

IGOR KONIECZNY

*Zespół Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG/AMG
Uniwersytet Gdański
Kładki 24, 80-822 Gdańsk
e-mail: igor@biotech.univ.gda.pl*

PLAZMIDY O SZEROKIM ZAKRESIE GOSPODARZY

WSTĘP

Plazmidy są pozachromosomalnymi elementami genetycznymi powszechnie występującymi w różnych gatunkach bakterii. Podstawowymi warunkami zapewniającymi stabilne utrzymywanie się plazmidu w komórce bakteryjnej są: zdolność replikacji DNA, kontrola tego procesu oraz w wielu przypadkach systemy zapewniające równomierną segregację plazmidów w trakcie podziału komórkowego. Większość plazmidów posiada zdolność do koniugacji (transferu plazmidowego DNA pomiędzy komórkami bakteryjnymi), co przyczynia

się do rozprzestrzeniania różnorodnych cech istotnych dla metabolizmu bakterii. Między innymi plazmidy zapewniają: oporność na antybiotyki, oporność na metale ciężkie, produkcję toksyn oraz degradację szerokiej gamy związków toksycznych. Ze względu na łatwość izolacji, prostotę manipulacji genetycznych i stosunkowo łatwą analizę w warunkach laboratoryjnych *in vitro*, systemy plazmidowe stały się modelowymi w badaniach procesu replikacji DNA.

PLAZMIDY O SZEROKIM ZAKRESIE GOSPODARZY

Większość plazmidów posiada kolistą, superzwiniętą strukturę, natomiast liniową formę posiadają plazmidy wyizolowane z niektórych gatunków bakterii z rodzaju *Streptomyces* sp. czy *Borrelia* sp. Uważa się, że większość plazmidów należy do grupy określanej jako plazmidy o wąskim zakresie gospodarza (ang. narrow-host-range) i jest zdolna do replikacji DNA oraz transferu tylko w jednym, określonym gatunku bakterii. W odróżnieniu od tej grupy, plazmidy określane jako plazmidy o szerokim zakresie gospodarzy (ang. broad-host-range)

posiadają zdolność do replikacji i stabilnego utrzymywania się w wielu, często nie spokrewnionych gatunkach bakterii. DNA plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy może również być przekazywane na drodze koniugacji z komórki jednego gatunku bakterii do komórki innego gatunku bakterii, stając się tym samym czynnikiem horyzontalnego transferu genów (THOMAS i HELINSKI 1989, THOMAS 1996). Wykazano, że zdolność koniugacji nie jest ograniczona jedynie do transferu pomiędzy komórkami bakteryjnymi, ale również dotyczy transferu

DNA z bakterii do komórek eukariotycznych (HEINEMANN i SPRAGUE 1989). Kilka dobrze genetycznie scharakteryzowanych plazmidów z grupy niezgodności IncP1 (RK2), IncQ (RSF1010), IncW (pSa) i IncN (pCU1) utrzymuje się stabilnie w różnych gatunkach bakterii (DEL SOLAR i współaut. 1993, 1996, 1998;

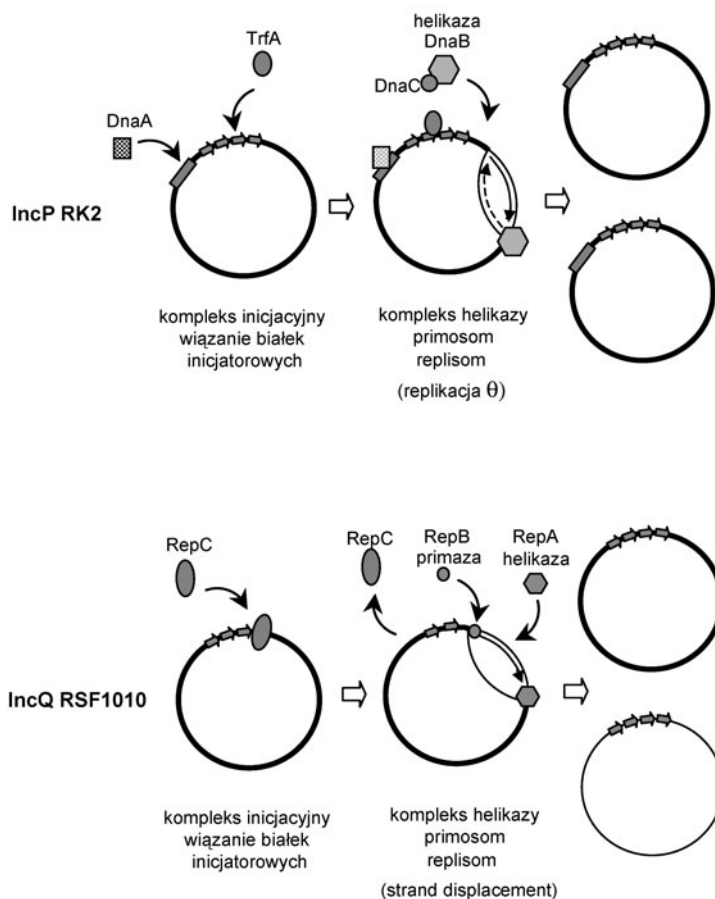
HELINSKI i współaut. 1996). Wykazano również, że niektóre z naturalnie występujących plazmidów izolowanych w środowisku morskim są w stanie utrzymywać się w wielu nie spokrewnionych ze sobą gatunkach bakterii (SOBECKY i współaut. 1998)

