

BORYS WRÓBEL

*Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej,
Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk,
Św. Wojciecha 5, 81-347 Gdynia
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,
Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdańsk
e-mail: wrobel@biotech.univ.gda.pl*

REPLIKACJA PLAZMIDÓW

WSTĘP

Plazmidy to cząsteczki kwasu nukleinowego zdolne do niezależnego dziedziczenia w komórce. Można je traktować jako wewnątrzkomórkowe pasożyty lub symbionty (jako że czasem niosą geny nadające komórkom korzystny, przynajmniej w pewnych warunkach, fenotyp). W przeciwieństwie do plazmidów, inne pasożyty wewnątrzkomórkowe – wirusy – replikują się podczas rozwoju litycznego w sposób w zasadzie niekontrolowany. Genomy wirusowe charakteryzuje też większa „inwazyjność”, dzięki rekrutacji genów umożliwiających nie tylko wydajną replikację, ale też wyjście z komórki gospodarza, ochronę materiału genetycznego poza komórką i wreszcie wnikięcie do innej komórki.

Materiał genetyczny wirusów i plazmidów zdolny jest czasem do integracji do genomu gospodarza. Wówczas plazmidowe czy wirusowe geny są powielane i przekazywane komórkom potomnym łącznie z DNA chromosomalnym. Integracja do genomu gospodarza jest immanentną cechą właściwą transpozonom: elementom genetycznym zdolnym do zmiany swojej lokalizacji w genomie. Można powiedzieć, że transpozony różnią się od plazmidów tym, że nie są zdolne do niezależnej replikacji w komórce – muszą stanowić część innego replikonu, by ulec powieleniu. Ten opis jednak nie do końca odpowiada prawdzie. Otóż niektóre transpozony istotnie fizycznie zmieniają

lokalizację w genomie z miejsca donorowego na akceptorowe. Jednak istnieją też transpozony, których transpozycja jest replikacyjna – tzn. po jej zajściu transpozon obecny jest zarówno w miejscu donorowym, jak i akceptorowym. Istnieją też transpozony niosące sekwencje pozwalające na zajście innego specyficznego rodzaju replikacji, replikacji koniugacyjnej. Takie elementy genetyczne – transpozony koniugacyjne (SALYERS i współaut. 1995) oraz constiny (HOCHHUT i współaut. 2000) – podobnie jak plazmidy koniugacyjne zdolne są do przejścia z jednej komórki do drugiej na drodze koniugacji. Intermediatem w tym procesie jest kolistą zamkniętą cząsteczką transpozonu. Transferowi koniugacyjnemu towarzyszy replikacja, specyficzna o tyle, że potomne cząsteczki DNA znajdują się w dwóch różnych komórkach.

Koniugacja, obok transformacji i transdukcji, jest jednym z procesów parapłciowych, na drodze których może dochodzić do horyzontalnego transferu genów chromosomalnych. Związanie w wyniku rekombinacji genu chromosomalnego z niezależnym elementem genetycznym (plazmidem, wirusem, transpozonom), pozwala na przejście takiego genu z jednej komórki do drugiej. Związanie genu chromosomalnego z plazmidem może też mieć inne konsekwencje: jeśli kopia chromosomalna zostanie utracona, wtedy plazmid może stać się

obligatoryjnym symbiontem, a granica między plazmidem a dodatkowym chromosomem może być arbitralna. Czasem należałoby mówić o chromosomie pierwszorzędowym – tym, który zawiera większość niezbędnych komórcy genów – i o chromosomach drugorzędowych. Istnieją gatunki bakterii, które na takich chromosomach drugorzędowych niosą geny kodujące rRNA czy enzymy podstawowe dla metabolizmu komórki (KOLSTO 1997).

Mechanizmy molekularne replikacji wielu plazmidów wykazują duże podobieństwo do mechanizmów wykorzystywanych przez wirusy. Niewykluczone jest pochodzenie przynajmniej niektórych plazmidów od wirusów na drodze utraty genów warunkujących wysoką inwazyjność, a z drugiej strony – pozyskania genów zapewniających taką regulację replikacji, żeby powielenie plazmidowego DNA nie stało się nadmiernym obciążeniem metabolicznym dla gospodarza. Można sobie wyobrazić też odwrotny kierunek rozwoju – od niezależnie replikującego fragmentu genomu do wysoce inwazyjnego pasożyta. Koegzystencja kilku replikonów (wirusowych, plazmidowych, chromosomalnych) w jednej komórce stwarza możliwość rekrutacji – na drodze rekombinacji – genów replikacyjnych jednych replikonów przez drugie. Można spekulować nawet o rekrutacji pewnych genów replikacyjnych pozochromosomalnych elementów genetycznych do maszynerii replikacyjnej chromosomu (WRÓBEL i WĘGRZYN 2002).

Wysoka liczba kopii cząsteczek o małych rozmiarach może nie stanowić istotnego obciążenia metabolicznego dla komórki. Duże rozmiary niektórych plazmidów są konsekwencją pozyskiwania genów, które mogą w pewnych warunkach dać gospodarzowi korzystny fenotyp, a także genów zapewniających stabilne przekazywanie do komórek potomnych oraz systemów zapewniających eliminację z populacji komórek potomnych pozbawionych plazmidu. Im jednak większy rozmiar plazmidu, tym większa presja selekcyjna do utrzymania niskiej liczby kopii i do jej ścisłej regulacji.

Obecność identycznych cząsteczek kwasów nukleinowych w jednej komórce może

prowadzić do ich rekombinacji i powstania cząsteczek multimerycznych. Mutlimery mogą też być skutkiem samego procesu replikacji. Dla zapewnienia stabilnego dziedziczenia cząsteczek plazmidów konieczne jest zatem pozyskanie przez nie genów pozwalających na rozdzielenie mutlimerów.

Propagacji plazmidu sprzyja pozyskanie genów koniugacyjnych promujących zetknięcie się komórek i kodujących białka uczestniczące w transferze DNA, a przede wszystkim obecność na danej cząsteczce plazmidu specyficznej sekwencji pozwalającej na mobilizację. Jeśli taką sekwencję niesie cząsteczka małego plazmidu, może dojść do jej transferu z wykorzystaniem produktów genów koniugacyjnych innego plazmidu obecnego w tej samej komórce.

Jakie są konsekwencje istnienia dwóch tendencji: do pozyskiwania nowych funkcji i do minimalizowania obciążenia metabolicznego? O ile można sobie pozwolić na jakąś generalizację, większą szansę sukcesu ewolucyjnego mają albo małe cząsteczki (które mogą mieć wysoką liczbę kopii), albo duże cząsteczki o niskiej liczbie kopii. Cząsteczki małe będą niosły głównie geny zapewniających ich regulowaną replikację (liczba kopii nie może być zbyt duża), a przy tym mało genów „dodatkowych”: genów, które można usunąć z plazmidu bez zniszczenia jego zdolności do niezależnego dziedziczenia w komórce. Istnieją wręcz małe plazmidy, które wydają się nie nieść żadnych genów poza replikacyjnymi. Oczywiście, geny „dodatkowe” w naturalnym środowisku mogą być niezbędne dla utrzymania plazmidu w populacji komórek w dłuższej perspektywie, a zatem do jego „przeżycia” w szerszym sensie.

Niektóre plazmidy zdolne są na drodze koniugacji przechodzić między dość odległymi systematycznie gospodarzami i do wykorzystania w replikacji enzymów bardzo daleko spokrewnionych gatunków bakterii. Bywa, że duże plazmidy niosą kilka sekwencji, w których może dojść do rozpoczęcia syntezy cząsteczek potomnych (*origin* replikacji, *ori*). W przypadku niektórych plazmidów o szerokim spektrum gospodarzy różne *origin* mogą być wykorzystywane w komórkach różnych gatunków (DEL SOLAR i współaut. 1996).

PLAZMIDY W KOMÓRACH EUKARIOTYCZNYCH

Możliwość modyfikacji budowy plazmidów z użyciem technik inżynierii genetycznej

oraz modyfikacji genotypu bakterii technikami genetyki molekularnej pozwoliła bardzo

dogłębnie zbadać molekularne mechanizmy replikacji i regulacji liczby kopii wielu plazmidów bakteryjnych. Sporo wiadomo również o mechanizmach replikacji plazmidów DNA występujących u grzybów, szczególnie u drożdży. O wiele mniej wiadomo o plazmidach innego prostego eukariotycznego organizmu modelowego – śluzowca *Dictyostelium discoideum*.

Wiele szczepów grzybów, w tym drożdży, a także wiele gatunków roślin niesie również w komórkach replikony RNA, które przekazywane są komórkom potomnym. Wydaje się, że w wielu przypadkach są to „oswojone” genomy wirusów RNA (ZHANG i BROWN 1993, MORIYAMA i współaut. 1995, RODRIGUEZ-COUSINO i współaut. 1998, GIBBS i współaut. 2000), które utraciły zdolność do przetrwania poza komórką. To samo być może dotyczy wielu cytoplazmatycznych i mitochondrialnych plazmidów DNA grzybów (KEMPKEN i współaut. 1992). Choć może liczba kopii tych „oswojonych” wirusów w komórce nie jest ściśle regulowana, nie stanowią one na tyle wielkiego obciążenia metabolicznego dla gospodarza, by mogły zostać łatwo wyeliminowane, mimo że nie wydają się nieść żadnej funkcji korzystnej dla gospodarza. W przypadku bakterii niska stabilność RNA w komórkach być może uniemożliwia takie „oswojenie” bakteryjnych wirusów RNA.

Pozachromosomalne DNA w komórkach eukariotycznych może też być wynikiem „usamodzielnienia się” fragmentu DNA mitochondrialnego (SINCLAIR i współaut. 1998) czy chromosomalnego. W komórkach wielu gatunków prostych eukariontów stwierdzono występowanie plazmidów niosących geny dla rybo-

malnego RNA. W przypadku śluzowca *D. discoideum* i *Physarum polycephalum*, wszystkie geny rRNA niesione są na wielkich liniowych plazmidach; u *Entamoeba histolytica* wszystkie geny rRNA znajdują się na kolistej cząsteczce DNA (DHAR i współaut. 1996). By podać jeszcze dwa przykłady, ameby z rodzaju *Naegleria* niosą geny rRNA na kilku kolistych cząsteczkach, a u patogennego grzyba *Candida albicans* występują zarówno liniowe, jak i kolisty plazmidy niosące geny rRNA (HUBER i RUSTCHENKO 2001).

Rejony pozwalające na replikację dotąd zbadanych „plazmidów rDNA” zbliżone są w budowie do sekwencji replikacyjnych występujących na chromosomalnym DNA. W przypadku kilku gatunków tworzenie się tych pozachromosomalnych elementów genetycznych zaobserwowano *de novo*. Wydaje się, że w pewnych warunkach środowiskowych czy rozwojowych może być korzystna możliwość zwiększenia liczby genów dla rRNA (SINCLAIR i współaut. 1998) przez zwiększenie liczby kopii niosących je pozachromosomalnych elementów genetycznych. Co interesujące, u drożdży zwiększenie liczby kopii takich „plazmidów rDNA” jest związane ze starzeniem się komórek (SINCLAIR i współaut. 1998, ROTHSTEIN i GANGLOFF 1999). Ogólnie, u grzybów akumulacja pozachromosomalnego kolistego DNA wydaje się przynosić efekty podobne do starzenia się komórek. Trudno jeszcze powiedzieć, czy to zjawisko dotyczy innych eukariontów (w tym ssaków), w komórkach których również obserwują się występowanie takich cząsteczek (SINCLAIR i współaut. 1998).

