiven u istraživanju koje su proveli Pfeifer i suradnici (2022). Najveći udio zabilježen je kod plazmida s 20,8% nakon kojih su fagoplazmidi s 4,2%, a bakteriofagi imaju daleko najmanji udio s manje od 1%. Vrijednosti nakon stupaca označavaju broj pojedinih elemenata koji sadrže gene za antibiotičku rezistenciju u odnosu na ukupni broj analiziranih elemenata. Preuzeto i prilagođeno iz (Pfeifer i sur. 2022).

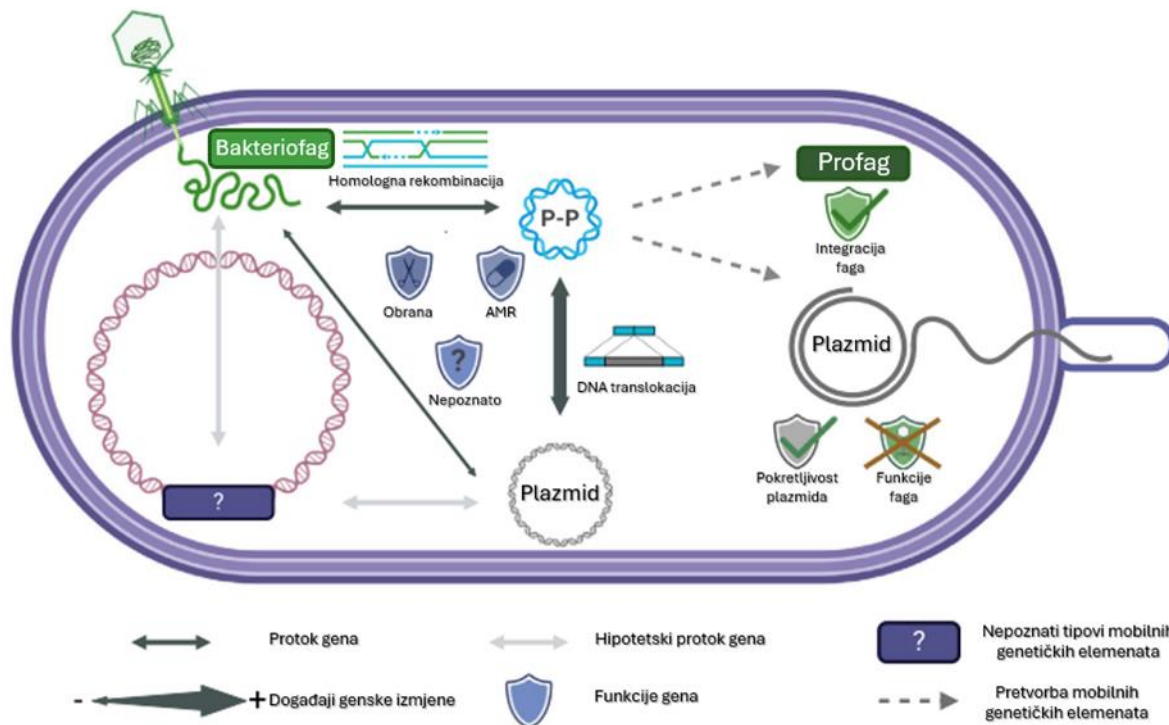
Geni za faktore virulencije i toksine čine samo mali udio gena u mobilnim genetičkim elementima s vrijednostima od 0,23% gena fagoplazmida 1,4% plazmidnih gena i svega 0,05% gena bakteriofaga. Pfeifer i Rocha (2024) utvrdili su da 48% gena za faktore virulencije detektiranih u bakteriofagima čine geni *stx* koji kodiraju shiga toksine (Pfeifer i Rocha 2024). Ovi geni tipično se nalaze u heterogenoj skupini temperiranih *stx*-faga koji mogu inficirati široki raspon domaćina i oni imaju ključnu ulogu u stvaranju patogenih sojeva bakterije *Escherichia coli*, koje proizvode shiga toksin i uzrokuju teške bolesti kod ljudi poput hemoragičnog kolitisa i hemolitičko-uremičkog sindroma (Krüger i Lucchesi 2015; Pfeifer i Rocha 2024). Geni koji kodiraju za faktore virulencije vjerojatno se prenose iz bakteriofagnih genoma u druge mobilne genetičke elemente što doprinosi njihovom širenju u bakterijskim populacijama (Pfeifer i Rocha 2024).