STRUKTURA ORIGIN I MECHANIZM REPLIKACJI DNA

Do tej pory badania replikacji plazmidowego DNA ograniczone były głównie do grupy plazmidów o wąskim zakresie gospodarzy i bakterii *Escherichia coli* jako gospodarza dla tych plazmidów. Mimo dużej różnorodności replikonów plazmidowych opisano dwa podstawowe schematy inicjacji replikacji kolistego plazmidowego DNA. Pierwszy zakłada regulację inicjacji replikacji poprzez antysensowną cząsteczkę RNA, która poprzez hybrydyzację reguluje częstość inicjacji (DEL SOLAR i współaut. 1998, HELINSKI i współaut. 1996). Przykłady tego typu inicjacji replikacji to plazmidy z grupy ColEI oraz plazmidy RC (ang. rolling circle) takie jak pT181, pUB110 czy pMV158, których replikacja zachodzi według modelu σ (toczącego się koła). Drugi mechanizm inicjacji replikacji plazmidowego DNA dotyczy plazmidów kodujących własne białka inicjatorowe (Rep), które wiążą się do specyficznych powtórzonych sekwencji (iteronów) w obrębie miejsca startu replikacji plazmidowego DNA (ang. *origin*, *ori*), a ich replikacja zachodzi według modelu θ . Do intensywnie badanych plazmidów tej grupy należą między innymi P1, F, R6K, pSC101 i RK2. Zaproponowano dwie strategie inicjacji replikacji plazmidów o szerokim zakresie gospodarza: (i) inicjacja replikacji niezależna od białek replikacyjnych gospodarza oraz (ii) inicjacja replikacji, podczas której dochodzi do współdziałania replikacyjnych czynników plazmidowych z komórkowym aparatem replikacyjnym (DEL SOLAR i współaut. 1996).

Charakterystyczną cechą większości miejsc inicjacji replikacji replikonów (autonomicznych jednostek replikacyjnych takich jak cząsteczki plazmidów, chromosomy, DNA wirusów czy bakteriofagów) jest występowanie struktur bogatych w reszty tyminy i adeniny (rejon A+T). W miejscach tych dochodzi do destabilizacji dwuniciowej struktury DNA, co rozpoczyna proces replikacji i jest warunkiem związania helikazy, która rozwija dwuniciową

matrycę DNA umożliwiając w ten sposób utworzenie i propagację kompleksu replikacyjnego. *Origin* może również posiadać rejon bogaty w reszty guaniny i cytozyny (rejon G+C). Innym charakterystycznym elementem origin replikacji są wielokrotnie powtórzone sekwencje-iterony. Szeroka grupa plazmidów posiada te sekwencje, które są miejscami wiązania, kodowanego przez plazmid, białka inicjującego proces replikacji DNA (Rep). Wykazano, że iterony występują w origin replikacji plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy należących między innymi do grup IncQ oraz IncP (Ryc. 1). Ilość sekwencji powtórzonych może wpływać na stabilność DNA plazmidu w określonych gatunkach bakterii (SCHMIDHAUSER i współaut. 1983). Oprócz miejsc wiązania plazmidowego białka Rep origin może zawierać jedną bądź kilka sekwencji specyficznych dla wiązania bakteryjnego białka DnaA (sekwencje DnaA-box). Białko *E. coli* DnaA jest czynnikiem inicjującym replikację DNA chromosomalnego, jakkolwiek wykazano, że może tworzyć kompleksy w origin różnych plazmidów. Geny kodujące białko DnaA znaleziono w większości bakterii i wykazują one znaczny stopień podobieństwa (KAGUNI 1997, MESSER i współaut. 2001). Wykazano, że w przypadku plazmidów IncP sekwencje DnaA-box warunkują możliwość replikacji plazmidów w niektórych gatunkach bakterii, podczas gdy w innych gatunkach bakterii nie są absolutnie niezbędne w procesie inicjacji replikacji DNA plazmidu (DORAN i współaut. 1999a,b). W odróżnieniu od plazmidów IncP, origin replikacji plazmidów IncQ (RSF1010) nie zawiera sekwencji DnaA-box. Inicjacja replikacji DNA tych plazmidów nie wymaga udziału białek bakteryjnych, w tym bakteryjnego białka DnaA, i zachodzi jedynie przy udziale plazmidowych białek replikacyjnych według mechanizmu typu oddzielania nici (ang. strand displacement) (SCHERZINGER i współaut. 1991, 1997). Plazmid RSF1010 oprócz iteronów w re-



Ryc. 1. Model inicjacji replikacji DNA plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy posiadających wielokrotnie powtórzone sekwencje – iterony.

