

MIROŚŁAWA WŁODARCZYK

Zakład Genetyki Bakterii

Instytut Mikrobiologii

Uniwersytet Warszawski

Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

miraw@biol.uw.edu.pl

RÓŻNORODNOŚĆ CECH FENOTYPOWYCH BAKTERII KODOWANYCH PRZEZ PLAZMIDY

W zależności od wielkości cząsteczki, plazmidy noszą geny kodujące od kilku do kilkuset różnych białek. Jednakże, jak już wspomniałam w poprzednim artykule, produkty genów o plazmidowej lokalizacji nie są niezbędne do wzrostu komórki w standardowych (normalnych) warunkach. Na plazmidach nie znajdziemy więc genów kodujących polimerazę RNA, podjednostki rybosomów, enzymów cyklu Krebsa itp. W rzadkich przypadkach, gdy na plazmidzie stwierdzamy obecność tego typu genów, lub gdy nie jesteśmy w stanie usunąć replikonu uznawanego za plazmid z komórki, mamy podstawy do podjęcia rozważań czy istotnie mamy do czynienia z plazmidem, czy też jest to replikon niezbędny do życia komórki, a więc chro-

mosom. Przypominam, że od modelowej zasady, iż jedna komórka bakteryjna zawiera jeden chromosom są wyjątki; przykładem mogą być niektóre gatunki *Rhizobium* i *Paracoccus*. Geny o lokalizacji plazmidowej dają bakteriom selekcyjną przewagę w pewnych specjalnych warunkach, często wręcz umożliwiając im przeżycie. Powstaje zatem pytanie, dlaczego geny te nie są po prostu częścią chromosomu, tak aby wszystkie bakterie w sytuacjach nietypowych mogły odnosić korzyść z ich obecności. Dyskusja tego problemu zostanie podjęta na końcu artykułu, po przedstawieniu przeglądu różnorodności funkcji fenotypowych kodowanych przez geny plazmidowe.

TYPY GENÓW OBECNYCH NA PLAZMIDACH

Wśród genów obecnych na plazmidach możemy wyróżnić dwa ich podstawowe typy. Pierwszy, to geny absolutnie niezbędne dla funkcjonowania plazmidu jako autonomicznego replikonu i obecne w każdym plazmidzie, a więc geny i sekwencje (np. *oriV*), niezbędne do replikacji i stabilnego utrzymywania cząsteczki plazmidu w komórce. Drugi typ, to wszystkie pozostałe geny stanowiące „dodatkowe wyposażenie” plazmidu, od których zależy różnorodność fenotypów kodowanych przez plazmidy, lecz które nie są niezbędnym elementem składowym każdego plazmidu. Na

Ryc. 1 w schematyczny sposób przedstawiono złożoność struktury plazmidu, wyróżniając w obrębie jego cząsteczki kilka umownych modułów strukturalno-funkcjonalnych (THOMAS 2000).

Plazmid zawierający tylko „moduł replikacyjny”, będzie spełniał kryteria definicji plazmidu, lecz jego obecność nie będzie nadawała komórce gospodarza żadnych specjalnych fenotypowych właściwości odróżniających ją od komórki bezplazmidowej. Będzie to więc plazmid *sensu stricto* kryptyczny. Zwracam uwagę, że mianem plazmidu kryptycznego określa-



Ryc. 1. Typy genów występujące w cząsteczce plazmidowej.

Rejon replikacyjny to moduł absolutnie niezbędny w plazmidzie, pozostałe grupy genów mogą lecz nie muszą być obecne.

my też zwyczajowo plazmid zidentyfikowany poprzez wykrycie w komórce fizycznej obecności DNA plazmidowego, lecz którego obecności nie kojarzymy (na tym etapie analizy) z określoną cechą fenotypową komórki gospodarza. Geny warunkujące replikację cząsteczki plazmidu są zazwyczaj skupione na jednym fragmencie DNA plazmidowego, który w dużych plazmidach stanowi niewielki procent całego genomu. Identyfikacja takiego fragmentu i wyposażenie go w marker selekcyjny pozwala na konstrukcję pochodnej plazmidu zawierającej tylko moduł replikacyjny. Taki minimalny replikon jest niezwykle przydatny w molekularnej analizie systemu replikacyjnego plazmidu macierzystego.

CECHY FENOTYPOWE BAKTERII DETERMINOWANE PRZEZ GENY PLAZMIDOWE

Cech takich jest niezwykle dużo, dlatego też dla zwiększenia przejrzystości opisu w Tabeli 1 zgrupowano je w kilka powszechnie wyróżnianych typów, aby następnie, na wybranych przykładach omówić niektóre z nich bardziej szczegółowo.

OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI I CHEMIOTERAPEUTYKI

Cecha oporności bakterii, zwłaszcza chorobotwórczych, na antybiotyki jako najbardziej

Kolejny wyróżniony zespół genów to geny odpowiedzialne za horyzontalny transfer plazmidów (autotransfer drogą koniugacji lub transfer „wspomagany” obecnością innego plazmidu, tzw. mobilizującego). Są one bardzo ważne dla możliwości rozprzestrzeniania się plazmidów w środowisku, lecz ich brak nie powoduje zaburzeń w funkcjonowaniu plazmidu w komórce.

Moduł zaznaczony na schemacie jako „sekwencje insercyjne” to określenie umowne; sekwencje IS nie są oczywiście zgrupowane w jednej części genomu plazmidowego, stanowią jednak składnik bardzo ważny, odpowiedzialny głównie za wszelkiego rodzaju przegrupowania genów w obrębie cząsteczki plazmidu oraz ich transfer między różnymi replikonami w komórce. Często sekwencje IS ograniczają inne zespoły genów (np. opornościowych) tworząc duże, złożone elementy mobilne, transpozony. O istotnym znaczeniu sekwencji insercyjnych w funkcjonowaniu i ewolucji plazmidów świadczyć może ich stosunkowo duża (w porównaniu do chromosomów) zawartość w plazmidach (MAHILLON i współaut. 1999).

Na schemacie największy obszar zajmuje moduł grupujący geny związane z różnymi cechami fenotypowymi gospodarza, zwykle metaboliczno-fizjologicznymi, wynikającymi z obecności plazmidu. W konkretnych plazmidach takich genów może być różna liczba, a wielkość obszaru tego modułu ma raczej obrazować ogólny ogromny zakres różnorodności tych cech. W każdym plazmidzie występuje pewna frakcja sekwencji DNA, których funkcji nie znamy, pozostaje to prawdziwe nawet w odniesieniu do plazmidów o kompletnie poznanej sekwencji nukleotydowej. Ten obszar oznaczono jako rejon „cichy” (ang. silent).

bezpośrednio „dotykająca” człowieka, była od dawna i wciąż jest przedmiotem bardzo intensywnych badań naukowców na całym świecie. Cecha lekooporności jest też fenotypem bakterii najpowszechniej kojarzonym z obecnością w nich plazmidów z grupy tzw. opornościowych (plazmidy R), chociaż należy pamiętać, że geny warunkujące oporność bakterii na antybiotyki mogą być też zlokalizowane w chromosomie komórki. Jednak oporność kodowana plazmidowo istotnie jest przedmiotem szczególnego zainteresowania, co wynika z kil-