REPLIKACJA DNA

Do inicjacji replikacji DNA konieczne jest po pierwsze utworzenie grupy 3'OH, która będzie mogła być wykorzystywana przez replikacyjną polimerazę DNA do rozpoczęcia syntezy nici potomnej, a po drugie – dostarczenie aparatu enzymatycznego niezbędnego do zajścia reakcji polimeryzacji do miejsca rozpoczęcia syntezy (*origin* replikacji).

Używane w replikacji polimerazy DNA nie są w stanie rozpocząć syntezy kwasu deoksynukleinowego z użyciem wyłącznie wolnych nukleotydów. Replikacyjne polimerazy DNA są zdolne natomiast dołączać kolejne nukleotydy do wolnej grupy hydroksylowej. Taka grupa

może pochodzić z odcinka RNA (primera, startera) zsyntetyzowanego przez polimerazę RNA na nici matrycowej DNA, czy powstać po przecięciu jednej z nici dwuniciowego DNA. Istnieją również polimerazy DNA, które są w stanie wykorzystać do rozpoczęcia syntezy DNA wolną grupę OH seryny lub treoniny terminalnego białka starterowego. Ten ostatni mechanizm wykorzystywany jest w replikacji liniowych cząsteczek DNA niektórych wirusów i plazmidów oraz w replikacji końców liniowych chromosomów niektórych bakterii (HINNEBUSCH i TILLY 1993, VOLFF i ALTEMBUCHNER 2000).

„Problem końców” jest podstawowy dla replikacji liniowych cząsteczek DNA. Jeśli replikacja odbywa się z użyciem starterów RNA, to nawet gdyby zostały utworzone na samych końcach chromosomów, nie ma możliwości zsyntetyzować kopii DNA tego fragmentu matrycy, do którego jest komplementarny primer. W rezultacie w kolejnych rundach replikacji liniowe chromosomy replikujące się w ten sposób ulegają skróceniu. W komórkach eukariotycznych obecność telomerazy, enzymu przedłużającego końce chromosomów, zapobiega ich skracaniu się przy kolejnych podziałach komórkowych. Innym sposobem rozwiązania „problemu końców” jest użycie cząsteczek DNA o kowalencyjnie zamkniętych końcach lub, jak wspomniano wyżej, białek terminalnych (Ryc. 1).

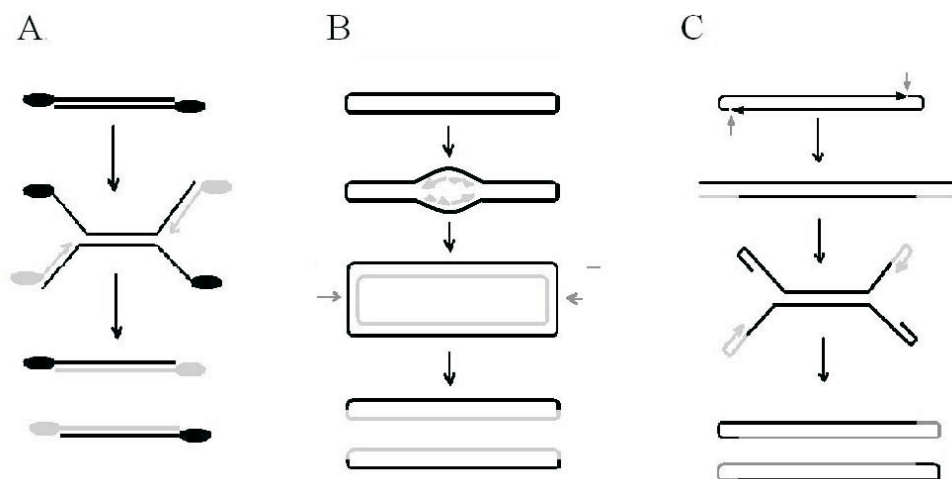
REPLIKACJA LINIOWYCH CZĄSTECZEK

Plazmidy wykorzystujące w replikacji białko terminalne występują zarówno u bakterii, jak i grzybów i roślin (MEINHARDT i współaut. 1990, 1997). Do ich replikacji niezbędna jest obecność kodowanej przez plazmid polimerazy DNA, która może rozpocząć syntezę z użyciem grupy OH seryny lub treoniny białka terminalnego (Ryc. 1A). Istnieją też li-

niowe plazmidy, których replikacja rozpoczyna się nie z końców, ale z wnętrza cząsteczki. Sama inicjacja przebiega jak inicjacja replikacji według modelu theta (patrz poniżej). Konsekwencją rozpoczynania syntezy z wnętrza cząsteczki jest jednak „problemem końców”. Może on zostać rozwiązany dzięki wykorzystaniu białka terminalnego dla replikacji samych zakończeń. Tak się dzieje w przypadku liniowych chromosomów i plazmidów niektórych gatunków bakterii, w tym u wielu z rodzaju *Streptomyces* (HINNEBUSCH i TILLY 1993, VOLFF i ALTEMBUCHNER 2000). Nie jest jednak do końca jasne, czy mimo obecności białek terminalnych, proces replikacji tych plazmidów przebiega z wykorzystaniem białka jako primera do syntezy DNA, czy z użyciem innego mechanizmu (BAO i COHEN 2001).

Innym rozwiązaniem zasadniczego problemu w replikacji cząsteczek liniowych jest kowalencyjne zamknięcie końców (HINNEBUSCH i TILLY 1993, VOLFF i ALTEMBUCHNER 2000). Takie plazmidy występują u grzybów, jeden został też opisany u bakterii *Klebsiella oxytoca*, wiele – u bakterii z rodzaju *Borrelia* (CASJENS 1999). Nota bene, u *Borrelia* zazwyczaj również chromosomy są liniowe.

W istocie liniowa dwuniciowa cząsteczka o zamkniętych końcach jest tożsama z kolistą jednoniciową cząsteczką kwasu nukleinowego



Ryc. 1. Replikacja liniowych plazmidów.

(A) Replikacja z użyciem białka terminalnego (wypełnione elipsy). Związanie białka (szare elipsy) do końców pozwala na rozpoczęcie syntezy nici potomnych (szare). Po zakończeniu replikacji, białka pozostają związane do końców 5' DNA. (B) Replikacja inicjowana ze środka cząsteczki o kowalencyjnie zamkniętych końcach prowadzi do powstania dwuniciowego kolistego intermediatu, będącego dimerem dwuniciowych liniowych cząsteczek. Szare strzałki znaczą miejsce rozdziału tego dimeru na potomne cząsteczki liniowe. (C) Niektóre plazmidy linowe z kowalencyjnie zamkniętymi końcami kodują białko replikacyjne przecinające DNA w pobliżu końców. Powstała w wyniku nacięcia grupa 3' OH wykorzystywana jest do rozpoczęcia replikacji. Najpierw syntetyzowana jest kopia końców, co umożliwia przemianę strukturalną i zmianę cząsteczki matrycowej (w środku). Synteza przebiega aż do dojścia do powstałego w analogiczny sposób dwuniciowego rejonu na drugim końcu.

składająca się z dwóch wzajemnie komplementarnych rejonów. Produktem replikacji, inicjowanej jak replikacja typu theta (patrz poniżej), jest zatem także kolistą cząsteczką, w której obie te uprzednio sparowane ze sobą połówki sparowane są teraz z nicią potomną. Innymi słowy, produkt jest dimerem dwóch liniowych cząsteczek potomnych połączonych ze sobą końcami, po rozdzieleniu z użyciem specjalnego enzymu produktem są dwa liniowe plazmidy o końcach zamkniętych. Nie jest do końca jasne, czy właśnie ten sposób replikacji wykorzystywany jest przez plazmidy i chromosomy *Borrelia* (HINNEBUSCH i TILLY 1993, CASJENS 1999, VOLFF i ALTEMBUCHNER 2000).

Replikacja liniowych cząsteczek z zamkniętymi końcami niektórych plazmidów (oraz wirusów) jest inicjowana poprzez utworzenie wolnej grupy 3' OH w wyniku nacięcia DNA w okolicach końców. Replikacja przebiega najpierw aż do końca nienaciętej nici. Powstały fragment jest zatem komplementarny do poprzedzającego go rejonu na przedłużanej nici. Sparowanie tych dwóch rejonów pozwala rozpocząć syntezę z wykorzystaniem jako matrycy przeciętej uprzednio nici (Ryc. 1C). Taki w zarysach model replikacji zaproponowany został w przypadku liniowego plazmidu o kowalencyjnie zamkniętych końcach występującego u patogenicznego grzyba *Rhizoctonia solani* (MIYASHITA i współaut. 1990).

REPLIKACJA CZĄSTECZEK KOLISTYCH – MECHANIZM THETA

W przypadku kolistych cząsteczek DNA replikacja może przebiegać na jeden z trzech sposobów: według mechanizmu theta, mechanizmu odrzucenia jednej z nici lub wreszcie wg mechanizmu toczącego się koła (Ryc. 2). Replikacja według mechanizmu theta została poznana najdokładniej w przypadku kilku plazmidów bakterii Gram-ujemnych. Rozpoczyna się od lokalnego rozplecenia nici rodzicielskich, syntezy starterowego RNA i inicjacji syntezy DNA z użyciem tego startera.

Enzymatyczna synteza kwasów nukleinowych zawsze przebiega w kierunku 5'→3' (przedłużany jest koniec 3'). Replikacje typu theta na obu niciach katalizuje jeden kompleks enzymatyczny składający się z dwóch podzespołów enzymów (JACHYMCZYK 1995). Oba podzespoły syntetyzują nici potomne w miarę jak kompleks przesuwa się w stosunku do ma-

trycy, sukcesywnie rozplataną. W stosunku do jednej nici matrycowej kierunek ruchu kompleksu odpowiada kierunkowi syntezy. Jedna nić potomna, tzw. prowadząca, powstaje zatem w sposób ciągły. Synteza drugiej musi być przerywana (jest to nić opóźniona), gdyż w stosunku do drugiej nici matrycowej kompleks replikacyjny przesuwa się w kierunku przeciwnym (3'→5'). Prawdopodobnie dzięki zapętleniu tej nici może być możliwy w stosunku do niej lokalny ruch polimerazy w kierunku 3'→5'. Na zapętłonej nici matrycowej co chwilę syntetyzowany jest starterowy RNA i rozpoczynana jest synteza fragmentu DNA. Po ich wykorzystaniu, primery są degradowane, tak więc synteza danego odcinka potomnego DNA kończy się po dotarciu do początku (końca 5') uprzednio powstałego fragmentu nici potomnej. Wtedy następuje translokacja aparatu enzymatycznego względem matrycy i rozpoczęcie syntezy z wykorzystaniem następnego primera.

Replikacja typu theta (DEL SOLAR i współaut. 1998) może rozpocząć się z jednego lub kilku *origin* na tej samej cząsteczce i może być jednokierunkowa – kiedy zostaje utworzony tylko jeden kompleks replikacyjny, a zatem replikacja rozpoczyna się i kończy w tym samym rejonie – albo dwukierunkowa, gdy tworzone są dwa kompleksy i matryca rozplataną jest w dwie przeciwne strony. Gdy cząsteczka jest kolistą, produkty pośrednie replikacji przypominają grecką literę theta – stąd nazwa – ale w podobny sposób, jak wspomniano, może przebiegać replikacja cząsteczek liniowych. Według tego mechanizmu replikują się zatem nie tylko koliste, ale i liniowe chromosomy bakterii, a także, w istocie, chromosomy organizmów wyższych. W ten sposób replikują się też niektóre plazmidy występujące w komórkach eukariotycznych.

