

MAŁGORZATA ŁOBOCKA, OLGA BUGAJSKA i ANETA DOBRUK

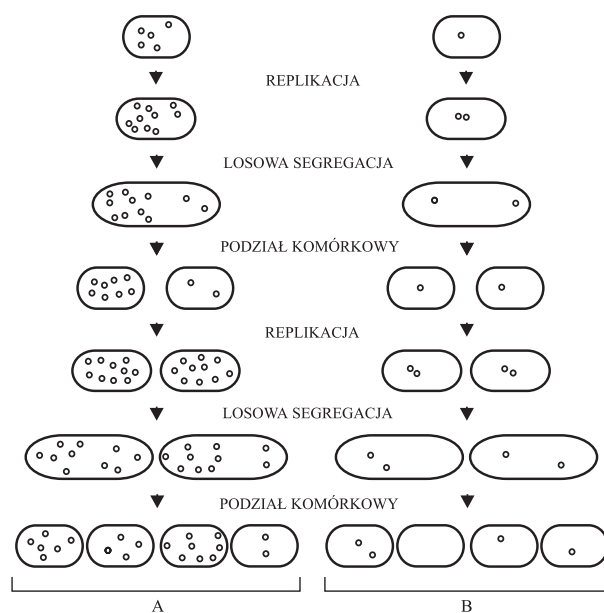
*Zakład Biochemii Drobnoustrojów
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
e-mail: lobocka@ibb.waw.pl*

PARTYCJA NISKOKOPIOWYCH PLAZMIDÓW

WPROWADZENIE

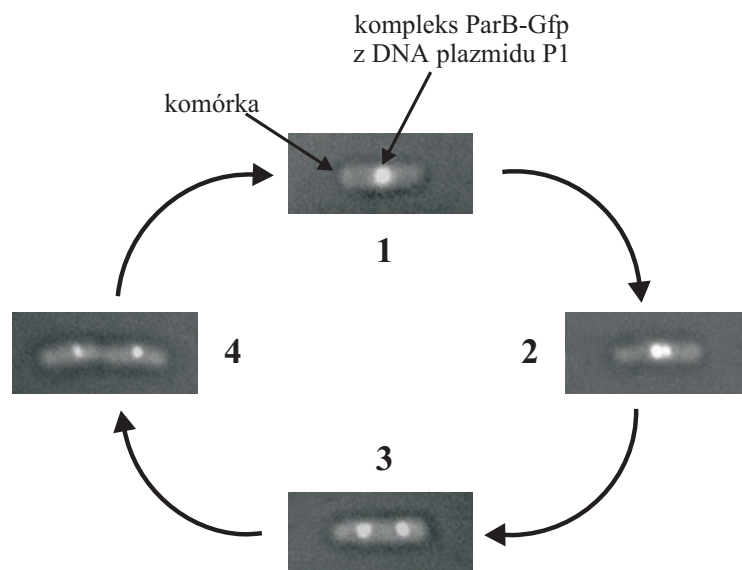
Segregacyjna stabilność plazmidów zależy od częstości z jaką każda komórka potomna otrzymuje przynajmniej jedną kopię plazmidu od komórki macierzynej w czasie podziału. Przy losowym rozmieszczeniu plazmidów w komórce częstość ta jest wprost proporcjonalna do ilości kopii plazmidu i może być obliczona ze wzoru: $P = 1 - 0,5^{2n}$, w którym n oznacza liczbę kopii. Losowa segregacja wystarcza do stabilnego utrzymania w populacjach bakteryjnych plazmidów wielokopiiowych (Ryc. 1). Przykładowo w 500-tysięcznej populacji bakterii zawierających dziesięciokopiiowy plazmid aż 99,9999% z miliona komórek powstałych po jednym podziale będzie nadal zawierało ten plazmid. Natomiast plazmid jednokopiiowy byłby obecny tylko w 75% komórek po podziale, co prowadziłoby do jego szybkiej utraty. Chociaż częstość losowej utraty niskokopiiowych plazmidów powinna być duża, plazmidy te są stabilnie utrzymywane w populacjach bakteryjnych. Okazuje się, że lokalizacja niskokopiiowych plazmidów w komórkach nie jest przypadkowa, a dystrybucja ich zreplikowanych kopii zależy od procesu aktywnej segregacji (partycji). Partycja przypomina mitozę w tym, że przed podziałem komórkowym zreplikowane cząsteczki plazmidu są przemieszczane z centrum komórki macierzynej do pozycji odpowiadających przyszłym centrom komórek potomnych (Ryc. 2). Tylko dwa białka kodowane przez każdy niskokopiiowy plazmid są niezbędne dla procesu partycji. Dlatego przy-

puszcza się, że ich rola może polegać na podczepianiu cząsteczek plazmidu do maszyneryi



Ryc. 1. Schemat losowej segregacji plazmidu wielokopiiowego (A) i jednokopiiowego (B).

partycyjnej komórki. Partycja zależy od obecności w cząsteczkach plazmidowego DNA specyficznych sekwencji, uważanych za analogi centromerów eukariotycznych. Są one rozpoznawane przez plazmidowe białka partycyjne.



Ryc. 2. Lokalizacja w komórkach *Escherichia coli* cząstek jednokopiowego plazmidu P1 podczas kolejnych etapów cyklu komórkowego oznaczonych jako 1, 2, 3 i 4.

Pomiędzy przejściem z etapu 1 do 2 nastąpiła replikacja plazmidu P1 i zapoczątkowanie procesu segregacji jego kopii. Ogniska fluorescencji reprezentują kompleksy DNA plazmidu P1 z fluoryzującym białkiem fuzyjnym ParB-Gfp wiążącym się do DNA tego plazmidu (patrz tekst; Bugajska i Łobocka, dane niepublikowane).

Białka bakteryjne, które mogłyby uczestniczyć w procesie przemieszczania plazmidów wewnątrz komórki nie zostały dotąd poznane, a badania nad rolą samych białek plazmidowych w ruchu plazmidów są w toku.

Niespodzianką ostatnich lat było odkrycie homologów plazmidowych białek partycyjnych kodowanych przez chromosomy bakteryjne (GERDES i współaut. 2000). Badania nad ich funkcją u *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus* i *Pseudomonas putida* wykazały, że uczestniczą one w partycji chromosomów tych bakterii (LIN i GROSSMAN 1998, MOHL i GOBER 1997, GODFRIN-ESTEVENON i współaut. 2002). Homologie białek partycyjnych wskazują, że mimo różnic w partycji chromosomów i plazmidów oba procesy mają elementy wspólne.

Mechanizm aktywnej partycji jest ewolucyjnie stary i charakteryzuje się szeroką uni-

wersalnością działania (GERDES i współaut. 2000, YAMAICHI i NIKI 2000). Sekwencje centromerowe plazmidów w połączeniu z genami kodującymi plazmidowe białka partycyjne mogą być wykorzystane w formie kaset genowych w stabilizacji innych plazmidów. Funkcja tych kaset nie zależy od replikacji (TREPTOW i współaut. 1994) ani od typu replikonu (AUSTIN i współaut. 1986, LIN i GROSSMAN, 1998), ani nawet od całkowitej topologii DNA (GRIGORIEV i ŁOBOCKA 2001). Kasety partycyjne funkcjonują nawet po przeniesieniu z bakterii Gram-dodatnich do Gram-ujemnych. Plazmid zawierający miejsce centromerowe chromosomu *Bacillus subtilis* podlegał aktywnej segregacji w komórkach *Escherichia coli* syntetyzujących białka partycyjne *B. subtilis* (YAMAICHI i NIKI 2000).

ORGANIZACJA PLAZMIDOWYCH KASET PARTYCYJNYCH

Funkcje plazmidowych białek partycyjnych są konserwatywne (HIRAGA 2000). Jedno z nich ma zdolność specyficznego wiązania się do centromeru. Drugie ma aktywność ATPazy, która jest niezbędna dla partycji. Przypuszcza się, że hydroliza ATP zależna od ATPaz partycyjnych może dostarczać energii dla ruchu plazmidów podczas partycji.

Organizacja genów kodujących oba białka partycyjne u większości plazmidów jest podobna. Tworzą one operon, w którym gen kodujący ATPazę partycyjną (*parA/sopA*) jest pierwszym, zaś gen kodujący białko wiążące

centromer (*parB/sopB*) drugim genem operonu. Transkrypcja operonów partycyjnych jest reprimowana przez jeden lub oba produkty białkowe tych operonów. Zapewnia to utrzymanie wewnątrzkomórkowego stężenia białek partycyjnych w określonych granicach. Auto-regulacja jest niezbędna dla efektywnej partycji. Nie tylko nadprodukcja lub niedobór jednego z białek partycyjnych, lecz także zaburzenia w proporcjach stężeń obu białek interferują z procesem partycji.