Model przedstawia mechanizmy inicjacji replikacji plazmidów należących do grupy IncP oraz IncQ. Podczas inicjacji replikacji plazmidów IncP dochodzi do wiązania inicjatorowego białka plazmidowego z wielokrotnie powtórzonymi iteronami. Dochodzi do destabilizacji (otwarcia) dwuniciowej struktury DNA. Wiązanie i aktywność bakteryjnej helikazy w rozwijaniu helisy DNA wymaga udziału białek bakteryjnych DnaA i DnaC. Bakteryjna primaza syntetyzuje startery do replikacji DNA która zachodzi jednokierunkowo na obydwu niciach (synteza nici wiodącej i opóźnionej). W wyniku jednej rundy replikacji powstają dwie dwuniciowe cząsteczki plazmidowego DNA. Inicjacja replikacji plazmidów IncQ nie wymaga udziału białek bakteryjnych. Wiązanie plazmidowego białka inicjatorowego RepC destabilizuje strukturę DNA co pozwala na wiązanie plazmidowych białek helikazy RepA oraz primazy RepB w jednym z dwóch miejsc inicjacji replikacji. Helikaza oddziela jedną z macierzystych nici DNA (ang. strand displacement) co pozwala na ciągłą syntezę DNA z wykorzystaniem bakteryjnych polimeraz DNA. W wyniku tego procesu powstaje jedna dwuniciowa oraz jedna jednociowa cząstka DNA, która następnie służy jako matryca do syntezy nici komplementarnej.

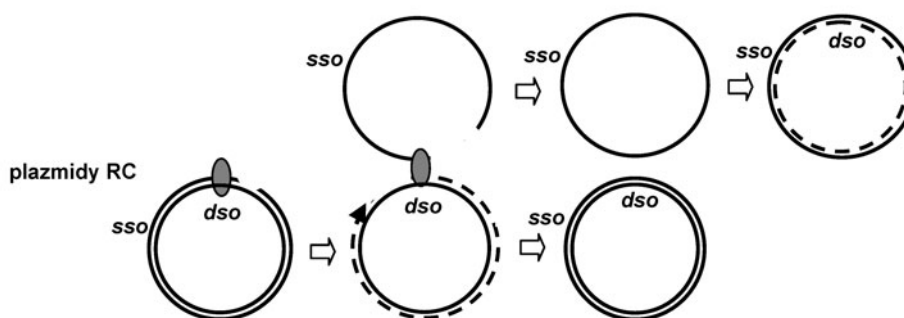
W modelu inicjacji replikacji, zawiera dwie palindromowe sekwencje *ssiA* oraz *ssiB*, z których niezależnie może zachodzić synteza DNA. Kodowane przez plazmid białko RepC wiążąc się do sekwencji iteronów otwiera strukturę origin (powoduje miejscową destabilizację dwuniciowej helisy DNA), co pozwala na związanie plazmidowej helikazy RepA i w konsekwencji rozwinięcie helisy DNA, oddzielenie nici stanowiącej matrycę dla syntezy. Synteza DNA rozpoczyna się w sposób losowy w jednych cząsteczkach plazmidowego DNA w miejscu

ssiA, a w innych w *ssiB* i powoduje powstanie specyficznej struktury typu D-loop. W wyniku tego procesu powstaje jedna dwuniciowa oraz jedna jednociowa cząstka plazmidowego DNA, która została oddzielona od matrycy. Należy podkreślić, że w inicjacji replikacji RSF1010 uczestniczą jedynie białka kodowane przez plazmid. Przypuszcza się, że kodowanie przez plazmid własnych białek replikacyjnych i niezależność inicjacji replikacji DNA RSF1010 od czynników bakteryjnych jest jednym z istotnych elementów nadających plazmidom z gru-

py IncQ możliwość replikacji i utrzymywania się w wielu gatunkach bakterii.

DNA plazmidów należących do grupy RC (ang. rolling circle) może zachodzić zarówno w bakteriach Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, zawiera dwa miejsca inicjacji (*dso* – ang. double-strand-origin oraz *sso* – ang. single strand origin) (KHAN 2000). Inicjacja replikacji tych plazmidów rozpoczyna się od wiązania plazmidowego białka Rep w dwuniciowym origin *dso* (Ryc. 2). Wiązanie to generuje struk-

ter sp., *Rhizobium* sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Azospirillum* sp., *Thiobacillus* sp., *Xanthomonas* sp. (PANSEGRAU i LANKA 1996, THOMAS i HELINSKI 1989). Pierwotnie został zidentyfikowany jako czynnik nadający oporność na antybiotyki patogennej bakterii *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowanej z ran pooperacyjnych pacjentów jednego z brytyjskich szpitali (LOWBURY i współaut. 1969). Zidentyfikowano go również jako pozachromosomalny element bakterii patogennych roślin.



Ryc. 2. Model replikacji DNA plazmidów RC.

DNA plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy należących do grupy RC (ang. rolling circle) zawierają dwa rejonu inicjacji replikacji. Inicjacja replikacji DNA rozpoczyna się poprzez wiązanie białka inicjatorowego w rejonie *dso* (ang. double strand origin), nacięcie jednej z nici DNA i syntezę nici potomnej według modelu toczącego się koła. W wyniku tej syntezy powstaje jedna dwuniciowa cząsteczka plazmidu oraz jedna jednoniciowa, której replikacja zachodzi przy udziale polimeraz RNA i DNA z rejonu *sso* (ang. single strand origin).

ture główki od szpilki (ang. hairpin) a następnie nacięcie *dso* przez białko Rep. Kolejnym etapem jest wiązanie helikazy i synteza nici wiodącej (z wykorzystaniem 3'OH wolnego końca powstałego na skutek nukleolitycznej aktywności Rep), w wyniku której powstaje jednoniciowa cząsteczka DNA. Ten intermediat replikacyjny zawierający *sso* jest substratem dla syntezy nici opóźnionej z udziałem bakteryjnej polimerazy RNA (synteza starterów) i holoenzymu DNA polimerazy III. Ostatnio zaproponowano, że specyficzne przejście z syntezy jednoniciowego intermediatu na syntezę plazmidowej cząsteczki dwuniciowej może być istotnym elementem nadającym plazmidom RC możliwość replikacji w wielu gatunkach bakterii (KHAN 2000).

