

MAŁGORZATA ŁOBOCKA

*Zakład Biochemii Drobnoustrojów
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
e-mail: loboeka@ibb.waw.pl*

LINIOWE PLAZMIDY BAKTERYJNE

WPROWADZENIE

Problem replikacji 3' końców liniowych cząsteczek DNA wynika z właściwości powszechnie występujących polimeraz replikacyjnych. Zapoczątkowanie przez nie syntezy nowego łańcucha DNA na starej matrycy nie odbywa się samoistnie, a poprzez dołączenie deoksyrybonukleotydu do grupy OH na 3' końcu tzw. primera, najczęściej krótkiego RNA komplementarnego do poprzedzającego start replikacji rejonu matrycy. Dlatego replikacja liniowego DNA przez polimerazę prowadzi do skracania końców 5' nowo syntetyzowanych nici w każdej rundzie. W chromosomach organizmów eukariotycznych problem replikacji końców został rozwiązany przez ich wydłużanie o setki kopii identycznych fragmentów DNA, z udziałem enzymu telomerazy. W większości chromosomów i plazmidów bakteryjnych prostym ominięciem tego problemu okazała się cyrkularyzacja cząsteczek DNA. Jeszcze do niedawna kolisty cząsteczki DNA uznawano za atrybut organizmów prokariotycznych. Dopiero badania ostatnich kilkunastu lat doprowadziły do wykrycia liniowych form DNA u bakterii.

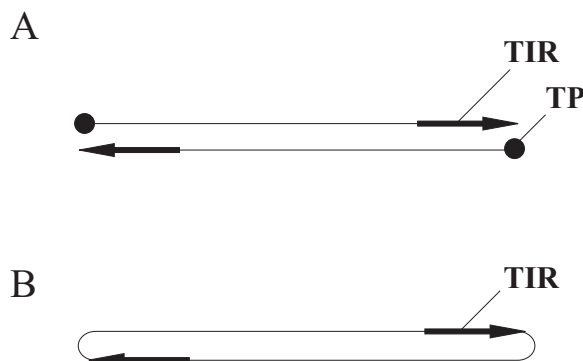
Liniowe plazmidy zidentyfikowano u bakterii Gram-dodatnich z rodzaju *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Clavibacter*, *Lactobacillus* oraz u bakterii Gram-ujemnych z rodzaju *Borrelia*, *Xantobacter*, *Klebsiella* (ROUSSEL i współaut. 1993, NETOLITZKY i współaut. 1995, PICARDEAU i VINCENT 1997, BERGERON i współaut. 1998, PALMER i

współaut. 2000, UZ i współaut. 2000, RAVEL i współaut. 2000, KRUM i ENSIGN 2001, GOETHALS i współaut. 2001, SHIMIZU i współaut. 2001, BROWNK i współaut. 2002, PANG i współaut. 2002). Często warunkują one lekooporność lub infekcyjność patogennych szczepów bakteryjnych (MEINHARDT i współaut. 1997, RAVEL i współaut. 1998). Wiele z nich to megaplazmidy, kodujące enzymy całych szlaków metabolicznych związanych z wykorzystaniem określonych związków (SVEKI i współaut. 1999). Niektóre oprócz funkcji plazmidowych kodują funkcje fagowe. Profag bakteriofaga N15 *Escherichia coli*, popularnej pałeczki okrężnicy, występuje w komórkach tej bakterii w formie liniowego plazmidu (RYBCHIN i SVARCHEVSKY 1999).

Z ponad pięćdziesięciu zsekwencjonowanych do tej pory chromosomów bakteryjnych kilka ma strukturę liniowych cząsteczek DNA. Liniowe chromosomy są charakterystyczne dla bakterii z rodzaju *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, *Borrelia* i prawdopodobnie *Coxiella* (VOLFF i ALTENBUCHNER 2000, WILLEMS i współaut. 1998). U patogennego dla roślin szczepu C58 *Agrobacterium tumefaciens* jeden liniowy i jeden kolisty chromosom składają się na całość genomu (GOODNER i współaut. 2001). Przypuszczalnie liniowe chromosomy bakteryjne powstały z kolistych chromosomów na skutek ich rekombinacji z liniowymi plazmidami. U bakterii z rodzaju *Streptomyces* i *Borrelia* liniowe chromosomy

współlistnieją z liniowymi plazmidami o strukturze i, często, sekwencji końców podobnej do struktury i sekwencji końców chromosomów

riotypycznymi telomerami (Ryc. 1; KOBRYN i CHACONAS 2001). Bardziej liczny tworzą cząsteczki o końcach 5' związanych z



Ryc. 1. Struktura liniowych plazmidów bakteryjnych.

(A) Struktura plazmidów o końcach 5' kowalencyjnie związanych z białkiem. Rejony końcowych odwróconych powtórzeń podobnych sekwencji (TIR) oznaczono strzałkami. Białka kowalencyjnie związane z końcami 5' nici DNA (TP) oznaczono czarnymi kropkami. (B) Struktura plazmidów o kowalencyjnie zamkniętych końcach (wg HINNEBUSHA i TILLY 1993).

ich bakteryjnego gospodarza (CASJENS i współaut. 1997, BEY i współaut. 2000, CASJENS i współaut. 2000, SPATZ i współaut. 2002). Wewnątrz komórki liniowe replikony drogą rekombinacji mogą wymieniać się końcami (PIZA i współaut. 1998).

Zaobserwowano dwa typy liniowych plazmidów i chromosomów bakteryjnych różniące się strukturą końców, zwanych proka-

białkiem, mniej liczny – cząsteczki o kowalencyjnie zamkniętych końcach, przypominających strukturę szpilki do włosów. W obu typach cząsteczek sekwencja jednego końca powtarza się w odwrotnej orientacji na przeciwnym końcu, a utworzone w ten sposób rejony końcowych odwróconych powtórzeń (ang. terminal inverted repeat, TIR), mogą być różnej długości.

WYSTĘPOWANIE I ZNACZENIE LINIOWYCH PLAZMIDÓW

Badania nad liniowymi plazmidami prowadzone są głównie w związku z ich mechanizmem replikacji, występowaniem w szczepach bakterii o szczególnym znaczeniu dla człowieka, a także użytecznymi lub związanymi z patogennością cechami fenotypu. U bakterii Gram-dodatnich najwięcej liniowych plazmidów wyizolowano z bakterii rodzaju *Streptomyces*, *Rhodococcus* i *Mycobacterium*. Wszystkie one należą do rzędu promieniowców, Actinomyce-tes, obejmującego szereg wolnożyjących bakterii glebowych i liczne patogeny.

Szczególnie użyteczne dla człowieka są bakterie rodzaju *Streptomyces*, kojarzone z ziemnym zapachem lasów. Wytwarzają one ponad 60% antybiotyków produkowanych przez przemysł farmaceutyczny. Nosicielami niektórych genów związanych z syntezą antybiotyków przez szczepy *Streptomyces* są liniowe plazmidy. Na przykład, synteza metylomycyny przez *S. coelicolor*, aktynomycyny D przez

S. parvulus i chloramfenikolu przez *S. venezuelae* zależy od obecności w komórkach tych szczepów olbrzymich, liczących odpowiednio 350, 520 i 130 tysięcy par zasad (tpz) długości liniowych plazmidów (MEINHARDT i współaut. 1997).

Rodzaj *Rhodococcus* skupia szereg bakterii patogennych dla roślin, a także bakterie zdolne do degradacji ksenobiotyków (ang. xenobiotics) – związków typu pestycydów, składników zanieczyszczeń przemysłowych czy leków, nie występujących normalnie w naturze, ale obecnych w naszym środowisku. *R. fascians* infekuje najróżniejsze gatunki roślin zapoczątkowując tworzenie się tzw. galasów, charakterystycznych wyrosła na liściach. Galasy tworzą w roślinie centra o specyficznych właściwościach metabolicznych, szczególnie korzystnych dla życia *R. fascians*. Geny związane z tworzeniem galasów znajdują się na dużym, liczącym 200 tpz długości, liniowym

plazmidzie (MEINHARDT i współaut. 1997, GOETHALS i współaut. 2001). Wszystkie badane dotąd wirulentne szczepy *R. fascians* zawierały podobne plazmidy.