W zależności od rodzaju kodowanej ATPazy operony partycyjne podzielono na dwa typy

(GERDES i współaut. 2000, Ryc. 3). Operony typu pierwszego (I) kodują ATPazy zawierające w swojej sekwencji aminokwasowej tzw. motyw Walkera występujący w szeregu enzymach o aktywności ATPazowej (KOONIN 1993). W ATPazach partycyjnych motyw ten jest w charakterystyczny sposób zmieniony. Podobne zmiany motywu Walkera zaobserwowano w niektórych ATPazach pełniących funkcję pomp jonowych oraz w ATPazach rodziny MinD, będących częścią systemu, który kontroluje tworzenie przegród podziałowych w komórkach bakteryjnych. Operony typu drugiego (II) kodują ATPazy aktynowopodobne (BORK i współaut. 1992).

Ze względu na lokalizację miejsc centromerowych operony typu I-go cechuje duża różnorodność. W przypadku większości z nich, wyodrębnionych jako podtyp A, rejony centromerowe znajdują się na końcu operonu, za genem dla białka wiążącego się z centromerem. W mniej licznej grupie, wyodrębnionej jako podtyp B, rejony centromerowe, znajdują się na początku operonu, przed genem dla ATPazy partycyjnej, gdzie pokrywają się one z rejonami promotorowo-operatorowymi. U niektórych plazmidów (np. RK2 i N15) rejony centromerowe nie są bezpośrednio sprzężone z operonami partycyjnymi, a białka wiążące centromer tych plazmidów oprócz uczestnictwa w partycji mogą funkcjonować jako regulatory ekspresji genów nie związanych z partycją (BIGNELL i THOMAS, 2001, GRIGORIEV i ŁOBOCKA 2001). Sekwencje białek wiążących centromer różnych opero-

nów typu IA wykazują znaczące podobieństwo.

W operonach partycyjnych typu II-go rejon centromerowy pokrywają się częściowo lub całkowicie z rejonami promotorowo-operatorowymi.

Szczególnym przykładem odmiennej organizacji są geny partycyjne licznych plazmidów bakterii z rodzaju *Agrobacterium*, *Rhizobium* i *Paracoccus*, nazwane *repA* i *repB* z powodu sprzężenia ich funkcji z funkcjami replikacyjnymi. Tworzą one wspólny operon z genem kodującym białko inicjujące replikację tych plazmidów, *repC* (BARTOSIK, 2001). Produkt genu *repA*, ATPaza typu Walkera, jest jednocześnie represorem transkrypcji operonu *repABC*. Rejon centromerowy w tego typu operonach znajduje się bezpośrednio za końcem genu *repC* (BARTOSIK i współaut. 2002).

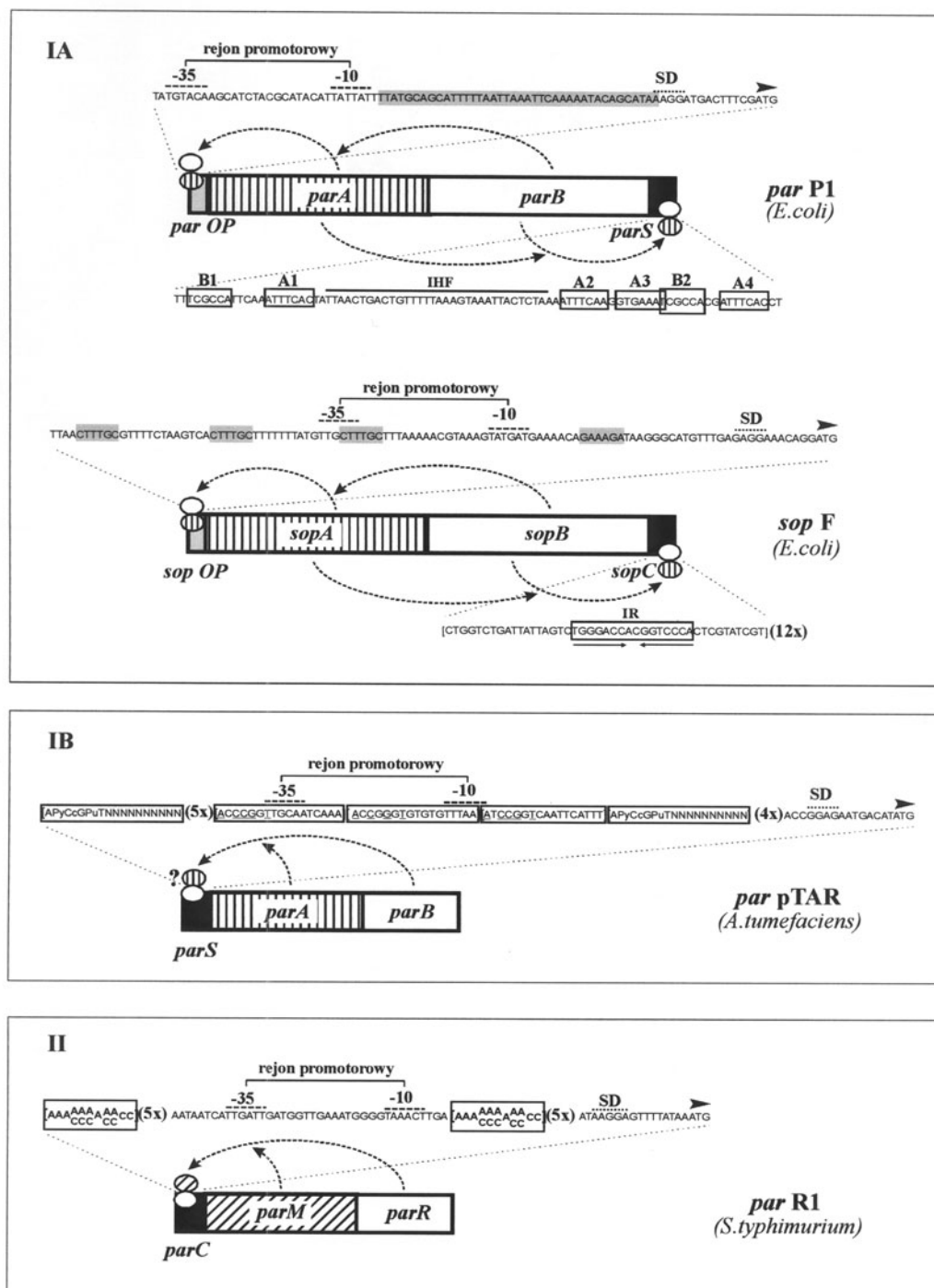
Odmierna organizacja genów partycyjnych, w połączeniu ze sprzężeniem ich regulacji z regulacją replikacji może być również cechą niektórych plazmidów bakterii Gram-dodatnich, jak np. pSM19035 (DE LA HOZ i współaut. 2000). Gen kodujący białko δ tego plazmidu, podobne do ATPaz partycyjnych typu Walkera, tworzy jednogenny operon. Jego transkrypcja jest negatywnie regulowana przez białko, które jednocześnie pełni funkcje pozytywnego regulatora liczby kopii pSM19035. Przeciwna regulacja ekspresji genu związanego z partycją i liczby kopii plazmidu mogłaby być częścią mechanizmu indukcji funkcji partycyjnych plazmidów średniokopiiowych w odpowiedzi na spadek liczby kopii.

KASETY PARTYCYJNE KODUJĄCE ATPAZY TYPU WALKERA

Operony partycyjne typu I-go, kodujące ATPazy ze zmienionym motywem Walkera, są szeroko rozpowszechnione. Występują zarówno w większości niskokopiiowych plazmidów, jak i w szeregu chromosomach bakteryjnych. Ich funkcje poznano najlepiej w badaniach nad partycją plazmidu P1. P1 jest bakteriofagiem łagodnym, który w lizogenach nie występuje w postaci wintegrowanej do chromosom lecz jako duży jednokopiiowy plazmid o kolistym genomie długości prawie 100 kb.

