

URSZULA ZIELENKIEWICZ i PIOTR CEGŁOWSKI

*Zakład Biochemii Drobnoustrojów
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
e-mail: ulazet@ibb.waw.pl
e-mail: piotr106@ibb.waw.pl*

MECHANIZMY STABILNEGO DZIEDZICZENIA PLAZMIDÓW

LOSOWY I LEPSZY NIŻ LOSOWY ROZDZIAŁ PLAZMIDÓW DO KOMÓREK POTOMNYCH

Podczas podziału komórek bakterii istniejące w nich plazmidy ulegają segregacji do komórek potomnych. Naturalnie występujące plazmidy bakteryjne są niezwykle trwale dziedziczone przez komórki potomne i to w warunkach braku presji selekcyjnej. Plazmidy małe, o wielkości nie przekraczającej kilku tysięcy par zasad, zawdzięczają to po prostu znacznej liczbie kopii w jakiej występują w komórce. Stwierdzenie to stanie się jasne przy założeniu, że plazmidy mogą „rozchodzić się” do komórek potomnych w sposób losowy. Wtedy prawdopodobieństwo, że dany plazmid nie znajdzie się w komórce potomnej wynosi 0.5. Jeżeli w dzielącej się komórce występuje n cząsteczek plazmidowych (liczba kopii = n) to prawdopodobieństwo, że żaden z nich nie trafi do komórki potomnej wynosi $(0.5)^n$. Ponieważ każdy podział komórkowy prowadzi do powstania dwóch komórek, to prawdopodobieństwo, że którakolwiek z nich nie będzie zawierać plazmidu (czyli tzw. częstość segregacji plazmidu) wynosi: $P = 2(0.5)^n = 2^{(1-n)}$ (NORDSTRÖM i AUSTIN 1989). Używając powyższego równania porównajmy dwa plazmidy, z których jeden występuje w dwóch, a drugi w dwudziestu kopiach w komórce. Komórki bezplazmidowe powinny pojawić się w przypadku pierwszego z nich już po zejściu dwóch podziałów, a w przypadku drugiego z nich częstość segregacji wynosi mniej niż 10^{-6} , a więc jest praktycznie niewykrywalna.

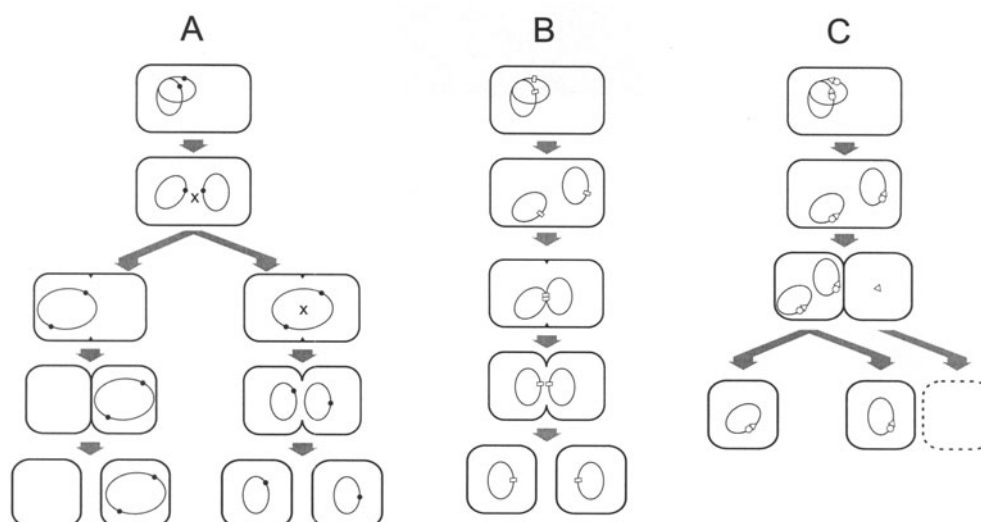
W naturze, również plazmidy występujące w niskiej liczbie kopii są niezwykle trwale utrzymywane w populacjach bakteryjnych, niezależnie od braku presji selekcyjnej. Oznacza to, że muszą istnieć specyficzne mechanizmy skutecznie przeciwdziałające utracie plazmidów przez dzielące się komórki. Mechanizmy te można podzielić, w zależności od sposobu działania, na trzy grupy: A, B i C (Ryc. 1).