Z pewnymi wyjątkami, plazmidy bakteryjne replikujące się z użyciem mechanizmu theta niosą gen kodujący plazmidowe białko replikacyjne, białko Rep. Dużą grupę plazmidów replikujących się według mechanizmu theta stanowią tzw. plazmidy iteronowe. Należą do tej grupy np. plazmid płciowy F bakterii *Escherichia coli*, a także plazmidy pSC101, RK2 i R6K. W pobliżu *origin* replikacji plazmidów z tej grupy znajduje się zawsze kilka (zazwyczaj nieidentycznych) powtórzeń charakterystycznej dla danego plazmidu kilku-kilkunastonukleotydowej sekwencji. Do tych powtórzeń – iteronów – wiąże się kodowane przez plazmid inicjato-

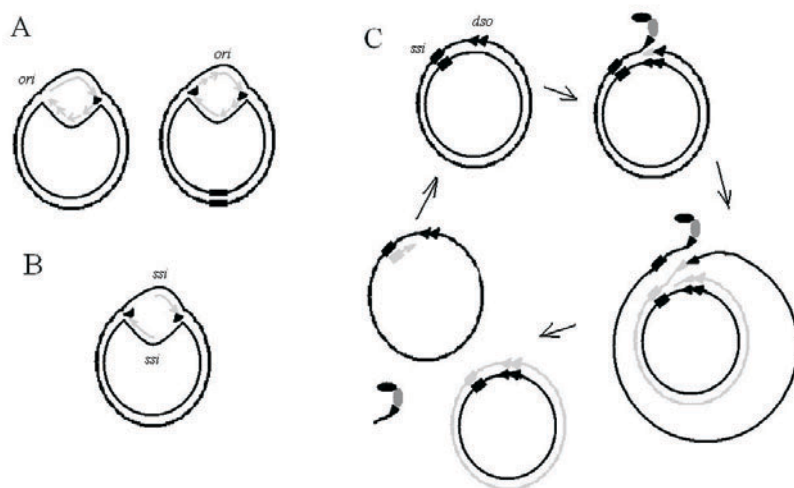
rowe białko replikacyjne. Białka inicjatorowe różnych plazmidów iteronowych wykazują podobieństwo, co może sugerować ich wspólne pochodzenie ewolucyjne. Ogólny mechanizm replikacji plazmidów iteronowych przypomina też, nota bene, mechanizm inicjacji replikacji chromosomu bakteryjnego: w pobliżu bakteryjnego *origin* replikacji znajdują się powtórzenia pozwalające na związanie się białka inicjatorowego chromosomalnej replikacji – białka DnaA.

W okolicy iteronów znajduje się zazwyczaj rejon DNA bogaty w pary A-T, gdzie dochodzi do lokalnego rozplecenia nici DNA. To rozplecenie ułatwione jest również dzięki ujemnemu superskręceniu cząsteczki plazmidu. Utrzymanie ujemnego superskręcenia DNA (niedobór helikalnych opleceń jednej nici DNA wokół drugiej) w komórce wymaga nakładu energii. Rozplecenie DNA w jednym miejscu prowadzi poza tym rejonem do wzrostu liczby opleceń, ułatwionemu dzięki wcześniejszemu wprowadzeniu

ich niedoboru. Zmiana struktury DNA powodowana przez związanie białek replikacyjnych do *origin* dodatkowo zmniejsza energię konieczną do początkowego rozplecenia.

Wiele plazmidów iteronowych w pobliżu iteronów niesie też sekwencje wiążące białko DnaA gospodarza, które może współuczestniczyć z plazmidowym białkiem replikacyjnym w wiązaniu innych białek gospodarza niezbędnych do rozpoczęcia replikacji DNA: helikazy (której funkcją jest dalsze rozplatanie matrycy), primazy i wreszcie polimerazy DNA. Dokładny mechanizm molekularny procesu budowania kompleksu replikacyjnego jest różny w szczegółach dla różnych plazmidów.

Nie wszystkie plazmidy replikujące się według mechanizmu theta są plazmidami iteronowymi. Jeden z dokładniej zbadanych na poziomie molekularnym plazmidów, plazmid R1, w pobliżu *origin* niesie jedynie dwa miejsca wiążące jego białko inicjacyjne (białko RepA). Do tych miejsc, oddalonych od siebie o



Ryc. 2. Replikacja plazmidów kolistych.

(A) Model theta. Nici potomne zostały zaznaczone na szaro; nić opóźniona linią przerywaną. Gdy replikacja jest jednokierunkowa (po lewej), miejsce origin jest też miejscem zakończenia syntezy. W replikacji dwukierunkowej typu theta (po prawej) synteza kończy się w rejonie (pogrubione linie) leżącym naprzeciw *origin*. (B) Replikacja wg modelu odsuwanej nici przypomina replikację typu theta, ale syntetyzowane są jedynie nici prowadzące (szare). (C) Replikacja typu sigma rozpoczyna się od reakcji transestryfikacji w miejscu *dso* (dwa trójkąty). Pozwala to rozpocząć replikację. Najpierw powstaje kopia części *dso*. Po stworzeniu nici potomnej, synteza jest kontynuowana aż powstanie w pełni nowa kopia *dso* (dwa szare trójkąty). Teraz możliwe jest zajście czterech kolejnych reakcji transestryfikacji. Cztery sekwencje DNA biorące udział w tym procesie przedstawione są na rysunku obok siebie, w kolejności. Wolna grupa OH tyrozyny podjednostki białka replikacyjnego symbolizowanej przez czarną elipsę rozcina *dso* będące hybrydą starej i nowej nici. Po uwolnieniu końca 3' starej nici może zajść reakcja będąca odwróceniem reakcji inicjacyjnej, co prowadzi do zamknięcia odsuniętej nici w kolistą cząsteczkę. W trzeciej reakcji transestryfikacji rozcinane jest nowosyntetyzowane miejsce *dso* (dwa szare trójkąty). Tym samym ta sama podjednostka białka, która wzięła udział w inicjacji (szara elipsa) zostaje związana z krótkim odcinkiem DNA zsintetyzowanym na końcu. W wyniku czwartej reakcji uwalniana jest tyrozyna drugiej podjednostki (czarna elipsa) i zostaje zamknięta nić potomna. Na jednoniciowej matrycy powstaje druga nić potomna po inicjacji w miejscu *ssi*.

8 skrętów helisy, wiąże się kompleks dwóch cząsteczek RepA. Powoduje to utworzenie pętli DNA o rozmiarze około 100 bp, utrzymywanej u podstawy przez dimer RepA. Kolejne cząsteczki białka inicjacyjnego wiążą się w rejonie pętli. W zasadzie przypomina to nieco inicjację replikacji plazmidów iteronowych: wiązanie białka inicjacyjnego powoduje powstanie zagięcia DNA, a w pobliżu znajduje się sekwencja wiążąca białko DnaA i sekwencja bogata w pary AT, gdzie dochodzi do lokalnego rozplecenia nici. DnaA być może współuczestniczy z RepA w dostarczeniu do *origin* białek replikacyjnych gospodarza, podobnie jak to się dzieje w przypadku plazmidów iteronowych.

Natomiast zupełnie inny jest mechanizm inicjacji replikacji plazmidów o budowie *origin* zbliżonej do *origin* plazmidu ColE2 *E. coli* (TAKECHI i ITOH 1995). Plazmidy te niosą gen kodujący białko replikacyjne o aktywności polimerazy RNA, które rozpoznaje bardzo krótką, kilkunastonukleotydową, sekwencję, i syntetyzuje w tym miejscu primer. W innej grupie plazmidów, plazmidów podobnych do plazmidu pAM β 1 (są to plazmidy o szerokim zakresie gospodarzy należących do bakterii Gram-dodatnich), do syntezy startera wykorzystywana jest polimeraza RNA gospodarza (transkryptaza), natomiast ich plazmidowe białko inicjacyjne prawdopodobnie nacina starter w odpowiedniej pozycji (DEL SOLAR i współaut. 1998). Wreszcie, plazmidy podobne do plazmidu ColE1 (występujące u enterobakterii) w ogóle nie wymagają do replikacji białek kodowanych przez plazmid: polimeraza RNA gospodarza tworzy, na matrycy plazmidowego DNA, inicjatorowy RNA. Primer powstaje w wyniku nacięcia cząsteczki tego RNA przez jedną z RNaz gospodarza (DEL SOLAR i współaut. 1998).

W przypadku tych trzech grup plazmidów powstanie primera nie oznacza jeszcze zbudowania kompleksu replikacyjnego. Pozwala jedynie na rozpoczęcie syntezy jedynie nici prowadzącej, przez komórkową polimerazę DNA zwaną polimerazą I. W przypadku plazmidu ColE1 synteza z użyciem polimerazy I przebiega tylko na jednej nici, aż odsłonięte zostanie na drugiej nici tzw. miejsce budowania primosomu (ang. primosome assembly site, *pas*; miejsce to też nazywane jest jednoniciowym miejscem inicjacji, ang. single-strand initiation, *ssi*). Jest to sekwencja DNA zdolna do wiązania komórkowego białka PriA. Związanie białka PriA do DNA pozwala na drodze oddziaływań z innymi białkami gospodarza na utworzenie w

miejscu *pas* właściwego kompleksu replikacyjnego. W pobliżu *pas* plazmidy z grupy ColE1 niosą też miejsce wiązania komórkowego białka DnaA, co stwarza alternatywną drogę do wymiany polimeraz i rozpoczęcia syntezy nici opóźnionej. Sekwencje budowania primosomu (*ssi*) znajdują się również w pobliżu *origin* innych plazmidów z grupy ColE2 (gdzie również prawdopodobnie pozwala na rozpoczęcie syntezy nici opóźnionej), a także plazmidu R1 i plazmidów iteronowych, gdzie wydają się być ważne dla powstawania starterów na nici opóźnionej lub wiodącej (NOMURA i współaut. 1991).

MECHANIZM ODSUWANEJ NICI

Nie wszystkie plazmidy iteronowe replikują się według mechanizmu theta. Bardzo ciekawy jest mechanizm replikacji plazmidu o szerokim spektrum gospodarzy, RSF1010 (HONDA i współaut. 1991). Na replikację RSF1010 w komórkach różnych gatunków bakterii być może pozwala to, że plazmid ten sam koduje helikazę (RepA) i primazę (RepB). Do jego replikacji nie jest zatem konieczne zapewnienie silnego oddziaływania między białkiem wiążącym iterony a białkami gospodarza na pierwszych etapach inicjacji replikacji.

Białko inicjatorowe plazmidu RSF1010, RepC, oddziałuje z jednej strony z iteronami, a z drugiej prawdopodobnie z RepA, co pozwala na związanie się tego ostatniego w rejonie lokalnego rozplecenia DNA w miejscu bogatym w pary A-T w pobliżu iteronów. Aktywność helikazy RepA prowadzi do powiększenia jednoniciowych obszarów DNA w rejonie *origin*, a dzięki temu do odsłonięcia rejonów *ssi* na obu niciach. Do tych rejonów wiąże się plazmidowa primaza RepB. Do tego etapu włącznie wykorzystywane są jedynie białka kodowane przez plazmid. Po zsyntetyzowaniu primera polimeraza replikacyjna gospodarza rozpoczyna syntezę, ale jedynie nici prowadzącej. W tym aspekcie replikacja plazmidu RSF1010 przypomina replikację liniowych plazmidów rozpoczynaną z końców: druga nić rodzicielska pozostaje jednoniciowa, aż zreplikuje ją drugi kompleks replikacyjny – ten, który rozpoczął syntezę w drugą stronę. Na marginesie, według podobnego mechanizmu replikowany jest także mitochondrialny i chloroplastowy DNA (JACHYMCZYK 1995).