Operon partycyjny plazmidu P1 składa się z genu *parA*, kodującego ATPazę i genu *parB* kodującego białko zdolne do wiązania centromeru (ABELES i współaut. 1985; patrz Ryc. 3). Centromer P1, *parS*, obejmuje około 90-cio nukle-

otydowy rejon zlokalizowany bezpośrednio za końcem genu *parB*. Białko ParB rozpoznaje dwa rodzaje krótkich sekwencji (typu A i B, patrz Ryc. 3) w obrębie centromeru (FUNNELL, 1988b, FUNNELL i GAGNIER 1993). Wiązanie się ParB do centromeru zachodzi razem z wiązaniem bakteryjnego białka IHF i jest uważane za początkowy etap partycji (FUNNELL 1991). IHF zagina DNA umożliwiając oddziaływanie ze sobą cząsteczek ParB związanych z DNA po przeciwnych stronach miejsca rozpoznawanego przez IHF (HAYES i AUSTIN 1994). ParA w formie związanej z ATP może przyłączać się do kompleksu centromerowego poprzez interakcję z ParB (BOUET i FUNNELL 1999). Oczyszczony ParA *in vitro* ma słabą aktywność ATPazową



Ryc. 3. Organizacja plazmidowych kaset partycyjnych typu I (IA i IB) i typu II.

Geny kodujące ATPazy partycyjne typu Walkera i ich produkty wyróżniono przy pomocy poprzecznych prążków, geny kodujące ATPazy aktynopodobne i ich produkty przy pomocy skośnych prążków. Rejony centromerowe oznaczono czarnym kolorem. Kropkowane linie zakończone strzałkami obrazują interakcje białek partycyjnych z rejonami centromerowymi i regulatorowymi poszczególnych operonów. W operonach typu IA (*par* plazmidu P1 i *sop* plazmidu F) sekwencje rejonów regulatorowych (*parOP* i *sopOP*) przedstawiono powyżej, a sekwencje rejonów centromerowych (*parS* i *sopC*) poniżej schematów organizacji genów tych operonów. Miejsca wiązania białka ParA lub SopA w rejonach regulatorowych podświetlono na szaro. W operonach typu IB i II miejsca centromerowe i pokrywające się z nimi rejony regulacyjne przedstawiono powyżej schematów organizacji genów. Sekwencje wiążące białka ParB lub ParR obwiedziono czarnymi prostokątami. Grot strzałki na końcu każdej sekwencji znajduje się nad początkowym kodonem genu dla ATPazy partycyjnej każdego operonu. Fragmenty DNA kodujące miejsca wiązania rybosomów przed startem translacji (SD) oznaczono kropkowaną linią.

(DAVIS i współaut. 1992). Jest ona stymulowana przez białko ParB i DNA. Chociaż aktywność ATPazowa ParA nie jest niezbędna dla włączania ParA do kompleksu centromerowego *in vitro*, jest ona niezbędna dla partycji *in vivo* (DAVIS i współaut. 1996).

Niezależnie od aktywności partycyjnej, białko ParA bierze udział w autoregulacji operonu *par*. Rozpoznaje ono sekwencję DNA zlokalizowaną pomiędzy promotorem operonu *par* i początkiem genu *parA*. Poprzez interakcję z tą sekwencją ParA przeszkadza w wiązaniu polimerazy RNA do promotora i w ten sposób reprimuje transkrypcję (DAVIS i współaut. 1992, DAVEY i FUNNELL 1994). Samo ParA słabo wiąże się do DNA. W komórce ParA występuje głównie w kompleksie z ATP lub ADP. Oba nukleotydy stymulują wiązanie ParA do DNA poprzez indukcję zmiany konformacji całej cząsteczki białka (DAVEY i FUNNELL 1997, FUNG i współaut. 2001). Konformacje ParA w kompleksie z ATP i ADP różnią się. ParA-ADP jest lepszym represorem niż ParA-ATP. Jednak ATP lepiej wiąże się z ParA i występuje w komórce w stężeniu kilkakrotnie wyższym niż ADP. Dlatego wewnątrz komórek, ParA w kompleksie z ATP jest formą dominującą. ParB wzmacnia represję operonu *par* przez ParA-ATP poprzez stymulację zmiany konformacji tego kompleksu do formy tak efektywnej w represji jak ParA-ADP. Dodatkowe wzmocnienie represji zachodzi w obecności centromeru P1, *parS* (HAO i YARMOLINSKY 2002). Przypuszcza się, że białka partycyjne związane z rejonem

promotorowo-operatorowym i z rejonem centromerowym operonu *par* mogą oddziaływać ze sobą powodując utworzenie kompleksu superrepresorowego.

W oparciu o różnice w zmianach konformacyjnych ParA indukowanych przez ATP i ADP oraz różny wpływ obu nukleotydów na różne aktywności ParA zaproponowano, że wiązanie i hydroliza nukleotydów adeninowych przez ParA pełnią rolę molekularnych przełączników kontrolujących zapoczątkowanie dwóch niezależnych procesów z udziałem ParA, reakcji związanych z autoregulacją i reakcji partycyjnych (BOUET i FUNNELL 1999). Ani autoregulacja ani wiązanie ParA do kompleksu *parS*-ParB-IHF nie wymaga hydrolizy ATP co sugeruje, że aktywność ATPazowa ParA jest niezbędna w zaawansowanych reakcjach partycyjnych.

U dzikiego plazmidu P1 kombinacja funkcji partycyjnych oraz funkcji systemu tzw. „addycji”, działającego poprzez aktywację toksyny plazmidowej w komórkach, które utraciły plazmid, powoduje obniżenie utraty plazmidu do częstości mniejszej niż 10^{-5} na każdy podział komórkowy (patrz artykuł U. ZIELENKIEWICZ i P. CEGŁOWSKIEGO w tym numerze KOSMOSU). Udział systemu partycji w stabilizacji plazmidu jest znaczący. Utrata z populacji plazmidów P1 pozbawionych kasety addycyjnej wynosi poniżej 1% po czasie około 25-ciu generacji. Częstość utraty zwiększa się do ponad 99% w populacjach komórek niosących pochodne tego plazmidu z mutacjami inaktywującymi geny *parA* lub *parB*, lub rejon centromerowy.

KASETY PARTYCYJNE KODUJĄCE ATPAZY TYPU AKTYNOWEGO

Operony partycyjne typu II-go, kodujące ATPazy aktynopodobne występują w plazmidach rzadziej niż operony kodujące ATPazy typu Walkera. Sekwencja aminokwasowa aktynopodobnych ATPaz partycyjnych jest ewolucyjnie najbardziej zbliżona do kodowanych przez chromosomy bakteryjne białek rodziny MreB, uznanych za prokariotyczne homologi aktyny (VAN DEN ENT i współaut. 2001, JONES i współaut. 2001, MOLLER-JENSEN i współaut. 2002). Białka rodziny MreB tworzą filamenty podobne do filamentów eukariotycznej aktyny. U *E. coli* filamenty MreB formują pod błoną komórkową cytoskielet, który umożliwia komórkom utrzymanie pałczkowatego kształtu.

Najlepiej zbadanym operonem typu II-go jest operon *par* plazmidu R1, wyizolowanego

jako czynnik lekooporności ze szczepu *Salmonella typhimurium* (Ryc. 3). Oprócz genu *parM* kodującego ATPazę, zawiera on gen *parR*, kodujący białko wiążące się do centromeru (GERDES i współaut. 2000). Centromer plazmidu R1, *parC*, znajduje się przed genem *parM*. Składa się on z dwóch ciągów pięciokrotnych powtórzeń podobnej, 12-to nukleotydowej sekwencji, przedzielonych krótkim fragmentem DNA zawierającym promotor operonu *par* (DAM i GERDES 1994). Białko ParR ma zdolność do wiązania się do centromeru. Jednocześnie poprzez interakcję z sekwencjami sąsiadującymi z promotorem reprimuje ono transkrypcję operonu *par* (JENSEN i współaut. 1994). Białko ParM nie bierze udziału w autoregulacji ale uczestniczy w kompleksie centromerowym.

merowym poprzez oddziaływanie z ParR (JENSEN i GERDES 1997). W komórce ParM może występować zarówno w kompleksie z ATP, jak i z ADP (MOLLER-JENSEN i współaut.

2002). Aktywność ATPazowa ParM jest silnie stymulowana w obecności kompleksu ParR z *parC*.