Do grupy A należą systemy miejscowo-specyficznej rekombinacji, dzięki którym, formy oligomeryczne plazmidów powstałe głównie na drodze rekombinacji pomiędzy plazmidami, są rozdzielane na pojedyncze cząsteczki plazmidowe, podlegające następnie losowej dystrybucji do komórek potomnych.

Grupa B obejmuje systemy aktywnego rozdziału plazmidów (tzw. partycji) do dzielących się komórek zapewniające, że w trakcie podziału każda komórka potomna otrzyma plazmid.

W grupie C występują tzw. mechanizmy adykcyjne, a więc uzależniające komórki gospodarzy od występujących w nich plazmidów. Powodują one śmierć lub zahamowanie wzrostu powstałych po podziale komórek bezplazmidowych.

Należy podkreślić, że mechanizmy grupy A wspomagają jedynie rozdział losowy plazmidów, podczas gdy te z grup B i C zapewniają dziedziczenie lepsze niż losowe. Ponadto, o ile mechanizmy A i B mają bezpośredni wpływ na



Ryc. 1. Mechanizmy stabilnego dziedziczenia plazmidów.

Dla uproszczenia wszystkie trzy mechanizmy przedstawiono dla plazmidów występujących w jednej kopii w przeliczeniu na chromosom gospodarza. (A) Miejscowo-specyficzna rekombinacja; ciemne kółka na plazmidach oznaczają miejsca *res*; litera x pomiędzy plazmidami lub wewnątrz dimeru plazmidowego oznacza zachodzenie rekombinacji. (B) Partycja; jasne prostokąty oznaczają tzw. miejsca centromerowe. (C) Mechanizm addykcyjny czyli po-segregacyjne zabijanie komórek bezplazmidowych; kontury narysowane przerywaną linią oznaczają śmierć komórki na skutek utraty plazmidu.

tzew. stabilność segregacyjną plazmidu i działają na poziomie komórkowym, to mechanizm C – poprzez eliminację komórek pozbawionych plazmidów – działa na poziomie populacyjnym. Czasem u plazmidów, które zazwyczaj występują w 1–2 kopiach w przeliczeniu na chromosom gospodarza, funkcjonują wszystkie trzy rodzaje mechanizmów wspomagających dziedziczenie, a niektóre z nich mogą być jeszcze zduplikowane, co prowadzi, całkowicie na przekór

regułom rachunku prawdopodobieństwa, do ich niezwyklej stabilności segregacyjnej.

Poniżej nieco bardziej szczegółowo omówimy mechanizmy z grup A i C, natomiast systemom partycji plazmidów poświęcony jest artykuł M. ŁOOCKIEJ i współautorów w tym zeszycie KOSMOSU. Tutaj należy jedynie podkreślić, że systemy z grupy B są niezwykle precyzyjne i skutecznie zapewniają wysoką stabilność segregacyjną plazmidów.

SYSTEMY MIEJSCOWO-SPECYFICZNEJ REKOMBINACJI

Identyczne kopie plazmidów często ulegają między sobą rekombinacji i tworzą tym samym tzw. dimery lub formy oligomeryczne wyższego rzędu (trimery, tetramery itd.). Tym samym zmniejsza się liczba jednostek plazmidowych podlegających segregacji do komórek potomnych. Warto tu zaznaczyć, że system kontroli liczby kopii plazmidu, który działa poprzez „odliczanie” miejsc startu replikacji (*ori*) „nie dostrzega”, że np. w dimerze dwa *ori* występują w jednej cząsteczce DNA i nie uruchamia mechanizmów korygujących liczbę kopii plazmidu. Natomiast, ponieważ *ori* wybierane są losowo do replikacji, prawdopodobieństwo wybrania w mieszaninie monomerów i dimerów plazmidowych danego *ori* do replikacji jest dla dimeru 2-razy wyższe niż dla monome-

ru. W konsekwencji, liczba powstających dimerów będzie wzrastać. Wynikiem tej sytuacji, określanej mianem „katastrofy dimerowej” (SUMMERS i współaut. 1993) jest częstsze niż oczekiwane powstawanie komórek bezplazmidowych.