MECHANIZM TOCZĄCEGO SIĘ KOŁA

Jak wspomniano wyżej, jednym z najbardziej istotnych etapów inicjacji replikacji jest utworzenie wolnej grupy OH, koniecznej do rozpoczęcia syntezy potomnej cząsteczki DNA. W przypadku plazmidów replikujących się wg mechanizmu toczącego się koła wolna grupa OH powstaje w wyniku reakcji transestryfikacji, w której bierze udział kodowane przez plazmid białko Rep (DEL SOLAR i współaut. 1998, KHAN 2000). Reakcja zachodzi w obrębie plazmidowej sekwencji *dso* (ang. double strand origin). Po związaniu Rep w tym rejonie, zostaje utworzone wiązanie fosfodiesterowe między grupą OH jednej z tyrozyn tego białka a określonym nukleotydem wchodzącym w skład sekwencji *dso*. Synteza nici potomnej rozpoczyna się od uwolnionej w ten sposób grupy 3'OH poprzedzającego nukleotydu i jest kontynuowana nieco poza miejsce na komplementarnej do niej nici rodzicielskiej, naprzeciw którego doszło do cięcia inicjatorowego. Powstaje w ten sposób drugi *dso* (Ryc. 2C). W miarę syntezy przecięta nić rodzicielska jest odsuwana. Jej koniec 5' pozostaje przy tym związany z białkiem inicjatorowym.

Jednym z najdokładniej poznanych plazmidów replikujących się według tego mechanizmu jest plazmid pT181, wyizolowany z komórek *Staphylococcus aureus*. Białko inicjatorowe pT181, RepC, buduje dimery. Obie podjednostki mają po jednej tyrozynie, która może ulec estryfikacji. Po zsyntetyzowaniu nici potomnej do jednej tyrozyny dimeru związana jest nić rodzicielska, ale wolna jest katalityczna tyrozyna drugiej podjednostki. Pozwala to na zajście czterech kolejnych reakcji transestryfikacji w procesie terminacji replikacji (Ryc. 2C). Pierwsza reakcja zachodzi na połączeniu starej nici z nową. Ich rozdzielanie polega na połączeniu tyrozyny drugiej podjednostki białka Rep z nowo zsyntetyzowaną nicią. Uwolniony koniec 3' starej nici (ten, od którego rozpoczęła się synteza) może zostać zatem powiązany z końcem 5' tej samej rodzicielskiej cząsteczki. Jest to ten sam koniec, który został związany z RepC podczas inicjacji.

Zatem druga reakcja transestryfikacji polega na uwolnieniu tyrozyny podjednostki RepC, która wzięła udział w inicjacji i zamknięciu w kolistą jednoniciową cząsteczkę uprzednio odsuniętej nici rodzicielskiej. Na tym etapie dimer RepC jest ponownie związany jedną z tyrozyn z DNA, teraz z nicią potomną, a wolna jest

druga tyrozyna. Może zająć zatem trzecia reakcja transestryfikacji z wykorzystaniem nowo zsyntetyzowanego miejsca *dso*. Czwarta prowadzi do zamknięcia nici potomnej. Dimer białka RepC nie może zostać użyty do kolejnej inicjacji, gdyż pozostaje związany do fragmentu DNA pochodzącego z przedłużenia nici potomnej poza miejsce inicjacji. Nota bene, jest to jeden ze składników mechanizmu regulacji replikacji tego plazmidu (RASOOLY i RASOOLY 1997).

Produktami na tym etapie są: dwuniciowa kolistą cząsteczka potomna plazmidu – w skład której wchodzi matrycowa nić rodzicielska – oraz kuliście zamknięta druga nić macierzysta. Na matrycy tej jednoniciowej cząsteczki powstaje druga nić potomna, a tym samym druga dwuniciowa cząsteczka potomna plazmidu. Do zajścia tej fazy replikacji konieczna jest obecność jednoniciowego miejsca inicjacji (ang. single strand initiation *ssi*, inaczej, single strand origin, *sso*). Synteza drugiej nici potomnej nie może zostać rozpoczęta wcześniej, jako że *ssi* zostaje odsłonięte dopiero po odsunięciu prawie całej nici macierzystej.

Do inicjacji z *ssi* potrzebne są wyłącznie białka komórkowe (KHAN 2000). W przypadku niektórych plazmidów replikujących się według mechanizmu toczącego się koła do rejonu *ssi* wiąże się ta sama polimeraza RNA gospodarza, która zaangażowana jest w proces transkrypcji. Zsyntetyzowany przez transkryptazę primer wydłużany jest najpierw przez polimerazę I DNA, a dopiero potem przez polimerazę replikacyjną. Inne plazmidy natomiast wydają się zawierać rejon *ssi*, do których wiążą się białka primosomalne gospodarza, w przypadku zatem tych plazmidów primer może być syntetyzowany nie przez transkryptyczną polimerazę RNA, a primazę (SEEGERS i współaut. 1995). Różna zdolność *ssi* różnych plazmidów do rekrutacji aparatu enzymatycznego różnych gatunków bakterii jest zasadnicza dla zakresu gospodarzy, w których dane plazmidy mogą występować – ma to zatem duże znaczenie dla procesów horyzontalnego transferu genów, w tym przenoszenia się cech oporności na antybiotyki.

Mechanizm toczącego się koła wykorzystywany jest też przez niektóre plazmidy podczas szczególnego procesu replikacji, jakim jest replikacja koniugacyjna (LANKA i WILKINS 1995, LLOSA i współaut. 2002). W procesie koniugacji – procesie parapłciowym bakterii – a także podczas szczególnego rodzaju koniugacji, jaki

zachodzi między komórkami *Agrobacterium* i komórkami roślinnymi – transferowi materiału genetycznego z jednej komórki do drugiej towarzyszy replikacja. Innymi słowy, po zajęciu koniugacji obie komórki niosą materiał, który uległ przekazaniu. Transfer rozpoczyna się, gdy po zetknięciu się osłon dwóch komórek, cząsteczka DNA zostaje nacięta w komórce dawcy. W miarę jej replikacji w tejże komórce według modelu toczącego się koła, odsuwana

nić rodzicielska transportowana jest do komórki biorcy. Po zakończeniu transportu w komórce biorcy na tej jednoniciowej matrycy dochodzi do zbudowania primosomu i zsyntetyzowania nici potomnej. Geny kodujące funkcje istotne dla replikacji koniugacyjnej wykazują homologie do genów replikacyjnych plazmidów replikujących się „wegetatywnie” według modelu toczącego się koła (WATERS i GUINEY 1993).

EWOLUCJA MODUŁÓW REPLIKACYJNO-REGULACYJNYCH

Aby nie stanowić nadmiernego obciążenia metabolicznego dla komórki, tempo tworzenia potomnych cząsteczek plazmidu musi być regulowane. Zatem, chociaż liczba kopii danego plazmidu w komórce może zależeć od warunków środowiskowych, plazmidy niosą systemy kontrolne, które dzięki pętłom sprzężenia zwrotnego pozwalają na utrzymanie w stałych warunkach wzrostowych stałej liczby kopii plazmidu na komórkę. U bakterii z zasady losowy jest wybór cząsteczek, które ulegają replikacji dla podwojenia liczby cząsteczek plazmidowych z każdym podwojeniem liczby komórek. Negatywna kontrola replikacji i losowy dobór cząsteczek do powielenia prowadzi do tego, że przy braku selekcji dwa plazmidy niosące takie same moduły regulacyjno-replikacyjne nie są w stanie stabilnie koegzystować w tej samej komórce bakteryjnej. Po wprowadzeniu dwóch plazmidów o bardzo zbliżonej budowie rejonów (modułów) replikacyjnych dojdzie z czasem do ich segregacji w populacji komórek gospodarza – powstaną dwie linie komórkowe, z których każda będzie niosła inny plazmid. To zjawisko nazywa się niekompatybilnością (nie-

zgodnością) plazmidów, a plazmidy o dużym podobieństwie sekwencji replikacyjnych i regulacyjnych tworzą grupy niekompatybilności. Warto zauważyć, że do niekompatybilności plazmidów może też prowadzić wysokie podobieństwo innych rejonów, np. rejonów rozdziału kopii plazmidowych.

Jednak można sobie wyobrazić, że w sytuacji presji selekcyjnej na utrzymanie obu plazmidów w jednej komórce korzystne ewolucyjnie będą takie zmiany w sekwencjach kodujących białka replikacyjne i regulacyjne oraz w sekwencjach, które te białka wiążą, żeby przy zachowaniu funkcjonalności modułów replikacja obu plazmidów była regulowana niezależnie. Taki mechanizm ewolucyjny może prowadzić do utworzenia grupy plazmidów o podobnej budowie rejonów replikacyjnych i zbliżonym sposobie regulacji replikacji, ale niestanowiących grupy niekompatybilności. Takie grupy podobnych plazmidów tworzą np. plazmidy ColE1-podobne czy ColE2-podobne. Jak wspomniano być może wspólne pochodzenie ewolucyjne mają też plazmidy iteronowe.

REGULACJA LICZBY KOPII PLAZMIDÓW W KOMÓRKACH BAKTERYJNYCH

Żeby zachować określone stężenie w komórce, plazmidy muszą mieć mechanizmy pozwalające im „zmierzyć” własne stężenie. Takim mechanizmem w przypadku poznanych do tej pory plazmidów jest synteza inhibitora, którego stężenie w komórce zależy od stężenia plazmidu. Dotychczas poznano dwa typy regulacji inicjacji replikacji plazmidowego DNA w komórkach prokariotycznych przez inhibitory: mechanizm wykorzystujący antysensowny RNA i ewentualnie białko inhibitorowe (DEL SOLAR i ESPINOSA 2000) oraz mechanizm, w

którym inhibitorami są iterony (CHATTORAJ 2000).

KONTROLA REPLIKACJI PLAZMIDÓW KODUJĄCYCH ANTYSSENSOWNY RNA

Systemy kontroli inicjacji replikacji oparte o antysens (DEL SOLAR i ESPINOSA 2000) są szeroko wykorzystywane przez plazmidy o różnym mechanizmie replikacji, ale wykazujących podobną w zarysach strukturę rejonu regula-

cyjnego: dwa skierowane w przeciwne strony promotory regulujące syntezę, w jedną stronę – RNA, którego synteza jest niezbędna do zajścia replikacji (RNA inicjatorowego) – i w drugą, na matrycy drugiej nici DNA – RNA zwanego kontrtranskrybowanym albo antysensownym RNA (ctRNA, asRNA). Konsekwencją komplementarności matryc jest komplementarność produktów transkrypcji, a tym samym możliwość ich oddziaływania.

Ważne jest przy tym, żeby synteza ctRNA zachodziła stale i na znacznie wyższym poziomie niż synteza RNA inicjatorowego – RNA, z którego powstaje primer albo na matrycy którego powstaje białko replikacyjne. Okres półtrwania w komórce ctRNA musi być też niski, aby jego stężenie w komórce było proporcjonalne do stężenia plazmidu.