Tabela 1. Przykłady fenotypów zależnych od obecności plazmidów

Fenotyp	Plazmid	Naturalny gospodarz
Oporność na antybiotyki i inne leki		
Tetracyklina	RP4 NR1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Shigella flexneri</i>
Streptomycyna	R6K	<i>Proteus rettgeri</i>
Chloramfenikol	R938	<i>Serratia marcescens</i>
Penicylina	R6K	<i>Proteus rettgeri</i>
Erytromycyna	pIP1527	<i>Escherichia coli</i>
Sulfamidy	pSa	<i>Shigella</i> sp.
Oporność na jony metali ciężkich		
Rtęć	NR1(Tn21) pI258	<i>Shigella flexneri</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Kadm, cynk, kobalt	pMOL30	<i>Ralstonia eutropha</i>
Miedź	pRJ1004	<i>Pseudomonas syringae</i>
Arsen	R773	<i>Escherichia coli</i>
Produkcja antybiotyków i bakteriocyn		
Metylenomycyna	pSCP1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Kolicyna E1	ColE1	<i>Escherichia coli</i>
Kloacyna DF13	CloDF13	<i>Enterobacter cloacae</i>
Megacyna BII	pSE203	<i>Bacillus megaterium</i>
Katabolizm toksycznych związków		
Toluen (inne przykłady – patrz Tabela 2)	TOL (pWWO)	<i>Pseudomonas putida</i>
Patogenność bakterii		
Produkcja hemolizyny	pJH1	<i>Streptococcus faecalis</i>
Czynnik wirulencji	pX01	<i>Bacillus anthracis</i>
Antygen kolonizacyjny	pK88	<i>Escherichia coli</i>
Adhezyna <i>YadA</i>	pYV	<i>Yersinia</i> spp.
Wirulencja	pMYSG6000	<i>Shigella flexneri</i> 2a
Interakcje z roślinami		
Rakowate guzy roślin	pTi	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Kędzierzawość korzeni	pRi	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
Tworzenie brodawek korzeniowych	pPN1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Wiązanie azotu	pIJ1007	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Zdolność do koniugacji		
	F	<i>Escherichia coli</i>
	RK2	<i>Klebsiella aerogenes</i>
	NR1	<i>Shigella flexneri</i>
	pAD1	<i>Enterococcus faecalis</i>
	pSCP1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Inne właściwości		
Tworzenie pęcherzyków gazowych	pHH1	<i>Halobacterium</i> sp.
Pigmentacja	pPL376	<i>Erwinia herbicola</i>
Fermentacja laktozy	pLM3601	<i>Streptococcus cremoris</i>
Wykorzystywanie sacharozy	CTnscr94	<i>Salmonella senftenberg</i>

ku powodów. Po pierwsze, bardzo często plazmidy niosą genetyczne determinanty oporności na więcej niż jeden antybiotyk równocze-

śnie, co *a priori* stwarza utrudnienie w terapii, po drugie, w naturalnych plazmidach opornościowych genetyczne determinanty oporności

na antybiotyki są często częścią składową ruchomych elementów genetycznych, transpozonów. Ponadto plazmidy opornościowe są zwykle zdolne do koniugacyjnego transferu swego DNA. Wszystkie te cechy sprzyjają niebezpiecznemu rozprzestrzenianiu się cechy oporności na antybiotyki w środowisku (także szpitalnym!).

Ponieważ problemowi plazmidowo kodowanej oporności na antybiotyki poświęcony jest oddzielny artykuł (patrz art. J. PORTYKUS w tym zeszycie KOSMOSU), w tym miejscu poprzestaną na podkreśleniu kilku ważnych ogólnych aspektów tego zagadnienia. Najogólniej mówiąc antybiotyki można podzielić na kilka kategorii w zależności od mechanizmu ich działania: takie które (i) oddziałują na syntezę ściany komórkowej bakterii (β -laktamy), (ii) naruszające integralność błony cytoplazmatycznej (polimyksyna), (iii) hamujące metabolizm kwasów nukleinowych (kwas nalidyksowy, aktynomycyna D) lub (iv) hamujące syntezę białek (chloramfenikol, streptomycyna). Bakterie wykształciły szlaki oporności tak różnorodne, że potrafią one zapobiec skutecznemu działaniu każdego z wymienionych mechanizmów. Oporność na antybiotyk wynikać może na przykład z: (i) detoksyfikacji lub inaktywacji antybiotyku, (ii) zmniejszenia poziomu pobierania antybiotyku lub jego aktywne usuwanie z komórki, (iii) nadprodukcji komórkowego celu działania antybiotyku (tzw. tarczy), lub z jej modyfikacji, (iv) wytworzenia zastępczego wobec zahamowanego przez antybiotyk kompletnego szlaku metabolicznego lub tylko jego zablokowanego etapu, czyli tzw. mechanizm „bypass”. Tylko niektóre z dróg zyskiwania oporności na antybiotyk mogą wynikać z pojedynczej mutacji istniejącego w komórce genu. W większości przypadków wymagane jest uzyskanie nowego genu (lub kilku genów),

genów te pochodzą od mikroorganizmów produkujących antybiotyki, u których stanowią one naturalne zabezpieczenie przed zabójczym działaniem własnego metabolitu.

OPORNOŚĆ NA JONY METALI CIĘŻKICH

Obecność w środowisku kationów metali ciężkich (rtęci, niklu, ołowiu, kadmu, bizmutu, antymonu czy srebra) oraz niektórych anionów (arsenianów, boranów, chromianów) nie jest rzadka w okolicach uprzemysłowionych. Są to związki wysoce toksyczne dla wszystkich organizmów żywych, także dla większości bakterii. Jednak z gleb i wód zanieczyszczonych tymi związkami izolowane są bakterie odporne na ich działanie, a najczęściej oporność ta warunkowana jest obecnością plazmidów. W wielu przypadkach mechanizmy oporności na jony metali ciężkich zostały poznane bardzo dokładnie. Szczególnie ciekawy jest system genetyczny warunkujący oporność bakterii na jony Hg^{2+} oraz organiczne związki rtęci. Enzymy uczestniczące w detoksyfikacji tych związków tworzą tzw. operon *mer* i są najczęściej zlokalizowane na transpozonach (najlepiej poznane to Tn501 z *Pseudomonas aeruginosa* i Tn21 z plazmidu NR1 *Shigella flexneri*). Najistotniejszą cechą mechanizmu oporności bakterii na jony rtęci jest wytworzenie wysoce specyficznego systemu transportu związków rtęci do wnętrza komórki, gdzie są one, z udziałem reduktazy rtęcianowej, przekształcane w mniej toksyczną i lotną formę Hg^0 . W przypadku organicznych związków rtęci, system wyposażony jest w dodatkowy enzym, liazę, uwalniający rtęć w formie jonowej przed jej redukcją do formy Hg^0 (MISRA 1992). Genetyczna organizacja operonu *mer* pokazana jest na Ryc. 2.



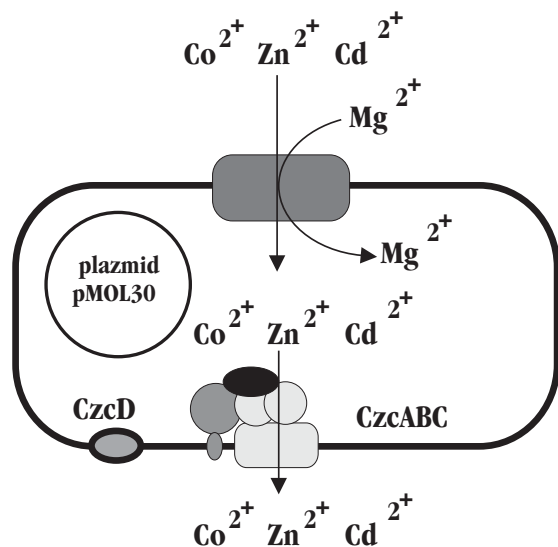
Ryc.2. Genetyczna organizacja operonu *mer* (Tn501) warunkującego oporność na jony rtęci.

Geny *merT* i *merA* odpowiadają za transport jonów Hg^{2+} do wnętrza komórki, gen *merA* koduje reduktazę rtęcianową, a geny *merR* i *merD* pełnią funkcje regulacyjne, OP – to rejon operatora i promotora.

co, podobnie jak w sytuacji pojawiania się wielorakiej oporności jest najczęściej związane z wprowadzeniem do komórki plazmidu opornościowego. Oczywiście nie wyjaśnia to „pierwotnego” źródła genów determinujących oporności niesionych przez plazmid. Aktualnie powszechnie akceptowana jest hipoteza, iż

Na całkowicie innych zasadach opiera się mechanizm oporności na Ca^{2+} , Co^{2+} i Zn^{2+} (NIES 1992). W tym przypadku, obecne w środowisku toksyczne jony wnikają do wnętrza komórki niespecyficznie lub przez systemy transportujące jony Mg^{2+} . Jeżeli w komórce obecny jest jeden z plazmidów kodujących

tzw. system CZC, to jony które wniknęły do komórki ulegają specyficznemu transportowi na zewnątrz. Jednym z najdokładniej scharakteryzowanych plazmidów odpowiedzialnych za oporność bakterii na jony kadmu, kobaltu i cynku jest bardzo duży (238 kb) plazmid pMOL30 zidentyfikowany w *Ralstonia eutropha* (MERGEAY i współaut. 1985). Rycina 3 ilustruje zasadę oporności tej bakterii na jony kadmu, cynku i kobaltu warunkowaną obecnością plazmidu pMOL30.