PORÓWNANIE PLAZMIDOWYCH SEKWENCJI CENTROMEROWYCH

Ze względu na obecność dwóch rodzajów sekwencji wiążących białko ParB i sekwencji wiążącej białko bakteryjne IHF, centromer plazmidu P1 reprezentuje grupę centromerów plazmidowych o najbardziej skomplikowanej budowie. Jednak dla zachowania minimalnej funkcji partycyjnej, wystarczy 22 nukleotydowy fragment jego prawego ramienia obejmujący dwa miejsca wiązania ParB typu A (A2, A3) i jedno miejsce typu B (B2, Ryc. 3, MARTIN i współaut. 1991). Chociaż „minimalny” fragment centromeru powoduje niewielką stabilizację plazmidu w porównaniu z kompletnym *parS*, jego aktywność wskazuje, że zarówno pozostałe miejsca wiązania ParB, jak i miejsce wiązania IHF są krytyczne dla efektywności partycji, ale nie niezbędne dla zajścia procesów partycyjnych. Sekwencje centromerowe podobne do *parS* P1 są wysoce efektywne w partycji. Przypuszczalnie dlatego w znanych plazmidach podobne centromery występują w jednej kopii.

Struktura większości centromerów plazmidowych w operonach typu IA jest inna niż struktura *parS*. Zawierają one najczęściej wielokrotne powtórzenia podobnej sekwencji (BIGNELL i THOMAS 2001). Centromer plazmidu F (*sopC*) składa się aż z 12-tu 43-nukleotydowych powtórzeń (Ryc. 3, LANE i współaut. 1987). Każde z nich zawiera sekwencję o charakterze palindromu (IR), do której wiąże się białko SopB plazmidu F (homolog ParB P1, MORI i współaut. 1989). Już obecność na plazmidzie jednej z powtórzonych sekwencji centromerowych powoduje jego zauważalną stabilizację w obecności białek partycyjnych F (BIEK i SHI 1994, RAVIN i LANE 1999). Jednak dopiero obecność co najmniej kilku powtó-

rzeń zapewnia wysoką efektywność partycji. Powtórzone sekwencje centromerowe w operonach typu IA cechuje niezależność. Ich zgromadzenie w jednym odcinku DNA nie jest niezbędne dla funkcji. Być może dlatego wariantem organizacji tego typu centromerów jest rozproszenie pojedynczych powtórzeń w różnych rejonach DNA, gdzie każde z nich może pełnić funkcję centromeru. Taka organizacja sekwencji centromerowych występuje u szeregu plazmidów i jest typowa dla chromosomów bakteryjnych kodujących ATPazy partycyjne typu Walkera (BIGNELL i THOMAS 2001, GRIGORIEV i ŁOBOCKA, 2001, GODFRIN-ESTEVENON i współaut. 2002).

W plazmidach posiadających kasety partycyjne typu IB i II rejon centromerowe pokrywają się z rejonami promotorowo-operatorowymi operonów partycyjnych (BREUNER i współaut. 1996, KALNIN i współaut. 2000). Typowe centromery tych plazmidów składają się z kilku do kilkunastu powtórzeń podobnej sekwencji. Integralność ciągu powtórzeń może być istotna dla funkcji centromerowej, ponieważ jego niepełne fragmenty okazywały się нефunkcjonalne w partycji. Rejon centralnych powtórzeń w obrębie centromeru pokrywa się lub sąsiaduje z sekwencjami promotorowymi operonów partycyjnych (Ryc. 3). Dzięki temu w tego typu operonach sekwencje centromerowe mogą pełnić funkcję regulacyjną. Dwufunkcyjność elementów centromerowych sprawia, że białka wiążące centromer tych operonów (np. ParB pTAR i ParR R1) są elementami bezpośrednio kontrolującymi ich transkrypcję, a kodowane przez nie ATPazy partycyjne nie biorą udziału w regulacji.

NIEZGODNOŚĆ PARTYCYJNA I PAROWANIE CZĄSTECZEK PLAZMIDÓW

Plazmidowe rejon centromerowe są czynnikami tzw. niezgodności partycyjnej (ang. partition incompatibility) (AUSTIN i NORDSTROM 1990). Wyraża się ona tym, że dwa różne plazmidy niosące taki sam centromer nie mogą stabilnie współistnieć w komórce w obecności

rozpoznających ten centromer białek partycyjnych. Niestabilność plazmidów wynikająca z niezgodności nie jest dramatyczna. Po dłuższym czasie wzrostu w nieobecności antybiotyków selekcyjnych dla obu plazmidów początkowo dwuplazmidowe komórki tworzą

dwie populacje. Komórki jednej z nich zawierają wyłącznie jeden, komórki drugiej wyłącznie drugi plazmid.

Zjawisko niezgodności partycyjnej stało się podstawą do zaproponowania modelu partycji. Zakłada on, że przed podziałem komórkowym plazmidy łączą się w pary przy pomocy rejonów centromerowych, a następnie każdy z elementów pary jest przemieszczany do przeciwległej połówki dzielącej się komórki. Niezgodność partycyjna byłaby konsekwencją tworzenia par zawierających dwa różne plazmidy. Ich rozdział prowadziłby do segregacji każdego z plazmidów pary tylko do jednej z komórek potomnych.

Ostatnio potwierdzono zdolność plazmidowych centromerów do tworzenia par w obecności białek partycyjnych. Pary fragmentów DNA zawierających rejon centromerowy plazmidu R1, *parC*, zaobserwowano na zdjęciach z mikroskopu elektronowego (JENSEN i współaut. 1998). Tworzenie par wymagało związania białka ParR do *parC* i było silnie stymulowane w obecności ATPazy partycyjnej plazmidu R1, ParM. Można założyć, że parowanie kolistych cząsteczek plazmidów poprzez

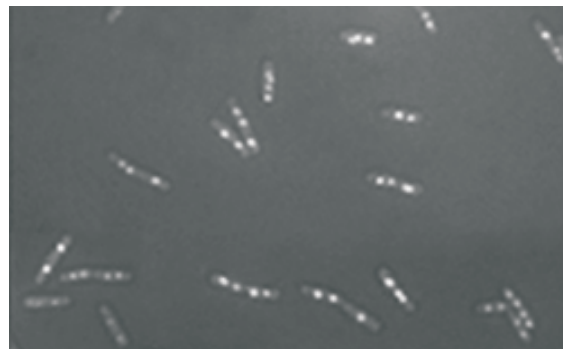
rejon centromerowy prowadzi do zablokowania swobodnej rotacji sąsiadującego z centromerami DNA. Rzeczywiście, w eksperymentach *in vivo* pokazano, że obecność miejsc centromerowych P1, *parS*, w cząsteczkach plazmidów blokuje dyfuzję wzdłuż cząsteczki wywołanych transkrypcją zmian w superskręceniu DNA (EDGAR i współaut. 2001). Efekt ten występował tylko w komórkach zawierających białko ParB P1, co uznano za dowód tworzenia par plazmidów zawierających *parS* w obecności tego białka.

Wydaje się, że *in vivo* jednostką w partycji nie jest pojedynczy rejon centromerowy, a cała cząsteczka DNA zawierająca jeden lub więcej centromerów. Partycja dwóch fragmentów centromerowych tej samej cząsteczki plazmidu prowadziłaby do rozerwania plazmidu i jego utraty. Tymczasem plazmidy zawierające dwa identyczne nawet odległe od siebie centromery nie są mniej stabilne niż plazmidy jednocentromerowe (AUSTIN, 1984). Najprawdopodobniej *in vivo* parowanie zachodzi preferencyjnie pomiędzy centromerami dwóch różnych cząsteczek plazmidowych (LANE i współaut. 1987, GRIGORIEV i ŁOBOCKA 2001).

WIZUALIZACJA PROCESU PARTYCJI

Rozwój technik mikroskopii fluorescencyjnej umożliwił obserwację cząsteczek plazmidów w komórkach i potwierdzenie modelu partycji (Ryc. 2, 4). W pierwszych doświadczeniach tego typu użyto plazmidów P1 i F ze wstawionymi do cząsteczek wielokrotnymi kopiami sekwencji wiążącej białko bakteryjne LacI^Q. Komórki z tak skonstruowanymi plazmidami, zamiast normalnego białka LacI^Q, zawierały jego fuzję z fluoryzującym na zielono białkiem, Gfp (GORDON i współaut. 1997). Wiążące się do DNA plazmidowego białko fuzyjne LacI^Q-Gfp tworzyło ogniska fluorescencji w miejscach odpowiadających lokalizacji plazmidów. W małych komórkach powstałych świeżo po podziale zaobserwowano pojedyncze ogniska fluorescencji umiejscowione w rejonie centrum komórki. W większych komórkach zaobserwowano po dwa ogniska fluorescencji odpowiadające rozsegregowanym po replikacji kopiom plazmidów. Były one rozmieszczone symetrycznie w rejonach bliskich 1/4 i 3/4 długości komórki. Podobną lokalizację zarówno P1 i F, jak i niskokopiowego plazmidu

RK2 pokazano tzw. metodą FISH (ang. fluorescent *in situ* hybridization), w której utrwalone komórki przytwierdzone do szkiełka mikroskopowego, poddawano hybrydyzacji ze znakowanymi fluorescencyjnie fragmentami DNA komplementarnymi do DNA tych pla-



Ryc. 4. Lokalizacja plazmidów P1 w komórkach *E. coli* na różnych etapach cyklu komórkowego (zdjęcie barwne na okładce).