W jaki sposób dochodzi do zahamowania replikacji na skutek działania ctRNA? W przypadku plazmidów ColE1-podobnych, oddziaływanie antysensownego RNA z RNA inicjatorowym powoduje taką zmianę struktury tego ostatniego, że nie może już zostać przekształcony w primer. W przypadku innych plazmidów ctRNA oddziałuje z RNA matrycowym dla powstania białka inicjatorowego i hamuje jego translację. Tu należą np. plazmidy z grupy ColE2 oraz plazmidy podobne do R1. Powstawanie białka replikacyjnego może zostać zahamowane na skutek indukcji degradacji tego RNA przez komórkowe RNazy (plazmid R1) czy poprzez zablokowanie miejsc ważnych dla związania rybosomu (plazmidy ColE2). Inny sposób regulacji powstawania inicjatora zachodzi w przypadku replikującego się według mechanizmu toczącego się koła plazmidu pT181. Tu oddziaływanie ctRNA z rejonem na początku RNA matrycowego dla białka replikacyjnego prowadzi do powstania elementu strukturalnego powodującego zakończenie transkrypcji i tym samym powstanie krótszej, нефunkcjonalnej matrycy.

Plazmidy podobne do R1 i ColE1 oprócz ctRNA kodują też białka inhibitorowe. W przypadku plazmidu R1 białko inhibitorowe (CopB) ogranicza transkrypcję genu *rep*. Część plazmidów ColE1-podobnych koduje natomiast białko (nazwane Rom) zwiększające wydajność oddziaływania RNA inhibitorowego i RNA inicjatorowego. W przypadku obu tych plazmidów białka inhibitorowe nie są zasadniczym elementem regulującym, na co wskazują matematyczne modele biorące pod uwagę stężenia obu inhibitorów (RNA i białka) w komórkach niosących te

plazmidy. Zaproponowano natomiast, że ta dodatkowa pętla regulacyjna może odgrywać rolę, gdy liczba kopii plazmidów w komórce z jakichś powodów spada – albo jest niska bezpośrednio po wniknięciu cząsteczki plazmidu do komórki. W takich warunkach ważne jest chwilowe zwiększenie tempa inicjacji replikacji. Być może dodatkowe pętle regulacyjne odgrywają też rolę w dostosowaniu liczby kopii plazmidów do warunków wzrostowych komórek. Tak się dzieje prawdopodobnie w przypadku plazmidów ColE1-podobnych. Stanowią one większe obciążenie metaboliczne dla komórek rosnących w ubogiej pożywce po usunięciu genu kodującego Rom (ATLUNG i współaut. 1999).

Istnieją jednak plazmidy kodujące białkowe regulatory odgrywające zasadniczą rolę w regulacji. Jaka jest różnica między systemami opartymi głównie na ctRNA, a tymi, w których rolę regulacyjną spełnia zarówno RNA, jak i białko? W pierwszym systemie, RNA inicjatorowe jest syntetyzowane stale, na niskim poziomie w porównaniu z syntezą ctRNA. Inaczej jest w regulacji replikacji plazmidów podobnych do plazmidu pMV158, a także w replikacji grupy plazmidów zbliżonych w budowie do pIP501 (DEL SOLAR i ESPINOSA 2000). Tu synteza matrycy dla białka inicjatorowego zachodzi z silnego promotora i jest pod negatywną kontrolą plazmidowego białka regulacyjnego. W sytuacji, gdy poziom tego białka jest niski (np. po wniknięciu plazmidu do komórki na drodze koniugacji), zniesienie negatywnej kontroli syntezy Rep pozwala na szybkie osiągnięcie charakterystycznej dla danego plazmidu liczby kopii. Warto zauważyć, że plazmidy podobne do pMV158 i pIP501 są plazmidami o bardzo szerokim spektrum gospodarzy i są zdolne do mobilizacji, tzn. chociaż same nie kodują białek koniecznych dla koniugacji, w obecności innego plazmidu który je koduje, mogą ulec transferowi (DEL SOLAR i ESPINOSA 2000).

KONTROLA PRZEZ ITERONY

Plazmidy iteronowe niosą zwykle dodatkowe iterony w pobliżu promotora genu *rep*. Pozwala to na autoregulację poziomu białka Rep w komórce na poziomie transkrypcji. W przypadku niektórych plazmidów, te same iterony odgrywają rolę w inicjacji replikacji oraz regulacji transkrypcji genu *rep*. Białko Rep innych plazmidów może występować w dwóch formach: w jednej wiąże iterony „replikacyjne”, a

w drugiej te w pobliżu promotora *rep*. Na przykład Rep plazmidu F i pSC101 tworzy dimery i w tej formie preferencyjnie wiąże iterony w pobliżu własnego genu. Żeby możliwe było związanie się w rejonie *origin* potrzebny jest rozpad dimerów na podjednostki (CHATTORAJ 2000).

Zdolność Rep do dimeryzacji pozwala nie tylko na ograniczenie jego nadmiernej syntezy, ale przede wszystkim, na regulację liczby kopii przez kajdankowanie (ang. handcuffing). W procesie tym regulacyjną rolę spełnia stężenie iteronów w komórce. Wprowadzenie dodatkowych iteronów, czy to na innym plazmidzie, czy to nawet na tym samym, ale poza rejonem replikacyjnym, prowadzi do spadku liczby kopii. Stężenie białka Rep nie jest limitujące w przypadku wielu plazmidów iteronowych, tak więc dodatkowe iterony nie działają hamująco na replikację po prostu wymiareczkowując białko inicjacyjne. Wydaje się raczej, że kiedy wzrasta liczba kopii plazmidów, cząsteczki białka Rep związane do jednego rejonu replikacyjnego oddziałują z cząsteczkami związanymi do *origin* drugiego plazmidu. Prowadzi to do sparowania dwóch cząsteczek plazmidu

(utworzenia struktury kajdanek) i do zahamowania replikacji obu cząsteczek plazmidowych. Zahamowana jest przy tym także transkrypcja genu *rep* na skutek autoregulacji. Dopiero powiększenie objętości komórki pozwala na rozpad kajdanek. Po inicjacji replikacji dochodzi do odwiązania białka Rep od iteronów i do czasowej indukcji genu *rep*. Związanie białka Rep do obu *origin* prowadzi jednak szybko do zahamowania transkrypcji i ponownego utworzenia kajdanek. Innymi słowy, Rep jest pozytywnym regulatorem replikacji jedynie przy stężeniu iteronów niższym niż optymalne dla danego plazmidu.

Nie jest jasne, w jaki sposób kajdankowanie hamuje replikację. Być może utworzenie struktury kajdanek zapobiega utworzeniu w miejscu *origin* kompleksu inicjacyjnego. W przypadku niektórych plazmidów wyższe stężenie komórkowych białek DnaA czy DnaB (helikazy) odwraca efekt kajdankowania, być może zwiększając szanse raczej na powstanie kompleksu inicjacyjnego replikacji niż struktury kajdanek. Zwiększyć szansę utworzenia kompleksu replikacyjnego może też zwiększenie ujemnego superkręcenia plazmidowego DNA.

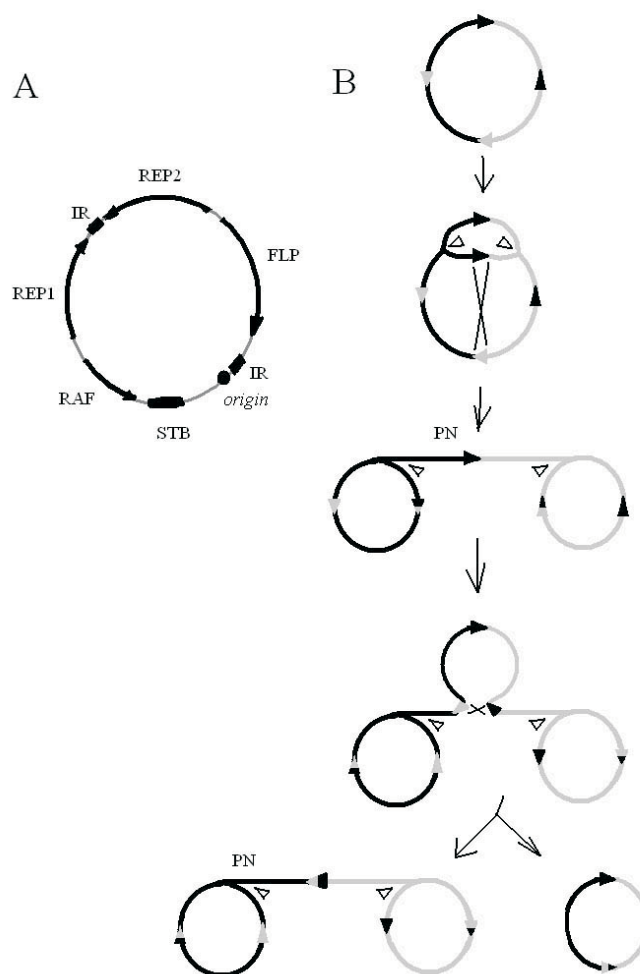
REGULACJA REPLIKACJI PLAZMIDÓW EUKARIOTYCZNYCH

Gdy liczba kopii plazmidu jest niska w komórce – czy to na skutek nierównomiernego rozdziału cząsteczek potomnych plazmidu do komórek potomnych, czy to bezpośrednio po wnikięciu jednej cząsteczki plazmidu do komórki – regulacja replikacji plazmidu niezależnie od regulacji replikacji DNA chromosomalnego pozwala zwiększyć wydajność inicjacji. Ale część plazmidów eukariotycznych wykorzystuje *origin* replikacji o budowie zbliżonej do *origin* chromosomalnych. Na przykład plazmidy drożdżowe, podobne do plazmidu 2 μ niosą sekwencje przypominające *origin* drożdżowe (ang. autonomous replicating sequences, ARS). ARS są aktywne jedynie podczas fazy S cyklu komórkowego, i w ten sposób zapewniają jednokrotną replikację chromosomów. *Origin* replikacji plazmidów podobnych do 2 μ również są aktywne tylko raz podczas cyklu komórkowego (FARRAR i WILLIAMS 1988).

Oprócz *origin* plazmid 2 μ niesie 4 geny kodujące białka (Ryc. 3A). Dwa z nich, REP1 i REP2, wiążą prawdopodobnie otoczkę jądra komórkowego oraz plazmidowe DNA w tzw. rejonie STB, leżącym między trzecim genem,

RAF a *origin*. System REP1-REP2-STB jest niezbędny do prawidłowego przekazywania plazmidu do komórek potomnych, niemniej nie jest to system doskonały. Jako że *origin* replikacji jest aktywne tylko raz w cyklu, nierównomierny rozdział cząsteczek plazmidu prowadzi do stałego obniżania się liczby kopii w części linii komórek potomnych.

Na przywrócenie wysokiej liczby kopii (około 100 na komórkę) pozwala kodowana przez czwarty gen plazmidu 2 μ rekombinaza FLP. Białko to wiąże się z dwoma rejonami obecnymi na plazmidzie, podobnymi w sekwencji. Jedno z tych miejsc znajduje się w pobliżu *origin*, między genami RAF a REP2, drugie zaś w rejonie między genami FLP i REP1 (Ryc. 3A). Po zajęciu inicjacji dwukierunkowej replikacji w rejonie *origin* białko FLP katalizuje reakcję rekombinacji między swoimi miejscami wiązania. Badania sugerują, że katalizowana przez FLP rekombinacja zachodzi w dimerze, powstałym podczas replikacji albo na skutek wcześniejszej rekombinacji między dwoma cząsteczkami plazmidu (Ryc. 3B). Rekombinacja wewnątrzcząsteczkowa w replikującym di-



Ryc. 3. Replikacja plazmidu 2 μ .