Ryc. 3. System oporności *Ralstonia eutropha* na kobalt, cynk i kadm warunkowanej przez pMOL30. Zasady funkcjonowania – w tekście.

Czytelników zainteresowanych problemami plazmidowo kodowanej oporności na sole metali ciężkich odsyłam do poświęconego temu tematowi całego numeru specjalistycznego czasopisma „Plasmid” 1/1992 oraz do artykułów przeglądowych (SILVER i MISRA 1988, SILVER 1996, SILVER i PHUNG 1996).

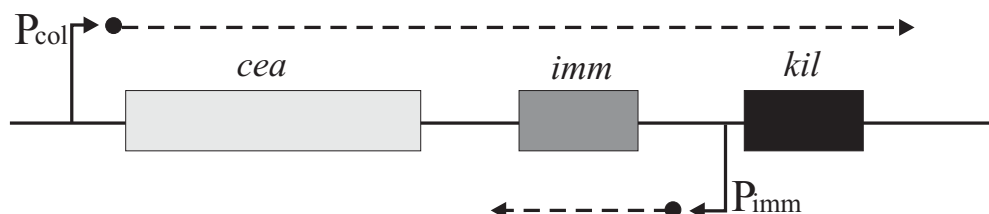
PRODUKCJA BAKTERIOCYN

Zdolność pewnych bakterii do produkcji antybakteryjnych czynników zdolnych do zabijania jedynie szczepów blisko spokrewnionych, lecz niezdolnych do produkcji tychże czynników opisana została już w 1925 r. przez belgijskiego mikrobiologa Andre Gratia jako tzw. „principle V” (ang. virulence, gdyż producent tego czynnika był jednocześnie wirulentny w stosunku do świń). Czynniki te określane obecnie ogólnie mianem bakteriocyn (lub kolicyn, jeżeli producentami są szczepy *Escherichia coli*) syntetyzowane są najczęściej pod

kontrolą genetyczną genów zlokalizowanych na plazmidach, które jednocześnie niosą genetyczne determinanty oporności (ang. immunity) producenta na działanie obecnej w środowisku bakteriocyny (BAREFOOT i współaut. 1992, JOERGER i współaut. 2000). Pod względem chemicznym bakteriocyny to substancje białkowe o masie 20–90 kDa, chociaż znane są też tzw. mikrocyiny o masie <1 kDa. Mechanizm działania bakteriocyn na komórki obejmuje zaburzenia struktury i funkcji membran, tzw. depolaryzację (np. kolicyna E1), uszkodzenia DNA (np. kolicyna E2 działająca jako niespecyficzna endonukleaza), lub hamowanie syntezy białek poprzez inaktywację rybosomowego RNA (kolicyna E3 i kloacyna DF13). Bakteriocyny, jako substancje antybakteryjne o bardzo wąskim (w odróżnieniu od „prawdziwych” antybiotyków) spektrum działania, nie znalazły szerszego zastosowania praktycznego. Zasadniczo jedynie produkowana przez *Lactococcus lactis* nizyna (która jest jednak kodowana przez geny chromosomowe) znalazła prawnie usankcjonowanie zastosowanie jako konserwant żywności. Próby stosowania bakteriocyn w medycynie weterynarii są wciąż w stadium niezbyt zaawansowanym.

Systemy genetyczne determinujące produkcję bakteriocyn (np. kolicyny E1 kodowanej przez plazmid ColE1 czy kloacyny kodowanej przez plazmid CloDF13) są jednak niezwykle ciekawe w swojej organizacji i regulacji i choćby z tego powodu wzbudzają duże zainteresowanie badaczy (LURIA i SUIT 1992). Zespół genów stanowiących „kasetę kolicynową” plazmidu ColE1 przedstawiony jest na Ryc. 4. Ciekawą cechą systemu jest to, że wytwarzanie kolicyny jest zabójcze dla producenta, gdyż uwolnienie produktu genu *cea* do środowiska związane jest z lizą komórki przy udziale produktu genu *kil*. Jednak cały ten zlokalizowany na plazmidzie system jest w stanie represji wynikającej z zablokowania głównego promotora (P_{col}) przez komórkowe białko LexA₃ i praktycznie w populacji nie więcej niż 10^{-3} komórek na generację produkuje aktywnie kolicynę i w wyniku „samobójczego aktu” wydziela ją do środowiska. Komórki nie produkujące aktualnie kolicyny, lecz niosące plazmid ColE1, są chronione przed działaniem egzogennej kolicyny dzięki funkcji produktu genu *imm*, (ulegającemu ekspresji także z własnego promotora, patrz Ryc. 4), natomiast eliminacji ze środowiska ulegają pokrewne bakterie bezplazmidowe. Wszelkie sytuacje powodujące zniszczenie

represora (białko LexA), a więc indukujące komórkowy system SOS uruchamiają jednocześnie lawinową produkcję kolicyny przez całą populację niosących plazmid bakterii. Biologiczny sens zjawiska bakteriocynogenii rozważany jest głównie w aspekcie roli tego zjawiska w środowisku, w którym bakterie dysponujące takim „egzotycznym” mechanizmem zyskują przewagę selekcyjną nad współistniejącymi bakteriami bezplazmidowymi (RILEY i GORDON 1999).



Ryc. 4. Schemat „kasety kolicynowej” plazmidu ColE1.

Gen *cea* – koduje białko kolicyny ColE1, *imm* – białko „immunity”, *kil* – białko lityczne, uwalniające kolicynę z komórki. P_{col} – indukcyjny promotor całego systemu, P_{imm} – niezależny promotor genu *imm*.

Zjawisko bakteriocynogenii jest dość powszechne wśród różnych grup bakterii i w większości przypadków jest związane z obecnością plazmidów. Najlepiej poznane są plazmidy warunkujące syntezę kolicyn. Wyróżniamy wśród nich dwie grupy; małe plazmidy niekonjugacyjne (ColE1, CloDF13) oraz duże plazmidy koniugacyjne, które często determinują produkcję więcej niż jednej kolicyny, a także niosą geny oporności na antybiotyki oraz geny wirulencji (ColIb, ColIa, ColV).

Co ciekawe, najpopularniejszy plazmid kolicynogeny, opisany wyżej ColE1, swą „sławę” zawdzięcza nie tyle zjawisku kolicynogenii, ile możliwości prostego dostosowania jego cząsteczki do roli wektora do klonowania genów. System replikacyjny typu ColE1 obecny jest w wielu wektorach, zarówno ogólnego (np. pBR322), jak i specjalistycznego (pUC18, pBluScript, pTZ19U itp.) zastosowania.

BIODEGRADACJA TOKSYCZNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH (PLAZMIDY KATABOLICZNE)

Ogólnie znana jest nieograniczona wręcz rola bakterii w procesach biodegradacji gromadzącej się w środowisku materii organicznej w wyniku wykorzystywania tychże związków jako źródeł węgla i energii. Jednak wiele naturalnych lub syntetyzowanych w prowadzonych przez człowieka procesach prze-

myslowych związków to substancje toksyczne. Z bakterii żyjących w zanieczyszczonych glebach, wodach i osadach dennych izolowano plazmidy niosące geny kodujące szlaki metaboliczne odpowiedzialne za degradację zarówno prostych związków organicznych, jak np. alifatyczne (oktan), jednopierścieniowe aromatyczne (fenol, toluen) węglowodory, związki aromatyczne wielopierścieniowe (naftalen, bifenył) i heterocykliczne (nikotyna) jak również licznych, bardzo toksycznych ich chloropo-

chodnych (WALLACE i SAYLER 1992, TOP i współaut. 2000, HAY i współaut. 2000). Plazmidy takie określamy ogólną nazwą plazmidów degradacyjnych lub katabolicznych, a przykłady degradowanych z ich udziałem związków przedstawione są w Tabeli 2.