Zdolność szczepu BD2 *R. opacus* do degradacji izopropylobenzenu i dichloroetenu zależy od obecności w jego komórkach liczącego 210 tpz długości liniowego plazmidu (DABROCK i współaut. 1994, KESSELER i współaut. 1996). Szczep B-276 *R. corallinus* zdolny do utleniania trójchloroetenu (TCE) zawiera aż cztery liniowe plazmidy (SVEKI i współaut. 1999). Gen kodujący enzym monooksygenazę alkenów, niezbędny do utleniania TCE, znajduje się na jednym z tych plazmidów. Inny szczep *Rhodococcus* sp., RHA1, ma zdolność do degradacji polichlorodwufenyli, tzw. PCB (ang. polichlorinated biphenyl) stanowiących jedno z bardziej toksycznych zanieczyszczeń środowiska. Proces degradacji przebiega przez szereg etapów pośrednich związanych z aktywnością ponad dwudziestu enzymów. Z trzech liniowych plazmidów obecnych w komórkach RHA1 dwa największe, pRHL1 (1100 tpz) i pRHL2 (390 tpz) kodują po sześć enzymów uczestniczących w procesie degradacji (FUKUDA i współaut. 1998, MASAI i współaut. 1997).

Niektóre szczepy *R. opacus* są chemolitoautotrofami. Mogą wykorzystywać dwutlenek węgla i wodór w postaci gazowej jako jedyne źródło węgla i energii. Właściwość tę zawdzięczają liniowym plazmidom obecnym w ich komórkach. Dotąd scharakteryzowano kilka takich plazmidów, pHG201, pHG205 i pHG207, o długości odpowiednio 270, 280 i 225 tpz (KALKUS i współaut. 1993). Jeden z nich, pHG207, nabył wysoką zdolność koniugacyjnego transferu do innych szczepów *R. opacus* poprzez rekombinację swojego protoplasty, pHG205, z innym plazmidem koniugacyjnym.

Rodzaj *Mycobacterium* grupuje zarówno bakterie wolnożyjące, jak i patogenne. Z blisko spokrewnionych ze sobą, powszechnie występujących w środowisku szczepów *M. avium* i *M. xenopi*, *M. brieri* i *M. celatum* wyizolowano kilkanaście liniowych plazmidów o długościach od 20 do 320 tpz (PICARDEAU i VINCENT 1997, 1998). Określenie funkcji kodowanych przez liniowe plazmidy rodzaju *Mycobacterium* okazało się trudne ze względu na wysoką stabilność tych plazmidów. Nieliczne udane próby pozbycia się ich z komórek wskazują, że żaden nie jest niezbędny dla życia bakterii. Nie wiadomo czy posiadanie któregoś z liniowych

plazmidów przez mykobakterie wiąże się z wirulencją lub nabyciem innych korzystnych cech. Analiza kompletnej sekwencji nukleotydowej plazmidu pCLP *M. celatum* (23 tpz), pozwoliła na identyfikację genów związanych z replikacją i stabilną segregacją tego plazmidu oraz mobilnych elementów genetycznych (LE DANTEC i współaut. 2001). Niektóre geny plazmidu pCLP są homologami chromosomalnych genów *M. tuberculosis*, co wskazuje na transfer informacji genetycznej pomiędzy liniowymi i kolistymi formami DNA w obrębie rodzaju *Mycobacterium*. Potwierdzeniem tego typu transferu jest organizacja genetyczna plazmidu pCLP, która, z wyjątkiem liniowych kółców, jest typowa dla kolistych plazmidów.

Powszechne występowanie liniowych plazmidów u bakterii Gram-ujemnych wydaje się być ograniczone do krętków rodzaju *Borrelia*. Wielu przedstawicieli tego rodzaju to groźne patogeny człowieka i zwierząt. Do najlepiej znanych należą *B. burgdorferi*, powodująca chorobę zwaną boreliozą (ang. Lyme disease), oraz *B. hermsi* i *B. duttoni*, powodujące gorączkę powrotną. Wszystkie gatunki *Borrelia*, oprócz liczącego około 0,9 – 1 mln par zasad liniowego chromosomu, posiadają liczne liniowe i kliste plazmidy. U infekcyjnego dla człowieka szczepu *B. burgdorferi* wykryto aż dziewięć kolistych i dwanaście liniowych plazmidów – największą znaną liczbę pozachromosomalnych elementów genetycznych mogących współistnieć w jednej bakterii (CASJENS i współaut. 2000). Z infekcyjnego szczepu Ly *B. duttoni* również wyizolowano dwanaście liniowych plazmidów różniących się wielkością od 11 do 200 tpz (TAKAHASHI i współaut. 2000). Wszystkie wyizolowane z naturalnych środowisk szczepy *Borrelia* charakteryzuje obecność licznych liniowych plazmidów. Na ogół występują one w liczbie kopii podobnej do liczby kopii chromosomu. Utrata większości z nich nie pogarsza zdolności bakterii do wzrostu w pożywkach laboratoryjnych, często natomiast idzie w parze z utratą infekcyjności dla tych ssaków, dla których bakterie te są normalnie patogenne. Niektórych plazmidów nie zdołano usunąć z komórek. Możliwe, że są one mini-chromosomami kodującymi vitalne funkcje.

Znacząca frakcja DNA liniowych plazmidów *Borrelia* jest w stanie intensywnych przemian ewolucyjnych (CASJENS i współaut. 2000). Świadczą o tym ślady licznych, czasami bardzo niedawnych procesów wymiany DNA

pomiędzy poszczególnymi plazmidami. Na przykład, liniowy plazmid lp56 *B. burgdorferii* zawiera kopię plazmidu podobnego do kolistego plazmidu cp32, co wskazuje, że powstał on z integracji przodka cp32 do genomu liniowego plazmidu. Plazmid lp54 zawiera dziewięć długich rejonów homologii z plazmidem cp32s. Jeszcze liczniejsze homologie występują pomiędzy cząsteczkami DNA różnych liniowych plazmidów. Znacząca liczba homologii wskazuje na wielokrotną reprezentację tych samych lub podobnych funkcji we współistniejących w komórce różnych plazmidach. Zwielokrotnieniu kopii szeregu genów towa-

rzyszy zadziwiająco duża liczba tzw. pseudogenów, sekwencji wysoce homologicznych do funkcjonalnych genów, lecz zawierających mutacje, które znoszą ich zdolności kodujące. Możliwe, że liczne plazmidy *Borrelia* pełnią rolę magazynu dla wielu kopii genów podlegających niezależnym procesom ewolucyjnym. Zdolność do ekspresji podobnych, ale nie identycznych genów z różnych plazmidów prawdopodobnie przyczynia się do przyspieszonej dynamiki zmian powierzchniowych antygenów komórkowych tej bakterii. To z kolei zwiększa możliwości ukrycia się przed systemem immunologicznym gospodarzy *Borrelia*.

REPLIKACJA LINIOWYCH PLAZMIDÓW

Replikacja liniowych plazmidów i chromosomów bakteryjnych rozpoczyna się dwukierunkowo wewnątrz cząsteczek ich DNA, a miejsca inicjacji replikacji reprezentują różne typy replikonów (ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA i SCHREMPF 1992, CALCUTT i SCHMIDT 1992, KIESERK i współaut. 1992, SHIFFMAN i COHEN 1992, CHANG i COHEN 1994, Musiałowski i współaut. 1994, CHANG i współaut. 1996, FISCHER i współaut. 1998, QIN i COHEN, 1998, REDENBACH i współaut. 1999, PICARDEAU i współaut. 2000, HIRATSU i współaut. 2000). Niektóre z nich przypominają replikony kolistych

plazmidów lub chromosomów bakteryjnych. Brak różnic pomiędzy replikonami liniowych i kolistych plazmidów potwierdza możliwość replikacji liniowych plazmidów pozbawionych rejonów telomerów jako kolistych cząsteczek DNA (FERDOWS i współaut. 1996). Informacja potrzebna dla odtworzenia struktury telomerów zawarta jest w sekwencji samych telomerów i w genach dla rozpoznających te sekwencje specyficznych białek (BAO i COHEN 2001, YANG i współaut. 2002, RAVIN i współaut. 2001, CHACONAS i współaut. 2001). Nie są one specyficzne dla typu replikonu.

LINIOWE PLAZMIDY O KOŃCACH 5' ZWIĄZANYCH Z BIAŁKIEM

Końce związane z białkiem wykryto w cząsteczkach liniowych plazmidów bakterii Gram-dodatnich z rodzaju *Streptomyces*, *Rhodococcus* i *Mycobacterium*, należących do rzędu Actinomycetes, oraz w liniowych chromosomach bakterii z rodzaju *Streptomyces* i *Saccharopolyspora* (MEINHARDT i współaut. 1997, VOLFF i ALTENBUCHNER 2000, HINNEBUSCH i TILLY 1993, PICARDEAU i VINCENT 1998, SHIMIZU i współaut. 2001, KALKUS i współaut. 1998). Są one wrażliwe na trawienie egz nukleazą III, która usuwa nukleotydy z końca 3' dwuniciowego DNA. Obecność związanego białka sygnalizuje zmianę ruchliwości elektroforetycznej końcowych fragmentów DNA po trawieniu enzymem proteolitycznym, proteinazą K.