Do grupy plazmidów IncP należy plazmid RK2 (identyczny z plazmidem RP4), który jest dużym kolistym plazmidem (60kbp) występującym w szeregu bakteriach z rodziny *Enterobacteriace*, *Agrobacterium* sp., *Azotobacter* sp., *Bordetella* sp., *Vibrio* sp., *Methophilus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acidobacter* sp., *Caulobacter* sp., *Neisseria* sp., *Legionella* sp., *Acetobac-*

RK2 jest więc nie tylko atrakcyjny jako modelowy system w badaniach podstawowych, ale również badania nad RK2 mogą doprowadzić do uzyskania wyników o walorach aplikacyjnych. Ostatnie lata przynoszą coraz więcej informacji dotyczących molekularnych mechanizmów czyniących plazmid RK2 zdolnym do utrzymywania się i propagacji w różnych gatunkach bakterii. W przypadku plazmidu RK2 jedynie dwa czynniki kodowane w DNA plazmidowym uczestniczą w inicjacji replikacji jego DNA. Są to: rejon inicjacji replikacji (*oriV*) oraz białko inicjatorowe TrfA (FIGURSKI i HELINSKI 1979, THOMAS i współaut. 1980). Białko inicjatorowe TrfA syntetyzowane jest w dwóch formach: o długości 44kDa (TrfA-44) oraz 33kDa (TrfA-33). Krótka forma białka (TrfA-33) jest wystarczająca do inicjacji replikacji RK2 w *E. coli* i szeregu innych bakterii. Inicjacja replikacji RK2 w *P. aeruginosa* wymaga dłuższej formy TrfA-44 (DURLAND i HELINSKI 1987). W obrębie minimalnej sekwencji origin RK2 znajduje się pięć miejsc wiązania białka TrfA: cztery miejsca wiązania bakteryjnego białka DnaA oraz rejon bogaty w pary A+T i re-

jon bogaty w pary G+C (KONIECZNY i współaut. 1997). Minimalna sekwencja origin RK2 jest wystarczająca do inicjacji replikacji w *E. coli* oraz innych bakteriach Gram-ujemnych. Pozostałe białka niezbędne w procesie replikacji to białka bakteryjne (PINKEY i współaut. 1988, KITTELL i HELINSKI 1991). Udało się zrekonstruować *in vitro*, z wykorzystaniem oczyszczonych enzymów, reakcję replikacji RK2 (KONIECZNY i HELINSKI 1997a). Proces ten wymaga matrycy DNA zawierającej *oriV*, oczyszczonego białka inicjatorowego TrfA oraz białek *E. coli*: DnaA, helikazy DnaB, białka DnaC, primazy DnaG, gyrazy, SSB – białka wiążącego pojedynczą nić DNA i holoenzymu polimerazy DNA III. Podczas inicjacji replikacji RK2 dochodzi do wiązania białka inicjatorowego TrfA do iteronów (PERRI i współaut. 1991). Powstaje kompleks inicjacyjny. Podobnie jak inne plazmidowe białka inicjatorowe, TrfA występuje w postaci dimeru, jednak do DNA wiąże się jako monomer. Wykazano, że białko opiekuńcze *E. coli* ClpX aktywuje TrfA podczas inicjacji replikacji (KONIECZNY i HELINSKI 1997b). Aktywacja ta polega na monomeryzacji dimerycznej formy białka TrfA. Podobne wyniki otrzymano dla białka inicjatorowego plazmidu P1 (RepA), które jest aktywowane przez białka opiekuńcze DnaK, DnaJ, GrpE oraz ClpP (KONIECZNY i ŻYLICZ 1999). Ostatnio stwierdzono, że inne białko ClpB (należące do rodziny Hsp100) wraz z białkami opiekuńczymi DnaK, DnaJ i GrpE tworzy alternatywny system aktywujący TrfA (KONIECZNY i LIBEREK 2002). Wydaje się, że proces aktywacji nie jest ograniczony jedynie do bakterii *E. coli* i aktywacja TrfA w innych gatunkach bakterii zachodzi z udziałem homologicznych lub/i analogicznych systemów białek opiekuńczych.