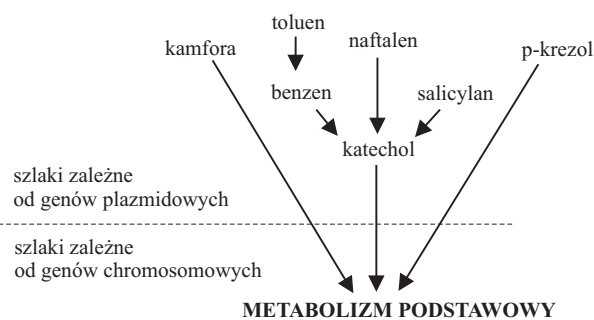
Szlaki kataboliczne prowadzące do przekształcenia toksycznych substancji w metabolity pośrednie, które mogą być następnie wprowadzone do tzw. metabolizmu podstawowego są zwykle dość skomplikowane i może w nich uczestniczyć nawet kilkanaście enzymów kodowanych przez geny o plazmidowej lokalizacji. Ogólne wyobrażenie o roli plazmidów degradacyjnych w katabolizmie toksycznych związków organicznych daje schemat na Ryc. 5. Widać tu jednocześnie, że w wielu przypadkach ważnym metabolitem pośrednim jest katechol, który dalszym przemianom może ulegać w dwojaki sposób: według szlaku *meta*-kodowanego przez geny plazmidowe lub *orto*-kodowanego przez geny chromosomowe. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych szlaków degradacji fenolu jest plazmidowo kodowany system obecny w *Pseudomonas* sp. CF600. Na plazmidzie pVI150 obecnym w tym szczepie zidentyfikowano 16 genów zorganizowanych w jeden operon *dmp*, poznano produkty tych genów, ich funkcje i sposób regulacji (PAWŁOWSKI i SHINGLER 1994).

Należałoby wspomnieć, że pierwszym zidentyfikowanym w 1974 r. plazmidem degra-

Tabela 2. Przykłady toksycznych związków (naturalnych i syntetycznych) degradowanych pod kontrolą genów plazmidowych

Nazwa degradowanego związku	Plazmid	Szczep bakterii
Oktan, dekan	OCT	<i>Pseudomonas oleovorans</i> PpG6
Niecykliczne izoprenoidy	pSRQ50	<i>Pseudomonas putida</i> PPU2
Salicylan	SAL1	<i>Pseudomonas putida</i> R1
Benzen	pWW174	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Anilina	pCIT1	<i>Pseudomonas</i> sp. CIT1
Styren	pEG	<i>Pseudomonas putida</i> ST
Bifenyl	pWW100	<i>Pseudomonas</i> sp. CB406
Nikotyna	NIC	<i>Pseudomonas convexa</i> Pcl
Dibenzotiofen	pDBT2	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> DBT2
Chlorobenzen	pP51	<i>Pseudomonas</i> sp. P51
Kwas 3-chlorobenzoesowy (3CBA)	pBR60	<i>Alcaligenes</i> sp. BR60
Kwas para-toluenosulfonowy	pTSA	<i>Comamons testosteroni</i> T-2
Polichlorobifenyle (PCBs)	pSS60	<i>Achromobacterium</i> sp.
	pKF1	<i>Arthrobacter</i> sp.
Oligomer nylonu	pOAD2	<i>Flavobacterium</i> sp.
Paration	pCS1	<i>Pseudomonas diminuta</i>
Kwas dichlorofenoksyoctowy (2,4-D)	pJP4	<i>Ralstonia eutropha</i>

dacyjnym był plazmid TOL (117 kb) z *Pseudomonas putida*, któremu następnie nadano symbol pWWO i stał się on prototypem dużej grupy plazmidów „TOL” odpowiedzialnych za degradację toluenu i jego pochodnych. Pierwsza część szlaku katabolizmu toluenu (tzw. górny operon), prowadząca do przemiany toluenu do katecholu, jest przedstawiona na



Ryc. 5. Schematyczne przedstawienie roli plazmidów katabolicznych w szlakach degradacji związków toksycznych.

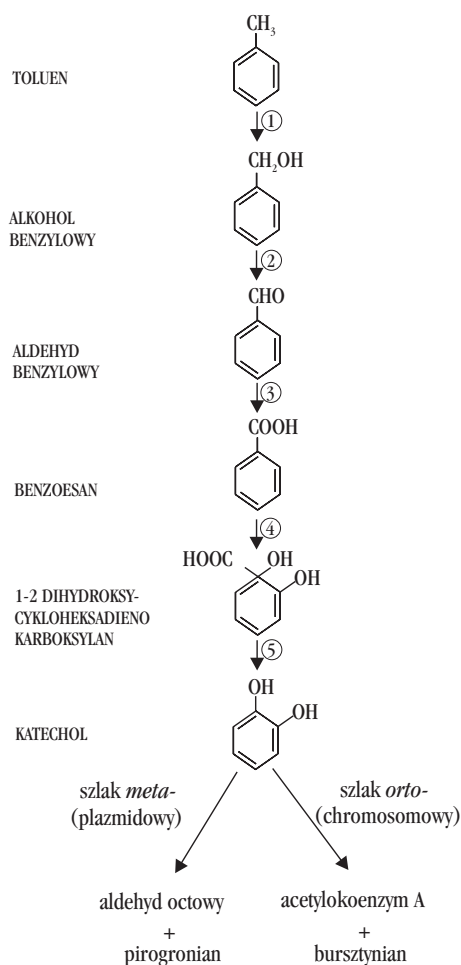
Ryc. 6. Geny kodujące enzymy szlaków degradacyjnych zgrupowane w operony są często zlokalizowane na transpozonach, co pozwala na ich efektywny transfer między obecnymi w komórce replikonami, a także na horyzontalne

rozprzestrzenianie się w środowisku nawet jeżeli plazmid będący pierwotnym nośnikiem transpozonu nie może replikować się w nowym gospodarzu (TAN 1999). Przykłady transpozonów katabolicznych to Tn4651 (z pWWO), Tn4655 (z plazmidu NAH7), Tn5280 (z pP51 – degradacja chlorokatecholu), Tn4371 (obecny w wielu plazmidach IncP1).

Plazmidy kataboliczne są niezmiernie ważne z praktycznego punktu widzenia. Znajdują one szerokie zastosowanie w procesach bioremediacji. Wiele z nich posłużyło do konstrukcji chronionych patentami systemów wykorzystywanych w profesjonalnych urządzeniach usuwających zanieczyszczenia ze ścieków, gleby wokół zakładów przemysłowych i innych skażonych miejsc.

CECHY ZWIĄZANE Z PATOGENNOŚCIĄ BAKTERII WOBEC CZŁOWIEKA I ZWIERZĄT

Genetyczna determinacja zjawiska patogenności bakterii (czyli ich zdolności do wywoływania chorób) to problem bardzo złożony. Wiele spośród czynników odpowiedzialnych za patogenność bakterii, czyli tzw. czynników wirulencji, jest kodowanych przez geny umiejscowione na plazmidach. Należy jednak zdać sobie sprawę, że czynników które możemy uważać za związane z chorobotwór-



Ryc. 6. Szlak degradacyjny toluenu determinowany przez geny zlokalizowany na plazmidzie pWWO.