Bardzo często plazmidy kodują specjalny system miejscowo-specyficznej rekombinacji, tzw. *mrs* (ang. multimer resolution system) skutecznie przeciwdziałający utrzymywaniu się form multimerycznych plazmidów w komórce. Proces przekształcania ich w formy monomeryczne odbywa się na drodze wewnątrzplazmidowej rekombinacji. Przeprowadzają go miejscowo-specyficzne rekombinazy (tzw. resolwazy) rozpoznające określone miejsca w plazmidach, tzw. sekwencje *res*, które obejmują zwy-

kle kilkadziesiąt par zasad. Systemy *mrs* są zazwyczaj w całości kodowane przez plazmidy (np. *loxP-cre* plazmidu P1, AUSTIN i współaut. 1981; *parCBA* plazmidu RK2, GRINTER i współaut. 1989). Znane są jednak przypadki, że plazmid (np. plazmid ColE1) zawiera tylko miejsce *res*, a do rozdziału oligomerów wykorzystuje rekombinazę kodowaną przez genom gospodarza (SUMMERS i SHERRATT 1984). Zdarza się też, że kodowany przez plazmid system *mrs* wymaga chromosomalnego histono-podobnego

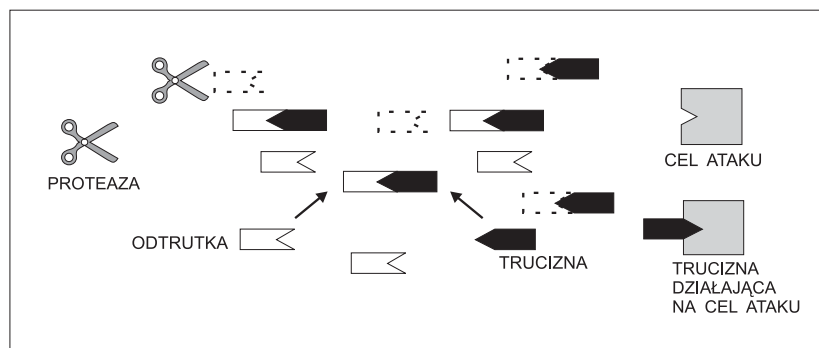
białka komórkowego (np. białko Hbsu *B. subtilis* dla rekombinazy beta plazmidu pSM19035, ALONSO i współaut. 1995).

Systemy miejscowo-specyficznej rekombinacji są często jedynymi dodatkowymi mechanizmami stabilizującymi plazmidy występujące w średniej (15-30) liczbie kopii. Jednakże, w połączeniu z precyzyjną, pozbawioną fluktuacji kontrolą liczby kopii skutecznie zapobiegają one utracie plazmidów z populacji (SUMMERS 1998).

SYSTEMY ADDYKCYJNE

Chociaż powyżej opisane procesy zasadniczo zapewniają trwałe dziedziczenie plazmidów, to jednak z niską częstością pojawiają się komórki bezplazmidowe. Brak plazmidu zmniejsza obciążenie metaboliczne komórki co powoduje, że bezplazmidowe bakterie dzieląc się szybciej zdominowałyby całą populację doprowadzając praktycznie do eliminacji komórek plazmidowych. Bardzo szczególnym sposobem uniknięcia takiej sytuacji jest działanie systemów addykcyjnych, zwanych również systemami po-segregacyjnego zabijania komórek bezplazmidowych, trucizny i od-

truczyny. Trucizna zawsze jest białkiem, a odtrutką może być albo białko albo tzw. antysensowny RNA. W komórce posiadającej plazmid przebiega ciągła, kontrolowana synteza odtrutki zapewniająca jej nadmiar, dzięki czemu komórka jest chroniona przed działaniem trucizny. Jednakże, z chwilą utraty plazmidu, ilość odtrutki szybko się zmniejsza na skutek degradacji przez odpowiedni enzym hydrolityczny i dochodzi do syntezy lub uwolnienia z kompleksu aktywnej trucizny. Pozbawiona plazmidu komórka więc ginie, a w populacji pozostaną jedynie komórki zawierające plazmid (Ryc. 2).



Ryc. 2. Funkcjonowanie plazmidowych systemów addykcyjnych u bakterii.

Na przedstawionym schemacie trucizna i odtrutka są białkami. Kontur narysowany przerywaną linią oznacza degradację odtrutki przez specyficzną proteazę.

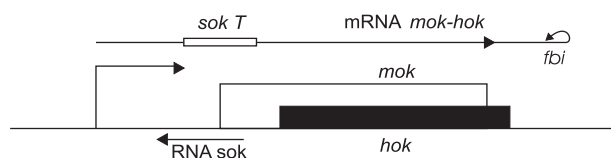
trutki, czy zaprogramowanej śmierci komórkowej. Systemy te doprowadzają do eliminacji komórki potomnej jeżeli nie odziedziczyła ona plazmidu. Ideę addykcji, czyli uzależnienia komórek od własnych plazmidów zaproponował Koyama (KOYAMA i współaut. 1975) zauważając, że jeżeli komórka tracąca plazmid ginie, to w populacji nigdy nie znajdzie się pozbawionego plazmidów potomstwa.

