

GRAŻYNA JAGURA-BURDZY

*Zakład Biochemii Drobnoustrojów
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
gjburdzy@ibb.waw.pl*

ROLA REGULACJI EKSPRESJI GENÓW W STABILNOŚCI PLAZMIDÓW

Plazmidy, czyli niezależnie replikujące się pozachromosomalne elementy genetyczne występują w Archea, Eubacteria i Eukaryota. Najlepiej poznano biologię plazmidów u bakterii i tej grupie poświęcone będą niniejsze rozważania. Plazmidy, zgodnie z przyjętą definicją, nie są niezbędne komórce gospodarza do przetrwania ale często zwiększają jego zdolności adaptacyjne do zmieniających się warunków środowiska. Ekspresja informacji genetycznej, którą niosą (stanowiąca niejednokrotnie kilkanaście % informacji komórki) może prowadzić do obciążenia metabolizmu w takim stopniu, że zmniejszy szansę gospodarza w konkurencji z komórkami bezplazmidowymi. Regulacja ekspresji genów plazmidowych decyduje więc o sukcesie w rozprzestrzenianiu się zarówno w linii pionowej (z pokolenia na pokolenie, ang. vertical inheritance), jak i horyzontalnie (poprzez „infekcję” nowych komórek, ang. horizontal transfer).

Mówiąc o plazmidach zwykle wymieniamy cechy fenotypowe o jakie wzbogacają gospodarza: oporności na antybiotyki czy metale ciężkie, zdolność rozkładu związków organicznych, wykorzystanie różnych związków węgla, oporności na UV itp. Dla biologii plazmidów najistotniejsze są jednak operony odpowiedzialne za replikację i mechanizmy stabilnego dziedziczenia stanowiące tzw. szkielet genetyczny

(ang. backbone). Dla większych plazmidów jest to także zdolność zasiedlania nowych gospodarzy w wyniku transferu koniugacyjnego (plazmidy mobilizowalne czy koniugacyjne). Badania nad transkryptomem plazmidów IncP-1 (Thomas, dane nieopublikowane) wskazują, że spośród około 60 genów plazmidu RK2 wysoki poziom ekspresji charakteryzuje jedynie operony oporności na antybiotyki. Być może jest to reguła dla genów warunkujących wymierne korzyści adaptacyjne, a być może jest oznaką niedawnego włączenia tych genów do wyciszonego na drodze ewolucji tła genetycznego, jakim jest szkielet plazmidowego genomu.

Promotory operonów odpowiedzialnych za replikację, stabilne utrzymywanie w komórkach czy transfer horyzontalny w przeważającej części należą do bardzo silnych sygnałów transkrypcyjnych, z których ekspresja rzadko zachodzi konstytutywnie. Podlegają one regulacji negatywnej, zapewniając w ten sposób potencjalną możliwość wysokiego poziomu ekspresji genomu plazmidowym. Możliwość, która przez większość cyklu życiowego plazmidu jest jednak niewykorzystana. Indukcja ekspresji operonów jest rzadko używanym mechanizmem regulacji transkrypcji, najlepiej poznane przykłady dotyczą indukcji systemów transferu koniugacyjnego i jeden z przykładów będzie omówiony szczegółowo.

REGULACJA PROCESU REPLIKACJI

Celem kontroli procesu replikacji plazmidu jest utrzymywanie ścisłej liczby kopii, opty-

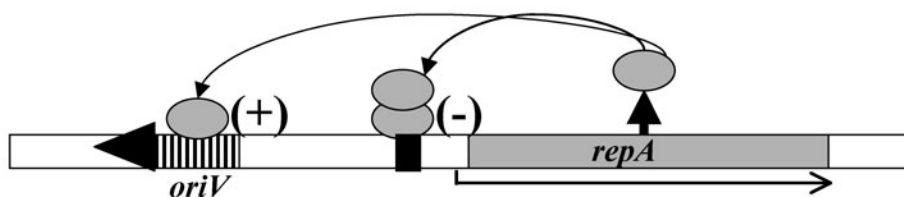
malnej dla określonej wielkości plazmidu tak, aby z jednej strony nie obniżyć zdolności prze-

życia gospodarza (ang. fitness) a z drugiej strony zabezpieczyć przekazanie w czasie podziału bakterii chociaż jednej kopii plazmidu każdej komórce potomnej (DEL SOLAR i współaut. 1998)