Ogniska fluorescencji (jasne plamki) reprezentują kompleksy DNA plazmidu P1 z fluoryzującym białkiem fuzyjnym ParB-Gfp wiążącym się do DNA tego plazmidu (patrz tekst; Bugajska i Łobocka, dane nieopublikowane).

zmidów (BIGNELL i współaut. 1999, POGLIANO i współaut. 2001, HO i współaut. 2002). Lokalizacja rozsegregowanych kopii plazmidów przy granicach ćwiartek komórkowych wydaje się charakterystyczna dla plazmidów zawierających operony partycyjne typu I-go. Rozsegregowane plazmidy R1 lokalizują się odmiennie, głównie w rejonach biegunów komórkowych (JENSEN i GERDES 1999, WEITAO i współaut. 2000). Dopiero po podziale komórkowym są one przemieszczane do centrów komórek potomnych.

W komórkach zawierających plazmidy P1, F i RK2 białka wiążące centromer tych plazmidów, ParB, SopB i KorB, lokalizują się w tych samych miejscach co cząsteczki DNA plazmidowego (ERDMANN i współaut. 1999, HIRANO i współaut. 1998, BIGNELL i współaut. 1999). Dzięki wiązaniu się do swoistych centromerów i interakcji z DNA plazmidowym w ich sąsiedztwie (omówionym w dalszej części tego artykułu) fuzje tych białek z białkami fluoryzującymi (np. Gfp) są dogodnymi wskaźnikami wewnątrzkomórkowej lokalizacji plazmidów zawierających rozpoznawane przez nie sekwencje centromerowe (Ryc. 4).

Chociaż w większości komórek z P1, F, czy RK2 cząsteczki plazmidów znajdują się w rejonach bliskich 1/4 i 3/4 długości komórki, a w

nielicznych małych komórkach w jej centrum, lokalizacja niektórych plazmidów odpowiada etapom pośrednim ich przemieszczania. W wolno rosnących komórkach przemieszczanie cząsteczek plazmidów jest również powolne i odbywa się w tempie wielu minut (BIGNELL i współaut. 1999, BUGAJSKA i ŁOBOCKA, dane niepublikowane). Przemieszczanie plazmidów jednej pary zachodzi synchronicznie, natomiast procesy partycyjne w dwóch komórkach powstałych z jednej po podziale często odbywają się w różnym czasie.

Mimo, że liczne plazmidy umiejscowione są podczas partycji w tych samych rejonach komórkowych oglądane wspólnie w komórce nie lokalizują się dokładnie w tych samych miejscach (HO i współaut. 2002). Ponadto ich partycja nie jest zsynchronizowana w czasie. W prawie wszystkich badanych komórkach segregacja kopii plazmidu RK2 powstałych po replikacji poprzedzała segregację kopii plazmidu F, a segregacja F poprzedzała segregację P1. Obserwacje te wskazują, że albo różne plazmidy podczas partycji oddziałują z różnymi strukturami komórki, albo segregują niezależnie od struktur komórkowych, albo też ich oddziaływanie z tymi samymi strukturami odbywa się w różnym czasie.

PARTYCJA PLAZMIDÓW A KOMÓRKOWE CENTRA REPLIKACYJNE

Zaskakującym odkryciem ostatnich lat było wykazanie, że replikacja DNA w komórkach *Bacillus subtilis* nie zachodzi, jak przypuszczano, przez przesuwanie się kompleksu replikacyjnego wzdłuż DNA, a odwrotnie, przez przesuwanie się DNA chromosomalnego przez kompleks enzymów replikacyjnych ulokowany w centrum komórki lub w rejonach odpowiadającym przyszłemu centrom komórek potomnych (LEMON i GROSSMAN 1998, 2000). Przypuszcza się, że ulokowany centralnie replisom mógłby działać jako rodzaj „silnika biosyntetycznego”, który wypycha zreplikowane kopie chromosomu w przeciwnych kierunkach (LEMON i GROSSMAN 2001). Zarówno u *B. subtilis*, jak i u *E. coli* zreplikowane rejony startu replikacji

chromosomu przemieszczają się z replisomu w kierunku przeciwnych biegunów komórki, przy których lokalizują się przez większość cyklu komórkowego. Najprawdopodobniej replikacja DNA niskokopiovych plazmidów również odbywa się w obrębie kompleksu komórkowych enzymów replikacyjnych. Możliwe, że każdy z plazmidów może inicjować montaż nowego kompleksu białek replikacyjnych z użyciem mechanizmu, który sprzęga centralnie tworzony kompleks z tym rejonem cząsteczki plazmidu gdzie zaczyna się replikacja DNA (HO i współaut. 2002). Ostatnio doliczono się zwiększonej liczby replisomów na komórkę w szczepie *Caulobacter crescentus* zawierającym wielokopiovym plazmid (JENSEN i współaut. 2001).

WYCISZANIE TRANSKRYPCJI PRZEZ BIAŁKA PLAZMIDOWE WIAŻĄCE CENTROMERY

Badania *in vitro* wskazują, że interakcje białek wiążących centromer z DNA plazmidowym są ograniczone do sekwencji w obrębie

centromeru rozpoznawanych przez te białka. Jednak właściwości białek typu ParB *in vivo* sugerują, że interakcje te mogą obejmować szer-

sze rejony DNA plazmidowego. Chociaż naturalną funkcją systemu partycji jest stabilizacja plazmidów, białka z rodzin ParB mogą powodować destabilizację plazmidów niosących centromery, do których się wiążą (FUNNELL 1988a, ŁOBOCKA i YARMOLINSKY 1996, KUSUKAWA i współaut. 1987, GRIGORIEV i ŁOBOCKA 2001, JAGURA-BURDZY i współaut. 1999). Destabilizacja prowadzi do utraty plazmidów centromerowych z częstością większą niż wynikałoby to z ich przypadkowego rozdzielenia w nieobecności systemu partycji. Zależy ona od stężenia białka typu ParB i od kontekstu DNA w jakim znajduje się specyficzna dla tego białka sekwencja centromerowa. Na przykład duży nadmiar białka ParB P1 prowadzi do destabilizacji wszystkich badanych plazmidów niosących *parS*, niezależnie od obecności ParA.

Destabilizacja plazmidów centromerowych przez białka rodziny ParB zależy od zdolności tych białek do wyciszania transkrypcji genów w sąsiedztwie rozpoznawanych przez nie sekwencji centromerowych (YARMOLINSKY 2000). Wydaje się, że zdolność ParB P1 do wyciszania transkrypcji ma związek z jego funkcją w reakcjach partycyjnych następujących po związaniu centromeru. Białka mutantów *parB* P1, które wiązały *parS*, lecz były niezdolne do wyciszania transkrypcji, straciły także aktywność partycyjną.