## 4. Mehanizmi izmjene gena fagoplazmida

Homologni geni u različitim mobilnim genetičkim elementima mogu nastati kao rezultat zajedničkog podrijetla, odnosno vertikalnog prijenosa kroz generacije ili kao posljedica horizontalne izmjene gena (Slika 5) (Pfeifer i Rocha 2024). Postojanje velikih skupina međusobno sličnih fagoplazmida poput P1, N15 i drugih sugerira da su fagoplazmidi drevni, a ne samo nedavno nastali prijelazni oblici (Pfeifer i sur. 2021). Ipak istraživanje evolucijske povijesti mobilnih genetičkih elemenata je otežano jer u identifikaciji i rekonstrukciji događaja genetske izmjene koji su se dogodili prije mnogo vremena veliki problem predstavljaju mutacije i rekombinacijski događaji koji su se ponavljali kroz povijest, kao i činjenica da bakteriofagi i plazmidi brzo evoluiraju rekombinacijom. Iz ovoga razloga nemoguće je precizno odrediti sekvence prethodnike ovih elemenata jer različiti geni imaju različitu evolucijsku povijest (Pfeifer i Rocha 2024).

Pfeifer i Rocha (2024) dobili su rezultate da fagoplazmidi izmjenjuju gene čak 2.3 puta češće s plazmidima nego s drugim fagoplazmidima. Prema njihovom istraživanju izmjena gena između fagoplazmida i plazmida ili bakteriofaga je češća nego izravna izmjena gena između plazmida i bakteriofaga što ukazuje da fagoplazmidi imaju važnu ulogu intermedijera u izmjeni gena među različitim genetičkim elementima. Također, fagoplazmidi češće izmjenjuju gene s plazmidima nego bakteriofagima (Slika 5) (Pfeifer i Rocha 2024). Činjenica da fagoplazmidi mogu služiti kao intermedijer između plazmida i bakteriofaga otvara važno pitanje mogu li drugi tipovi genetičkih elemenata također poticati izmjenu gena na ovaj način (Slika 5) (Figuroa i sur. 2024). Mogući razlog zašto fagoplazmidi tako često sudjeluju u izmjeni gena s plazmidima i bakteriofagima je to što imaju puno homologa s oba elementa što pospješuje izmjene homolognom rekombinacijom. Osim toga, geni koji su homologni plazmidima i bakteriofagima mogu biti adaptivni za fagoplazmide i takvi geni se mogu fiksirati u fagoplazmidnim genomima. Ipak, ključni plazmidni i bakteriofagni geni čine samo mali udio izmijenjenih gena. Još jedno svojstvo koje može objasniti veliku izmjenu gena je velika veličina genoma fagoplazmida koja omogućuje veću toleranciju na nakupljanje dodatnog genetskog materijala (Pfeifer i Rocha 2024). Fagoplazmidi ne samo da mogu prenositi gene između potpuno različitih tipova genetičkih elemenata, već su sposobni širiti ih i na velike udaljenosti. U nedavnim istraživanjima otkriveno je da fagoplazmidi mogu sadržavati gene homologne onima iz bakteriofaga i plazmida koji se nalaze na međusobno jako udaljenim geografskim prostorima, pa čak i na različitim kontinentima. Jedan od primjera je fagoplazmid iz bakterije *Tritonibacter mobilis* A3R06 koji nosi plazmidne gene homologne

fagoplazmidu pronađenom u Danskoj i bakteriofagne gene koji su homologni bakteriofagu pronađenom u Arapskom moru, a sam fagoplazmid iz bakterije *Tritonibacter mobilis* A3R06 izoliran je u saveznoj državi Massachusetts, SAD (Shan i sur. 2023).