Enzymy przeprowadzające kolejne reakcje: (1) monoksygenaza ksylenowa, (2) dehydrogenaza alkoholu benzyłowego, (3) dehydrogenaza aldehydu benzyłowego, (4) oksygenaza toluenianowa, (5) dehydrogenaza dwuhydroksycykleheksadienokarboksylenowa.

nością jest wiele. Jednym z omawianych już czynników jest chociażby cecha oporności bakterii na antybiotyki. Oczywiście brak tej cechy nie zmienia zdolności patogenu do wywołania choroby, ale jej występowanie stwarza ogromne problemy w terapii. Wśród czynników bezpośrednio zaangażowanych w proces wywoływania choroby, kodowanych przez geny plazmidowe, możemy wyróżnić zdolność do adhezji do powierzchni odpowiednich komórek atakowanej tkanki i ewentualnej penetracji do wnętrza komórki, rozprzestrzenianie się między komórkami (czyli inwazyjność patogena), zdolność do produkcji różnego typu toksyn, oporność na antybakteryjne czynniki obecne w surowicy (ang. serum resistance) itp.

Dla zilustrowania roli plazmidów w procesach patogenyzy bardzo spektakularne (aczkolwiek dobrane zupełnie arbitralnie) są zjawiska związane z „wirulencyjnymi” plazmidami popularnych enteropatogenów takich jak *Salmonella* i *Shigella*, a także rola plazmidów w „uzjadliwianiu się” szczepów nieszkodliwego komensala, mieszkańca naszego jelita, czyli pałeczki okrężnicy, *E. coli* (BAHRANI-MOUGEOT i DONNENBERG 2000).

Na przykładzie chorobotwórczych szczepów *Salmonella* i *Shigella* możemy prześledzić też bardzo ciekawe zjawisko współdziałania genów chromosomowych i plazmidowych w warunkowaniu zdolności bakterii do wywołania kompletnego procesu chorobowego. Bakterie z rodzaju *Salmonella* są jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń pokarmowych (dur brzuszny, dur rzekomy) przejawiających się jako zapalenia jelita cienkiego lub grubego, ale także są odpowiedzialne za znacznie groźniejsze tzw. infekcje systemowe u ludzi i zwierząt. Wiele genów związanych z wirulencją, zwłaszcza tych wymaganych do adhezji i inwazji komórek nabłonka, ale także odpowiedzialnych za oporność na fagocytozę odnaleziono w tzw. wyspach patogenności (SPI) w chromosomie (MARCUS i współaut. 2000). Jednak powszechna jest także obecność w różnych serowarach *Salmonella* tzw. „plazmidów wirulencji” (ROTGER i CASADESUS 1999). Są to plazmidy heterogenne, zazwyczaj duże (50 – ponad 200 kb), lecz wiele z nich zawiera konserwanty (~8 kb) region, w którym zlokalizowany jest operon *spv*, którego produkty wymagane są do kolonizacji głębiej położonych tkanek. Potwierdza to fakt, że szczepy bezplazmidowe wywołują objawy zapalne jelita, lecz nie są zdolne do infekcji systemowej. Kilka spośród plazmidów wirulencji *Salmonella* (np. pSLT, 94 kb plazmid z *S. typhimurium* LT2 oraz plazmidy pHCM1 i pHCM2 z *S. enterica* CT18) zostało kompletnie zsekwencjonowanych, a ponieważ od niedawna znana jest także kompletna sekwencja nukleotydowa chromosomów szczepów LT2 i CT18 należy spodziewać się znacznego postępu w zrozumieniu molekularnych mechanizmów wirulencji tego patogena, w tym także roli genów plazmidowych w tym zjawisku.

Także większość genów wirulencji odpowiedzialnych za chorobotwórczość *Shigella* spp. głównego czynnika etiologicznego bakteryjnych dysenterii, zlokalizowanych jest na dużych, ~220 kb plazmidach obecnych we

wszystkich chorobotwórczych szczepach *Shigella* oraz enteroinwazyjnych szczepach *E. coli*. W 2001 r. poznano kompletną sekwencję nukleotydową jednego z plazmidów wirulencji *Shigella* (pWR501 z *S. flexneri*, VENKATESAN i współaut. 2001); okazało się, że geny związane z wirulencją stanowią aż 35% jego genomu. Geny te zgrupowane są w funkcjonalne zespoły. Na przykład na ~30 kb fragmencie DNA plazmidowego zlokalizowane są geny *ipa* (ang. invasion plasmid antigens) kodujące białka niezbędne do adhezji (IpaD) i inwazji (Ipa A,B,C), oraz geny *mxi* (10 loci) i *spa* – genetyczne determinanty specyficznego systemu sekrecyjnego tych białek. Na innym fragmencie plazmidu zgrupowane są geny warunkujące międzykomórkowe rozsiewanie się bakterii (*icsA* i *icsB*). Natomiast wiele genów regulacyjnych całego systemu mieści się w chromosomie. Również chromosomową lokalizację mają geny kodujące letalną cytotoksynę produkowaną tylko przez *S. dysenteriae* (tzw. Shiga toxin) odpowiedzialną za wywoływanie najcięższego przejawu shigellozy, tzw. zespołu HUS (ang. hemolytic uremic syndrome), prowadzącego do trwałego uszkodzenia nerek oraz poważnych symptomów neurologicznych. Nieplazmidowa lokalizacja genów kodujących tę toksynę jest dla człowieka „korzystna”, obniża bowiem prawdopodobieństwo przenoszenia się tego niebezpiecznego fenotypu do szczepów innych enteropatogenów.

Wiele zjadliwych, tzw. enteropatogennych (EPEC) szczepów *E. coli*, wywołuje objawy podobne do zakażeń *Shigella* spp.; w nich stwierdzono obecność plazmidów (podobnych do wirulencyjnych plazmidów *Shigella*) odpowiedzialnych za niektóre objawy chorobowe, inne wynikają z „pojawienia się” w chromosomie wysp patogenności.

Kilka lat temu duże zainteresowanie wzbudził izolowany w 1982 r. enterohemokrotoyczny (EHEC) szczep *E. coli* oznaczony symbolem O157:H7. Produkuje on dwie groźne werotoksyny (STX-1 i STX-2), podobne do wspomnianej wyżej toksyny „Shiga toxin”, a zachorować można po spożyciu pokarmu zakażonego bardzo małą dawką bakterii (10–100 komórek), trudną do wykrycia w czasie rutynowej kontroli procesu technologicznego (np. produkcji hamburgerów). Dla analizowanego tematu ważna jest informacja, że szczep ten niesie 93 kb plazmid (pO157) kodujący szereg cech związanych z patogennością swego gospodarza (BURLAND i współaut. 1998).

Przedstawione przykłady nie wyczerpują tematu – moim celem było jedynie zasygnalizowanie roli plazmidów w tak ważnym i bezpośrednio dotykającym człowieka temacie jakim jest genetyczna determinacja procesów patogenyzy. Przykłady innych plazmidowo-kodowanych cech odgrywających rolę w zdolności bakterii do wywoływania procesu chorobowego zamieszczono w Tabeli 1.

INTERAKCJE BAKTERII Z KOMÓRKAMI ROŚLINNYMI

Niewątpliwie najlepszym modelowym układem do zaprezentowania tematu zawartego w tytule rozdziału jest analiza roli dużych (>200 kb) plazmidów Ti oraz Ri w genetycznym uwarunkowaniu procesu powstawania rakowatych narośli (ang. crown gall tumors) lub włosowatości/kędzierzowatości korzeni (ang. hairy roots) w wyniku infekcji rośliny (najczęściej dwuliściennej) przez szczepy *Agrobacterium tumefaciens* lub *A. rhizogenes*. Jest to system bardzo złożony, wymagający współdziałania wielu genów chromosomowych i plazmidowych bakterii, lecz jego efekt biologiczny jest unikatowy – część genomu plazmidowego, fragment określany jako T-DNA, zostaje wprowadzony w procesie specyficznego rodzaju koniugacji, warunkowanego przez zespół plazmidowych genów *vir* do komórki roślinnej, aby następnie wnikać do jej jądra komórkowego i trwale wbudować się do chromosomowego DNA. Konsekwencją tej integracji jest indukcja niekontrolowanych podziałów komórek prowadzących do utworzenia rakowatego guza u nasady łodygi rośliny (Ti plazmid), ale także do syntezy specyficznych substancji (typu opin lub nopalin) stanowiących unikatowe źródło substancji odżywczych dla bakterii niosących plazmid (Ti lub Ri) wyposażony w geny umożliwiające katabolizm tych właśnie związków.