Mechanizm wyciszania transkrypcji nie jest znany. Liczne obserwacje wskazują, że ParB plazmidu P1 i SopB plazmidu F, po związaniu z DNA centromerowym, mogą pośrednio lub bezpośrednio wiązać się z DNA pozacentromerowym. Dowodem takiej interakcji jest izolacja z komórek niosących plazmid P1 kompleksów białka ParB tego plazmidu z DNA P1 reprezentującym rejony odległe o kilka tysięcy par zasad od sekwencji *parS* (RODIONOV i współaut. 1999). Zaproponowano, że wiązanie SopB lub ParB do specyficznych dla nich sekwencji cen-

trimerowych zapoczątkowuje wiązanie dodatkowych cząsteczek tych białek do sąsiadującego DNA. Wyciszanie transkrypcji mogłoby wynikać z ochrony DNA pokrytego przez ParB lub SopB przed dostępem innych białek. Niestety w warunkach *in vitro* nie uzyskano kompleksów ParB ani SopB z DNA poza rejonem centromeru, co może sugerować udział nieznanych białek komórkowych w tworzeniu takich kompleksów. Ciekawych wyników dostarczyły badania nad fragmentem SopB zawierającym 82 reszty aminokwasowe z N końca tego białka. Okazał się on niezbędny dla wyciszania transkrypcji przez SopB choć jest niezależny od ułożenia centralnie rejonu SopB niezbędnego dla wiązania DNA (KIM i WANG 1999). N-końcowy fragment SopB w połączeniu z fragmentami innych białek zdolnymi do wiązania specyficznych sekwencji DNA, lecz niezdolnymi do wyciszania transkrypcji, nadawał białkom fuzyjnym zdolność do wyciszania transkrypcji genów w sąsiedztwie tych sekwencji. Możliwe, że wyciszanie transkrypcji po utworzeniu kompleksu SopB-*sopC* zależy od oddziaływania N-końcowego fragmentu SopB z niezidentyfikowanym czynnikiem komórkowym zdolnym do wiązania pozacentromerowego DNA. Podobieństwo N-końcowych fragmentów SopB plazmidu F, ParB plazmidu P1 oraz ich homologów kodowanych przez inne plazmidy wskazuje na wspólny mechanizm wyciszania transkrypcji genów przez te białka (HANAI i współaut. 1996). Samo wyciszanie mogłoby być przejściowym efektem ubocznym tworzenia struktur białko-DNA niezbędnych dla wewnątrzkomórkowego przemieszczania plazmidu. Kompleksy ParB z pozacentromerowym DNA plazmidu P1 występują w komórkach również podczas aktywnej partycji tego plazmidu. Wskazuje to, że w warunkach fizjologicznych reakcje związane z tworzeniem tych kompleksów nie prowadzą do zaburzeń partycji.

UDZIAŁ ATPAZ PARTYCYJNYCH W PRZEMIESZCZANIU PLAZMIDÓW

Pozycjonowanie plazmidów podczas partycji wymaga ATPaz partycyjnych i zależy od ich zdolności do hydrolizy ATP. W nieobecności tych ATPaz niskokopiowe plazmidy lokalizują się w dowolnych miejscach komórki, głównie w przestrzeniach nie zajętych przez nukleoid.

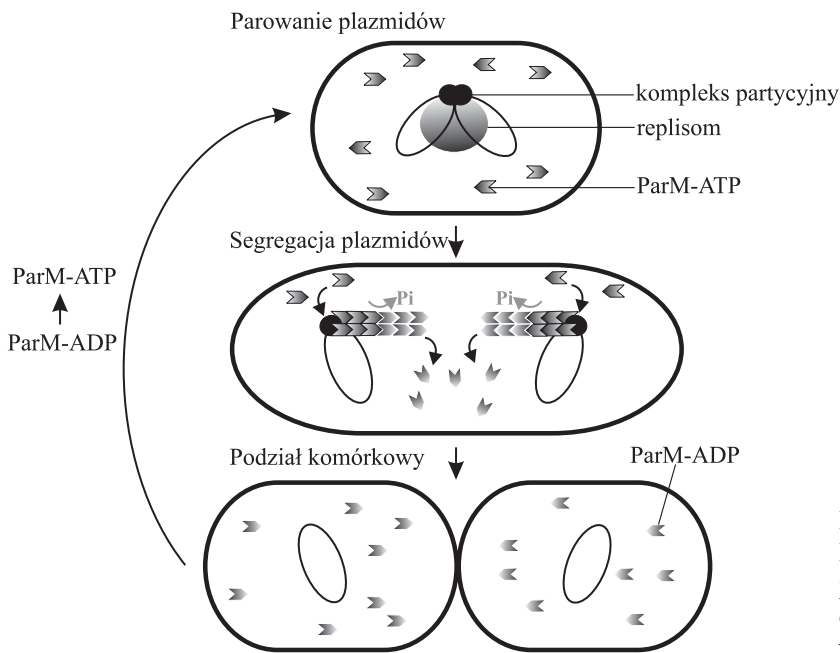
Mechanizm lokalizacji plazmidów podczas partycji z udziałem ATPaz typu Walkera może przypominać mechanizm regulacji powstawania przegród podziałowych wewnątrz komórek *E. coli* zależny od białek MinC, MinD i MinE (YAMAICHI i NIKI 2000). Potencjalne miejsca tworzenia przegród znajdują się zarówno w

centrum komórki, jak i w płaszczyznach odpowiadających 1/4 i 3/4 jej długości, które wyznaczają przyszłe centra komórek potomnych. Białka MinCDE umożliwiają tworzenie przegrody centralnej blokując jednocześnie tworzenie przegród blisko rejonów biegunowych. Jedno z nich, MinD, jest ATPazą, której sekwencja aminokwasowa jest podobna do sekwencji białek rodziny ParA. Ponadto z użyciem fuzji z fluoryzującym białkiem Gfp pokazano, że zarówno MinD, jak i jego homologi partycyjne, białko ParA kodowane przez plazmid pB171 patogennego szczepu *E. coli* i białko Soj kodowane przez chromosom *B. subtilis*, oscylują pomiędzy przeciwnymi biegunami komórki (RASKIN i DE BOER 1999, QUISEL i współaut. 1999, EBERSBACH i GERDES 2001). Oscylacja polega na przemieszczaniu się wewnątrzkomórkowej puli MinD, ParA lub Soj na przemian z jednego do drugiego bieguna i zależy od aktywności ATPazowej tych białek. Kinetyka oscylacji MinD i białek partycyjnych jest różna: MinD oscylowało w odstępach sekundowych, białko ParA_{pB171} w odstępach minutowych. W przeciwieństwie do MinD, ParA_{pB171} było zdolne do oscylacji tylko w komórkach zawierających plazmid z centromerem pB171 i białko ParB tego plazmidu, co wskazuje na zależność oscylacji od wcześniejszego utworzenia kompleksu białkowo-centromerowego i jej związek z zaawansowanymi reakcjami partycyjnymi. Nie wiadomo czy oscylacja białek typu ParA jest w jakiś sposób zsynchronizowana z ruchem plazmidów wewnątrz komórki i czy dostarcza siły motorycznej dla tego ruchu.

Mechanizm przemieszczania plazmidów zależny od aktywnopodobnych ATPaz partycyjnych może różnić się istotnie od mechanizmu przemieszczania zależnego od ATPaz typu Walкера. Wydaje się on działać na zasadzie podobnej do generacji ruchu przez polimeryzację aktywny (patrz: STRZELECKA-GOLASZEWSKA 2001). Wskazują na to właściwości ATPazy partycyjnej plazmidu R1, ParM, oraz zaobserwowane w komórkach, utrwalonych podczas aktywnej partycji R1, dynamiczne zmiany w lokalizacji i sposobie organizacji cząsteczek ParM (MOLLER-JENSEN i współaut. 2002). W części komórek białko ParM tworzyło filamenty ciągnące się wzdłuż długiej osi komórki od bieguna do bieguna, w części było rozproszone w cytoplazmie, w części skupiało się w postaci ognisk w pozycjach biegunowych lub w centrum komórki. Obserwowane zmiany można uznać za dowód naprzemiennej polimeryzacji i

depolimeryzacji ParM. Tworzenie filamentów zależało od obecności w komórkach plazmidu zawierającego centromer R1, *parC*, i białka ParR wiążącego się do centromeru, natomiast nie zależało od aktywności ATPazowej ParM. Ta ostatnia okazała się niezbędna dla depolimeryzacji ParM i w konsekwencji dla wewnątrzkomórkowej dynamiki tworzenia filamentów. Białka ParM mutantów, pozbawione aktywności ATPazowej tworzyły stabilne filamenty we wszystkich komórkach, niezależnie od obecności ParR i *parC*. Również *in vitro* tworzenie filamentów ParM wymagało ATP, a ich depolimeryzacja następowała spontanicznie i zależała od hydrolizy ATP. Poprzez dodawanie do oczyszczonego ParM kolejnych porcji ATP udało się odtworzyć cykliczność procesu polimeryzacji i depolimeryzacji. Polimeryzacja ParM w obecności ATP stymuluje jego aktywność ATPazową niezbędną do depolimeryzacji związanej z hydrolizą ATP do ADP i wolnego fosforanu. Dodanie świeżej porcji ATP zwiększa ilość kompleksów wolnego ParM-ATP w stosunku do ParM-ADP, co powoduje przesunięcie równowagi w stronę ponownego zapoczątkowania procesów polimeryzacyjnych. Obserwowana *in vivo* zależność tworzenia filamentów ParM od ParR i *parC* ma miejsce również *in vitro* w roztworach ParM zawierających zbyt niskie stężenia ATP dla zapoczątkowania spontanicznie reakcji polimeryzacyjnych. Jednoczesne dodanie śladowych ilości ParR i DNA zawierającego *parC* zapoczątkowuje polimeryzację ParM w tych roztworach. Filamenty ParM mają szerokość 7 nm, podobną do szerokości zawierających dwa protofilamenty filamentów eukariotycznej aktyny.