Plazmidy wykorzystują do powielania się „fabryki replikacyjne” gospodarza. Sygnał rozpoczęcia replikacji w *oriV* (ang. origin – punkt startu) plazmidu jest jednak zależny od specyficznego Inicjatora kodowanego przez sam plazmid: może to być białko (zwane najczęściej Rep) lub inicjatorowe RNA (np. RNA II w plazmidach typu ColE1). Generalnie kontrola ilości kopii plazmidu przebiega na etapie inicjacji replikacji poprzez obniżanie ekspresji genu *rep* (ESPINOZA i współaut. 2000). Najprostszy negatywny mechanizm regulacyjny to autogenna represja. Wyjściowo wysoki poziom ekspresji (po podziale komórki i spadku ilości kopii plazmidu czy przejściu genomu plazmidowego do biorcy w czasie koniugacji) jest reprimowany w miarę przybywania produktu, czyli białka Rep. Dla wielu plazmidów wykazano, że białko Rep przyjmuje dwie formy: w postaci monomeru wiąże się do powtórzonych sekwencji w *oriV* zwanych iteronami, aktywuje *oriV* powodując „topnienie” dwuniciowej struktury DNA i inicjuje replikację, natomiast w postaci dimeru wiąże się do operatora w regionie własnego promotora i blokuje transkrypcję (Ryc. 1) (CHATTORAJ 2000). W niektó-

Inny mechanizm regulacji ekspresji genu *rep* również często wykorzystywany przez plazmidy oparty jest na powstawaniu antysensownego RNA, które poprzez oddziaływanie z mRNA_{*rep*} obniża jego trwałość, powoduje atenuację, maskuje sygnały translacyjne lub zwiększa powinowactwo dodatkowych elementów regulacyjnych np. białek represorowych (WAGNER i SIMONS 1994, FRANCH i GERDES 2000). Regulatorowe, antysensowne RNA jest wysoce labilne, jego stężenie jest więc ściśle proporcjonalne do ilości kopii plazmidu. Spadek ilości kopii plazmidu, a tym samym regulatorowego RNA, prowadzi do wzmożonej syntezy inicjatora. Najlepiej poznany system replikacji plazmidów typu ColE1, w których inicjacja replikacji regulowana jest przez antysensowne RNA (RNA I) nie zależy od białka inicjatorowego Rep: inicjatorem replikacji jest tu transkrypt tzw. RNA II. Jego prawidłowe zwinięcie się i oddziaływanie z DNA w regionie *oriV* jest sygnałem do wkroczenia RNazyH i PolI DNA oraz rozpoczęcia replikacji plazmidu. Tworzenie dwuniciowych struktur między RNA II i komplementarnym do niego RNA I uniemożliwia tworzenie hybrydu RNAII-DNA i blokuje replikację.

Negatywna kontrola oparta na działaniu represorów, produktów niezależnych operonów wydaje się najrzadziej stosowanym sposobem regulacji ekspresji genu *rep*. W takich przypad-



Ryc. 1. Autogenna regulacja genu *rep*.

Białko Rep w postaci monomeru wiąże się z iteronami (powtórzone miejsca wiązania Rep) w regionie *oriV* i inicjuje replikację. W postaci dimeru rozpoznaje operator w regionie własnego promotora i blokuje transkrypcję.

rych plazmidach lokalizacja iteronów *oriV* w regionie promotora *rep* umożliwia pełnienie różnych funkcji przez tę samą formę białka Rep w zależności od stężenia Rep. Co więcej, sam proces replikacji może indukować produkcję białka Rep i nowe wydarzenia inicjacyjne poprzez usuwanie represora Rep z miejsc operatorowych (profag P1) (MUKHOPADHYAY i CHATTORAJ 2000).

kach sensorem ilości kopii plazmidu staje się element niezależny od samego procesu replikacji. Interesującym przykładem są tu plazmidy IncP-1, w których ekspresja genu *trfA* (czyli *rep*) jest regulowana przez przynajmniej trzy globalne represory KorA, IncC i KorB, produkty tzw. centralnego operonu kontroli *korAincC-korB* (PANSEGRAU i współaut. 1994).