Naszukowany tutaj krótki zarys procesu jest rozbudowany w odrębnym artykule (patrz art. A. ZIEMIENOWICZ w tym zeszycie KOSMOSU), tamże można znaleźć odsyłacze do innych pozycji literatury z tego tematu. Wspomniany artykuł przedstawia także drogi modyfikacji tego naturalnego procesu biologicznego dla celów konstrukcji systemu przydatnego w tworzeniu transgenicznych roślin.

Innym przykładem udziału genów plazmidowych w procesach oddziaływania pomiędzy bakteriami a roślinami jest zależność pomiędzy

zdolnością roślin motylkowych do wiązania azotu cząsteczkowego z powietrza a ich symbiotycznym związkiem z bakteriami z rodziny Rhizobiaceae, które dla uproszczenia określam dalej ogólnym terminem „rizobia” (FREIBERG i współaut. 1997) Plazmidy w rizobiach występują bardzo powszechnie, a niektóre z nich są bardzo duże, osiągając wielkość nawet 1700 kb (=1,7 Mb), czyli większą niż niektóre bakteryjne chromosomy. Nawiasem mówiąc, to w stosunku do tych plazmidów zastosowano pierwotnie termin megaplazmidy, który następnie rozszerzono na inne plazmidy, też bardzo duże lecz nie przekraczające wielkości 1 Mb (np. wymieniany wyżej megaplazmid pMOL30 – 0,24 Mb). Rizobia wykształciły bardzo skomplikowane symbiotyczne związki z korzeniami roślin motylkowych, przejawiające się tworzeniem brodawek korzeniowych, w których następuje proces enzymatycznej redukcji azotu cząsteczkowego. Lista genów „symbiotycznych” zidentyfikowanych w rizobiach liczy ponad 50 pozycji. Wiele spośród genów determinujących proces symbiozy mieści się na tzw. plazmidach symbiotycznych (pSym), inne w chromosomie. W różnych gatunkach dystrybucja tych genów pomiędzy różne replikony w komórce nie jest jednakowa. Główne grupy genów to: zespół genów odpowiedzialnych za tworzenie brodawek (*nod*), ich rozwój (*nodV*), specyficzność wobec gospodarza (*hsn*), tzw. efektywność nodulacji (*nfe*), za syntezę komponentów strukturalnych powierzchni komórki takich jak np. egzoopolisacharydy (*exo*) oraz genów, których produkty związane są bezpośrednio z procesem wiązania azotu: *nif* (gen strukturalny nitrogenazy), *hem* (gen strukturalny leghemoglobiny chroniącej nitrogenazę przed destrukcyjnym działaniem tlenu) i wiele innych. Rizobia zawierają także liczne plazmidy tzw. niesymbiotyczne (MERCADO-BLANCO i TORO 1996), które, chociaż nie niosą genów bezpośrednio zaangażowanych w proces symbiotycznego wiązania azotu odgrywają ważną rolę w adaptacji komórek gospodarza do lokalnych warunków środowiskowych, chociażby dzięki kodowaniu enzymów pozwalających na katabolizm różnych nietypowych związków obecnych w ryzosferze (pRtrW14-2c), jak też np. tolerancję niskiego pH (pRtrANU1173b), podwyższonego stężenia chlorku sodu (pRtrW14-2b) itp., co pozwala przetrwać potencjalnym symbiontom w okresie tzw. „free-living state” (TOP i współaut. 2000).

INNE WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI FENOTYPOWE

W tej części, stosując absolutnie subiektywne kryteria, chcę wskazać niektóre kodowane przez plazmidy fenotypy, które nie zostały zakwalifikowane do wyżej wyróżnionych grup, a według mojej oceny rozszerzają i urozmaicają wachlarz kodowanych plazmidowo cech.

I tak na przykład, poza wyżej wymienionymi typami oporności (oporność na antybiotyki, na substancje toksyczne), obecność plazmidu R46 w *S. typhimurium* lub plazmidu pMK101 w *E. coli* powoduje efekt ochronny (a więc zwiększa oporność) wobec letalnego skutku działania promieniowania UV, przy jednoczesnym zwiększonym poziomie jego (UV) mutagenności. Wydaje się, że obserwowany fenotyp wynika z aktywacji systemu naprawczego typu „error prone” – czyli powodującego błędy podczas naprawy. Podobny efekt w stosunku do *P. aeruginosa* wywołują plazmidy R takie jak: pMG1, R2, R931. Także wiele spośród genów odpowiedzialnych za niezwykłą w świecie żywym oporność na promieniowanie jonizujące bakterii *Deinococcus radiodurans* mieści się na dużym plazmidzie pMP1 (177 kb).

Niektóre „proste” właściwości metaboliczne, u pewnych gatunków bakterii są kodowane przez geny plazmidowe. Jako przykłady mogą posłużyć: fermentacja laktozy przez *Streptococcus cremoris* (pML3601), dekarboksylacja lizyny przez *Proteus morgani* (pGC1070), wykorzystywanie sacharozy przez *S. senftenberg* (CTnscr94), produkcja proteazy przez *Streptococcus lactis* (pLM3001), a także zdolność *Ralstonia eutropha* do utleniania wodoru (pHG1).

Plazmidy kodują takie cechy jak: zdolność do produkcji antybiotyków (plazmid pSCP1 u *Streptomyces coelicolor*), insektocydobójcze białka (pHD2 u *Bacillus thuringiensis*), pigmentację (pPL376 u *Erwinia herbicola*) oraz pęcherzyków gazowych przez halofilnego archeona (pHH1 u *Halobacterium* sp.). Dalsze wyliczanie cech kodowanych przez geny zlokalizowane w genomach plazmidowych wydłużyłoby tę listę czyniąc ją nużącą dla Czytelnika – a przecież nowe jej pozycje pojawiają się nieustannie. Na zakończenie tego przeglądu chciałabym wspomnieć o nowej, opisanej w 2001 r. właściwości bakterii *E. coli* niosących plazmid F. Okazało się, że ten „najstarszy” i niemal doskonale scharakteryzowany plazmid (patrz następny rozdział) poza zdolnością do

koniugacji warunkuje zdolność komórek do tworzenia błon biologicznych (GHIGO 2001),

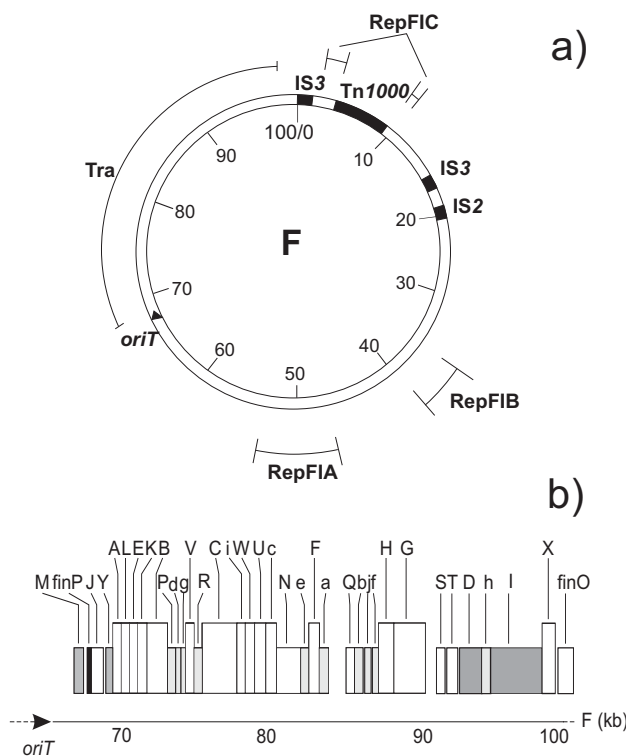
w czym kluczową rolę, niewątpliwie odgrywają pilusy.