Molekularną podstawą funkcjonowania systemów addykcyjnych jest istnienie przynajmniej dwóch genów plazmidowych, warunkujących powstawanie trwałego czynnika toksycznego oraz odtrutki – nietrwałego czynnika przeciwdziałającego powstawaniu lub działa-

SYSTEMY ADDYKCYJNE REGULOWANE PRZEZ ANTYSSENSOWNY RNA

Systemy addykcyjne regulowane przez antysensowny RNA stanowią spójną grupę określaną mianem rodziny *hok-sok* (ang. host killing, suppression of killing) opisujących geny znalezione na plazmidzie R1 *E. coli*. Model organizacji genetycznej locus *hok-sok* przedstawiono na Ryc. 3. Zawiera on trzy nakładające się geny: *hok* – kodujący truciznę, *mok* – regulujący translację trwałego mRNA trucizny oraz *sok* – kodujący nietrwały, antysensowny RNA, który jest komplementarny do obszaru 5' mRNA *mok-hok*. mRNA trucizny zawdzięcza swoją wysoką trwałość występującej na jego

końcu 3' strukturze *fbi* (ang. fold back inhibition). Ekspresja genu *hok* jest negatywnie regulowana przez RNA Sok, który łącząc się z komplementarnym odcinkiem mRNA genu *mok* sprawia, że utworzony kompleks, reprezen-



Ryc. 3. Schemat systemu *hok-sok* kodowanego przez plazmid R1.

Miejsce SokT w mRNA *mok-hok* oznacza region komplementarny dla RNA Sok. W tym miejscu powstaje dwuniciowy RNA, który jest degradowany przez RNazę III.

tujący dwuniciowy RNA, jest rozcinany przez RNazę III i tym samym nie dochodzi do translacji białek Mok i Hok. W komórce bezplazmidowej istniejący RNA Sok zostaje zdegradowany, a niezwiązany mRNA *hok* ulega translacji. Powstające małe, zbudowane z 52 aminokwasów, błonowe białko Hok powoduje śmierć komórek poprzez zahamowanie oddychania, obniżenie potencjału błonowego i wpływ związków niskocząsteczkowych (THISTED i współaut. 1995). Homologiczne geny *hok-sok* odnajdowane są na licznych plazmidach bakterii Gram-ujemnych, a także w chromosomach wielu bakterii, gdzie ich ewentualna funkcja stanowi prawdziwą zagadkę.

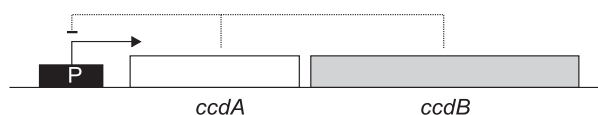
Niedawno odkryto podobnie regulowany poprzez antysensowny RNA, lecz niehomologiczny do rodziny *hok-sok*, system stabilizacji plazmidów u bakterii Gram-dodatnich: *par* plazmidu pAD1 z *Enterococcus faecalis* (WEAVER i współaut. 1996). Region *par* koduje dwa przeciwstawnie transkrybowane RNA: dłuższy RNA I zawierający gen toksyny *fst* (ang. faecalis plasmid-stabilizing peptide) oraz krótszy RNA II, komplementarny do RNA I. Utworzenie kompleksu obu RNA hamuje wytwarzanie trucizny poprzez uniemożliwienie dostępu rybosomów do sekwencji inicjacji translacji *fst*. Również w tym przypadku czas trwania czynnika zabezpieczającego RNA II jest znacznie krótszy niż RNA I. Zarówno nadprodukcja RNA I, jak i peptydu Fst powoduje śmierć komórek, przed którą chroni dostarczenie nadmiaru RNA II (GREENFIELD i współaut. 2000).

BIAŁKOWE SYSTEMY ADDYKCYJNE

W tym przypadku oba składniki systemu przeciwdziałającego utracie plazmidów są białkami. Organizacja genetyczna białkowych kaset stabilizujących plazmidy jest zasadniczo podobna – dwa (niekiedy trzy) geny stanowią operon. Bardzo istotną cechą tych operonów jest autoregulacja transkrypcji: białko odtrutki samo lub w kompleksie z trucizną działa jako represor. Wyjątkowo, w autoregulacji addykcyjnego systemu ω - ϵ - ζ plazmidu pSM19035 z *Streptococcus pyogenes* nie biorą udziału ani odtrutka ani trucizna, lecz oddzielne białko regulatorowe (DE LA HOZ i współaut. 2000).