**Slika 5.** Izmjena gena između različitih mobilnih genetičkih elemenata i evolucija fagoplazmida. Lijevi dio slike prikazuje učestalost protoka gena (označen tamno sivim strelicama) između fagoplazmida, bakteriofaga i plazmida pri čemu debljina strelica označava koliko su česti događaji prijenosa gena prema rezultatima istraživanja koje su proveli Pfeifer i Rocha (2024). Mehanizmi dobivanja gena (homologna rekombinacija i translokacija DNA) su označeni shemama iznad ili pokraj strelica. Funkcije zajedničkih gena označene su ikonama u obliku štita. U bakterijskom kromosomu (ružičasto) prisutan je ljubičasti okvir koji zajedno s strelicama (svijetlo sivo) označava tipove mobilnih genetičkih elemenata koji još nisu proučeni ili identificirani, a koji također mogu pospješiti protok gena između vrsta mobilnih genetičkih elemenata. Na desnoj strani slike prikazani su evolucijski putovi fagoplazmida koje su prijavili Pfeifer i Rocha (2024). Fagoplazmidi mogu postati integrativni bakteriofagi stjecanjem integracijskih funkcija, a dobivanjem plazmidnih gena mobilnosti i gubitkom bakteriofagnih funkcija se mogu pretvoriti u prenosive plazmide. Kratica AMR označava antimikrobnu rezistenciju. Preuzeto i prilagođeno iz (Figuroa i sur. 2024).

Mehanizmi koji kontroliraju izmjenu gena između fagoplazmida, plazmida i bakteriofaga još uvijek nisu posve poznati. Postoji mogućnost da rekombinaze pokreću ove procese i da one

posreduju u mjesno specifičnim ili homolognim rekombinacijama. Rekombinaze mogu poticati izmjenu gena unutar istih ili između različitih tipova mobilnih genetičkih elemenata jer one zahtijevaju manju sličnost i manju duljinu homolognih sekvenci za rekombinaciju u usporedbi s izmjenom gena koja se odvija bez prisutnosti rekombinaze (Pfeifer i Rocha 2024). Fagoplazmidi, za razliku od profaga koji se ugrađuju u bakterijski kromosom, ne trebaju kodirati rekombinaze za mjesno specifičnu rekombinaciju. Ipak, neki fagoplazmidi ih posjeduju i poput plazmida koriste za razdvajanje dimera ili za prijelaz između integrativnog i plazmidnog oblika. Također, moguće je da transpozaze koje posreduju u translokacijama također kontroliraju izmjenu gena (Slika 1) (Pfeifer i sur. 2021). Zbog ograničenja veličine genoma bakteriofaga i fagoplazmida prisutnog kod pakiranja u virusne čestice, neadaptivne sekvence dobivene transpozicijom mogu se brzo izgubiti i to uzrokuje otežanu detekciju transpozaza pa je nužno promatrati prijenose gena koji su se dogodili nedavno (Pfeifer i Rocha 2024). Geni koji kodiraju za antibiotsku rezistenciju u fagoplazmidima često su okruženi s transpozonskim sekvencama, posebice transpozazama iz obitelji slične IS6 i/ili integronima što podupire hipotezu da transpozaze imaju važnu ulogu u genskoj izmjeni kod fagoplazmida (Pfeifer i sur. 2022; Pfeifer i Rocha 2024). Zbog činjenice da transpozoni obično sudjeluju u izmjeni gena kod plazmida, a u bakteriofagima se često događa selekcija protiv njih, moguće je da translokacija potiče prijenos gena između plazmida i fagoplazmida, dok homologna rekombinacija pospješuje izmjene gena između bakteriofaga i fagoplazmida (Slika 5) (Figuroa i sur. 2024).