ZDOLNOŚĆ BAKTERII DO KONIUGACYJNEGO TRANSFERU DNA

Przenoszenie się plazmidów z komórki do komórki, zarówno w środowisku naturalnym, jak i w laboratorium, czyli tzw. transfer horyzontalny, może następować w wyniku transformacji, transdukcji i koniugacji. Jednak jedynie w przypadku koniugacji kluczowe genetyczne determinanty takiego procesu zlokalizowane są w obrębie DNA plazmidowego, a plazmidy niosące takie determinanty nazywamy plazmidami koniugacyjnymi. Koniugacyjny transfer materiału genetycznego pomiędzy bakteriami to zagadnienie bardzo obszerne; doczekało się ono bardzo wielu opracowań przeglądowych, do których odsyłam zainteresowanych Czytelników (np. CLEWELL 1993, FIRTH i współaut. 1996, ZATYKA i THOMAS 1998, WŁODARCZYK 1998, FROST 2000, ZECHNER i współaut. 2000), a w tym miejscu zwracam jedynie uwagę na niektóre aspekty tego zjawiska.

Prototypem plazmidu koniugacyjnego bakterii Gram-ujemnych jest plazmid F *Escherichia coli*. Struktura genetyczna regionu cząsteczki plazmidu F odpowiedzialnego za koniugacyjny transfer jego DNA (tzw. region *tra* – ang. transfer) została bardzo dokładnie poznana. Region *tra* plazmidu F obejmuje około 33 kb (co stanowi niemal 30% wielkości jego

cząsteczki) i niesie ponad 35 genów. Wśród nich wyróżniamy dużą grupę genów warunkujących syntezę pilusów (tworzenie materiału budulcowego – piliny i jej montowanie w ostateczną formę strukturalną) odgrywających rolę w tworzeniu par koniugacyjnych, geny kodujące białka stabilizujące pary koniugacyjne oraz geny odpowiedzialne za proces koniugacyjnego metabolizmu DNA. W tej ostatniej grupie genów bardzo ważną funkcję pełni gen *traI* kodujący białko o aktywności helikazy (enzymu rozwijającego helisę DNA), lecz także aktywności „nikazy”, wprowadzającej specyficzne nacięcie nici DNA w miejscu *oriT* (ang. origin of transfer), od którego zaczyna się proces rozwijania DNA i przekazywania nici o wolnym końcu 5' do komórki biorcy. W obszarze tym znajdują się także geny regulacyjne całego systemu *tra*. Organizacja genetyczna regionu *tra* plazmidu F przedstawiona jest w sposób uproszczony na Ryc. 7. Plazmidów posiadających system *tra*, homologiczny do opisanego w plazmidzie F jest wśród plazmidów bakterii Gram-ujemnych bardzo wiele, określamy je zbiorczą nazwą plazmidów „F-like”, czyli podobnych do F (np. NR1, ColV, R6, pSC50, R386 oraz kilkadziesiąt innych). Na ogólnie podob-



Ryc. 7. Uproszczona mapa genetyczna całego plazmidu F (a) oraz jego regionu *tra* (b).

Na mapie zaznaczono lokalizację systemów replikacyjnych plazmidu F (RepF), regionu *tra* punktu początkowego transferu (*oriT*) oraz elementów translokacyjnych IS i TN (a), oraz w części (b): 16 genów warunkujących syntezę pilusów płciowych (wysokie szare słupki), geny koniugacyjnego metabolizmu DNA (M-Y-D-I), geny odpowiedzialne za stabilizację par i wykluczanie powierzchniowe (N-S-T-G), oraz geny regulacyjne (J, *finO*, *finP*). Pominięto geny, których funkcja nie jest w pełni jasna.

nej zasadzie (kontakt komórek warunkowany obecnością specyficznych struktur powierzchniowych, pilusów płciowych, syntetyzowanych pod kontrolą genów plazmidowych) działają systemy koniugacyjne determinowane przez plazmidy z grupy IncP. W odróżnieniu od bardzo wyspecjalizowanego systemu koniugacyjnego warunkowanego przez plazmid F, plazmidy koniugacyjne z grupy IncP umożliwiają transfer koniugacyjny w obrębie szerokiego kręgu niespokrewnionych filogenetycznie bakterii (system typu „broad host range”). Czasem plazmid nie niesie pełnego kompletu genów potrzebnych do przeprowadzenia procesu koniugacji, lecz przy „pomocy” innego plazmidu, tzw. mobilizującego, jego DNA może być przekazany do komórki biorcy. O takich plazmidach mówimy, że są one mobilizowalne (Mob⁺); przykładem plazmidu mobilizowalnego jest znany nam już ColE1.

Na zupełnie innej zasadzie funkcjonuje system koniugacyjny Gram-dodatniej bakterii *Enterococcus faecalis*. W tym przypadku plazmid koniugacyjny (np. pAD1) jest elementem składowym mechanizmu „odpowiadającego” na wytwarzane przez szczep biorcy, pod kontrolą genów chromosomowych, feromony płciowe. Warunkuje on syntezę przez komórkę dawcy substancji agregacyjnej (adhezyny), niezbędnej do utworzenia par lub agregatów koniugacyjnych.

Jeszcze inny mechanizm odpowiada za koniugacyjny transfer u promieniowców (*Streptomyces* sp.). Plazmidy koniugacyjne promieniowców mogą być małe (9 kb plazmid pIJ101) lub bardzo duże (liniowy plazmid SCP1 – 350 kb). Wiele spośród tych plazmidów wykazuje właściwość CMA (ang. chromosome mobilizing activity). Genetyczne uwarunkowanie systemu koniugacyjnego plazmidów *Streptomyces* nie jest tak dokładnie poznane jak systemów wspomnianych wyżej.

Zjawisko zależnej od plazmidów koniugacyjnej wymiany materiału genetycznego, które jest możliwe nie tylko między blisko spokrewnionymi szczepami (plazmid F), ale także gatunkami bakterii odległymi filogenetycznie (systemy obecne na plazmidach z grupy IncP), a nawet między różnymi domenami świata żywego (np. bakterie/rośliny), zwłaszcza, że może zachodzić nie tylko w laboratorium, ale i w środowiskach naturalnych, ma zupełnie niewymierny udział w krążeniu i mieszaniu się puli materiału genetycznego całego świata żywego. W tym momencie nie należy zapominać, że plazmidy tzw. koniugacyjne zwykle niosą także geny determinujące opisane powyżej przeróżne inne właściwości bakterii, które w akcie koniugacji także przekazywane są nowym gospodarzom.

PODSUMOWANIE

Problem pochodzenia plazmidów, dróg i mechanizmów ich ewolucji to zagadnienie samo w sobie bardzo ciekawe i złożone i wykracza poza przyjęte ramy tego rozdziału. Pytanie, które nasuwa się jednak niewątpliwie po spojrzeniu na wielość i różnorodność funkcji jakie plazmidy mogą pełnić w komórkach swoich gospodarzy to „dlaczego wobec tylu korzyści płynących z posiadania plazmidów nie są one po prostu częścią chromosomu gospodarza, który wtedy w każdej sytuacji mógłby korzystać z ich obecności?” Najbardziej oczywiste wyjaśnienie tej sytuacji to konieczność utrzymania wielkości chromosomu w „rozsądnych granicach” – mniejszy chromosom replikuje się szybciej niż duży, co w przypadku bakterii może stanowić ważny czynnik dający przewagę selekcyjną poprzez możliwość skrócenia czasu generacji, szybszego namnażania się i zdominowania jakiejś niszy

ekologicznej. Plazmidy replikujące się jako autonomiczne jednostki, niezależne od chromosomu nie wpływają w znaczący sposób na tempo wzrostu populacji bakteryjnej. Oczywiście konieczność replikowania dodatkowego DNA w komórce (nawet tego teoretycznie autonomicznego) jest dla niej pewnym obciążeniem metabolicznym, jednak to obciążenie w mniejszym stopniu odbija się na czasie generacji komórki niż gdyby replikacji ulegała jedna duża struktura. Ponadto, ponieważ cechy fenotypowe zależne od konkretnych plazmidów nie są komórce potrzebne w każdej sytuacji, w populacji nie poddawanej odpowiedniej presji selekcyjnej (czyli gdy nie istnieją warunki wymagające korzystania z tych potencjalnych możliwości) plazmidy może zachować tylko niewielka frakcja bakterii, która w warunkach „zagrożenia” zdominuje bakterie bezplazmidowe mając nad nimi przewagę selekcyjną.