Aktywnopodobna struktura ParM oraz jego cechy związane z tworzeniem i depolimeryzacją filamentów stały się podstawą do zaproponowania modelu przemieszczania plazmidów z udziałem ATPaz rodziny ParM (Ryc. 5). Zakłada on, że po procesie replikacji plazmidów w centrum komórki i parowania zreplikowanych kopii z udziałem kompleksów centromerowych *parC*-ParR, białko ParR w tych kompleksach staje się miejscem przyłączania i polimeryzacji obecnego w komórce wolnego ParM-ATP. Kolejne kompleksy ParM-ATP dołączając do tworzącego się filamentu poprzez interakcję z ParR są wstawiane pomiędzy kompleks centromerowy, a utworzony dotychczas filament, co powoduje odsuwanie plazmidów pary od siebie, w kierunku biegunów komórkowych. Po-



Ryc. 5. Model partycji plazmidu R1 z uwzględnieniem roli ATPazy partycyjnej ParM w przemieszczaniu cząsteczek plazmidu wewnątrz komórki (wg MOLLER-JENSENA i współaut. 2002, zmodyfikowany). Opis w tekście.

limeryzacja ParM stymuluje jego aktywność ATPazową. Prowadzi to do zapoczątkowania hydrolizy ATP wewnątrz struktury filamentów, tak jak w przypadku filamentów aktyny. Konwersja ParM-ATP w filamentach do ParM-ADP + Pi oraz dyfuzja nieorganicznego fosforanu powodują zmiany konformacji ParM, a w konsekwencji destabilizację struktury filamentu i jego depolimeryzację na końcu przeciwnym do końca dołączania nowych kompleksów ParM-ATP. Wymiana ADP na ATP w odłączonych od filamentu kompleksach ParM-ADP może inicjować następną rundę polimeryzacji z udziałem tych samych cząsteczek ParM. Ponieważ przed podziałem plazmidy R1

w komórce lokalizują się blisko jej biegunów założono, że po podziale komórkowym sam proces replikacji mógłby w nieznany jeszcze sposób powodować przemieszczanie plazmidów do centrum komórki i powtórzenie cyklu. W proponowanym modelu przemieszczanie plazmidów podczepionych do rosnącego końca filamentów byłoby generowane poprzez zaobserwowany poprzednio w przypadku filamentów aktynowych proces tzw. „przepływu monomerów” (ang. treadmiling) przez filamenty rosnące od strony kompleksu centromerowego, a depolimeryzujące na przeciwnym końcu.

PARTITIONING OF LOW-COPY NUMBER PLASMIDS

S u m m a r y

Partitioning of low-copy number plasmids at cell division resembles mitosis in that prior to cell division paired plasmid molecules are separated from each other and actively moved apart from the center of the mother cell into positions corresponding to the centers of future daughters. Two plasmid proteins and a *cis*-acting site in plasmid DNA, an analog of eukaryotic centromere, are essential for partitioning to occur. Typically, partition proteins are encoded within an operon whose expression is regulated by one or both of its products. The product of the first gene of the partition operon (ParA, SopA or ParM) is an ATPase, the product of the second gene (ParB,

SopB or ParR) is a centromere-binding protein. Partitioning ATPases belong to the Walker-type or actin-type ATPase families. They interact with their target centromeric complexes indirectly, *via* plasmid specific centromere-binding proteins. Two types of partitioning ATPases may provide two different ways of plasmid translocation within a cell. The movement of plasmid R1, which encodes the actin-type ParM ATPase, is associated with extension of ParM filaments at their polar end and depolymerization at the opposite end. Extension might possibly occur by insertion of new ParM molecules between the centromere-bound ParR proteins of paired R1

plasmids and ParM molecules bound to ParR, thus pushing the plasmids towards the opposite cell poles. The role of Walker-type ATPases in plasmid translocation is not clear. In their structure they resemble some ion pump proteins. They may either participate in plasmid movement by themselves or connect plasmids to unknown partition machinery of a host. Some of them can oscillate between cellular poles, reminiscent of the behavior of related bacterial

proteins, MinD, that specify the sites of septum placement.

Partitioning mechanisms in bacteria are evolutionarily conserved and of universal occurrence. Plasmid partition operons with centromeric sites can function as gene cassettes able to stabilize other unstable low-copy number plasmids. Certain bacterial chromosomes encode homologs of plasmid partition genes essential for chromosome partitioning.

LITERATURA

- ABELES, A. L., FRIEDMAN S. A., AUSTIN S. J., 1985. *Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. III. The DNA sequence and functional organization of the P1 partition region*. J. Mol. Biol. 185, 261–272.
- AUSTIN S., FRIEDMAN S., LUDTKE D., 1986. *Partition functions of unit-copy plasmids can stabilize the maintenance of plasmid pBR322 at low copy number*. J. Bacteriol. 168, 1010–103.
- AUSTIN S., NORDSTROM K., 1990. *Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids*. Cell 60, 351–354.
- AUSTIN S. J., 1984. *Bacterial plasmids that carry two functional centromere analogs are stable and are partitioned faithfully*. J. Bacteriol. 158, 742–745.
- BARTOSIK D., 2001. *Bacterial plasmid stability*. Postepy Biochem. 47, 138–145.
- BARTOSIK D., BAJ J., PIECHUCKA E., WALKER E., WŁODARCZYK M., 2002. *Comparative characterization of repABC-type replicons of Paracoccus versus composite plasmids*. Plasmid (w druku).
- BIEK D. P., SHI J., 1994. *A single 43-bp sopC repeat of plasmid mini-F is sufficient to allow assembly of a functional nucleoprotein partition complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8027–8031.
- BIGNELL C., THOMAS C. M., 2001. *The bacterial ParA-ParB partitioning proteins*. J. Biotechnol. 91, 1–34.
- BIGNELL C. R., HAINES A. S., KHARE D., THOMAS, C. M., 1999. *Effect of growth rate and incC mutation on symmetric plasmid distribution by the IncP-1 partitioning apparatus*. Mol. Microbiol. 34, 205–216.
- BORK P., SANDER C., VALENCIA A., 1992. *An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7290–7294.
- BOUET J. Y., FUNNELL B. E., 1999. *P1 ParA interacts with the P1 partition complex at parS and an ATP-ADP switch controls ParA activities*. Embo J. 18, 1415–1424.
- BREUNER A., JENSEN R. B., DAM M., PEDERSEN S., GERDES K., 1996. *The centromere-like parC locus of plasmid R1*. Mol. Microbiol. 20, 581–592.
- DAM M., GERDES K., 1994. *Partitioning of plasmid R1. Ten direct repeats flanking the parA promoter constitute a centromere-like partition site parC, that expresses incompatibility*. J. Mol. Biol. 236, 1289–1298.
- DAVEY M. J., FUNNELL B. E., 1994. *The P1 plasmid partition protein ParA. A role for ATP in site-specific DNA binding*. J. Biol. Chem. 269, 29908–29913.
- DAVEY M. J., FUNNELL B. E., 1997. *Modulation of the P1 plasmid partition protein ParA by ATP, ADP, and P1 ParB*. J. Biol. Chem. 272, 15286–15292.
- DAVIS M. A., MARTIN K. A., AUSTIN S. J., 1992. *Biochemical activities of the parA partition protein of the P1 plasmid*. Mol. Microbiol. 6, 1141–1147.
- DAVIS M. A., RADNEDGE L., MARTIN K. A., HAYES F., YOUNGREN B., AUSTIN S. J., 1996. *The P1 ParA protein and its ATPase activity play a direct role in the segregation of plasmid copies to daughter cells*. Mol. Microbiol. 21, 1029–1036.
- 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.
- EBERSBACH G., GERDES, K., 2001. *The double par locus of virulence factor pB171: DNA segregation is correlated with oscillation of ParA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 15078–15083.
- EDGAR R., CHATTORAJ D. K., YARMOLINSKY M., 2001. *Pairing of P1 plasmid partition sites by ParB*. Mol. Microbiol. 42, 1363–70.
- ERDMANN N., PETROFF T., FUNNELL B. E., 1999. *Intracellular localization of P1 ParB protein depends on ParA and parS*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14905–14910.
- FUNG E., BOUET J. Y., FUNNELL B. E., 2001. *Probing the ATP-binding site of P1 ParA: partition and repression have different requirements for ATP binding and hydrolysis*. EMBO J. 20, 4901–4911.
- FUNNELL B. E., 1988a. *Mini-P1 plasmid partitioning: excess ParB protein destabilizes plasmids containing the centromere parS*. J. Bacteriol. 170, 954–960.
- FUNNELL B. E., 1988b. *Participation of Escherichia coli integration host factor in the P1 plasmid partition system*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6657–6661.
- FUNNELL B. E., 1991. *The P1 plasmid partition complex at parS. The influence of Escherichia coli integration host factor and of substrate topology*. J. Biol. Chem. 266, 14328–14337.
- FUNNELL B. E., GAGNIER L., 1993. *The P1 plasmid partition complex at parS. II. Analysis of ParB protein binding activity and specificity*. J. Biol. Chem. 268, 3616–3624.