## 5. Fagoplazmidi kao izvor novih plazmida i bakteriofaga

Pretpostavlja se da fagoplazmidi potiču nastanak novih bakteriofaga i plazmida djelujući kao intermedijeri između ova dva tipa genetičkih elementa odnosno da različitim promjenama u genomu fagoplazmidi mogu postati isključivo plazmidi ili bakteriofagi (Slika 5). Ako je u genomu fagoplazmida prisutan mali udio jako sličnih gena koji su homologni potpuno drukčijem tipu genetičkog elementa to upućuje na nedavnu izmjenu gena između ovih elemenata. S druge strane, kada je udio jako sličnih gena homolognih plazmidu ili bakteriofagu velik, to ukazuje na pretvorbu fagoplazmida u drugi tip genetičkog elementa putem prijenosa i/ili inaktivacije gena (Pfeifer i Rocha 2024).

Identificirano je više primjera pretvorbe fagoplazmida u plazmide, pri čemu su novonastali genetički elementi izgubili mogućnost proliferacije u obliku bakteriofaga (Slika 5) (Pfeifer i Rocha 2024). Jedan od primjera je plazmid pRCS47 za koji nije moguće inducirati propagaciju u obliku bakteriofaga, pa se on može smatrati defektivnim fagom. Ovaj plazmid je vjerojatno do nedavno bio potpuno funkcionalan fagoplazmid s obzirom da sadrži kompletni skup gena za replikaciju i sastavljanje virusnih čestica. Izuzetak je gen za rep bakteriofaga, koji sadrži mutaciju koja je izazvala promjenu okvira čitanja i zbog toga bakteriofag nije u mogućnosti injektirati svoju DNA u domaćinsku stanicu (Billard-Pomares i sur. 2014; Gilcrease i Casjens, 2018). Još jedan primjer je plazmid pAMBAS45 duljine 45 kpb izoliran iz bakterije *Alteromonas macleodii*. Ovaj plazmid sadrži gene koji su homologni i u sintenijskom odnosu s obzirom na gene bakteriofaga pVv01, koji je daleko srodan bakteriofagu P1 i inficira red Vibrionales (Slika 3). Razlog zašto je plazmid pAMBAS45 defektivan bakteriofag je nedostatak kontinuirane sekvence DNA od približno 33 kbp u odnosu na bakteriofag pVv01 (Gilcrease i Casjens 2018). Zanimljivo je da plazmidi koji su nastali na ovaj način kasnije mogu steći genetičke elemente koji im omogućuju prijenos u druge bakterije konjugacijom poput *oriT* (služi za inicijaciju replikacije pri prijenosu DNA). Stjecanje ovakvih gena vjerojatno nadoknađuje gubitak propagacije putem virusnih čestica. Fagoplazmidi su podložni raznim promjenama u genomu koje mogu dovesti do gubitka ključnih bakteriofagnih funkcija kao što su stanična liza, formiranje repa bakteriofaga, transkripcijska regulacija i druge važne funkcije. Odsutnost ili inaktivacija ovih gena upućuje da ti elementi nemaju sposobnost dovršiti cjeloviti razvojni ciklus bakteriofaga (Pfeifer i Rocha 2024). Ipak, teško je sa sigurnošću znati je li nemogućnost indukcije profaga rezultat ograničenja korištenih laboratorijskih metoda ili zaista defektivnih gena. Također, virusne čestice mogu nastati, ali biti nestabilne i/ili ne proizvoditi

vidljive plakove na pločama agara što može navesti znanstvenike na krivi zaključak (Gilcrease i Casjens 2018). Još jedan izazov u istraživanju fagoplazmida je činjenica da određeni bakteriofagni geni služe za traženje ovih genetičkih elemenata pa odsutnost tih gena otežava detekciju. Pretvorba fagoplazmida u plazmide također se može dogoditi stjecanjem novih gena poput onih koji kodiraju za antibiotske rezistencije što povećava veličinu genoma. Fagoplazmidi tada mogu izgubiti sposobnost pakiranja cijelog svog genetskog materijala u kapsidu poput bakteriofaga. Takvi elementi se zatim mogu održati u populacijama u obliku plazmida koji kodiraju potencijalno korisne funkcije za domaćinske stanice (Pfeifer i Rocha 2024).