Dwukierunkowa replikacja z wewnętrznych rejonów origin w cząsteczkach tych plazmidów osiąga koniec 5' każdej matrycy przez dołączanie nukleotydów do końca 3'-OH nowo syntetyzowanej nici. Replikacja w kierunku 3'

matrycy nie osiąga końca. W badaniach nad plazmidem pSLA2-M *S. rochei* zaobserwowano powstawanie pośrednich form replikacyjnych – dwuniciowych cząsteczek DNA o końcach 5' skróconych o około 280 nukleotydów w stosunku do końców 3' (CHANG i COHEN 1994). Przypuszczalnie podobne formy pośrednie tworzone są podczas replikacji innych plazmidów bakteryjnych o końcach związanych z białkiem. Dosyntetyzowywanie końców 5', zależne od białek terminalnych i sekwencji telomerowych, zachodzi na drodze nieznanego mechanizmu.

Badania nad liniowymi plazmidami i chromosomami *Streptomyces* wskazują na skomplikowaną budowę ich rejonów telomerowych. Długość odwróconych powtórzeń (TIR) na końcach cząsteczek plazmidowego DNA waha się od 44 par zasad w liczącym 50 tpz plazmidzie pSLP2 (CHEN i współaut. 1993) do 95 tpz w liczącym 387 tysięcy par zasad plazmidzie

pPZG101 *S. rimosus* (GRAVIUS i współaut. 1994). Rejony TIR chromosomu *Streptomyces rimorus* mają aż 550 tysięcy par zasad długości (PIZA i współaut. 1997). Mimo podobieństwa, lewy i prawy rejon TIR mogą zawierać różniące się zasady lub fragmenty, co sugeruje zachodzenie niezależnych zmian w ich sekwencjach. Sekwencje końcowych 168 nukleotydów większości liniowych plazmidów i chromosomów *Streptomyces* okazały się niemal identyczne (HUANG i współaut. 1998, HIRATSU i współaut. 2000, STOLL i współaut. 2000). Wszystkie zaczynają się od liczącego 13 nukleotydów rejonu o charakterze palindromu (5'-CCCGC-GGAGCGGG-3') i zawierają oprócz jego powtórzeń powtórzenia innych sekwencji palindromicznych w takiej kolejności i orientacji, że mogą one razem tworzyć skomplikowane struktury drugorzędowe (HUANG i współaut. 1998, HIRATSU i współaut. 2000). Sugerowano, że struktury te są istotne dla inicjacji replikacji telomerów. Jednak niemożność ich tworzenia przez końce chromosomu *S. griseus* i nielicznych liniowych plazmidów, których sekwencja odbiega od typowej lub zawiera tylko jej fragmenty, przeczą takiej hipotezie (GOSHI i współaut. 2002). Ponadto końce szeregu liniowych plazmidów *Mycobacterium* i *Rhodococcus* nie mogą tworzyć podobnych struktur (PICARDEAU i VINCENT, 1998, KALKUS i współaut. 1998, SHIMIZU i współaut. 2001).

Oprócz liniowych plazmidów *Streptomyces*, *Rhodococcus* i *Mycobacterium* końce 5' związane z białkiem są charakterystyczne dla liniowych plazmidów wyizolowanych z cytoplazmy, mitochondriów lub plastydów komórek grzybów, alg lub roślin wyższych oraz dla cząsteczek DNA adenowirusów i niektórych bakteriofagów. Podobieństwo struktury końców oraz zdolność do replikacji z odtworzeniem liniowej formy DNA stały się podstawą do nadania tym elementom genetycznym wspólnej nazwy – inwertron (SAKAGUCHI 1990).

Zapoczątkowanie replikacji końców elementów typu inwertronu poznano na przykładzie bakteriofaga phi29 *Bacillus subtilis* (SALAS 1999, MEIJER i współaut. 2001). Telomer służy tu jako miejsce startu replikacji, a białko związane do końców 5' DNA (ang. terminal protein TP) jako primer dla specyficznej polimerazy DNA phi29. W reakcji zapoczątkowania replikacji polimeraza DNA tworzy kompleks z TP, a następnie katalizuje powstanie wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupą hy-

droksylową (OH) reszty serynowej TP, a deoksyrybonukleotydem (dAMP). Związane z białkiem dAMP staje się pierwszym nukleotydem nowo syntetyzowanej nici DNA. Chociaż dAMP jest początkowo przyłączane do TP w pozycji komplementarnej do drugiego T matrycy powstały kompleks ślizga się wstecz matrycy, do pozycji komplementarnej z jej pierwszym T. Poślizg możliwy jest dzięki obecności na końcach DNA phi29 ciągu trzech T wchodzących w skład sześcionukleotydowej sekwencji (5'-TTTCAT-3'). W ten sposób odzyskiwana jest informacja zakodowana w skrajnym nukleotydzie 3' matrycy. Po poślizgu wzdłuż matrycy polimeraza DNA pozostaje w kompleksie z TP podczas dołączania do nici DNA kilku dalszych nukleotydów. Zmiana konformacji kompleksu powoduje odłączenie TP od polimerazy kiedy nowa nić DNA ma już wystarczającą długość by sama mogła służyć jako primer.

Powtórzenia identycznych nukleotydów na końcach cząsteczek DNA są typowe dla adenowirusa (KING i VAN DER VLIET 1994) i bakteriofagów o strukturze inwertronów, a replikacja ich cząsteczek DNA zachodzi na zasadzie mechanizmu podobnego do replikacji bakteriofaga phi29. Nie jest jasne czy mimo podobieństwa struktur końce bakteryjnych plazmidów i chromosomów typu inwertronu, ulegają replikacji na zasadzie podobnego mechanizmu. Wszystkie one, z wyjątkiem końców chromosomu *S. griseus*, zaczynają się od przynajmniej dwóch identycznych nukleotydów (PICARDEAU i VINCENT 1998, HUANG i współaut. 1998, SHIMIZU i współaut. 2001, SPATZ i współaut. 2002, GOSHI i współaut. 2002). Jednak terminalne białka liniowych plazmidów i chromosomów *Streptomyces* nie wykazują homologii z terminalnymi białkami innych elementów o strukturze inwertronu (BAO i COHEN 2001, YANG i współaut. 2002). Zamiast tego zawierają one fragment o słabej homologii do enzymów typu odwrotnej transkryptazy, zdolnych do syntezy DNA na matrycy RNA.

Najprawdopodobniej terminalne białka związane z przeciwnymi końcami plazmidów *Streptomyces* wchodzi ze sobą w interakcję, co prowadzi do powstania wewnątrzkomórek pseudo-kolistych form DNA plazmidowego. W przypadku chromosomów *Streptomyces* uzyskano już dowody na interakcje pomiędzy terminalnymi białkami tej samej cząsteczki DNA (YANG i współaut. 2002).

Terminalne białka liniowych plazmidów innych bakterii Gram-dodatnich nie zostały dotąd poznane. Plazmid pCLP *M. celatum* koduje białko podobne do resolwazy, endonukleazy biorących udział w rozdzielaniu pośrednich

form rekombinacyjnych cząsteczek DNA (LE DANTEC i współaut. 2001). Zaproponowano, że być może uczestniczy ono w odtwarzaniu liniowych końców tego plazmidu (QIN i COHEN 1998).

LINIOWE PLAZMIDY O KOWALENCYJNIE ZAMKNIĘTYCH KOŃCACH

Liniowe plazmidy o kowalencyjnie zamkniętych końcach wykryto wyłącznie u bakterii Gram-ujemnych. Pojedyncze izolaty takich plazmidów opisano u *Klebsiella oocytia*, *Xantobacter*, *Yarsinia pestis* i *E. coli* (Meinhard i współaut. 1997, RYBCHIN i SVARCHEVSKY 1999, DENEKE i współaut. 2002). Powszechnie plazmidy tego typu występują jedynie u krętków rodzaju *Borrelia*, których liniowe chromosomy mają podobną strukturę końców (CASJENS 1999). Kowalencyjnie zamknięte końce plazmidów bakteryjnych przypominają strukturą końce liniowych cząsteczek DNA mitochondrialnego określonych gatunków drożdży oraz końce niektórych dużych wirusów, takich jak pokswirusy i irydopokswirusy.

Najlepiej poznanym plazmidem o kowalencyjnie zamkniętych końcach liniowego DNA jest profag bakteriofaga N15 *E. coli* (RYBCHIN i SVARCHEVSKY 1999). Bakteriofag N15 strukturą wirionu i długością genomu (46,4 tpb) przypomina bakteriofaga λ . Sekwencje genomów N15 i λ są w dużej części homologiczne (RAVIN i współaut. 2000). W odróżnieniu od λ N15 nie ma zdolności integracji do chromosomu lecz lizogenizuje bakterie jako niskokopionowy plazmid. Po infekcji komórek liniowe DNA faga N15 ulega cyrkularyzacji poprzez ligację lepkich końców *cosL* i *cosR* (Ryc. 2).