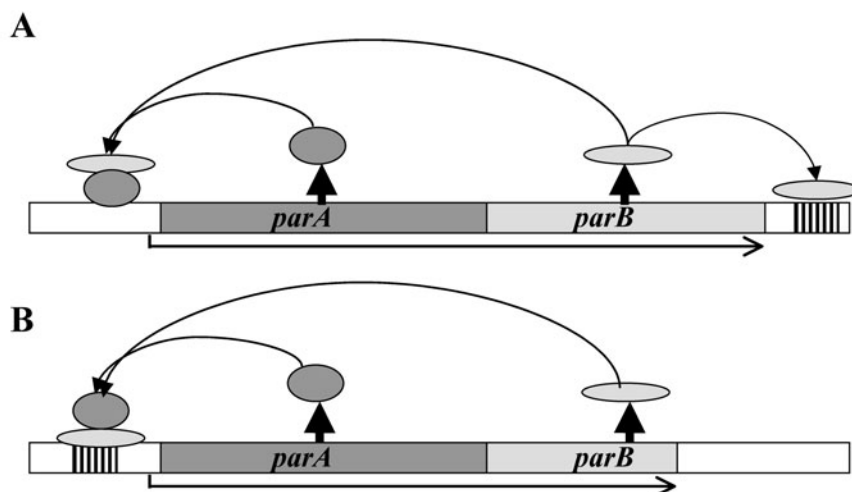
Rozwój badań nad replikacją plazmidów wyraźnie wskazuje, że proste mechanizmy kontroli, chociaż skuteczne, ustępują miejsca kombinacji różnych mechanizmów: autogen-

nej regulacji i regulacji przy udziale antysensownego RNA czy antysensownego RNA i dodatkowych białek represorowych (DEL SOLAR i ESPINOZA 2000).

REGULACJA EKSPRESJI OPERONÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA STABILNE DZIEDZICZENIE PLAZMIDÓW

Plazmidy rozprzestrzeniają się czynnie w populacji gospodarza dwoma sposobami: przekazywane są do potomstwa w czasie podziału komórki albo na drodze koniugacji/mobilizacji „infekują” bezplazmidowego dotychczas biorcę. Replikacja zapewnia właściwą ilość kopii plazmidu na komórkę zwiększając szansę przetrwania, a kodowane przez plazmidy systemy *mrs* (ang. multimer resolution systems) maksymalizują ilość kopii separując powstające dimery/multimery. Podczas gdy małe plazmidy o dużej ilości kopii bazują na losowej segregacji cząsteczek do komórek potomnych, duże plazmidy o niskiej liczbie kopii (1–2 na komórkę) aktywnie pomagają losowi stosując powszechnie dwa mechanizmy: aktywnego rozdziału (ang. active aprtitioning) i niszczenia w populacji tych bakterii, które przypadkowo straciły plazmid (ang. postsegregational killing, psk) (GERDES i współaut. 2000a). Genomika plazmidów dostarcza dowodów na „mobilność” tych mechanizmów między różnymi plazmidami. Jest to możliwe m.in. dzięki temu, że są kodowane przez zamknięte, samoregulowalne jednostki transkrypcyjne, nazywane często „kasetami”.

Systemy aktywnego rozdziału to operony składające się najczęściej z dwóch genów *parA* i *parB* i z miejsca centromero-podobnego *parS* (przez analogię do systemów eukariotycznych) (GERDES i współaut. 2000b). W uproszczeniu aktywny rozdział przebiega następująco: białko typu B rozpoznaje i wiąże *parS*, tworzy pary plazmidów, które następnie są aktywnie separowane przy udziale aktywności ATPazowej białka *ParA* i cząsteczki plazmidów kierowane są do przeciwnych biegunów komórki w czasie jej podziału. Istnieją dwa główne typy systemów aktywnego rozdziału oparte na budowie białkowych składników, lokalizacji centromeru i regulacji ekspresji. W przypadku pierwszym ilość białka typu *ParA* (ATPaza z motywami Walkera) jest limitowana (tak samo jak białka *ParB*). Białko *ParA* jest autogennym represorem operonu *parAparB* i w tej funkcji jest wspomagane przez *ParB* lub białko *ParB* jest autorepresorem wiążąc się do centromeru w rejonie promotora i w tej funkcji wspomagane jest przez *ParA* (Ryc. 2A, B). Zaburzenia relatywnych ilości obu składników prowadzą do gwałtownej utraty (destabilizacji) plazmidu. W przypadku plazmidu R1



Ryc. 2. Autoregulacja operonów aktywnego rozdziału.

Dwa modele autoregulacji są przedstawione schematycznie: (A) głównym represorem jest *ParA* a *ParB* stabilizuje kompleksy *ParA*-DNA, centromer (miejsce oddziaływania *ParB* z DNA) występuje bezpośrednio za operonem lub w odległych miejscach; (B) lokalizacja centromeru pokrywa się z promotorem operonu *parAB* i dzięki temu *ParB* pełni równocześnie dwie funkcje – autorepresora i białka podziałowego.