(A) Rejony kodujące białka plazmidu zostały zaznaczone czarnymi strzałkami. Zaznaczony został też rejon STB oraz IR – odwróconych powtórzeń (inverted repeats), miejsc rekombinacji, z których jedno leży w pobliżu *origin*. Dzięki takiemu usytuowaniu, rekombinacja z udziałem IR, która pozwoli na amplifikację plazmidu (panel B), może zajść wkrótce po inicjacji replikacji dimeru plazmidowego. Na panelu (B) IR zaznaczono jako grot strzałek, ich kolory odpowiadają kolorom IR macierzystych dla rekombinacji lub replikacji w poprzednich etapach. Miejsca syntezy DNA zaznaczone zostały otwartymi trójkątami. W miarę wydłużania liniowego łącznika w strukturze „pince-nez” (PN) powstają nowe powtórzenia. Skutkiem zachodzenia rekombinacji z ich udziałem jest powstawanie kolejnych cząsteczek potomnych, a więc amplifikacja plazmidu mimo braku inicjacji. Struktura PN za każdym razem może zostać odtworzona, z krótszym łącznikiem. (wg PETESA i WILLIAMSONA 1994)

merze doprowadza do powstania tzw. struktury „pince-nez” (PETES i WILLIAMSON 1994). Dalsza replikacja cząsteczki o tej strukturze prowadzi do przedłużenia obecnego w niej liniowego łącznika (Ryc. 3B), przy czym kolejne reakcje rekombinacji pozwalają na utworzenie potomnych kolistych cząsteczek plazmidu.

FLP znajduje się pod negatywną kontrolą REP1 i REP2, które wiążą plazmidowe DNA również w innych rejonach niż STB i na tej drodze powodują zahamowanie transkrypcji plazmidowych genów (FARRAR i WILLIAMS 1988, VAN DER SAND i współaut. 1995), a także być

może blokują miejsca wiązania białka FLP ograniczając możliwość rekombinacji. Według tego modelu regulacji, dopiero znaczący spadek liczby kopii plazmidu powoduje, że rejon STB zostaje przynajmniej częściowo uwolniony od białek REP1 i REP2, co powoduje aktywację znajdującego się w pobliżu genu RAF. Białko RAF jest pozytywnym regulatorem transkrypcji genu FLP (VAN DER SAND i współaut. 1995). Po zajściu amplifikacji plazmidu, wzrost liczby kopii matrycy powoduje wzrost stężenia REP1 i REP2 w komórce i ponowne zahamowanie transkrypcji plazmidowych genów.

Plazmid 2 μ jest właściwie jedynym plazmidem eukariotycznym, którego regulacja replikacji została dokładniej zbadana. Jego obecność stwierdzono w większości szczepów drożdży piekarskich (FARRAR i WILLIAMS 1988), co świadczy o skuteczności ewolucyjnej tego sposobu replikacji. Warto nadmienić, że obecność 2 μ nie daje tym szczepom żadnej przewagi selekcyjnej, a wręcz przeciwnie – ogranicza wzrost komórek. W komórkach innych gatunków drożdży (BLAISONNEAU i współaut. 1997) również zostały znalezione koliste cząsteczki DNA o podobnej budowie – wszystkie niosą sekwencje ARS, a także dwa rejony o zbliżonej sekwencji, które mogą brać udział w rekombinacji, oraz 3–4 rejony kodujące białka. Zawsze jedno z tych białek wykazuje podobieństwo do rekombinazy FLP plazmidu 2 μ .

Badania przesiewowe doprowadziły do stwierdzenia obecności pozachromosomalnych elementów genetycznych u około 10% przebadanych szczepów drożdży (FUKUHARA 1995). Dużą grupę tych elementów stanowią plazmidy RNA. Otrzymane wyniki sugerują również obecność w wielu szczepach drożdży liniowych plazmidów replikujących się z użyciem białek terminalnych. U drożdży te liniowe plazmidy znajdują się prawdopodobnie w cytoplazmie, chociaż doniesiono też o liniowym mitochondrialnym plazmidzie drożdżowym (BLAISONNEAU i współaut. 1999). Natomiast u grzybów nitkowatych, przeciwnie, prawie wszystkie wykryte do tej pory plazmidy występują w mitochondriach (GRIFFITHS 1995; MEINHARDT i współaut. 1990, 1997), a przy tym obecność tych plazmidów jest powszechna. Liczba kopii tych plazmidów jest w zasadzie stała w stosunku do liczby mitochondriów i z reguły są stabilnie dziedziczone – nie są jednak znane dokładne mechanizmy molekularne, dzięki którym replikacja jest regulowana i zapewniany jest nielosowy rozdział cząsteczek potomnych (GRIFFITHS 1995).

W większości przypadków końce liniowych plazmidów grzybów nitkowatych są związane z białkiem, chociaż u jednego z gatunków wykryto również, jak wspomniano, obecność liniowego plazmidu z kowalencyjnie zamkniętymi końcami (Ryc. 1C). U innych grzybów nitkowatych występują plazmidy koliste (GRIFFITHS 1995). Mechanizm ich replikacji nie jest jasny. Niektóre, być może replikują się według modelu toczonego się koła, obecność czasem genu odwrotnej transkryptazy zaś sugeruje, że podczas replikacji niosących go pla-

zmidów dochodzi najpierw do przepisania informacji genetycznej na RNA, a później, w wyniku odwrotnej transkrypcji, tworzone są potomne cząsteczki DNA. Nie jest wykluczone, że większość plazmidów grzybowych (RNA i DNA, liniowych i kolistych) pochodzi z „oswojonych” wirusów.

Pozostaje pytanie, dlaczego plazmidy są tak często obecne w izolatach grzybów. W warunkach laboratoryjnych, jeśli obserwuje się jakiś związek z ich obecnością fenotyp, raczej wydają się przynosić więcej szkody niż pożytku. Przede wszystkim powodują szybsze starzenie się komórek, chociaż znany jest też plazmid, który wydaje się dawać fenotyp przeciwny – przedłużenia życia (GRIFFITHS 1995). Możliwe, że plazmidy przynoszą niosącym je szczepom korzyść selekcyjną w naturalnym środowisku. Wysłunięto np. hipotezę, że ich obecność jest w jakiś sposób związana z właściwościami patogenicznymi grzybów pasożytniczych (GRIFFITHS 1995).

Jak wykazano, plazmidy u *Neurospora* są przenoszone horyzontalnie (GRIFFITHS i współaut. 1990, COLLINS i SAVILLE 1990). Z drugiej strony, podczas rozmnażania płciowego mogą zostać utracone (ARAGANOZA i współaut. 1994, GRIFFITHS 1995). Być może „oswojone wirusy” obniżają podatność szczepów rosnących w naturalnych warunkach na bardziej wirulentne elementy pozachromosomalne (plazmidy czy wirusy), w mechanizmie podobnym do niekompatybilności plazmidów bakteryjnych. Jest to zgodne z obserwacją, że plazmidy z tej samej rodziny nie występują w tych samych izolatach. Równocześnie, jeśli „oswojony” element okazałby się bardzo niekorzystny, możliwa byłaby jego eliminacja podczas rozwoju płciowego.

Wirusowe pochodzenie mają też być może jądrowe plazmidy występujące u śluzowców z rodzaju *Dictyostelium* (LEITING i współaut. 1990). Liczba kopii małych plazmidów śluzowców dochodzi do 300 na komórkę, większe mają mniejszą liczbę kopii, ale mogą stanowić 2–5% całkowitego DNA w komórkach (FARRAR i WILLIAMS 1988, SHAMMAT i współaut. 1998). Z czterech do tej pory grup plazmidów scharakteryzowanych u tych organizmów (Ddp1, Ddp2, Dpp1 i Dpp3) najlepiej została poznana grupa plazmidów podobnych do Ddp2 (SHAMMAT i współaut. 1998, GONZALES i współaut. 1999). Z jednym poznanym wyjątkiem, niosą one tylko jeden gen, nazywany *rep*, chociaż wydaje się, że jego produkt

odgrywa rolę raczej nie bezpośrednio w replikacji, ale w regulacji transkrypcji i w regulacji liczby kopii (SHAMMAT i współaut. 1998). Również geny niesione przez plazmid Ddp1 nie wydają się odgrywać roli bezpośrednio w

replikacji, część z nich jest istotna jednak do regulacji liczby kopii dla utrzymania się plazmidu w komórce (RIEBEN i współaut. 1998) – plazmidy *Dictyostelium* są bardzo stabilnie dziedziczone.

WYKORZYSTANIE PLAZMIDÓW REPLIKACYJNYCH W TRANSFERZE GENÓW DO ORGANIZMÓW WYŻSZYCH

Wprowadzanie transgenu na samodzielnie replikującej się cząsteczce DNA jest najczęstszym sposobem modyfikacji genetycznej mikroorganizmów. Co prawda, czasem celowo wprowadza się do komórek danego gatunku plazmidy niezdolne do replikacji w tych akurat komórkach. Celem wówczas jest rekombinacja do chromosomu gospodarza. Takie konstrukty nazywane są integracyjnymi. W przypadku bakterii, najczęściej wykorzystywane biotechnologicznie są plazmidy niosące *origin* pochodzące z plazmidów z grupy ColE1, choć czasem wykorzystuje się też plazmidy iteronowe (np. pSC101 czy RK2). Plazmidy oparte na replikonie 2 μ są najszerzej wykorzystywanymi w przemyśle biotechnologicznym wielokopijnymi wektorami drożdży *S. cerevisiae* (VAN DER SAND i współaut. 1995, LUDWIG i BRUSCHI 1991).

Plazmidy wykorzystuje się również do biotechnologicznego i terapeutycznego transferu genów do organizmów wyższych. W przypadku większości zastosowań, plazmidowe DNA niesie wyłącznie sekwencje pozwalające na ich replikację w komórkach bakteryjnych, zaś po wniesieniu do komórek roślinnych i zwierzęcych materiał genetyczny albo ulega integracji do chromosomu gospodarza, albo stopniowej eliminacji. Jedynie w niektórych tkankach zwierzęcych, szczególnie w tkance mięśniowej, plazmidowy DNA pozbawiony zdolności do replikacji może się utrzymywać przez kilka miesięcy (HARTIKKA i współaut. 1996). Nie zawsze zresztą celem terapeutycznego transferu genów jest długotrwałe utrzymywanie wprowadzanego materiału genetycznego w komórkach. Jednym z zastosowań plazmidów produkowanych w bakteriach jako wektorów do organizmów wyższych jest technika szczepionek DNA. Istotna jest tu jedynie czasowa, wysoka ekspresja wprowadzanych genów dla uzyskania odpowiedzi immunologicznej. W innych zastosowaniach, np. w terapii chorób genetycznych, spowodowanych brakiem określonego białka w komórkach, dąży się do utrzymania ekspresji jak najdłużej. Jednym z propo-

nowanych sposobów na jej zapewnienie jest zastosowanie plazmidów, które zdolne by były do replikacji również w docelowych komórkach zwierzęcych.

Pozachromosomalne wektory replikacyjne, według ich proponentów, mają przynajmniej trzy zalety. Po pierwsze, w przeciwieństwie do wektorów integracyjnych (niosących często sekwencje czy geny sprzyjających zajściu rekombinacji), wprowadzenie konstruktyw replikacyjnych niesie mniejsze ryzyko integracji do jakiegoś ważnego rejonu chromosomu. Warto zauważyć też, że integracja do chromosomu może mieć niekorzystne konsekwencje dla regulacji wprowadzanych genów. I wreszcie, możliwość zwiększenia liczby kopii wprowadzanego plazmidu (i jej regulacji) mogłaby pozwolić na osiągnięcie nie tylko stabilnej, ale też wysokiej ekspresji.