Białko TrfA wiążąc się z sekwencjami iteronów powoduje destabilizację podwójnej helisy DNA w obrębie rejonu bogatego w pary A+T (KONIECZNY i współaut. 1997). W odróżnieniu od inicjacji replikacji w *oriC*, białko DnaA *E. coli* nie jest czynnikiem odpowiedzialnym za powstanie kompleksu otwartego RK2, a jedynie stabilizuje tę strukturę. Nasze badania wykazały, że również białka homologiczne DnaA wyizolowane z bakterii *Pseudomonas sp.* stabilizują strukturę kompleksu otwartego *oriV*. W odróżnieniu, białka DnaA *Bacillus subtilis* i *Streptomyces lividans* nie stabilizują tej struktury (CASPI i współaut. 2000). Przypuszcza się, że może to być jeden z czynników uniemożliwiających inicjację replikacji DNA RK2 w bak-

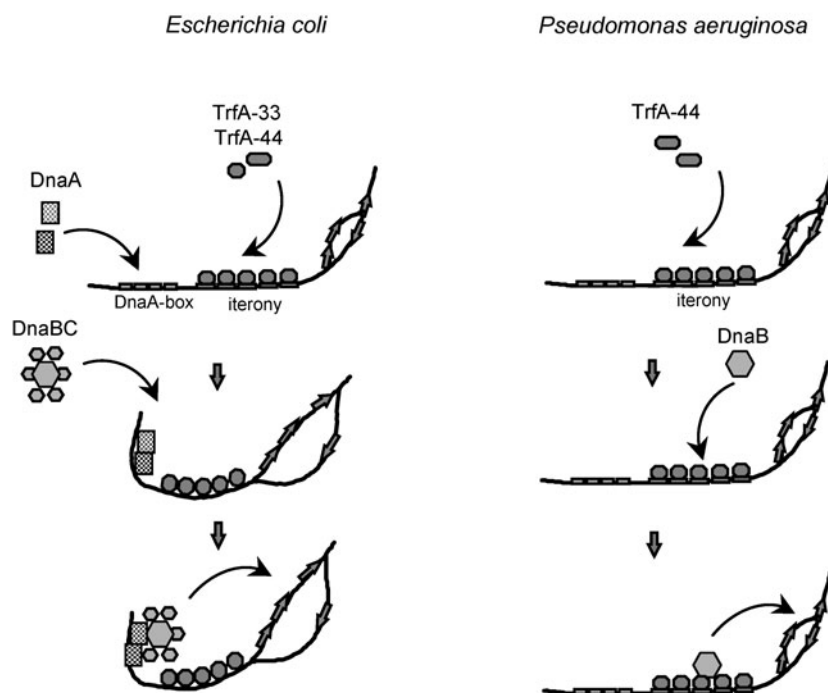
teriach Gram dodatnich. Otwarcie struktury origin jest warunkiem związania helikazy, która po utworzeniu kompleksu z jedną z nici DNA rozwija dwuniciową helisę DNA.

Mechanizm wiązania helikazy i aktywacji kompleksu helikazy niesie wiele pytań i to bez względu na badany system. Praktycznie dla żadnego modelu badawczego, prokariotycznego czy eukariotycznego, nie poznano w pełni mechanizmu tworzenia kompleksu preprimosomu – wiązania helikazy do DNA (BAKER i BELL 1998, EGELMAN 1998). Nie wiadomo w jaki sposób najczęściej pierścieniowe, heksameryczne struktury helikaz replikacyjnych wiążą się z DNA. Obecnie za najbardziej prawdopodobne uważa się otwarcie struktury pierścienia i ponowne jej zamknięcie z jednoniciowym DNA znajdującym się w środku heksameru. W ostatnich latach udało się uzyskać pierwsze opisy struktury niektórych helikaz replikacyjnych (PATEL i PICHA 2000). Co ciekawe, do tej pory znajomość budowy krystalicznej nie spowodowała przełomu w rozumieniu biochemicznego mechanizmu rozwijania podwójnej helisy DNA. W badaniach replikacji chromosomu *E. coli* oraz plazmidowych systemów specyficznych dla tej bakterii, opisano szereg istotnych oddziaływań białek replikacyjnych z helikazą DnaB *E. coli*. Wykazano, że helikaza *E. coli* tworzy kompleks z białkiem inicjatorowym DnaA (MARSZAŁEK i KAGUNI 1994). Oddziaływanie to jest istotne dla powstania kompleksu preprimosomu i w konsekwencji pozwala na wiązanie helikazy z jednoniciowym DNA w rejonie A+T w obrębie kompleksu otwartego *oriC*. Również białka inicjatorowe plazmidów, pSC101 i R6K, tworzą kompleksy z helikazą (RATNAKAR i współaut. 1996, LU i współaut. 1998, DATTA i współaut. 1999). Oddziaływania te są niezbędne w inicjacji replikacji DNA tych plazmidów, jednak rola bakteryjnego białka DnaA na tym etapie inicjacji replikacji pozostaje nie wyjaśniona. Sugeruje się, że oddziaływanie białek DnaA-DnaB nie jest krytyczne dla replikacji plazmidowego DNA pSC101 i R6K w *E. coli*.