Białka systemów addykcyjnych, poza jednym wyjątkiem, są raczej małe (70–130 aminokwasów), przy czym prawie zawsze białka trucizn są nieco większe od białek odtrutek (Tabela 1). Chociaż strukturalne i funkcjonalne podobieństwo licznych systemów addykcyjnych jest wyraźne, nie ma znaczących podobieństw sekwencji ich genów. Natomiast często odnajduje się prawie identyczne kasetki stabilizujące wśród plazmidów pokrewnych, co zapewne jest odbiciem horyzontalnego transferu genów pomiędzy różnymi bakteriami i plazmidami (GERDES 2000).

Jednym z najlepiej poznanych systemów działających według przedstawionego powyżej schematu jest system addykcyjny *ccd* jednokopijnego plazmidu *E. coli*. Początkowo został opisany jako uzależniający podział komórkowy od wcześniejszego zreplikowania plazmidu (ang. coupled cell division, OGURA i HIRAGA 1983), a następnie jako stabilizujący utrzymywanie plazmidu poprzez eliminowanie komórek bezplazmidowych (ang. control of cell death, JAFFE i współaut. 1985). W *locus ccd* gen odtrutki *ccdA* poprzedza gen trucizny *ccdB*. Ekspresja operonu jest negatywnie regulowana poprzez kompleks białek CcdA i CcdB (Ryc. 4). Białko toksyny CcdB doprowadza do



Ryc. 4. Schemat systemu *ccd* kodowanego przez plazmid F.

Zgięta strzałka wychodząca z miejsca P oznacza promotor transkrypcji. Jego aktywność jest reprimowana przez kompleks utworzony przez produkty genów *ccdA ccdB*.

śmierci komórek przez zablokowanie funkcjonowania gyrazy – enzymu wprowadzającego dodatkowe skręty w helisie DNA. Funkcjonowanie gyrazy jest niezbędne w wielu procesach komórkowych, takich jak transkrypcja, rekombinacja czy rozdział chromosomów do komórek potomnych. CcdB wiąże się trwale zarówno do wolnej gyrazy, blokując jej aktywność, jak i do kompleksu gyrazy z naciętym DNA uniemożliwiając ponowne jego złączenie. Powstałe w ten sposób pęknięcia w DNA wywołują alarmową reakcję komórki, tzw. odpowiedź SOS, polegającą m.in. na indukcji wielu białek naprawy DNA. Niemożność usunięcia uszkodzeń wywołanych zablokowaniem aktywności gyrazy powoduje wstrzymanie podziałów komórkowych, a następnie śmierć komórek.

Warto zaznaczyć, że system *ccd* nie jest jedynym przyczyniającym się do trwałego utrzymywania plazmidu F. Poza nim, plazmid F posiada kilka miejscowo-specyficznych rekombinaz, system partycji *sop* oraz dwa, homologiczne do rodziny *hok-sok*, systemy regulowane antysensownym RNA (NORDSTRÖM i AUSTIN 1989). Niewielki, w porównaniu np. z *sop*, stopień stabilizacji poprzez *ccd*, prawdopodobnie wynika z tego, że wywołuje w pierwszej kolejności odpowiedź SOS, a nie natychmiastową śmierć komórek bezplazmidowych. Postuluje się więc, że jego rolą może być, po części, zapewnienie komórkom zmienności genetycznej (COUTURIER i współaut. 1998).

Pomimo intensywnych badań prowadzonych przez ostatnie lata nad różnymi systemami trucizna-antidotum tylko dla nielicznych z

Tabela 1. Wybrane przykłady białkowych systemów stabilizujących utrzymywanie plazmidów; kompilacja wg GERDESA 2000 oraz ZIELENKIEWICZ i CEGŁOWSKIEGO 2001.