Fagoplazmid može izgubiti plazmidne gene i postati isključivo bakteriofag, takvi primjeri nisu dokumentirani u literaturi i sami mehanizmi koji sudjeluju u ovoj pretvorbi te uzroci njihova događanja još uvijek nisu potpuno istraženi (Slika 5). Moguće je da su fagoplazmidi koji su imali mogućnost integracije u kromosom na taj način uspjeli izbjeći obrambene sustave bakterijskih stanica i da od njih nastaju integrativni profagi (Pfeifer i Rocha 2024). Ovu teoriju podupire činjenica da bakterije imaju određene obrambene sustave protiv specifičnih mobilnih genetičkih elemenata koji se mogu ponašati kao paraziti ili nositi elemente sposobne za narušavanje integriteta bakterijskog genoma (Jaskólska i sur. 2022; Pfeifer i Rocha 2024). Osim toga, integracija fagoplazmida u bakterijski kromosom smanjuje metaboličku „cijenu“ ovih elemenata jer se oni repliciraju zajedno s bakterijskim kromosomom zbog čega plazmidne replikaze i segregacijski sistemi postaju suvišni. Nadalje, integracija u kromosom sprječava probleme inkompatibilnosti s drugim plazmidima i fagoplazmidima (Pfeifer i Rocha 2024). Međutim, integracija ima i svoje nedostatke jer ona može izazvati inaktivaciju gena te gubitak višestrukog stanja kakvo je prisutno kod nekih plazmida i fagoplazmida (Shan i sur. 2023). Ovdje je prisutno još mnogo nepoznanica i potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjele potencijalne prednosti i nedostaci povezani s pretvorbom fagoplazmida u profage (Pfeifer i Rocha 2024).

## 6. Zaključak

Fagoplazmidi su široko rasprostranjeni mobilni genetički elementi koji imaju karakteristike plazmida i bakteriofaga. Njihovi genomi imaju tendenciju biti veći od tipičnih bakteriofaga i plazmida te posjeduju mnoge gene homologne ovim elementima. Hibridni način života fagoplazmida omogućuje im veliku plastičnost i sposobnost rekombinacije s drugim elementima što ih čini jako učinkovitim u prijenosu gena kroz bakterijske populacije. Osim toga, fagoplazmidi mogu biti izvor novih plazmida i bakteriofaga koji nastaju uslijed izmjene ili gubitka određenih gena što je još jedna činjenica koja ukazuje na njihovu važnosti u bakterijskim zajednicama.

Fagoplazmidi se smatraju evolucijski jako starima i često su organizirani u različite skupine na temelju sličnosti njihovih genoma s drugim genetičkim elementima. Ove skupine često su prisutne u različitim bakterijskim rodovima što uključuje patogene bakterije od velikog kliničkog značaja. Istraživanje učestalosti i raznolikosti fagoplazmida te njihovih interakcija s drugim mobilnim genetičkim elementima važno je zbog njihove dokazane uključenosti u prijenos gena za različite antibiotske rezistencije, faktore virulencije, obrambene sustave i druge adaptivne gene. Praćenje evolucije fagoplazmida može dati važne uvide za razumijevanje evolucije bakterijskih populacija te za predviđanje pojave rezistencija koje su od velike važnosti za ljudsko zdravlje.