Wykazano ponadto, że w odróżnieniu od plazmidów pSC101 i R6K, w przypadku RK2 inicjacja replikacji DNA tego plazmidu w komórkach bakterii *E. coli* jest zależna od oddziaływania DnaA-DnaB (KONIECZNY i HELINSKI 1997a). Etapem pośrednim jest kompleks helikazy DnaB, zawierający również białka DnaA i DnaC, obserwowany w rejonie sekwencji DnaA-box (PACEK i współaut. 2001). Helikaza DnaB

przy udziale TrfA ulega translokacji do rejonu otwartego A+T. Interesujące okazały się badania z wykorzystaniem helikaz wyizolowanych z bakterii *P. putida* i *P. aeruginosa*. W odróżnieniu od helikazy *E. coli* białka te wiążą się w *oriV* i są aktywne w rozwijaniu matrycy RK2 bez udziału dodatkowego czynnika ATP-azy DnaC (CASPI i współaut. 2001). Do tej pory uważano, że udział białek posiadających aktywność ATP-azy podczas wiązania replikacyjnych helikaz do DNA jest uniwersalny i zachowany w toku ewo-

są zgodne z obserwacjami *in vivo*, w których mutanty delecyjne rejonu DnaA-box *oriV* wykazywały aktywność replikacyjną w *P. aeruginosa*, ale nie w *E. coli* (DORAN i współaut. 1999b), a replikacja RK2 w *P. aeruginosa* wymaga udziału dłuższej formy TrfA i, w odróżnieniu od replikacji w *E. coli* nie jest inicjowana przez krótką formę TrfA. Plazmid RK2, w zależności od gatunku bakterii, wykorzystuje odmienne mechanizmy inicjacji replikacji. Wydaje się więc, że zdolność inicjacji replikacji DNA RK2



Ryc. 3. Mechanizm inicjacji replikacji plazmidu RK2 w bakteriach *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Plazmid wykorzystuje odmienne, gatunkowo specyficzne mechanizmy wiązania bakteryjnej helikazy. Podczas inicjacji replikacji RK2 w *E. coli* niezbędne jest oddziaływanie helikazy DnaB z białkiem DnaA. Utworzenie kompleksu helikazy w origin plazmidu wymaga też udziału białka DnaC. Podczas inicjacji replikacji RK2 w *P. aeruginosa* wiązanie helikazy jest DnaA i DnaC niezależne. Helikaza tworzy kompleks z dłuższą formą plazmidowego białka TrfA związanego w rejonie iteronów.

lucji. Co więcej, badania nasze wykazały, że w odróżnieniu od helikazy *E. coli*, helikazy *Pseudomonas* sp. tworzą kompleks z dłuższą formą białka TrfA związaną z iteronami, a utworzenie takiego kompleksu oraz aktywność helikazy nie wymaga udziału białka DnaA (Ryc. 3). Wyniki te

w różnych gatunkach bakterii wynika z uniwersalności struktur origin tego plazmidu i wykorzystywaniu różnych typów gatunkowo-specyficznych oddziaływań pomiędzy dwoma formami plazmidowego białka TrfA a bakteryjnymi białkami replikacyjnymi.

SYSTEMY ZAPEWNIAJĄCE RÓWNOMIERNY ROZDZIAŁ CZĄSTEK PLAZMIDOWYCH ORAZ PLAZMIDOWE SYSTEMY PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI

Inicjacja replikacji i synteza DNA nie są jedynymi procesami zapewniającymi plazmi-

dom o szerokim zakresie gospodarzy bytowania w różnych gatunkach bakterii. Jak już

wspominałem, jednym z procesów niezbędnych do rozprzestrzeniania się plazmidowych cząsteczek DNA w populacji bakterii tego samego gatunku lub pomiędzy różnymi gatunkami bakterii jest proces koniugacji. Procesami niezbędnymi do stabilnej propagacji plazmidowego DNA jest rozdział multimerycznych cząsteczek plazmidowych (ang. multimer resolution systems, *mrs*), rozdział plazmidów do komórek potomnych (ang. partitioning) oraz plazmidowe systemy programowanej śmierci komórki (post segregational killing, *psk*). Obecnie procesy związane z dynamiką plazmidowego DNA są intensywnie analizowane przez wiele grup badawczych (HIRAGA 2000, GORDON i WRIGHT 2000, MOLLER-JENSEN i współaut. 2000). Okazało się, że cząsteczki pla-

zmidowe zgrupowane są w ściśle określonych miejscach w komórce bakteryjnej i ulegają partycji w trakcie cyklu komórkowego. Molekularny mechanizm tych procesów nie jest w pełni poznany. Systemy *psk*, oparte zazwyczaj na kodowanych przez plazmid toksynie i antytoksynie, eliminują z populacji komórki bakteryjne, które utraciły plazmid zapewniając w ten sposób stabilne utrzymywanie plazmidu w populacji bakterii. Należy podkreślić, że systemy partitioning, *mrs* czy *psk* kodowane przez plazmidy o szerokim zakresie gospodarza, takie jak RK2, doskonale spełniają swoją rolę w wielu gatunkach bakterii. Molekularny mechanizm czy mechanizmy tych procesów nie zostały w pełni poznane.

PODSUMOWANIE

Plazmidy o szerokim zakresie gospodarzy ze względu na swą specyfikę stanowią bardzo interesujący obiekt badawczy. Dopiero teraz zaczynamy poznawać kompleksowość tych pozachromosomalnych elementów genetycznych. Co więcej, możliwe staje się wykorzystanie zdobywanej wiedzy w biotechnologii. Plazmidy o szerokim zakresie gospodarzy są wykorzystywane jako wektory pomiędzy komórkami prokariotycznymi i eukariotycznymi. Stosuje się je również jako systemy ekspresji genów, w których precyzyjnie regulowana jest ilość kopii matrycy DNA. Poznanie mechani-

zmów replikacji DNA w wielu gatunkach bakterii, oprócz aspektu czysto poznawczego, może pozwolić na konstrukcję nowych leków antybakteryjnych. Interesująca wydaje się możliwość wykorzystania plazmidowych systemów programowanej śmierci komórki w walce z patogennymi drobnoustrojami. Plazmidy o szerokim zakresie gospodarzy mogą stworzyć możliwości konstruowania uniwersalnych, specyficznych względem wielu gatunków bakterii, środków farmakologicznych nowej generacji.