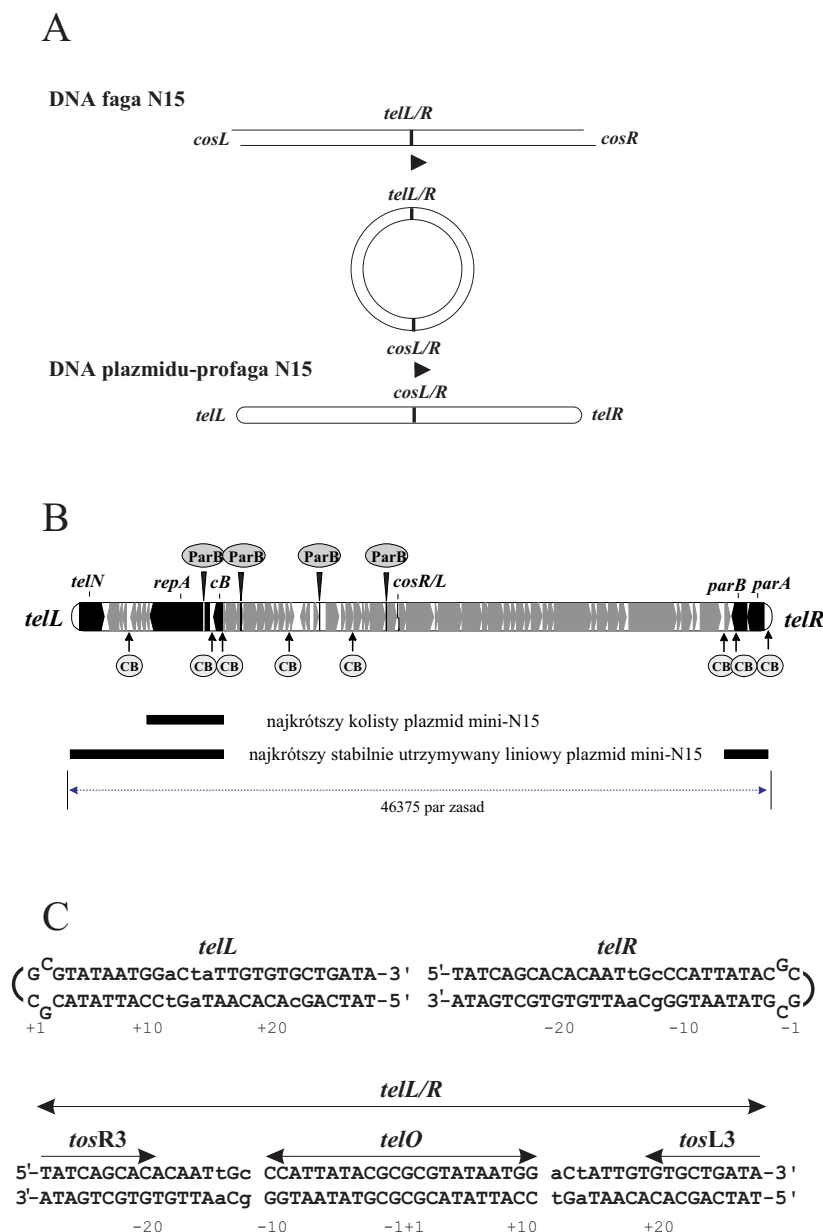
Zapoczątkowanie lizogenii wiąże się z przecięciem kolistej formy DNA N15 w miejscu *telL/R*, które służy jako substrat do wytworzenia kowalencyjnie zamkniętych końców liniowego plazmidu-profaga. Białkiem katalizującym przecięcie *telL/R* i wytworzenie telomerów jest produkt genu *telN* N15, jedyne genu niezbędnego dla utrzymania profaga N15 w liniowej formie (DENEKE i współaut. 2000, RAVIN i współaut. 2001).

Rejony telomerowe N15 zawierają 28-mio nukleotydowe sekwencje o charakterze palindromu, zakończone czteronukleotydową jednoniciową pętlą utworzoną przez kowalencyjnie zamknięte końce (Ryc. 2). Sekwencje obu końców są prawie identyczne (26/28). Miejsce, które stanowi substrat dla utworzenia telo-

merów w dwuniciowym DNA faga N15 (*telL/R*), obejmuje 56-cio nukleotydowy palindrom, którego lewe i prawe ramię różnią się tylko w pozycji odległej o -12 i +14 nukleotydów od centrum palindromu. Tworzący idealny palindrom 22 nukleotydowy rejon centralny *telL/R*, zwany *telO*, graniczy z obu stron z ciągami trzech odwróconych względem siebie powtórzeń podobnej dziewięcionukleotydowej sekwencji (taacAgAACA): *tosL1-tosR1*, *tosL2-tosR2* i *tosL3-tosR3*.

Replikacja plazmidu N15 zależy od genu replikacyjnego *repA* i rozpoczyna się dwukierunkowo w rejonie inicjacji (ang. *origin*) znajdującym się wewnątrz tego genu (Ryc. 2) Replikacja plazmidów pozbawionych *telN* prowadzi do powstania kolistych dimerów, w których poszczególne cząsteczki graniczą ze sobą rejonami *telL* i *telR* (RAVIN i współaut. 2001). Indukcja syntezy TelN w komórkach zawierających pośrednie formy dimeryczne powoduje odtworzenie liniowych cząsteczek N15. Funkcja TelN nie zależy od typu relikonu, a tylko od sekwencji telomerowych N15. W obecności białka TelN pochodne kolistych plazmidów F i P1 ze sklonowanym rejonem *telL/R* były utrzymywane w komórkach jako liniowe plazmidy. Tworzenie kolistych dimerów plazmidowego DNA jako pośrednich form replikacyjnych doprowadziło do zrozumienia mechanizmu odtwarzania liniowych telomerów w procesie replikacji N15 (Ryc. 3). Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że jedyną rolą TelN jest przecinanie zreplikowanych rejonów telomerowych kolistych dimerów lub wcześniejszych form replikacyjnych i tworzenie kowalencyjnych wiązań pomiędzy końcami komplementarnych nici DNA.

Mechanizm odtwarzania liniowej struktury plazmidów *Borrelia* w trakcie replikacji okazał się podobny do zaobserwowanego u profaga N15. Wymaga on zakonserwowanej sekwencji telomerów plazmidowych. Sekwencje końcowych 25-ciu nukleotydów liniowych plazmidów i chromosomów *Borrelia* oraz profaga N15 są homologiczne (CASJENS i współaut.



Ryc. 2. Struktura liniowego plazmidu profaga N15 i jego rejonów telomerowych.

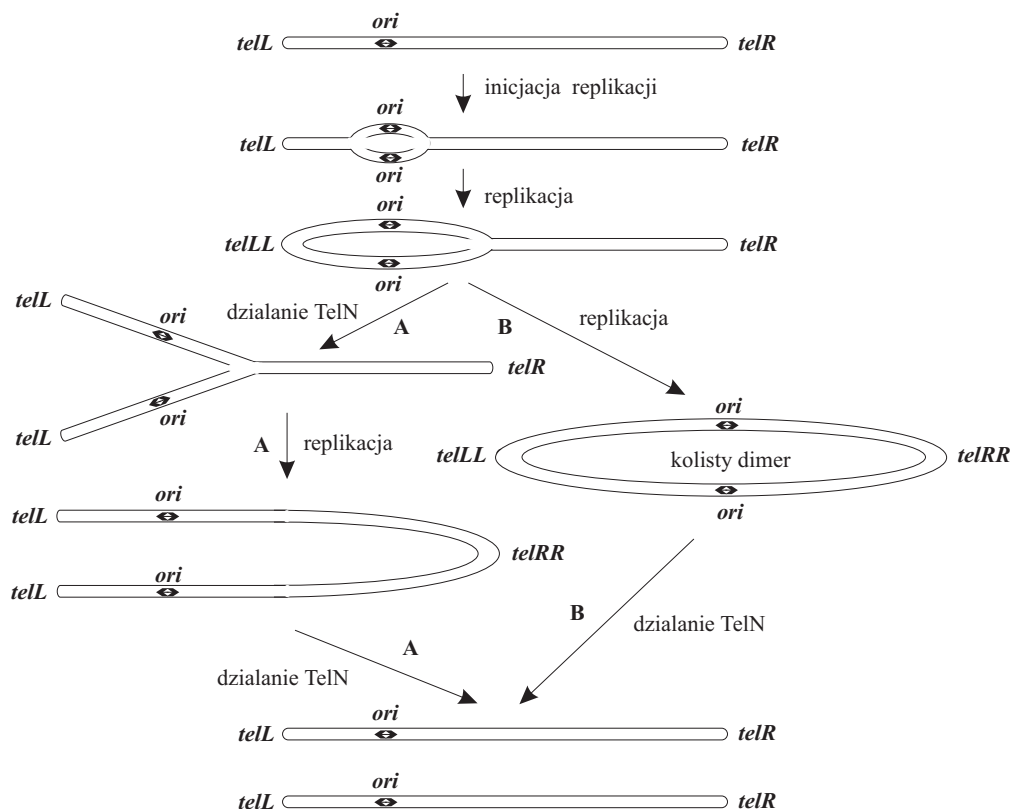
(A) Wewnątrzkomórkowa konwersja liniowego DNA faga N15 do liniowego plazmidu profaga. (B) Organizacja genomu profaga N15. Geny N15 niezbędne dla stabilnego utrzymania profaga jako liniowego plazmidu zaznaczono na schemacie kolorem czarnym. Miejsca wiązania represora funkcji fagowych, produktu genu *cB* (CB), oznaczono strzałkami pod schematem genomu. Miejsca centromerowe wiążące białko ParB i niezbędne dla stabilnej segregacji plazmidu N15 oznaczono ostrzami skierowanymi do dołu trójkątów. (C) Struktura telomerów profaga N15 (*telL* i *telR*) oraz rejonu *telL/R* w DNA faga N15. Rejon *telL/R* jest częścią dłuższego rejonu zwanego *tos* (z ang. telomerase occupancy site), służącego jako substrat do wytworzenia telomerów i zawierającego dwie dodatkowe (nie pokazane na rysunku) pary odwróconych powtórzeń sekwencji taacAgaACA: *tosL2-tosR2*, *tosL1-tosR1* (objaśnienia w tekście) (wg RYBCHINA i SVARCHEVSKYEGO 1999, RAVINA i współaut. 2001, GRIGORIEVA i ŁOOCKIEJ 2001).