System	Plazmid	Trucizna	Odtrutka	Proteaza degradująca odtrutkę	Cel
<i>ccd</i>	F	CcdB (101)	CcdA (72)	Lon	gyraza
<i>pem/parD</i>	R100/R1	PemK/Kid (110)	PemI/Kis (84)	Lon	helikaza (DnaB)
<i>phd-doc</i>	P1	Doc (126)	Phd (76)	ClpXP	translacja?
<i>parDE</i>	RK2/RP4	ParE (103)	ParD (83)	nieznana	gyraza
<i>pas</i>	pTF-FC2	PasB (90)	PasA (74)	Lon	nieznana
<i>relBE/stbDE</i>	P307/R485	RelE/StbE (95)	RelB/StbD (83)	Lon	translacja?
<i>hig</i>	Rts1	HigB (92)	HigA (104)	nieznana	nieznana
ω - ϵ - ζ	pSM19035	Zeta (287)	Epsilon (90)	nieznana	nieznana

W nawiasach podano wielkości białek w liczbach aminokwasów.

Znane są mutanty nietoksyczne białka CcdB oraz mutanty gyrazy niewrażliwe na tę truciznę. Dzięki temu oraz poznaniu krystalicznej struktury większej podjednostki gyrazy zaproponowano model tworzenia kompleksu GyrA-CcdB, w którym C-końcowy fragment toksyny umieszczony jest w przestrzeni centralnej dimeru gyrazy (LORIS i współaut. 1999).

Odtrutka CcdA nie tylko zapobiega tworzeniu kompleksu CcdB z gyrazą wiążąc się trwale z trucizną, ale uwalnia również CcdB z już istniejących kompleksów. Odtrutka CcdA jest degradowana przez proteazę Lon, a jej okres trwania jest dwukrotnie krótszy niż okres trwania trucizny CcdB.

nich udało się ustalić molekularny mechanizm działania trucizny. Obok opisanego powyżej mechanizmu działania białka CcdB plazmidu F poznano także cel ataku trucizny systemu *pemI/pemK* (inaczej określanego jako *kis/kid*) plazmidu R1 (RUIZ-ECHEVARRIA i współaut. 1995). PemK (Kid) blokuje aktywność DnaB – enzymu helikazy DNA, który rozplata dwuniciowy DNA podczas inicjacji replikacji chromosomu i niektórych plazmidów *E. coli*. Ostatnio ustalono, że trucizna ParE plazmidu RK2, podobnie jak CcdB, jest inhibitorem gyrazy (JIANG i współaut. 2002). Molekularne mechanizmy działania trucizn innych systemów nie zostały jeszcze ustalone. Nieco lepiej przedstawia się wiedza dotycząca mechanizmów zwią-

kszonej wrażliwości odtrutek w porównaniu do toksyn plazmidów *E. coli* – są one najczęściej degradowane przez proteazę Lon, a odtrutka Phd systemu *phd/doc* jest substratem dla proteazy ClpXP (Tabela 1).

GENY TRUCIZNA-ODTRUTKA UMIEJSCOWIONE W CHROMOSOMACH

Wiele plazmidowych genów addykcyjnych ma swoje homologii w chromosomach bakterijnych. Systematyczne przeszukiwania komputerowych baz danych pokazują, że są one obecne w każdej grupie taksonomicznej Proka-

ryota także u Archaea. Niekiedy liczne, pokrewne geny systemów trucizna-odtrutka powtórzone są w tym samym chromosomie (GERDES, 2000). Rola jaką geny te mogą pełnić w chromosomach bakterii jest całkowicie niejasna. Ich funkcjonowanie jako systemów trwałego dziedziczenia chromosomów nie miałoby żadnego sensu, bo komórki pozbawione chromosomów tak czy inaczej czeka niechybna śmierć. Jednakże, chromosomalne homologii genów addykcyjnych, przeniesione na plazmidy wydatnie zwiększają ich stabilność segregacyjną (AIZENMAN i współaut. 1996, GOTFREDSSEN i GERDES 1998).

BAKTERIOCyny ORAZ INNE CZYNNIKI PLAZMIDOWE DZIAŁAJĄCE Z ZEWNĄTRZ

Nazwą bakteriocyny oznacza się produkowane przez bakterie związki hamujące wzrost sąsiadujących komórek zazwyczaj blisko spokrewnionych gatunków. Często zdolność produkowania trującej bakteriocyny niesiona jest przez plazmidy, zawsze razem z odpowiednim genem(i) kodującym(i) odporność na działanie tego czynnika na komórkę producenta. Białka bakteriocyn wydzielane są na zewnątrz produkujących je komórek i adsorbowane na powierzchni komórek wrażliwych, których wzrost ulega zahamowaniu. Produkujące bakteriocyny komórki są na nie niewrażliwe, po-

nieważ jednocześnie aktywne są geny warunkujące oporność. Rezultatem jest względna nieobecność komórek bezplazmidowych, niechronionych przed obecną w podłożu trucizną. Podobieństwo działania bakteriocyn i systemów addykcyjnych jest tylko powierzchowne. Plazmidowe systemy addykcyjne nie dopuszczają do powstania bezplazmidowego potomstwa, natomiast produkowanie toksyn zewnętrznych broni głównie komórki posiadające plazmid przed konkurencją nowych, bezplazmidowych komórek.