BROAD-HOST RANGE PLASMIDS

S u m m a r y

Broad-host-range plasmids are model systems for exploring replication mechanisms in diverse bacterial species and can extend our understanding of universal rules guiding DNA metabolism. Despite extensive work carried out in many laboratories, several critical aspects of the plasmid DNA metabolism still remain unclear. This review is restricted to specification of the molecular events during theta replication initiation of the iteron containing broad-host-range

plasmids. The discussion concerns RC (rolling circle) broad-host-range plasmids replicating *via* sigma mode and the well biochemically characterized initiation of replication at *Escherichia coli* *oriC*. Recent extensive biochemical investigations of replication initiation of narrow-host-range plasmids: pSC101, R1, P1, F, R6K, and broad-host-range plasmids RSF1010 and RK2 allow us to discuss the specificity of DNA replication initiation at broad-host-range origins.

LITERATURA

- BAKER T. A., BELL S. P., 1998. *Polymerases and the replisome: Machines within machines*. Cell 92, 295–305.
- CASPI R., HELINSKI D. R., PACEK M., KONIECZNY I., 2000. *Interactions of DnaA proteins from distantly related bacteria with the replication origin of the broad*

- ad host range plasmid RK2*. J. Biol. Chem. 275, 18454–18461.
- CASPI R., PACEK M., CONSIGLIERI G., HELINSKI D. R., TOUKDARIAN A., KONIECZNY I., 2001. *A broad host range replicone with different requirements for replication initiation in three bacterial species*. EMBO J. 20, 3262–3271.