Jednymi z pierwszych wektorów stosowanych do wprowadzenia genów do komórek zwierzęcych były wektory niosące sekwencje replikacyjne pochodzące z polyomawirusa SV40 (CRAENENBROECK i współaut. 2000). Sztuczne plazmidy niosące replikon SV40 replikują się jednak w sposób niekontrolowany, co prowadzi do śmierci komórek. Wykorzystuje się je do osiągnięcia wysokiej, czasowej ekspresji wprowadzanych genów w hodowanych komórkach. Genomy poliomawirusów, oprócz genów kodujących białka otoczki wirusowej, kodują też białko niezbędne do replikacji – zwane dużym antygenem T. To wirusowe białko replikacyjne po związaniu się w pobliżu *origin* powoduje rozplecenie nici w rejonie bogatym w pary A-T. Antygen T wiąże się też z białkiem RPA gospodarza, które stabilizuje jednoniciowe odcinki DNA powstające w wyniku aktywności helikazy. W kolejnym etapie inicjacji do wirusowego DNA wiąże się primaza gospodarza. Konieczność oddziaływanie dużego antygeny T z primazą gospodarza jest prawdopodobnie czynnikiem ograniczającym spektrum gospodarzy polyomawirusów.

W przeciwieństwie do plazmidów niosących moduł replikacyjny SV40, plazmidy

niosące sekwencje ludzkiego polyomawirusa BKV wydają się replikować tylko jeden raz podczas cyklu komórkowego. Być może zatem znajdują zastosowanie w otrzymywaniu stabilnie zmodyfikowanych genetycznie linii komórkowych. Podobne zastosowanie zaproponowano dla wektorów niosących sekwencje replikacyjne mysiego wirusa polyoma (CAMENISCH i współaut. 1996). Fakt, że obecność antygeny T w komórkach może ułatwiać ich transformację nowotworową ogranicza jednak zastosowania wektorów opartych na polyomawirusach do celów terapeutycznych.

Historycznie, polyomawirusy były grupowane w rodzinę papowawirusów razem z papillomawirusami, z którymi są prawdopodobnie daleko spokrewnione ewolucyjnie (SHADAL i VILLARREAL 1993, BELNAP i współaut. 1996). Jednym z przedstawicieli papillomawirusów, którego sekwencje replikacyjne są wykorzystywane do otrzymania sztucznych plazmidów zdolnych do replikacji w komórkach zwierzęcych, jest wirus BPV-1 (bydłęcy wirus brodawczaka). W jego replikacji biorą udział wirusowe białka E1 i E2. E1 wykazuje aktywność helikazy podobnie jak duży antygen T polyomawirusów. Wiąże też RPA i primazę gospodarza (CRAENENBROECK i współprac. 2000). Natomiast E2 modyfikuje wiązanie E1 do DNA, być może wspomaga też wiązanie białek replikacyjnych gospodarza. E2 wydaje się też być głównym białkiem regulacyjnym wirusa, a oprócz tego odgrywa rolę w dziedziczeniu plazmidu: przywiązuje genom wirusa do chromatyny gospodarza. Mimo tego, że replikacja plazmidów niosących sekwencje replikacyjne BPV-1 nie jest związana z cyklem komórkowym, liczba kopii takich konstruktów utrzymuje się na w miarę stałym poziomie w mysich i ludzkich liniach komórkowych. Być może te wektory znajdują zastosowanie w terapii genowej.

Innym wirusem, którego sekwencje replikacyjne znajdują być może zastosowanie do konstrukcji terapeutycznych plazmidów jest herpeswirus Epstein-Barra (EBV). Podobnie jak BKV, ten wirus jest powszechny u ludzi – latentna infekcja dotyczy 90% populacji, do zakażenia dochodzi we wczesnym dzieciństwie. Do utrzymania się genomu tego wirusa w komór-

kach oprócz sekwencji *origin* wystarcza obecność genu EBNA1 (CRAENENBROECK i współprac. 2000). Nie jest jasne, czy produkt EBNA1 bierze udział bezpośrednio w inicjacji replikacji. Być może sprowadza do *origin* białka replikacyjne gospodarza, ale możliwe też, że jego główna funkcja leży w wiązaniu genomu wirusowego do chromatyny gospodarza. Niestety, *origin* EBV nie jest aktywne w komórkach gryzoni, co ogranicza jego zastosowanie do terapii genowej; testowanie wektorów na zwierzętach laboratoryjnych jest konieczne w początkowych etapach opracowywania terapeutyku. Mimo to, rejon replikacyjny EBV jest wykorzystywany w badaniach mających na celu stabilny transfer genów do komórek ludzkich (WADE-MARTINS i współaut. 2000). Użycie wektorów opartych na EBV pozwala na wprowadzanie bardzo długich odcinków DNA; technikę tę nazwano wręcz techniką sztucznych episomalnych chromosomów (VOS 1999).

Tak jak płynna jest granica między plazmidami i chromosomami bakteryjnymi, tak od techniki sztucznych episomalnych chromosomów niedaleko do techniki sztucznych chromosomów, w których rejon replikacyjny pochodzi z chromosomu gospodarza. Taka cząsteczka musi nieść też rejon centromerowy (zapewniający stabilne dziedziczenie) oraz telomery (by zapobiec stopniowemu skracaniu się konstruktów podczas kolejnych replikacji). Drożdżowe sztuczne chromosomy zbudowano już w latach 80. (BROWN i współaut. 2000). Niedawno podobne techniki zastosowano do konstrukcji sztucznych mysich i ludzkich chromosomów. Mała stabilność takich konstruktów w ludzkich komórkach sprawia, że ich zastosowanie w celach terapeutycznych stoi jeszcze pod znakiem zapytania. Praktyczne problemy sprawiają szczególnie telomery sztucznych chromosomów (BROWN i współaut. 2000, VOS 1999). Stąd propozycje wykorzystania zakończeń pochodzących z wirusów – między innymi adenowirusa, który używa białka terminalnego (VOS 1999). Takie konstrukty przypominałyby liniowe chromosomy bakteryjne. Naturalnie, wspomniana technika episomalnych, kolistych, sztucznych chromosomów pozwala w jeszcze inny sposób rozwiązać „problem końców”.

PODSUMOWANIE

Plazmidy odgrywają ogromną rolę w ewolucji bakterii. Horyzontalny transfer genów jest

jednym ze źródeł zmienności mikroorganizmów, warto też zauważyć, że samo „przejście”

jakiegoś genu na niezależny replikon pozwala na ewolucję takiego genu niezależnie od ewolucji jego chromosomalnej kopii. To sprawia, że badania plazmidów są bardzo istotne dla badania zmienności mikroorganizmów i mają ogromne znaczenie praktyczne (m.in. kliniczne). Niezależne replikony wykorzystywane są też do modyfikowania mikroorganizmów do celów biotechnologicznych.

Możliwości praktycznych zastosowań były zawsze wielkim stymulantem w badaniach plazmidów. Ale drugim czynnikiem sprzyjającym ich prowadzeniu jest fakt, że w większości przypadków obecność plazmidów nie jest niezbędna dla przeżycia gospodarza. Można sobie zatem pozwolić na daleko idące modyfikacje ich budowy z użyciem technik inżynierii genetycznej. Manipulacje te są ułatwione w przypadku małych cząsteczek plazmidowych – wykorzystując różnice w rozmiarze, można w praktyce takie cząsteczki łatwo oddzielić od chromosomów gospodarza.

Analiza replikacji plazmidów i jej kontroli doprowadziła do przełomowych odkryć dotyczących regulacji ekspresji genów w ogóle (np. z użyciem antysensownego RNA) i do poznania ogólnych mechanizmów rządzących procesem replikacji. Zdolność niektórych plazmidów do replikacji w komórkach odległych systematycznie gatunków doprowadziła do postawienia pytań dotyczących interakcji między białkami symbiontów a białkami gospodarza. Jako że plazmidy mimo tego, że są niezależnymi replikonami wykorzystują enzymy replikacyjne gospodarza, badania replikacji plazmidów pomogły zrozumieć wiele aspektów replikacji DNA chromosomalnego, a także innych posożytów wewnątrzkomórkowych – wirusów. Pozwoliły tym samym na dokładniejsze zrozumienie bodajże najbardziej podstawowego procesu biologicznego, jakim jest replikacja materiału genetycznego.

REPLICATION OF PLASMIDS

S u m m a r y

One of the characteristics that differentiates plasmids from other extrachromosomal genetic elements, transposons and viruses, is the controlled replication that allows stable inheritance in dividing cells. At the same time, the mechanism of replication of some plasmids is very similar to that of some viruses, and indeed some plasmids might have viral origin. In the case of other plasmids, their replication mechanism is similar to that used by the host. On the one hand, therefore, the study of plasmid replication may give hints as to the origin of a particular group of these extrachromosomal elements. On the other, the research on replication of plasmids helped to solve basic questions pertaining to this basic molecular process in general. The first basic problem of any process of DNA replication is that of priming, since none of the replicative polymerases can start DNA synthesis using just free nucleotides. Plasmids use three strategies to solve this problem. Some linear plasmids code for a replication protein which provides an OH group to which the first nucleotide of the copy molecule can be attached by a plasmid-coded DNA polymerase. Another strategy is to bring the host primase to the origin of replication. This enzyme synthesizes a short RNA molecule the 3' OH end of which can be elongated by the DNA polymerase of the host. The mechanism of replication of such plasmids shows many similarities to that of the host chromosome. Some plasmids, it may be added, code for their own primase. Finally, at the origin of replication of other plasmids, for instance those replicating using the rolling-cycle mechanism, one of the parent DNA strands becomes cleaved to provide a free 3'OH group. Research on plasmid repli-

cation provided many answers not only to basic questions on replication in general: it was also very important for understanding the mechanisms of gene regulation. Plasmid replication needs to be controlled so that the metabolic burden on the host is not excessive. There are two known mechanisms used to control the replication of bacterial plasmids. In one, the role of a regulator is played, actually, by the plasmid DNA sequences in the origin region. This is the mechanism of plasmid handcuffing, named after the appearance of two plasmid molecules brought together when such regions from two plasmids interact indirectly, the mechanism by which replication is repressed. As the interaction is reversible, when plasmid concentration in the growing and dividing cell drops, the molecules can separate and replicate. In a different mechanism of replication regulation, the role of the regulator is played by small molecules (RNA, and sometimes also a protein) the concentration of which depends on plasmid copy number and which inhibit the synthesis of another molecule coded for a plasmid (usually a protein, sometimes RNA) that is important for replication initiation. Indeed, it was thanks to the research on regulation of plasmid replication that the mechanism of regulation by small RNA molecules (antisense RNA) has been first described in detail. The reason for such a historical importance of research on plasmid replication is that it is easier to achieve the genetic modification of plasmids than modification of the host genome. Moreover, the effects of a modification of an element which is not necessary for survival of the cell can be observed and interpreted with less difficulty. For the same reasons of easy manipulation, introduc-

tion of artificial plasmids into the cells is the main method of genetic modification. Such molecules may not be replicative in the target host, and thus either are eliminated from the cells with time, or integrate into the host chromosomes. In the case of a majority of biotechnological applications, however, the plasmids used are replicative, and therefore it is important to be

able to control their copy level in the cells. Replicative elements are being also considered for use in therapy. Thus, the research on plasmid replication remains of vital importance.