(typ II) funkcję autorepresora pełni białko ParR (homolog ParB), którego ilość w komórce wynosi około 1000 cząsteczek. Nie jest to skuteczna autorepresja ponieważ poziom pierwszego produktu operonu ParM (aktywnopodobnej ATPazy) wynosi około 15000 monomerów (MOLLER-JENSEN i współaut. 2002). Różnice w ekspresji obydwu genów wynikają z inhibicji translacji *parB* z policistronowego mRNA (ang. translation coupling). ParM oddziałuje z kompleksem *parS*-ParR i polimeryzując tworzy dynamicznie aktywne długie struktury separujące przestrzennie cząsteczki plazmidu do biegunów- jest to pierwszy przykład analogu wrzeciona podziałowego u bakterii. Z punktu widzenia regulacyjnego jest to też wyjątek od klasycznej reguły „wyciszania” ekspresji genów plazmidowych.

Systemy posegregacyjnego zabijania psk, mimo swojej różnorodności i wyspecjalizowa-

nia w działaniu na różne „cele” w komórce, bazują na różnicach w stabilności toksyny i odtrutki (GERDES i współaut. 2000a). W operonach psk, które kodują dwa białkowe składniki albo sama odtrutka albo w kompleksie z trucizną odpowiada za autoregulację. W niektórych plazmidach jak np. pSM19035 z grupy *inc18* w operonie trucizny (ζ) i odtrutki (ϵ) pojawia się niezależny regulator omega, składnik tego samego operonu (ω - ϵ - ζ), który pełni funkcję autorepresora (Ryc. 3) (DE LA HOZ i współaut. 2000). W systemach gdzie odtrutką jest antysensowne niestabilne RNA (np. *hok/sok* w plazmidzie R1) transkrypcja zachodzi konstytutywnie, a regulacja ekspresji jest posttranskrypcyjna. Mechanizm *hok/sok* był pierwszym szczegółowo poznany mechanizmem potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów przy zastosowaniu antysensownego RNA (THISTED i współaut. 1995).

REGULACJA EKSPRESJI OPERONÓW TRANSFERU KONIUGACYJNEGO

Transfer koniugacyjny plazmidów jest jednym z najistotniejszych procesów w horyzontalnym rozprzestrzenianiu się genów w biosferze (ZECHNER i współaut. 2000). Generalnie proces koniugacji składa się z dwóch etapów:

(i) przygotowania DNA plazmidu do transferu tzw funkcje Dtr (ang. DNA transfer and replication);

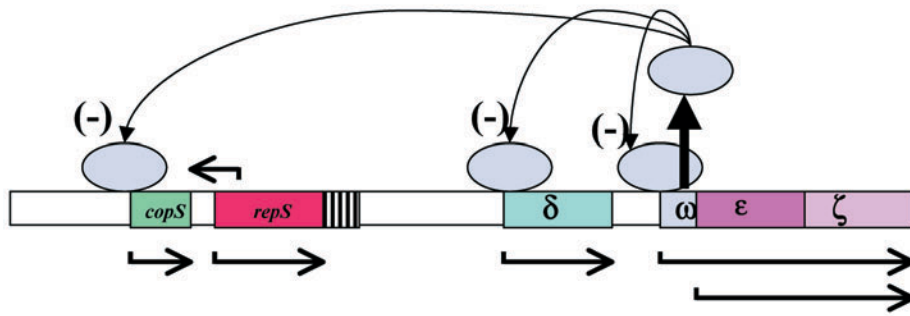
(ii) zbudowania mostu koniugacyjnego między biorcą i dawcą (agregaty koniugacyjne u bakterii Gram dodatnich czy kontakt przy udziale pilusa u bakterii Gram-ujemnych) czyli funkcje Mpf (ang. mating pair formation).

Kompleksy białkowe biorące udział w tych dwóch etapach są kodowane w dużych jednostkach transkrypcyjnych, przestrzennie rozdzielonych. Podczas gdy funkcje Dtr są plazmidowo-specyficzne (kompleks relaksazy rozpoznaje i nacina jedną nić tylko w *oriT* własnego plazmidu), funkcje Mpf plazmidów z bakterii Gram-ujemnych często wykorzystywane są do transportu przez inne plazmidy obecne w komórce bakterii (plazmidy mobilizowalne). Funkcje Dtr razem z Mpf zajmują od 20–40kb, stanowią około 50% informacji genetycznej plazmidów koniugacyjnych, nic więc dziwnego, że ich ekspresja musi być ściśle kontrolowana.