1997). Wszystkie one zawierają przy końcu heksanukleotyd TATAAT. Identyeczny heksanukleotyd występuje przy końcach cząsteczek DNA wirusa świńskiej gorączki afrykańskiej (ASFV) i wirusa ospy, których liniowe genomy mają kowalencyjnie zamknięte końce.

Kolisty plazmid, który zawierał zreplikowany rejon *telL* (*telLL*) liniowego plazmidu lp17 *B. burgdorferii* po wprowadzeniu do komórek tej bakterii był stabilnie utrzymywany w formie liniowego plazmidu o końcach identycznych z *telL* lp17 (CHACONAS i współaut. 2001). Jeden z kolistych plazmi-

dów *B. burgdorferii* zawiera gen (BBB03), którego produkt wykazuje homologie z białkiem TelN N15. Oczyszczony produkt tego genu, ResT, okazał się wystarczający do trawienia dwuniciowego fragmentu DNA zawierającego *telLL*, z utworzeniem dwóch fragmentów DNA o kowalencyjnie zamkniętych końcach powstałych w miejscu trawienia (KOBRYN i CHACONAS 2002). Badania nad białkami TelN N15 (DENEKE i współaut. 2000,

nych końców przeciwległych nici tego samego łańcucha DNA (Ryc. 4). Minimalny fragment DNA wymagany dla wydajnego odtworzenia telomerów N15 przez TelN pokrywa się z rejonem *telL/R* (Ryc. 2C). Udało się rozdzielić aktywności TelN związane z jego zdolnością do specyficznego rozpoznawania DNA *telL/R* oraz trawienia i ponownego łączenia nici DNA. Specyficzne wiązanie TelN z DNA wymaga przynajmniej centralne-

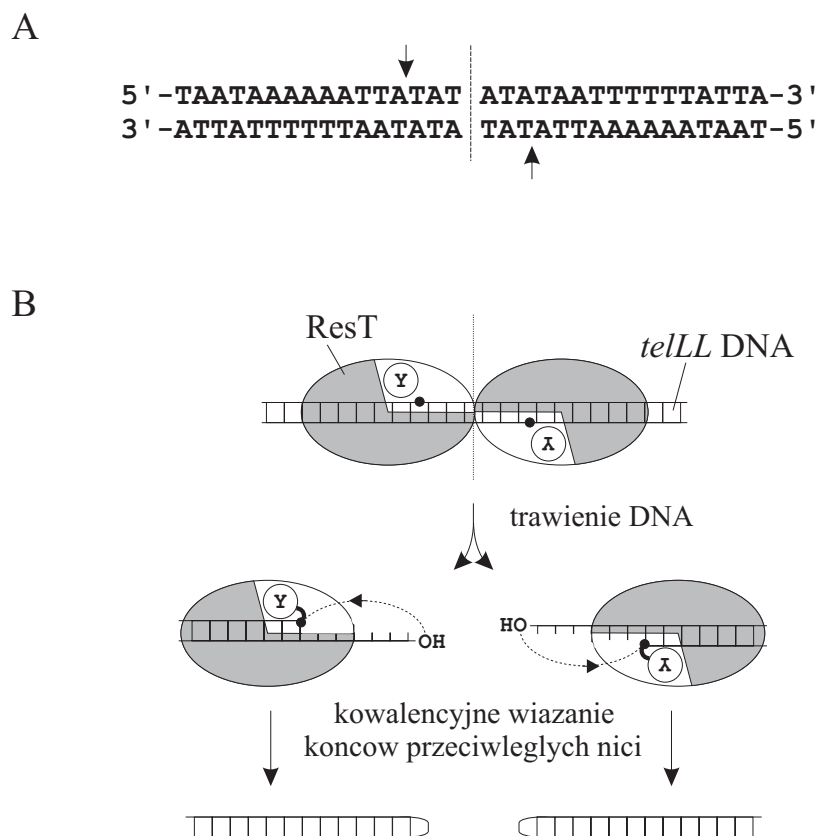


Ryc. 3. Model replikacji plazmidu-profaga N15 uwzględniający działanie protelomerazy TelN przed (wariant A) i po (wariant B) zakończeniu procesów replikacyjnych zainicjowanych z umieszczonego niesymetrycznie w cząsteczce rejonu origin (*ori*).

(A) Protelomeraza TelN przecina zduplikowany rejon *telL* (*telLL*) i odtwarza strukturę lewego telomeru przed zakończeniem replikacji. Prowadzi to do powstania Y-kształtnych pośrednich form replikacyjnych. (B) Replikacja całej cząsteczki DNA kończy się przed przecięciem zduplikowanego rejonu *telL* przez polimerazę, prowadząc do powstania jako form pośrednich kolistych dimerów. Cięcie zduplikowanych rejonów telomerowych i odtworzenie ich pierwotnej struktury kończy cykl replikacyjny profaga (wg. RAVINA i współaut. 2001).

2002) i ResT *Borrelia* pozwoliły zaszeregować je do nowej grupy enzymów o wspólnym mechanizmie działania dla których zaproponowano nazwę protelomerazy lub resolwazy telomerów. Oba białka katalizują rozdzielanie telomerów *in vitro* w reakcji, w której najpierw dochodzi do przecięcia dwóch wiązań fosfodwuestrowych, każdego w przeciwległej nici dwuniciowego DNA, a następnie kowalencyjnego połączenia komplementar-

go rejonu *telL/R* (*telO*) oraz dwóch sąsiadujących z nim sekwencji *tosL3* i *tosL3*. Reakcja przecinania i ponownego łączenia nici DNA zachodzi z niską wydajnością nawet w obecności samego rejonu *telO*. Reakcje rozdzielania telomerów zarówno przez TelN, jak i ResT, nie wymagają obecności ani jonów dwuwartościowych ani związków wysokoenergetycznych, ani też żadnych towarzyszących białek.



Ryc. 4. Mechanizm działania resolwazy telomerów ResT wyizolowanej z *B. burgdorferii*.

(A) Sekwencja zreplikowanego fragmentu lewego telomeru plazmidu lp17 (*telLL*) wchodząca w interakcję z resolwą telomerów ResT. Ciemne strzałki wskazują miejsca trawienia DNA zreplikowanego telomeru przez ResT. (B) Proponowany mechanizm rozdziału telomerów przez ResT. Środek symetrii zreplikowanej sekwencji telomeru zaznaczono przerywaną linią. Fosforany 5' w miejscach cięcia DNA przez ResT oznaczono czarnymi kropkami. Podczas procesu przecinania DNA reszta tyrozyny (Y) w centrum aktywnym ResT (zaznaczonym na białym) wiąże się kowalencyjnie z końcem 5' przeciętej nici DNA (wg KOBRYNA i CHACONASA 2002).