Innym elementem, który należy potraktować jako uzasadniający funkcjonowanie plazmidów w formie jednostek genetycznych odrębnych od chromosomów, to właśnie fakt, że zawarta w nich olbrzymia pula informacji genetycznej może być, poprzez ułatwioną (w porównaniu z pulą informacji zawartej w chromosomie) wymianę horyzontalną z innymi organizmami, traktowana jako uniwersalny, ogólnie dostępny „magazyn genów”.

Na zakończenie pozwolę sobie sformułować myśl, którą kiedyś użyłam jako tytuł swego wykładu na Festiwalu Nauki: „BAKTERIE POTRAFIĄ PRAWIE WSZYSTKO – ALE TYLKO DZIĘKI PLAZMIDOM”

Serdecznie dziękuję Dr Dariuszowi Bartosikowi za przygotowanie ilustracji do obu artykułów mojego autorstwa.

DIVERSITY OF PLASMID ENCODED BACTERIAL PHENOTYPIC TRAITS

S u m m a r y

Preceded by general information on the type of genes existing as obligatory or facultative “modules” in plasmid genomes, the range of bacterial phenotypic functions depending on plasmid located genes is reviewed. The plasmid encoded functions are divided into several commonly distinguished functional groups. Representatives of the individual groups are characterized in more detail except for those dealt with in separate articles of this issue. Special attention is given to the plasmid-encoded mechanisms of bacterial resistance to heavy metal ions (mercury, cadmium, zinc and cobalt) as well as to plasmid-dependent path-

ways of the degradation of natural and man-made toxic substances. The phenomenon of plasmid dependent bacteriocinogeny is presented. Also several examples of the role of plasmids in the relationship of bacteria with eukaryotic organisms are given. The last subject covered concerns the plasmid-encoded functions involved in the pathogenicity of bacteria to humans as well as the role of rhizobial plasmids in symbiotic relations with nitrogen fixing plants.

A section presenting a general description of the role of plasmids in conjugational horizontal gene transfer is also included.

LITERATURA

- BAHRANI-MOUGEOT F. K., DONNENBERG M.S., 2000. *Enteropathogenic bacteria*. [W:] *Encyclopedia of Microbiology*. LEDERBERG J. (red.). Academic Press. Wyd. 2, 187–200.
- BAREFOOT S. F., HARMON K. M., GRINSTED D. A., NETTLES C. G., 1992. *Bacteriocins, Molecular biology*. [W:] *Encyclopedia of Microbiology*. LEDERBERG J. (red.). Academic Press, San Diego, New York, Boston, 417–430.
- BURLAND V., SHAO Y., PERNA N.T., PLUNKETT G., SOFIA H. J., BLATTNER F. R., 1998. *The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Escherichia coli O157:H7*. *Nucleic Acid Res.* 28, 4196–4204.
- CLEWELL D. B., 1993. *Bacterial Conjugation*. Plenum, New York.
- FIRTH N., IPPEN-IHLER K., SKURRAY R. A., 1996. *Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F.C. (red.). ASM Press, Washington, D.C., 3277–3401.
- FREIBERG C., FELLAY R., BAIRICH A., BROUGHTON W. J., ROSENTHAL A., PERRET X., 1997. *Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes*. *Nature* 387, 394–401.
- FROST L. S., 2000. *Conjugation, bacterial*. [W:] *Encyclopedia of Microbiology*. LEDERBERG J. (red.). Academic Press, Wyd. 2, 847–862.
- GHIGO J. M., 2001. *Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development*. *Nature* 412, 442–445.
- HAY A.G., RIPP S., SAYLER G. S., 2000. *Plasmids, catabolic*. [W:] *Encyclopedia of Microbiology*. LEDERBERG J. (red.). Academic Press, Wyd. 3, 730–744.
- JOERGER R. D., HOOVER D. G., BAREFOOT S. F., HARMON K. M., GRINSTED D. A., NETTLES CUTTER C. G., 2000. *Bacteriocins*. [W:] *Encyclopedia of Microbiology*. LEDERBERG J. (red.). Academic Press, Wyd. 1, 383–397.
- LURIA S. E., SUIT J. L., 1987. *Colicins and Col plasmids*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.). ASM Press, Washington, D.C., 1615–1624.
- MAHILLON J., LEONARD C., CHANDLER M., 1999. *IS elements as constituents of bacterial genomes*. *Res. Microbiol.* 150, 678–687.
- MARCUS S. L., BRUMELL J. H., PFEIFER C. G., FINLAY B. B., 2000. *Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages*. *Microbes Infect.* 2, 145–156.
- MERCADO-BLANCO J., TORO N., 1996. *Plasmids in Rhizobia: the role of nonsymbiotic plasmids*. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 9, 535–545.
- MERGEAY M., NIES D., SCHLEGEL H. G., GERITS J., CHARLES P., VAN GIJSEGEN F., 1985. *Alcaligenes eutrophus CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals*. *J. Bacteriol.* 162, 328–334.

- MISRA T. K., 1992. *Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials*. Plasmid 27, 4-16.
- NIES D.H., 1992. *Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes*. Plasmid 27, 17-28.
- PAWLOWSKI J., SHINGLER V., 1994. *Genetics and biochemistry of phenol degradation by Pseudomonas sp. CF600*. Biodegradation 5, 219-236.
- RILEY M. A., GORDON D. M., 1999. *The ecological role of bacteriocins in bacterial competition*. Trends Microbiol. 7, 129-133.
- ROTGER R., CASADESUS J., 1999. *The virulence plasmids of Salmonella*. Int. Microbiol. 3, 177-184.
- SILVER S., 1996. *Bacterial resistance to toxic metal ions-a review*. Gene 179, 1-9.
- SILVER S., MISRA T. K., 1988. *Plasmid-mediated heavy metal resistances*. Annu. Rev. Microbiol. 42, 717-743.
- SILVER S., PHUNG L. T., 1996. *Bacterial heavy metal resistance: new surprises*. Ann. Rev. Microbiol. 50, 753-789.
- TAN H. M., 1999. *Bacterial catabolic transposons*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 1-12.
- THOMAS C. M., 2000. *Paradigms of plasmid organisation*. Mol. Microbiol. 37, 485-491.
- TOP E. M., MÖENNE-LOCOCOZ Y., PEMBROKE T., THOMAS C. M., 2000. *Phenotypic traits conferred by plasmids*. [W:] *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread*. THOMAS C. M. (red.). Harwood Academic Reading, UK, 249-280.
- VENKATESAN M. M., GOLDBERG M. B., ROSE D. J., GROTBECK E. J., BURLAND V., BLATTNER F. F., 2001. *Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Shigella flexneri*. Infect. Immun. 69, 3271-3285.
- WALLACE W. H., SAYLER G. S., 1992. *Catabolic plasmids in the environment*. [W:] *Encyclopedia of Microbiology*. LEDERBERG J. (red.). Academic Press Wyd. 1, 417-430.
- WŁODARCZYK M., 1998. *Wymiana materiału genetycznego i rekombinacja u bakterii*. Kosmos 47, 137-146.
- ZATYKA M., THOMAS C. M., 1998. *Control of genes for conjugative transfer of plasmid and other mobile elements*. FEMS Microbiol. Rev. 21, 291-319.
- ZECHNER E. L., DE LA CRUZ F., EISENBRANDT R., GRAHN A. M., KORAIMANN G., LANKA E., MUTH G., PANSEGRAU W., THOMAS C.M., WILKINS B. M., ZATYKA M., 2000. *Conjugative-DNA transfer processes*. [W:] *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread*. THOMAS C. M. (red.). Harwood Academic Reading, UK, 87-174.