SYSTEMY RESTRYKCJI-MODYFIKACJI JAKO CZYNNIKI STABILNOŚCI PLAZMIDÓW

Systemy restrykcji-modyfikacji DNA (R-M) występują powszechnie u Prokaryota zarówno w chromosomach, jak i na plazmidach. Para genów R-M koduje dwa enzymy: endonukleazę (R) rozpoznającą specyficzną krótką sekwencję nukleotydową w dwuniciowym DNA i zdolną do jego przecięcia w obrębie lub pobliżu tej sekwencji oraz metylazę (M), która poprzez metylację tej sekwencji czyni DNA niewrażliwym na działanie endonukleazy restrykcyjnej. Przyjmuje się, że obecność systemów R-M zabezpiecza komórkę przed inwazją obcego DNA (np. wirusów czy plazmidów). Jednak hipoteza „obrony komórkowej” nie wyjaśnia różnorodności ani specyficzności enzymów restrykcyjnych, zwłaszcza tych rozpoznających sekwencje 8-nukleotydowe, które niezwykle rzadko lub w ogóle nie występują w małych genomach plazmidów i wirusów, przed którymi mają chronić komórki.

NAITO i współaut. (1995) wykazali, że obecność genów systemów R-M, *EcoRI* lub *PaeR7* w plazmidzie wydatnie podnosi jego stabilność segregacyjną. Proponowany mechanizm stabilizacyjny również funkcjonuje na zasadzie po-segregacyjnego zabijania komórek bezplazmidowych, jednak należy podkreślić tu wyraźną różnicę w porównaniu do działania klasycznych systemów addykcyjnych. W przypadku systemów R-M nie jest potrzebna różnica w stabilności metylazy DNA (odpowiednik odtrutki) i endonukleazy restrykcyjnej (odpowiednik trucizny). Obydwa enzymy mogą mieć taką samą trwałość w komórce, jednak postępująca ich inaktywacja lub rozcieńczanie w dzielących się komórkach bezplazmidowych osiąga takie stadium, że niektóre sekwencje w chromosomie nie zostaną już zmetylowane. Do przecięcia chromosomu w niezmetylowanych sekwencjach i wywołania śmierci komór-

ki wystarczy tu nawet śladowa aktywność endonukleazy restrykcyjnej.

Widziane w ten sposób systemy R-M, podobnie jak systemy addykcyjne, rozważane są jako samolubne elementy, które utrwaliły się w

ewolucji jako moduły zaprogramowanej śmierci komórek, a które zostały wykorzystane przez plazmidy do zapewniania ich trwałego bytowania w komórkach bakterii (YARMOLINSKY 1995, KOBAYASHI 1998).

MECHANISMS OF PLASMID STABLE INHERITANCE

S u m m a r y

The stable inheritance of bacterial plasmids is achieved by a number of different mechanisms. Among them are: resolution of plasmid multimers into monomers, selective killing of plasmid-free segregants and active plasmid partitioning into dividing cells. The first two mechanisms are discussed in this article. The multimer resolution systems (*mrs*) consist of a site specific recombinase (resolvase) and the defined nucleotide sequence *res* located on the plasmid. By specific recombination between repeated *res* sequences the recombinase resolves plasmid oligomers to monomers. This maximizes the number of plasmid units prior to cell division and considerably contributes to

stable maintenance of plasmid in bacterial cells. The post-segregational killing systems involve a stable poison and an unstable antidote. The antidotes neutralize their cognate poisons or prevent their synthesis. The different decay rates of the poisons and the antidotes underlie the molecular mechanisms of poison activation in plasmid-free cells. By killing and eliminating plasmid-free cells from the population of plasmid-bearing ones the poison-antidote couples act therefore as plasmid addiction systems. While the *mrs* maximize the random plasmid distribution into the dividing cells addiction systems assure better-than-random plasmid distribution.