PARTYCJA LINIOWYCH PLAZMIDÓW BAKTERYJNYCH

Mimo istotnych różnic topologicznych pomiędzy liniowymi i kolistymi cząsteczkami DNA aktywna segregacja (partycja) liniowych i kolistych plazmidów zależy od podobnych mechanizmów (patrz artykuł M. Łobockiej i współaut. w tym numerze KOSMOSU). Najlepiej poznany został system partycyjny profaga N15 (Ryc. 2B; RAVIN i Lane 1999; Grigoriew i ŁOBOCKA 2001). Składa się on z operonu kodującego białka partycyjne ParA i ParB tego plazmidu oraz czterech rozrzuconych po genomie sekwencji centromerowych, *parS*. Białka

ParA i ParB N15 są homologami białek partycyjnych kolistych plazmidów i chromosomów bakteryjnych. Są one zdolne do stabilizacji zarówno liniowych, jak i kolistych plazmidów niosących przynajmniej jedną sekwencję *parS*. Stabilność innych liniowych plazmidów również wydaje się zależeć od homologów typowych białek partycyjnych, niezależnie od struktury telomerów tych plazmidów (KIM i współaut. 2000, PICARDEAU i współaut. 2000, LE DANTEC i współaut. 2001).

POCHODZENIE LINIOWYCH PLAZMIDÓW BAKTERYJNYCH

Liniowość określonych replikonów bakteryjnych wydaje się być stosunkowo nowym nabytkiem ewolucyjnym. Ograniczenie występowania większości liniowych plazmidów i chromosomów do kilku rodzajów bakterii wskazu-

je na ich pojawienie się u przedstawicieli tych rodzajów w wyniku transferu horyzontalnego lub rekombinacji z wirusowymi cząsteczkami DNA (CASJENS 1999, VOLFF i ALTENBUCHNER 2000).

Liniowe plazmidy o końcach typu inwertronu mogły wyewoluować z bakteriofagów lub też powstać drogą rekombinacji kolistych plazmidów z bakteriofagami (HINNEBUSCH i TILLY 1993). Poparciem takiej hipotezy są podobieństwa rejonów inicjacji replikacji liniowych plazmidów *Streptomyces*, pSLA2 i pSCL1 do rejonów inicjacji replikacji określonych bakteriofagów (CHANG i współaut. 1996). Również podobieństwo produktu genu w rejonie inicjacji replikacji plazmidu pSCP1 *S. coelicolor* do określonych enzymów replikacyjnych bakteriofagów Actinomycetes, może być śladem fagowego pochodzenia części tego plazmidu (REDENBACH i współaut. 1999). Różnorodność replikonów liniowych plazmidów Actinomycetes może świadczyć o tym, że nie powstały one ze wspólnego przodka, ale w wyniku niezależnych zdarzeń rekombinacyjnych kolistych plazmidów z różnymi bakteriofagami.

Chociaż homologie protelomerazy profaga N15 i resolwazy telomerów plazmidów rodzaju *Borrelia* wskazują na wspólne pochodzenie liniowych replikonów bakteryjnych o kowalencyjnie zamkniętych końcach, punkt wyjścia ich ewolucji jest trudny do ustalenia. Intrygująca jest zarówno nieliczna reprezentacja tego typu plazmidów i chromosomów u bakterii, jak i podobieństwo ich końców do końców liniowych cząsteczek DNA dużych wirusów eukariotycznych, takich jak poxwirusy i irydo-

poxwirusy (CASJENS 1999). Zaproponowano, że liniowe plazmidy bakterii z rodzaju *Borrelia* mogły powstać na drodze rekombinacji kolistego plazmidu z DNA irydopoxwirusa (HINNEBUSCH i BARBOUR 1991). Kontakt tych różnych filogenetycznie cząsteczek DNA mógł nastąpić w organizmie wspólnego nosiciela. Bakterie rodzaju *Borrelia* i należący do irydopoxwirusów wirus świnińskiej gorączki afrykańskiej (ASFV) są przenoszone przez różne pajęczaki. Jeden z afrykańskich kleszczy, *Ornithodoros moubata*, jest nosicielem zarówno *B. duttoni*, jak i wirusa ASFV.

Utworzone przez rekombinację liniowe plazmidy mogły podlegać dalszej ewolucji drogą kolejnych procesów rekombinacyjnych z kolistymi plazmidami i z chromosomalnym DNA. Kluczową rolę w ich rozprzestrzenianiu się do innych gatunków tego samego rodzaju bakterii odegrały zapewne procesy koniugacyjne. Większość plazmidów o końcach typu inwertronu to duże plazmidy koniugacyjne. Sereg obserwacji wskazuje zarówno na międzygatunkowe przekazywanie liniowych plazmidów w obrębie poszczególnych rodzajów Actinomycetales, jak i na ich przekazywanie pomiędzy przedstawicielami różnych rodzajów tego rzędu (WIENER i współaut. 1998, LE DANTEC i współaut. 2001). Zaobserwowano również transfer plazmidów *S. coelicolor* i *S. lividans* do *M. smegmatis* drogą spontanicznej transformacji (BHATT i współaut. 2002)

SPECYFIKA EWOLUCJI LINIOWYCH GENOMÓW PLAZMIDOWYCH

Powody stabilnego utrzymywania się liniowych form plazmidowego i chromosomalnego DNA u bakterii takich jak *Borrelia* i *Streptomyces* nie są do końca jasne. Szczególnie zadziwia fakt, że mimo wysokiej częstości spontanicznych konwersji liniowych form DNA do form kolistych, liniowość chromosomów i określonych plazmidów wydaje się niezmienną cechą u naturalnych izolatów tych bakterii (VOLFF i ALTENBUCHNER 2000, CASJENS 1999). Możliwe, że duże delecje towarzyszące cyrkularyzacji w warunkach naturalnych powodują utratę genów korzystnych dla wzrostu komórek.

Zaletą liniowych genomów jest niewątpliwie brak możliwości multimeryzacji cząsteczek DNA na skutek rekombinacji pomiędzy ich homologicznymi fragmentami. Towarzyszy temu brak miejscowo-specyficznych systemów rekombinacyjnych zdolnych do rozdzie-

lania multimerów i typowych dla genomów występujących w formie kolistych cząsteczek DNA (patrz art. U. ZIELENKIEWICZ i P. CEGŁOWSKIEGO w tym zeszycie KOSMOSU). Być może właśnie brak takich systemów decyduje o niestabilności kolistych plazmidów i chromosomów powstałych spontanicznie z pierwotnych form liniowych.

Liniowość ułatwia wymianę fragmentów pomiędzy różnymi cząsteczkami DNA. Zarówno u bakterii rodzaju *Streptomyces*, jak i *Borrelia* zaobserwowano wymianę końców pomiędzy liniowymi plazmidami lub liniowymi plazmidami i chromosomem na skutek pojedynczej rekombinacji DNA. Koniugacyjny transfer plazmidów zawierających chromosomalne fragmenty DNA daje łatwą możliwość przenoszenia tych fragmentów do innych gatunków tego samego lub pokrewnych rodzajów bakte-

rii. Geny zlokalizowane blisko końców liniowych cząsteczek DNA podlegają częstszym wymianom niż geny w pobliżu centrum cząsteczki, prawdopodobnie ze względu na zwiększone prawdopodobieństwo zatrzymania w cząsteczkach rekombinantów rejonów kodujących niezbędne funkcje. Dlatego uważa się, że reiony telomerowe są jednocześnie rejonami zwiększonej plastyczności genomowej. Pozwala to na różne tempo ewolucji genów w zależności od ich lokalizacji w liniowej cząsteczce DNA. Konsekwentnie najbardziej niezbędne i konserwatywne ewolucyjnie funkcje liniowych plazmidów i chromosomów bak-

teryjnych kodowane są na ogół przez centralne fragmenty ich DNA. W rejonach blisko końców zaobserwowano zadziwiająco dużo tzw. pseudogenów. Przyspieszone tempo ewolucji określonych rejonów liniowych cząsteczek DNA ma znaczenie dla szybkiego przystosowywania *Streptomyces* i *Borrelia* do zmian warunków w naturalnych środowiskach życia tych bakterii. W przypadku *Borrelia* ma ono szczególną wartość dla tzw. zmienności antygenowej (ang. antigenic variation), pozwalającej bakteriom na unikanie ataków ze strony systemu immunologicznego ich zainfekowanego gospodarza.