- GERDES K., MOLLER-JENSEN J., BUGGE JENSEN R., 2000. *Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny*. Mol. Microbiol. 37, 455–466.
- GODFRIN-ESTEVENON A. M., PASTA F., LANE D., 2002. *The parAB gene products of Pseudomonas putida exhibit partition activity in both P. putida and Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 43, 39–49.
- GORDON G. S., SITNIKOV D., WEBB C. D., TELEMEN A., STRAIGHT A., LOSICK R., MURRAY A. W., WRIGHT A., 1997. *Chromosome and low copy plasmid segregation in E. coli: visual evidence for distinct mechanisms*. Cell 90, 1113–1121.
- GRIGORIEV P., LOBOCKA M. B., 2001. *Determinants of segregational stability of the linear plasmid prophage N15 of Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 42, 355–368.
- HANAI R., LIU R., BENEDETTI P., CARON P. R., LYNCH A. S., WANG J. C., 1996. *Molecular dissection of a protein SopB essential for Escherichia coli F plasmid partition*. J. Biol. Chem. 271, 17469–17475.
- HAO J. J., YARMOLINSKY M., 2002. *Effects of the plasmid centromere on expression of P1 partition genes*. J. Bacteriol. 184, 4857–4867.
- HAYES F., AUSTIN S., 1994. *Topological scanning of the P1 plasmid partition site*. J. Mol. Biol. 243, 190–198.
- HIRAGA S., 2000. *Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes*. Annu. Rev. Genet. 34, 21–59.
- HIRANO M., MORI H., ONOGI T., YAMAZOE M., NIKI H., OGURA T., HIRAGA S., 1998. *Autoregulation of the partition genes of the mini-F plasmid and the intracellular localization of their products in Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 257, 392–403.
- HO T. Q., ZHONG Z., AUNG S., POGLIANO J., 2002. *Compatible bacterial plasmids are targeted to independent cellular locations in Escherichia coli*. EMBO J. 21, 1864–1872.
- JAGURA-BURDZY G., MACARTNEY D. P., ZATYKA M., CUNLIFFE L., COOKE D., HUGGINS C., WESTBLADE L., KHANIM F., THOMAS C. M., 1999. *Repression at a distance by the global regulator KorB of promiscuous IncP plasmids*. Mol. Microbiol. 32, 519–532.
- JENSEN R. B., DAM M., GERDES K., 1994. *Partitioning of plasmid R1. The parA operon is autoregulated by ParR and its transcription is highly stimulated by a downstream activating element*. J. Mol. Biol. 236, 1299–1309.
- JENSEN R. B., GERDES K., 1997. *Partitioning of plasmid R1. The ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-parC complex*. J. Mol. Biol. 269, 505–513.
- JENSEN R. B., GERDES K., 1999. *Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: ParM partitioning protein of plasmid R1 co-localizes with its replicon during the cell cycle*. EMBO J. 18, 4076–4084.
- JENSEN R. B., LURZ R., GERDES K., 1998. *Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: replicon pairing by parC of plasmid R1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8550–8555.
- JONES L. J., CARBALLIDO-LOPEZ R., ERRINGTON J., 2001. *Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in Bacillus subtilis*. Cell 104, 913–922.
- KALNIN K., STEGALKINA S., YARMOLINSKY M., 2000. *pTA-R-encoded proteins in plasmid partitioning*. J. Bacteriol. 182, 1889–1894.
- KIM S. K., WANG J. C., 1999. *Gene silencing via protein-mediated subcellular localization of DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8557–8561.
- KOONIN E. V., 1993. *A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif* [published erratum appears in J. Mol. Biol. 1993232(3), 1013]. J. Mol. Biol. 229, 1165–1174.
- KUSUKAWA N., MORI H., KONDO A., HIRAGA S., 1987. *Partitioning of the F plasmid: overproduction of an essential protein for partition inhibits plasmid maintenance*. Mol. Gen. Genet. 208, 365–372.
- LANE D., ROTHENBUEHLER R., MERRILLAT A. M., AIKEN C., 1987. *Analysis of the F plasmid centromere*. Mol. Gen. Genet. 207, 406–412.
- LEMON K. P., GROSSMAN A. D., 1998. *Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication* [see comments]. Science 282, 1516–1519.
- LEMON K. P., GROSSMAN A. D., 2000. *Movement of replicating DNA through a stationary replisome*. Mol. Cell 6, 1321–1330.
- LIN D. C., GROSSMAN A. D., 1998. *Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site*. Cell 92, 675–685.
- LOBOCKA M., YARMOLINSKY M., 1996. *P1 plasmid partition: a mutational analysis of ParB*. J. Mol. Biol. 259, 366–382.
- MARTIN K. A., DAVIS M. A., AUSTIN S., 1991. *Fine-structure analysis of the P1 plasmid partition site*. J. Bacteriol. 173, 3630–3634.
- MOHL D. A., GOBER J. W., 1997. *Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in Caulobacter crescentus*. Cell 88, 675–684.
- MOLLER-JENSEN J., JENSEN R. B., LOWE J., GERDES K., 2002. *Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament*. EMBO J. 21, 3119–3127.
- MORI H., MORI Y., ICHINOSE C., NIKI H., OGURA T., KATO A., HIRAGA S., 1989. *Purification and characterization of SopA and SopB proteins essential for F plasmid partitioning*. J. Biol. Chem. 264, 15535–15541.
- POGLIANO J., HO T. Q., ZHONG Z., HELINSKI D. R., 2001. *Multicopy plasmids are clustered and localized in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 4486–4491.
- QUISEL J. D., LIN D. C., GROSSMAN A. D., 1999. *Control of development by altered localization of a transcription factor in B. subtilis*. Mol. Cell 4, 665–672.
- RASKIN D. M., DE BOER P. A., 1999. *Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4971–4976.
- RAVIN N., LANE D., 1999. *Partition of the linear plasmid N15: interactions of N15 partition functions with the sop locus of the F plasmid*. J. Bacteriol. 181, 6898–6906.
- RODIONOV O., LOBOCKA M., YARMOLINSKY M., 1999. *Silencing of genes flanking the P1 plasmid centromere*. Science 283, 546–549.

- STRZELECKA-GOLASZEWSKA H., 2001. *Generacja ruchu przez polimeryzację aktyny*. Kosmos, 50, 411–425.
- TREPTOW N., ROSENFELD R., YARMOLINSKY M., 1994 *Partition of nonreplicating DNA by the par system of bacteriophage P1*. J. Bacteriol. 176, 1782–1786.
- VAN DEN ENT F., AMOS L. A., LOWE J., 2001. *Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton*. Nature 413, 39–44.
- WEITAO T., DASGUPTA S., NORDSTROM K., 2000. *Plasmid R1 is present as clusters in the cells of Escherichia coli*. Plasmid 43, 200–204.
- YAMAICHI Y., NIKI H., 2000. *Active segregation by the bacillus subtilis partitioning system in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 14656–14661.
- YARMOLINSKY M., 2000. *Transcriptional silencing in bacteria*. Curr. Opin. Microbiol. 3, 138–143.