## 7. Literatura

- Arnold, H. P., She, Q., Phan, H., Stedman, K., Prangishvili, D., Holz, I., Kristjansson, J.K., Garrett, R., Zillig, W. (1999): The genetic element pSSVx of the extremely thermophilic crenarchaeon *Sulfolobus* is a hybrid between a plasmid and a virus. **Molecular Microbiology** 34(2): 217-226.
- Billard-Pomares, T., Fouteau, S., Jacquet, M.E., Roche, D., Barbe, V., Castellanos, M., Bouet, J.Y., Cruveiller, S., Médigue, C., Blanco, J., Clermont, O., Denamur, E., Branger, C. (2014): Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from an *Escherichia coli* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 58(11): 6550-6557.
- Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M. (2009): Bacteriophages: Methods and Protocols. Humana Press: Totowa, NJ, USA.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., Yu, G. (2015): Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials** 14: 102-104.
- DiCenzo, G.C., Finan, T.M. (2017): The Divided Bacterial Genome: Structure, Function, and Evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 81(3): e00019-17.
- Figueroa, W., Cazares, D., Cazares, A. (2024): Phage-plasmids: missed links between mobile genetic elements. **Trends in Microbiology** 32(7): 622-623.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A. (2005): Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology** 3(9): 722-732.
- Gilcrease, E.B., Casjens, S.R. (2018): The genome sequence of *Escherichia coli* tailed phage D6 and the diversity of Enterobacteriales circular plasmid prophages. **Virology** 515: 203-214.
- Greig, D.R., Bird, M.T., Chattaway, M.A., Langridge, G.C., Waters, E. V., Ribeca, P., Jenkins, C., Nair, S. (2022): Characterization of a P1-bacteriophage-like plasmid (phage-plasmid) harbouring *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Microbial Genomics** 8(12): mgen000913.
- Hinnebusch, J., Tilly, K. (1993): Linear plasmids and chromosomes in bacteria. **Molecular Microbiology** 10: 917-922.
- Iranzo, J., Koonin, E. V., Prangishvili, D., Krupovic, M. (2016): Bipartite Network Analysis of the Archaeal Virosphere: Evolutionary Connections between Viruses and Capsidless Mobile Elements. **Journal of Virology** 90(24): 11043-11055.

- Jaskólska, M., Adams, D.W., Blokesch, M. (2022): Two defence systems eliminate plasmids from seventh pandemic *Vibrio cholerae*. **Nature** 604: 323-329.
- Kim, M., Kim, S., Park, B., Ryu, S. (2014): Core lipopolysaccharide-specific phage SSU5 as an auxiliary component of a phage cocktail for Salmonella biocontrol. **Applied and Environmental Microbiology** 80(3): 1026-1034.
- Knott, S.E., Milsom, S.A., Rothwell, P.J. (2020): The Unusual Linear Plasmid Generating Systems of Prokaryotes. IntechOpen, Hampton, UK.
- Krüger, A., Lucchesi, P.M.A. (2015): Shiga toxins and *stx* phages: Highly diverse entities. **Microbiology** 161(Pt 3): 451-462.
- Lennox, E.S. (1955): Transduction of Linked Genetic Characters of the Host by Bacteriophage P1. **Virology** 1(2): 190-206
- Łobocka, M.B., Rose, D.J., Plunkett, G., Rusin, M., Samojedny, A., Lehnerr, H., Yarmolinsky, M.B., Blattner, F.R. (2004): Genome of bacteriophage P1. **Journal of Bacteriology** 186(21): 7032-7068.
- von Mentzer, A., Blackwell, G.A., Pickard, D., Boinett, C.J., Joffré, E., Page, A.J., Svennerholm, A.M., Dougan, G., Sjöling, Å. (2021): Long-read-sequenced reference genomes of the seven major lineages of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) circulating in modern time. **Scientific Reports** 11: 9256.
- Nair, S., Barker, C.R., Bird, M., Greig, D.R., Collins, C., Painset, A., Chattaway, M., Pickard, D., Larkin, L., Gharbia, S., Didelot, X., Ribeca, P. (2024): Presence of phage-plasmids in multiple serovars of *Salmonella enterica*. **Microbial Genomics** 10(5): 001247.
- Paton, J.C., Paton, A.W. (1998): Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clinical microbiology reviews** 11(3): 450-479.
- Pedulla, M.L., Ford, M.E., Houtz, J.M., Karthikeyan, T., Wadsworth, C., Lewis, J.A., Jacobs-Sera, D., Falbo, J., Gross, J., Brussow, H., Pannunzio, N.R., Brucker, W., Kumar, V., Kandasamy, J., Keenan, L. (2003): Origins of Highly Mosaic Mycobacteriophage Genomes. **Cell** 113(2): 171-182.
- Pfeifer, E., Bonnin, R.A., Rocha, E.P.C. (2022): Phage-Plasmids Spread Antibiotic Resistance Genes through Infection and Lysogenic Conversion. **mBio** 13(5): e0185122.