LINEAR BACTERIAL PLASMIDS

S u m m a r y

Completion of linear DNA replication requires a way to restore the original sequence and structure of linear DNA ends which can not be fully replicated by conventional DNA polymerases. In bacteria, the end replication problem has been circumvented through the use of circular plasmids and chromosomes. However linear bacterial plasmids and chromosomes have also been isolated. Their ends, commonly known as prokaryotic telomers, differ in structure from the ends of eukaryotic chromosomes and, during replication, become restored to their original form by a different mechanism. Two kinds of linear plasmids have been isolated: plasmids with covalently closed hairpin ends, and plasmids with invertron ends, which contain proteins bound to their 5' termini. The latter constitute the larger group and are commonly found in actinomycetous bacteria. They are usually conjugative and confer advantageous phenotypes. Plasmids with covalently closed ends are common in spirochetes of

the genus *Borrelia*. A model plasmid of this group is prophage N15 of *Escherichia coli*, which exists in lysogens as a linear DNA molecule. The major difference between circular and linear plasmids is the presence in the latter of linear ends and proteins that specifically recognize those ends and are able to restore plasmid linearity during or after replication. Complete replication of invertron telomers depends on their 5' end-associated proteins but its mechanism is still unclear. Plasmids with covalently closed ends are completely replicated from an internal origin to form circular dimeric molecules that can be observed as replication intermediates. Further processing of the intermediates depends on telomere resolution, a DNA breakage and reunion reaction, in which opposite strands of replicated telomeres are cleaved and re-joined to form covalently closed ends of two progeny molecules.

LITERATURA

- BAO K., COHEN S. N., 2001. *Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in Streptomyces*. Genes Dev. 15, 1518-1527.
- BERGERON H., LABBE D., TURMEL C., LAU P. C., 1998. *Clooning, sequence and expression of a linear plasmid-based and a chromosomal homolog of chloroacetaldehyde dehydrogenase-encoding genes in Xanthobacter autotrophicus GJ10*. Gene 207, 9-18.
- BEY S. J., TSOU M. F., HUANG C. H., YANG C. C., CHEN C. W., 2000. *The homologous terminal sequence of the Streptomyces lividans chromosome and SLP2 plasmid*. Microbiology 146, 911-922.
- BHATT A., KIESER H. M., MELTON R. E., KIESER T., 2002. *Plasmid transfer from Streptomyces to Mycobacterium smegmatis by spontaneous transformation*. Mol. Microbiol. 43, 135-146.
- BROWN S. E., KNUDSON D. L., ISHIMARU C. A., 2002. *Linear plasmid in the genome of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. J. Bacteriol. 184, 2841-2844.
- CALCUTT M. J., SCHMIDT F. J., 1992. *Conserved gene arrangement in the origin region of the Streptomyces coelicolor chromosome*. J. Bacteriol. 174, 3220-3226.
- CASJENS S., 1999. *Evolution of the linear DNA replicons of the Borrelia spirochetes*. Curr. Opin. Microbiol. 2, 529-534.
- CASJENS S., MURPHY M., DE LANGE M., SAMPSON L., VAN VUGT R., HUANG W. M., 1997. *Telomeres of the linear chromosomes of Lyme disease spirochaetes: nucleotide sequence and possible exchange with linear plasmid telomeres*. Mol. Microbiol. 26, 581-596.
- CASJENS S., PALMER N., VAN VUGT R., HUANG W. M., STEVENSON B., ROSA P., LATHIGRA R., SUTTON G.,

- PETERSON J., DODSON R. J., HAFT D., HICKEY E., GWINN M., WHITE O., FRASER C. M., 2000. *A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi*. Mol. Microbiol. 35, 490–516.
- CHACONAS G., STEWART P. E., TILLY K., BONO J. L., ROSA P., 2001. *Telomere resolution in the Lyme disease spirochete*. EMBO J. 20, 3229–3237.
- CHANG P. C., COHEN S. N., 1994. *Bidirectional replication from an internal origin in a linear Streptomyces plasmid*. Science 265, 952–954.
- CHANG P. C., KIM E. S., COHEN S. N., 1996. *Streptomyces linear plasmids that contain a phage-like, centrally located, replication origin*. Mol. Microbiol. 22, 789–800.
- CHEN C. W., YU T. W., LIN Y. S., KIESER H. M., HOPWOOD D. A., 1993. *The conjugative plasmid SLP2 of Streptomyces lividans is a 50 kb linear molecule*. Mol. Microbiol. 7, 925–932.
- DABROCK B., KESSELER M., AVERHOFF B. i GOTTSCHALK G., 1994. *Identification i characterization of a transmissible linear plasmid from Rhodococcus erythropolis BD2 that encodes isopropylbenzene and trichloroethene catabolism*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 853–860.
- DENEKE J., ZIEGELIN G., LURZ R., LANKA E., 2000. *The protelomerase of temperate Escherichia coli phage N15 has cleaving-joining activity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 7721–7726.
- DENEKE J., ZIEGELIN G., LURZ R., LANKA E., 2002. *Phage N15 telomere resolution. Target requirements for recognition and processing by the protelomerase*. J. Biol. Chem. 277, 10410–10419.
- FERDOWS M. S., SERWER P., GRIESS G. A., NORRIS S. J., BARBOUR A. G., 1996. *Conversion of a linear to a circular plasmid in the relapsing fever agent Borrelia hermsii*. J. Bacteriol. 178, 793–800.
- FISCHER G., HOLL A. C., VOLFF J. N., VIEWIELE D., DECARIS B., LEBLOND P., 1998. *Replication of the linear chromosomal DNA from the centrally located oriC of Streptomyces ambofaciens revealed by PFGE gene dosage analysis*. Res. Microbiol. 149, 203–210.
- FUKUDA M., SHIMIZU S., OKITA N., SETO M., MASAI E., 1998. *Structural alteration of linear plasmids encoding the genes for polychlorinated biphenyl degradation in Rhodococcus strain RHA1*. Antonie Van Leeuwenhoek, 74, 169–173.
- GOETHALS K., VEREECKE D., JAZIRI M., VAN MONTAGU M. i HOLSTERS M., 2001. *Leafy gall formation by Rhodococcus fascians*. Annu. Rev. Phytopathol. 39, 27–52.
- GOODNER B., HINKLE G., GATTUNG S., MILLER N., BLANCHARD M., QUOROLLO B., GOLDMAN B. S., CAO Y., ASKENAZI M., HALLING C., MULLIN L., HOUMIEL K., GORDON J., VAUDIN M., IARTCHOUK O., EPP A., LIU F., WOLLAM C., ALLINGER M., DOUGHTY D., SCOTT C., LAPPAS C., MARKELZ B., FLANAGAN C., CROWELL C., GURSON J., LOMO C., SEAR C., STRUB G., CIELO C., SLATER S., 2001. *Genome sequence of the plant pathogen i biotechnology agent Agrobacterium tumefaciens C58*. Science 294, 2323–2328.
- GOSHI K., UCHIDA T., LEZHAVA A., YAMASAKI M., HIRATSU K., SHINKAWA H., KINASHI H., 2002. *Cloning and analysis of the telomere i terminal inverted repeat of the linear chromosome of Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 184, 3411–3415.
- GRAVIUS B., GLOCKER D., PIGAC J., PIZA K., HRANUELI D., CULLUM J., 1994. *The 387 kb linear plasmid pPZG101 of Streptomyces rimosus and its interactions with the chromosome*. Microbiology 140, 2271–2277.
- GRIGORIEV P., ŁOBOCKA M. B., 2001. *Determinants of segregational stability of the linear plasmid prophage N15 of Escherichia coli*. Mol. Microbiology 42, 355–368.
- HINNEBUSCH J., BARBOUR A. G., 1991. *Linear plasmids of Borrelia burgdorferi have a telomeric structure and sequence similar to those of a eukaryotic virus*. J. Bacteriol. 173, 7233–7239.
- HINNEBUSCH J., TILLY K., 1993. *Linear plasmids and chromosomes in bacteria*. Mol. Microbiol. 10, 917–922.
- HIRATSU K., MOCHIZUKI S., KINASHI H., 2000. *Cloning i analysis of the replication origin and the telomeres of the large linear plasmid pSLA2-L in Streptomyces rochei*. Mol. Gen. Genet. 263, 1015–1021.
- HUANG C. H., LIN Y. S., YANG Y. L., HUANG S. W., CHEN C. W., 1998. *The telomeres of Streptomyces chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures*. Mol. Microbiol. 28, 905–916.
- KALKUS J., DORRIS C., FISCHER D., REH M., SCHLEGEL H. G., 1993. *The giant linear plasmid pHG207 from Rhodococcus sp. encoding hydrogen autotrophy: characterization of the plasmid and its termini*. J. Gen. Microbiol. 139, 2055–2065.
- KALKUS J., MENNE R., REH M., SCHLEGEL H. G., 1998. *The terminal structures of linear plasmids from Rhodococcus opacus*. Microbiology 144, 1271–1279.
- KESSELER M., DABBS E. R., AVERHOFF B., GOTTSCHALK G., 1996. *Studies on the isopropylbenzene 2,3-dioxygenase and the 3-isopropylcatechol 2,3-dioxygenase genes encoded by the linear plasmid of Rhodococcus erythropolis BD2*. Microbiology 142, 3241–3251.
- KIESER H. M., KIESER K. T., HOPWOOD D. A., 1992. *A combined genetic and physical map of the Streptomyces coelicolor A3(2) chromosome*. J. Bacteriol. 174, 5496–5507.
- KING A. J., VAN DER VLIET P. C., 1994. *A precursor terminal protein-trinucleotide intermediate during initiation of adenovirus DNA replication: regeneration of molecular ends in vitro by a jumping back mechanism*. EMBO J. 13, 5786–5792.
- KOBYRN K., CHACONAS G., 2001. *The circle is broken: telomere resolution in linear replicons*. Curr. Opin. Microbiol. 4, 558–564.
- KOBYRN K., CHACONAS G., 2002. *ResT, a telomere resolvase encoded by the Lyme disease spirochete*. Mol. Cell 9, 195–201.
- KRUM J. G., ENSIGN S. A., 2001. *Evidence that a linear megaplasmid encodes enzymes of aliphatic alkene and epoxide metabolism i coenzyme M 2-mercaptoethanesulfonate biosynthesis in Xanthobacter strain Py2*. J. Bacteriol. 183, 2172–2177.
- LE DANTEC C., WINTER N., GICQUEL B., VINCENT V., PICARDEAU M., 2001. *Genomic sequence and trans-*

- criptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems.* J. Bacteriol. 183, 2157–2164.
- MASAI E., SUGIYAMA K., IWASHITA N., SHIMIZU S., HAUSCHILD J. E., HATTA T., KIMBARA K., YANO K., FUKUDA M., 1997. *The bphDEF meta-cleavage pathway genes involved in biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation are located on a linear plasmid and separated from the initial bphACB genes in Rhodococcus sp. strain RHA1.* Gene 187, 141–149.
- MEIJER W. J., HORCAJADAS J. A., SALAS M., 2001. *Phi29 family of phages.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 261–287.
- MEINHARDT F., SCHAFFRATH R., LARSEN M., 1997. *Microbial linear plasmids.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 329–336.
- MUSIALOWSKI M. S., FLETT F., SCOTT G. B., HOBBS G., SMITH C. P., OLIVER S. G., 1994. *Functional evidence that the principal DNA replication origin of the Streptomyces coelicolor chromosome is close to the dnaA-gyrB region.* J. Bacteriol. 176, 5123–5125.
- NETOLITZKY D. J., WU X., JENSEN S. E., ROY K. L., 1995. *Giant linear plasmids of beta-lactam antibiotic producing Streptomyces.* FEMS Microbiol. Lett. 131, 27–34.
- PALMER N., FRASER C., CASJENS S., 2000. *Distribution of twelve linear extrachromosomal DNAs in natural isolates of Lyme disease spirochetes.* J. Bacteriol. 182, 2476–2480.
- PIZA K., PFALZER G., CULLUM J., HRANUELI D., 1997. *Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of Streptomyces rimosus lies close to one end of the linear chromosome.* Microbiology 143, 1493–1501.
- PIZA S., BIUKOVIC G., PARAVIC A., DADBIN A., CULLUM J., HRANUELI D., 1998. *Recombination between the linear plasmid pPZG101 and the linear chromosome of Streptomyces rimosus can lead to exCHANGE of ends.* Mol. Microbiol. 28, 1165–1176.
- PANG X., SUN Y., LIU J., ZHOU X., DENG Z., 2002. *A linear plasmid temperature-sensitive for replication in Streptomyces hygroscopicus 10-22.* FEMS Microbiol. Lett. 208, 25–28.
- PICARDEAU M., LE DANTEC C., VINCENT V., 2000. *Analysis of the internal replication region of a mycobacterial linear plasmid.* Microbiology 146, 305–313.
- PICARDEAU M., VINCENT V., 1997. *Characterization of large linear plasmids in mycobacteria.* J. Bacteriol. 179, 2753–2756.
- PICARDEAU M., VINCENT V., 1998. *Mycobacterial linear plasmids have an invertion-like structure related to other linear replicons in actinomycetes.* Microbiology 144, 1981–1988.
- QIN Z., COHEN S. N., 1998. *Replication at the telomeres of the Streptomyces linear plasmid pSLA2.* Mol. Microbiol. 28, 893–903.
- RAVEL J., DIRUGGIERO J., ROBB F. T., HILL R. T., 2000. *Cloning and sequence analysis of the mercury resistance operon of Streptomyces sp. Strain CHR28 reveals a novel putative second regulatory gene.* J. Bacteriol. 182, 2345–2349.
- RAVEL J., SCHREMPF H., HILL R. T., 1998. *Mercury resistance is encoded by transferable giant linear plasmids in two chesapeake bay Streptomyces strains.* Appl. Environ. Microbiol. 64, 3383–3388.
- RAVIN N. V., STRAKHOVA T. S., KUPRIANOV V. V., 2001. *The protelomerase of the phage-plasmid N15 is responsible for its maintenance in linear form.* J. Mol. Biol. 312, 899–906.
- RAVIN V., RAVIN N., CASJENS S., FORD M. E., HATFULL G. F., HENDRIX R. W., 2000. *Genomic sequence and analysis of the atypical temperate bacteriophage N15.* J. Mol. Biol. 299, 53–73.
- REDENBACH M., BIBB M., GUST B., SEITZ B., SPYCHAJ A., 1999. *The linear plasmid SCP1 of Streptomyces coelicolor A3(2) possesses a centrally located replication origin and shows significant homology to the transposon Tn4811.* Plasmid 42, 174–185.
- ROUSSEL Y., COLMIN C., SIMONET J. M., DECARIS B., 1993. *Strain characterization, genome size and plasmid content in the Lactobacillus acidophilus group (Hansen i Mocquot).* J. Appl. Bacteriol. 74, 549–556.
- RYBCHIN V. N., SVARCHEVSKY A. N., 1999. *The plasmid prophage N15: a linear DNA with covalently closed ends.* Mol. Microbiol. 33, 895–903.
- SVEKI H., AKIRA M., FURUHASHI K., AVERHOFF B., GOTTSCHALK G., 1999. *Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in Rhodococcus corallinus (Nocardia corallina) B-276.* Microbiology 145, 1721–1730.
- SAKAGUCHI K., 1990. *Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adeno-type viruses.* Microbiol. Rev. 54, 66–74.
- SALAS M., 1999. *Mechanisms of initiation of linear DNA replication in prokaryotes.* Genet. Eng. 21, 159–171.
- SHIFFMAN D., COHEN S. N., 1992. *Reconstruction of a Streptomyces linear replicon from separately cloned DNA fragments: existence of a cryptic origin of circular replication within the linear plasmid.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6129–6133.
- SHIMIZU S., KOBAYASHI H., MASAI E., FUKUDA M., 2001. *Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, Rhodococcus sp. strain RHA1.* Appl. Environ. Microbiol. 67, 2021–2028.
- SPATZ K., KOHN H., REDENBACH M., 2002. *Characterization of the Streptomyces violaceoruber SANK95570 plasmids pSV1 and pSV2.* FEMS Microbiol. Lett. 213, 87–92.
- STOLL A., HORVAT L. I., LOPES-SHIKIDA S. A., PADILLA G., CULLUM J., 2000. *Isolation and cloning of Streptomyces terminal fragments.* Antonie Van Leeuwenhoek, 78, 223–236.
- TAKAHASHI Y., CUTLER S. J., FUKUNAGA M., 2000. *Size conversion of a linear plasmid in the relapsing fever agent Borrelia duttonii.* Microbiol. Immunol. 44, 1071–1074.
- UZ I., DUAN Y. P., OGRAM A., 2000. *Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, Rhodococ-*

- cus opacus* M213. FEMS Microbiol. Lett. 185, 231–238.
- VOLFF J. N., ALTENBUCHNER J., 2000. *A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution*. FEMS Microbiol. Lett. 186, 143–150.
- WIENER P., EGAN S., HUDDLESTON A. S., WELLINGTON E. M., 1998. *Evidence for transfer of antibiotic-resistance genes in soil populations of streptomyces*. Mol. Ecol. 7, 1205–1216.
- WILLEMS H., JAGER C., BALJER G., 1998. *Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium Coxiella burnetii*. J. Bacteriol. 180, 3816–3822.
- YANG C. C., HUANG C. H., LI C. Y., TSAY Y. G., LEE S. C., CHEN C. W., 2002. *The terminal proteins of linear Streptomyces chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins*. Mol. Microbiol. 43, 297–305.
- YANG M. C., LOSCICK R., 2001. *Cytological evidence for association of the ends of the linear chromosome in Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol. 183, 5180–5186.
- ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA J., SCHREMPF H., 1992. *Characterization of an autonomously replicating region from the Streptomyces lividans chromosome*. J. Bacteriol. 174, 2688–2693.