LITERATURA

- ARAGONOZA M. T., MIN J., HU Z., AKINS R. A., 1994. *Distribution of seven homology groups of mitochondrial plasmids in Neurospora: evidence for wide-spread mobility between species in nature*. *Curr. Genet.* 26, 62-73.
- ATLUNG T., CHRISTENSEN B. B., HANSEN F. G., 1999. *Role of the Rom protein in copy number control of plasmid pBR322 at different growth rates in Escherichia coli K-12*. *Plasmid* 41, 110-119.
- BAO K., COHEN S. N., 2001. *Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in Streptomyces*. *Genes. Dev.* 15, 1518-1527.
- BELNAP D. M., OLSON N. H., CLADEL N. M., NEWCOMB W. W., BROWN J. C., KREIDER J. W., CHRISTENSEN N. D., BAKER T. S., 1996. *Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids*. *J. Mol. Biol.* 259, 249-263.
- BLAISONNEAU J., SOR F., CHERET G., YARROW D., FUKUHARA H., 1997. *A circular plasmid from the yeast Torulaspora delbrueckii*. *Plasmid* 38, 202-209.
- BLAISONNEAU J., NOSEK J., FUKUHARA H., 1999. *Linear DNA plasmid pPK2 of Pichia kluyveri: distinction between cytoplasmic and mitochondrial linear plasmids in yeast*. *Yeast* 15, 781-791.
- BROWN W. R., MEE P. J., SHEN M. H., 2000. *Artificial chromosomes: ideal vectors?* *Trends Biotech.* 18, 218-223.
- CAMENISCH G., GRUBER M., DONOHO G., VAN SLOUN P., WENGER R. H., GASSMANN M., 1996. *A polyoma-based episomal vector efficiently expresses exogenous genes in mouse embryonic stem cells*. *Nucleic Acids Res.* 24, 3707-3713.
- CASJENS S., 1999. *Evolution of the linear DNA replicons of the Borrelia spirochetes*. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 529-534.
- CHATTORAJ, D. K., 2000. *Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical*. *Mol. Microbiol.* 37, 467-476.
- COLLINS R. A., SAVILLE B. J., 1990. *Independent transfer of mitochondrial chromosomes and plasmids during unstable vegetative fusion in Neurospora*. *Nature* 345, 177-179.
- CRAENENBROECK K., VANHOENACKER P., HAEGEMAN G., 2000. *Episomal vectors for gene expression in mammalian cells*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5665-5678.
- DARQUET A. -M., CAMERON B., WILS P., SHERMAN D., CROUZET J., 1997. *A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle*. *Gene Therapy* 4, 1341-1349.
- VAN DER SOLAR G., ESPINOSA M., 2000. *Plasmid copy number control: an ever growing story*. *Mol. Microbiol.* 37, 492-500.
- VAN DER SOLAR G., GIRALDO R., RUIZ-ECHEVARRIA M. J., ESPINOSA M., DIAZ-OREJAS R., 1998. *Replication and control of circular bacterial plasmids*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434-464.
- VAN DER SOLAR G., ALONSO J. C., ESPINOSA M., DIAZ-OREJAS R., 1996. *Broad-host range plasmid replication: an open question*. *Mol. Microbiol.* 21, 661-666.
- DHAR S. K., CHOUDHURY N. R., MITTAL V., BHATTACHARYA A., BHATTACHARYA S., 1996. *Replication initiates at multiple dispersed sites in the ribosomal DNA plasmid of the protozoan parasite Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2314-2324.
- FARRAR, N. A., WILLIAMS K. L., 1988. *Nuclear plasmids in the simple eukaryotes Saccharomyces cerevisiae and Dictyostelium discoideum*. *Trends Genet.* 4, 343-348.
- FUKUHARA H., 1995. *Linear DNA plasmids of yeast*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 1-9.
- GIBBS M. J., KOGA R., MORIYAMA H., PFEIFFER P., FUKUHARA T., 2000. *Phylogenetic analysis of some large double-stranded RNA replicons from plants suggests they evolved from a defective single-stranded RNA virus*. *J. Gen. Virol.* 81, 227-233.
- GONZALES C. M., SPENCER T. D., PENDLEY S. S., WELKER D. L., 1999. *Dgp1 and Dfp1 are closely related plasmids in the Dictyostelium Ddp2 plasmid family*. *Plasmid* 41, 89-96.
- GRIFFITHS A. J., KRAUS S. R., BARON R., COURT D. A., MYERS C. J., BERTRAND H., 1990. *Heterokaryotic transmission of senescence plasmid DNA in Neurospora*. *Curr. Genet.* 21, 479-484.
- GRIFFITHS A. J., 1995. *Natural plasmids of filamentous fungi*. *Microbiol. Rev.* 59, 673-685.
- HARTIKKA J., SAWDEY M., CORNEFERT-JENSEN F., MARGALITH M., BARNHART K., NOLASCO M., VAHLSING H. L., MEEK J., MARQUET M., HOBART P., NORMAN J., MANTHORPE M., 1996. *An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle*. *Hum. Gene Ther.* 7, 1205-1217.
- HINNEBUSCH J., TILLY K., 1993. *Linear plasmids and chromosomes in bacteria*. *Mol. Microbiology* 10, 917-922.
- HOCHHUT B., MARRERO J., WALDOR M. K., 2000. *Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in Vibrio cholerae O139*. *J. Bacteriol.* 182, 2043-2047.
- HONDA Y., SAKAI H., HIASA H., TANAKA K., KOMANO T., BAGDASARIAN M., 1991. *Functional division and reconstruction of a plasmid replication origin: molecular dissection of the oriV of the broad-host*

- st-range plasmid RSF1010*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 179–183.
- HUBER D. H., RUSTCHENKO E., 2001. *Large circular and linear rDNA plasmids in Candida albicans*. Yeast 18, 261–271.
- JACHYMCZYK W., 1995. *Replikacja DNA*. [W:] *Genetyka molekulanra*. WĘGLEŃSKI P. (red.) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 59–105.
- KEMPEN F., HERMANS J., OSIEWACZ H. D., 1992. *Evolution of linear plasmids*. J. Mol. Evol. 35, 502–513.
- KHAN S. A., 2000. *Plasmid rolling-circle replication: recent developments*. Mol. Microbiol. 37, 477–484.
- KOLSTO A.-B., 1997. *Dynamic bacterial genome organization*. Mol. Microbiol. 24, 241–248.
- LANKA E., WILKINS B. M., 1995. *DNA processing reactions in bacterial conjugation*. Annu. Rev. Biochem. 64, 141–169.
- LEITING B., LINDNER I. J., NOEGEL A. A., 1990. *The extra-chromosomal replication of Dictyostelium discoideum plasmid Dpd2 requires a cis-acting element and a plasmid-encoded trans-acting factor*. Mol. Cell. Biol. 7, 3727–3736.
- LLOSA M., GOMIS-RÜTH F. X., COLL M., CRUZ F. (2002) *Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport*. Mol. Microbiol. 45, 1–8.
- LUDWIG D. L., BRUSCHI C. V., 1991. *The 2m plasmid as a nonselectable, stable, high copy number yeast vector*. Plasmid 25, 81–95.
- MEINHARDT F., KEMPEN F., KAMPER J., ESSER K., 1990. *Linear plasmids among eukaryotes: fundamentals and application*. Curr. Genet. 17, 89–95.
- MEINHARDT F., SCHAFFRATH R., LARSEN M., 1997. *Microbial linear plasmids*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 329–336.
- MIYASHITA S., HIROCHIKA H., IKEDA J. E., HASHIBA T., 1990. *Linear plasmid DNAs of the plant pathogenic fungus Rhizoctonia solani with unique terminal structures*. Mol. Gen. Genet. 220, 165–171.
- MORIYAMA H., NITTA T., FUKUHARA T., 1995. *Double-stranded RNA in rice: a novel RNA replicon in plants*. Mol. Gen. Genet. 248, 364–369.
- NOMURA N., MASAI H., INUZUKA M., MIYAZAKI C., OHTSUBO E., ITOH T., SASAMOTO S., MATSUI M., ISHIZAKI R., ARAI K., 1991. *Identification of eleven single-strand initiation sequences (ssi) for priming of DNA replication in the F, R6K, R100 and ColE2 plasmids*. Gene 108, 15–22.
- PETES T. D., WILLIAMSON D. H., 1994. *A novel structural form of the 2 micron plasmid of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 10, 1341–1345.
- RASOOLY, A. R., RASOOLY, R. S., 1997. *How rolling circle plasmids control their copy number*. Trends Microbiol. 5, 440–446.
- RIEBEN W. K., GONZALES C. M., GONZALES S. T., PILKINGTON K. J., KIYOSAWA H., HUGHES J.E., WELKER D. L., 1998. *Dictyostelium discoideum nuclear plasmid Ddp5 is a chimera related to the Ddp1 and Ddp2 plasmid families*. Genetics 148, 1117–1125.
- RODIRUGEZ-COUSINO N., SOLORZANO A., FUJIMURA T., ESTEBAN R., 1998. *Yeast positive-stranded virus-like RNA replicons, 20S and 23S RNA terminal nucleotide sequences and 3' end secondary structures resemble those of RNA coliphages*. J. Biol. Chem. 273, 20363–20371.
- ROTHSTEIN R., GANGLOFF S., 1999. *The shuffling of a mortal coil*. Nat. Genetics 22, 4–6.
- SALYERS A. A., SHOEMAKER N.B., STEVENS A M., LI L.-Y., 1995. *Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements*. Microbiol. Rev. 59, 579–590.
- VAN DER SAND S. T. , GREENHALF W., GARDNER D. C., OLIVER S. G., 1995. *The maintenance of self-replicating plasmids in Saccharomyces cerevisiae: mathematical modelling, computer simulations and experimental tests*. Yeast 11, 641–658.
- SHADAN F. F., VILLARREAL L. P., 1993. *Coevolution of persistently infecting small DNA viruses and their hosts linked to host-interactive regulatory domains*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4117–4121.
- SEEGERS J. F., ZHAO A. C., MEIJER W. J., KHAN S. A., VENEMA G., BRON S., 1995. *Structural and functional analysis of the single-strand origin of replication from the lactococcal plasmid pWV01*. Mol. Gen. Genet. 249, 43–50.
- SHAMMAT I. M., GONZALES C. M., WELKER D. L., 1998. *Dictyostelium discoideum nuclear plasmid Dpd6 is a new member of the Dpd2 family*. Curr. Genet. 33, 77–82.
- SINCLAIR D., MILLS K., GUARENTE L., 1998. *Aging in Saccharomyces cerevisiae*. Annu. Rev. Microbiol. 52, 533–560.
- TAKECHI S., ITOH T., 1995. *Initiation of unidirectional ColE2 DNA replication by a unique priming mechanism*. Nucl. Acids Res. 23, 4196–41201.
- VOLFF J. -N., ALTEMBUCHNER J., 2000. *A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution*. FEMS Microbiol. Lett. 186, 143–150.
- VOS J. M., 1999 *Therapeutic mammalian artificial episomal chromosomes*. Curr. Opin. Mol. Ther. 1, 204–215.
- WADE-MARTINS R., WHITE R. E., KIMURA H., COOK P. R., JAMES M.R., 2000. *Stable correction of a genetic deficiency in human cells by an episome carrying a 115 kb genomic transgene*. Nat. Biotechnol. 18, 1311–1314.
- WATERS V. L., GUINEY D. G., 1993. *Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication*. Mol. Microbiol. 9, 1123–1130.
- WRÓBEL B., WĘGRZYN G., 2002. *Evolution of lambdoid replication modules*. Virus Genes, 24, 163–171.
- ZHANG M., BROWN G. G., 1993. *Structure of the maize mitochondrial RNAb and its relationship with other autonomously replicating RNA species*. J. Mol. Biol. 230, 757–765.