- DATTA H. J., KHATRI G. S., BASTIA D., 1999. *Mechanism of recruitment of DnaB helicase to the replication origin of the plasmid pSC101*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 73–78.
- DEL SOLAR G., MOSCOSO M., ESPINOSA M., 1993. *Rolling circle-replicating plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria: A wall falls*. Mol. Microbiol. 8, 789–796.
- DEL SOLAR G., ALONSO J. C., ESPINOSA M., DIAZ-OREJAS R., 1996. *Broad-host-range plasmid replication: An open question*. Mol. Microbiol. 21, 661–666.
- DEL SOLAR G., GIRALDO R., RUIZ-ECHEVARRIA M. J., ESPINOSA M., DIAZ-OREJAS R., 1998. *Replication and control of circular bacterial plasmids*. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 62, 434–464.
- DORAN K. S., HELINSKI D. R., KONIECZNY I., 1999a. *A critical DnaA box directs the cooperative binding of the Escherichia coli DnaA protein to the plasmid RK2 replication origin*. J. Biol. Chem. 274, 17918–17923.
- DORAN K. S., HELINSKI D. R., KONIECZNY I., 1999b. *Host-dependent requirement for specific DnaA boxes for plasmid RK2 replication*. Mol. Microbiol. 33, 490–498.
- DURLAND R. H., HELINSKI D. R., 1987. *The sequence encoding the 43-kilodalton trfA protein is required for efficient replication or maintenance of minimal RK2 replicons in Pseudomonas aeruginosa*. Plasmid 18, 164–9.
- EELMAN E. H., 1998. *Bacterial Helicases*. J. Struct. Biol. 124, 123–128.
- FIGURSKI D. H., HELINSKI D. R., 1979. *Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1648–52.
- GORDON S., WRIGHT A., 2000. *DNA Segregation in Bacteria*. Ann. Rev. Microbiol. 54, 681–708.
- HEINEMANN J. A., SPRAGUE JR. G. F., 1989. *Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast*. Nature 340, 205–209.
- HELINSKI D. R., TOUKDARIAN A. E., NOVICK R. P., 1996. *Replication control and other stable maintenance mechanisms of plasmids*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella, cellular and molecular biology*. NEIDHARDT, F. C. (red.). ASM Press, Washington, D. C., 2, 2295–2324.
- HIRAGA S., 2000. *Dynamic Localization of Bacterial and Plasmid Chromosomes*. Ann. Rev. Genet. 34, 21–59.
- KAGUNI J. M., 1997. *Escherichia coli DnaA protein: the replication initiator*. Mol. Cell. 7, 145–157.
- KHAN S. A., 2000. *Plasmid rolling-circle replication: recent developments*. Mol. Microbiol. 37, 477–484.
- KITTELL B. L., HELINSKI D. R., 1991. *Iteron inhibition of plasmid RK2 replication in vitro: evidence for intermolecular coupling of replication origins as a mechanism for RK2 replication control*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1389–93.
- KONIECZNY I., HELINSKI D. R., 1997a. *Helicase delivery and activation by DnaA and TrfA proteins during the initiation of replication of the broad host range plasmid RK2*. J. Biol. Chem. 272, 33312–33318.
- KONIECZNY I., HELINSKI D. R., 1997b. *The replication initiation protein of the broad-host-range plasmid RK2 is activated by the ClpX chaperone*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14378–14382.
- KONIECZNY I., ŻYLICZ M., 1999. *Role of bacterial chaperones in DNA replication*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- KONIECZNY I., LIBEREK K., 2002. *Cooperative action of Escherichia coli ClpB protein and DnaK chaperone in the activation of a replication initiation protein*. J. Biol. Chem. 277, 18483–18488.
- KONIECZNY I., DORAN K. S., HELINSKI D. R., BLASINA A., 1997. *Role of TrfA and DnaA proteins in origin opening during initiation of DNA replication of the broad host range plasmid RK2*. J. Biol. Chem. 272, 20173–20178.
- LOWBURY E. J. L., KIDSON A., LILLY H. A., AYLIFEE G. A. J., JONES R. J., 1969. *Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics: emergence of strains highly resistant to carbenicillin*. Lancet 448–452.
- LU Y. -B., DATTA H. J., BASTIA D., 1998. *Mechanistic studies of initiator-initiator interaction and replication initiation*. EMBO J. 17, 5192–5200.
- MARSZALEK J., KAGUNI J. M., 1994. *DnaA Protein Directs the Binding of DnaB Protein in Initiation of DNA Replication in Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 269, 4883–4890.
- MESSER W., BLAESING F., JAKIMOWICZ D., KRAUSE M., MAJKA J., NARDMANN J., SCHAPER S., SEITZ H., SPECK C., WEIGEL C., WĘGRZYN G., WELZECK M., ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA J., 2001. *Bacterial replication initiator DnaA. Rules for DnaA binding and roles of DnaA in origin unwinding and helicase loading*. Biochimie 83, 5–12.
- MOLLER-Jansen J., JENSEN R. B., Gerdes K., 2000. *Plasmid and chromosome segregation in prokaryotes*. Trends Microbiol. 8, 313–320.
- PACEK M., KONOPA G., KONIECZNY I., 2001. *DnaA Box Sequences as the Site for Helicase Delivery during Plasmid RK2 Replication in Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 276, 23639–23644.
- PANSEGRAU W., LANKA E., 1966. *Enzymology of DNA transfer by conjugative mechanisms*. Prog. Nucleic Acid. Re. Mol. Biol. 54, 197–251.
- PANSEGRAU W., LANKA E., BARTH P. T., FIGURSKI D. H., GUINEY D. G., HAAS D., HELINSKI D. R., SCHWAB H., STANISICH V. A., THOMAS C. M., 1994. *Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP-alpha plasmids: Compilation and comparative analysis*. J. Molec. Biol. 239, 623–663.
- PATEL S. S., PICHA K. M., 2000. *Structure and function of hexameric helicases*. Annu. Rev. Biochem. 69, 651–697.
- PERRI S., HELINSKI D. R., TOUKDARIAN A., 1991. *Interactions of plasmid-encoded replication initiation proteins with the origin of DNA replication in the broad host range plasmid RK2*. J. Biol. Chem. 266, 12536–43.
- PINKNEY M., DIAZ R., LANKA E., THOMAS C. M., 1988. *Replication of mini RK2 plasmid in extracts of Escherichia coli requires plasmid-encoded protein TrfA and host-encoded proteins DnaA, B, G DNA gyrase and DNA polymerase III*. J. Molec. Biol. 203, 927–938.
- RATNAKAR P. V., MOHANTY B. K., LOBERT M., BASTIA D., 1996. *The replication initiator protein pi of the*

- plasmid R6K specifically interacts with the host-encoded helicase DnaB.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5522–5526.
- SCHERZINGER E., HARING V., LURZ R., OTTO S., 1991. *Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins.* Nucleic Acid Res. 19, 1203–1211.
- SCHERZINGER E., ZIEGELIN G., BARCENA M., CARAZO J. M., LURZ R., LANKA E., 1997. *The RepA protein of plasmid RSF1010 is a replicative DNA helicase.* J. Biol. Chem. 272, 30228–30236.
- SCHMIDHAUSER T. J., FILUTOWICZ M., HELINSKI D. R., 1983. *Replication of derivatives of the broad host range plasmid RK2 in two distantly related bacteria.* Plasmid 9, 325–30.
- SOBECKY P. A., MINCER T. J., CHANG M. C., TOUKDARIAN A., HELINSKI D. R., 1998. *Isolation of broad-host-range replicons from marine sediment bacteria.* App. and Environment. Microbiol. 64, 2822–2830.
- THOMAS C. M., 1996. *Bacterial diversity and the environment: (Bacterial Genetics and Ecology, Nafplion, Greece, May 25–29, 1996).* Trends in Biotechnology 14, 327–329.
- THOMAS C. M., HELINSKI D. R., 1989. *Vegetative replication and stable inheritance of IncP plasmids.* [W:] *Promiscuous plasmids of gram-negative bacteria.* THOMAS C. M. (red.). Academic Press, San Diego, 1–25.
- THOMAS C. M., MEYER R., HELINSKI D. R., 1980. *Regions of broad-host-range plasmid RK2 which are essential for replication and maintenance.* J. Bacteriol. 141, 213–22.