- Pfeifer, E., Moura De Sousa, J.A., Touchon, M., Rocha, E.P.C. (2021): Bacteria have numerous distinctive groups of phage-plasmids with conserved phage and variable plasmid gene repertoires. **Nucleic Acids Research**, 49(5): 2655-2673.
- Pfeifer, E., Rocha, E.P.C. (2024): Phage-plasmids promote recombination and emergence of phages and plasmids. **Nature Communications** 15: 1545.
- Ravin, N. V. (2011): N15: The linear phage-plasmid. **Plasmid** 65(2): 102-109.
- Ravin, N. V. (2015): Replication and Maintenance of Linear Phage-Plasmid N15. **Microbiology Spectrum** 3(1): 71-82.
- Shan, X., Szabo, R.E., Cordero, O.X. (2023): Mutation-induced infections of phage-plasmids. **Nature Communications** 14(1): 2049.
- Siddaramappa, S., Challacombe, J.F., DeCastro, R.E., Pfeiffer, F., Sastre, D.E., Giménez, M.I., Paggi, R.A., Detter, J.C., Davenport, K.W., Goodwin, L.A., Kyrpides, N., Tapia, R., Pitluck, S., Lucas, S., Woyke, T., Maupin-Furlow, J.A. (2012): A comparative genomics perspective on the genetic content of the alkaliphilic haloarchaeon *Natrialba magadii* ATCC 43099<sup>T</sup>. **BMC Genomics** 13(1): 165.
- Smith, L., Goldobina, E., Govi, B., Shkoporov, A.N. (2023): Bacteriophages of the Order Crassvirales: What Do We Currently Know about This Keystone Component of the Human Gut Virome?. **Biomolecules** 13(4): 584.
- Szczepankowska, A.K., Łobocka, M. (2024): Exploring the role of phage plasmids in gene transfers. **Trends in Genetics** 40(7): 555-557.
- Venturini, C., Zingali, T., Wyrsh, E.R., Bowring, B., Iredell, J., Partridge, S.R., Djordjevic, S.P. (2019): Diversity of P1 phage-like elements in multidrug resistant *Escherichia coli*. **Scientific Reports** 9(1):18861.
- Yarmolinsky, M., Hoess, R. (2015): The Legacy of Nat Sternberg: The Genesis of Cre-lox Technology. **Annual Review of Virology** 2(1): 25-40.
- Zinder, N.D., Lederberg, J. (1952): GENETIC EXCHANGE IN SALMONELLA. **Journal of bacteriology** 64(5): 679-699.

## **8. Životopis**

Rođena sam 12.7.2002. godine u Zadru. Završila sam osnovnu školu i srednju školu (opću gimnaziju) u Benkovcu. Godine 2021. upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja odradila sam laboratorijsku stručnu praksu u herbarijskoj zbirci Herbarium Croaticum Biološkog odsjeka PMF-a pod vodstvom dr. sc. Ivane Rešetnik i dr. sc. Vedrana Šegote.