LITERATURA

- AIZENMAN E., ENGELBERG-KULKA H., GLASER G., 1996. *An Escherichia coli chromosomal "addiction module" regulated by guanosine 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6059-6063.
- ALONSO J. C., WEISE F., ROJO F., 1995. *The Bacillus subtilis histone-like protein Hbsu is required for DNA resolution and DNA inversion mediated by the beta recombinase of plasmid pSM19035*. J. Biol. Chem. 270, 2938-2945.
- AUSTIN S., ZIESE M., STERNBERG N., 1981. *A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons*. Cell 25, 729-736.
- COUTURIER M., BAHASSI E., VAN MELDEREN L., 1998. *Bacterial death by DNA gyrase poisoning*. Trends Microbiol. 6, 269-275.
- DE LA HOZ A. B., AYORA S., SITKIEWICZ I., FERNANDEZ S., PANKIEWICZ R., ALONSO J. C., CEGŁOWSKI P., 2000. *Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 728-733.
- GERDES K., 2000. *Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress*. J. Bacteriol. 182, 561-572.
- GOTFREDSSEN M., GERDES K., 1998. *The Escherichia coli relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family*. Mol. Microbiol. 29, 1065-1076.
- GREENFIELD T. J., EHLE E., KIRSCHENMANN T., FRANCH T., GERDES K., WEAVER K. E., 2000. *The antisense RNA of the par locus of pAD1 regulates the expression of a 33-amino-acid toxic peptide by an unusual mechanism*. Mol. Microbiol. 37, 652-660.
- GRINTER N. J., BREWSTER G., BARTH P. T., 1989. *Two mechanisms necessary for the stable inheritance of plasmid RP4*. Plasmid 22, 203-214.
- JAFFE A., OGURA T., HIRAGA S., 1985. *Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth*. J. Bacteriol. 163, 841-849.
- JIANG Y., POGLIANO J., HELINKI D. R., KONIECZNY I., 2002. *ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of Escherichia coli gyrase*. Mol. Microbiol. 44, 971-979.
- KOBAYASHI I., 1998. *Selfishness and death: raison d'être of restriction, recombination and mitochondria*. Trends Genet. 14, 368-374.
- KOYAMA A. H., WADA C., NAGATA T., YURA T., 1975. *Indirect selection for plasmid mutants: isolation of ColVBtrp mutants defective in self-maintenance in Escherichia coli*. J. Bacteriol. 122, 73-79.
- LORIS R., DAO-THI M. H., BAHASSI E. M., VAN MELDEREN L., POORTMANS F., LIDDINGTON R., COUTURIER M., WYNS L., 1999. *Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from E. coli*. J. Mol. Biol. 285, 167-1677.
- NAITO T., KUSANO K., KOBAYASHI I., 1995. *Selfish behavior of restriction-modification systems*. Science 267, 897-899.
- NORDSTROM K., AUSTIN S. J., 1989. *Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids*. Annu. Rev. Genet. 23, 37-69.
- OGURA T., HIRAGA S., 1983. *Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4784-4788.
- RUIZ-ECHEVARRIA M. J., GIMENEZ-GALLEGO G., SABARIEGOS-JARENO R., DIAZ-OREJAS R., 1995. *Kid, a small protein of the parD stability system of plasmid R1, is an inhibitor of DNA replication acting at the initiation of DNA synthesis*. J. Mol. Biol. 247, 568-577.
- SUMMERS D. K., 1998. *Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability*. Mol. Microbiol. 29, 1137-1145.

- SUMMERS D. K., BENTON W. H., WITHERS H. L., 1993. *Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis*. Mol. Microbiol. 8, 1031–1038.
- SUMMERS, D. K., SHERRATT D. J., 1984. *Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability*. Cell 36, 1097–1103.
- THISTED T., SORESENSEN N. S., GERDES K., 1995. *Mechanism of Post-segregational Killing: Secondary Structure Analysis of the Entire Hok mRNA from Plasmid R1 Suggests a Fold-back Structure that Prevents Translation and Antisense RNA Binding*. J. Mol. Biol. 247, 1960–1968.
- WEAVER K. E., JENSEN K. D., COLWELL A., SRIRAM S. I., 1996. *Functional analysis of the Enterococcus faecalis plasmid pAD1-encoded stability determinant par*. Mol. Microbiol. 20, 53–63.
- YARMOLINSKY M. B., 1995. *Programmed cell death in bacterial populations*. Science 267, 836–837.
- ZIELENKIEWICZ U., CEGŁOWSKI P., 2001. *Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems*. Acta Biochim. Polon. 48, 1003–1023.