Wśród plazmidów koniugacyjnych rozróżniamy takie, które czekają na sygnał do koniugacji utrzymując funkcje Dtr/Mpf w stanie

„utajnionym” i takie, które są w ciągłej gotowości do transferu chociaż jest to gotowość na minimalnym poziomie (ZATYKA i THOMAS 1998). Najlepiej poznany (i najwcześniej odkryty) jest system koniugacyjny plazmidu F (i plazmidów pochodnych R1 czy R100) zakodowany w około 40 genach regionu *tra*. Około połowa białek Tra uczestniczy w syntezie piliny i budowie F-pilusa. Region *tra* znajduje się za *oriT* i składa się z trzech jednostek transkrypcyjnych, dwóch mono *traM*, *traJ* i jednego multicistronowego operonu *traY*. TraJ jest aktywatorem promotora *traY*. Ekspresja *traJp* jest z kolei modulowana przez mRNA*finP* (antysensowne RNA, negatywny efektor translacji TraJ) i białko FinO, produkt ostatniego genu operonu *traY* (stabilizator dupleksu mRNA*finP*-RNA*traJ*). Działanie FinOP (ang. fertility inhibition) skutecznie wyłącza gen *traJ* i tym samym operon *traY*, jedynie około 0.1% komórek w populacji gospodarza R1 czy R100 jest zdolna do transferu. Dzięki mutacji insercyjnej IS3 w genie *finO* prowadzącej do częściowej derepresji *traJp* populacja gospodarza plazmidu F jest w 100% zdolna do transferu i to sprzyjało odkryciu zjawiska koniugacji u bakterii i skorelowania go z występowaniem plazmidu F (LEDERBERG i TATUM 1946).

Plazmidy IncP-1 są plazmidami o bardzo szerokim spektrum gospodarzy – mogą się replikować i stabilnie utrzymywać we wszyst-

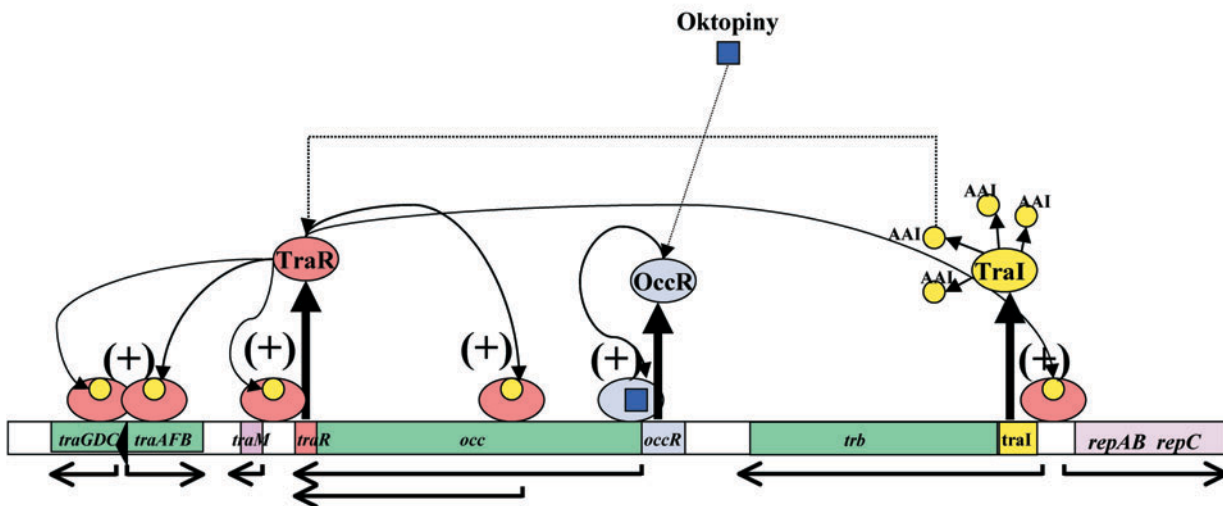


Ryc. 3. Regulon Omega w plazmidzie pSM19035 (*inc18*).

Represor Omega (ω) rozpoznaje krótkie sekwencje nukleotydów występujące jako bezpośrednie lub odwrotne powtórzenia w promotorach *copS* (determinującego ilość kopii plazmidu), δ , kodującego homolog ParA i ω - ϵ - ζ kodującego system stabilizacyjny typu psk.

kich badanych bakterii Gram-ujemnych (PANSEGRAU i współaut. 1994). Ich system koniugacyjny ma jeszcze szerszy zasięg: plazmidy IncP-1 mogą być przenoszone koniugacyjnie do bakterii Gram-dodatnich i komórek eukariotycznych (HEINEMANN i SPRAGUE 1989). Funkcje Dtr zakodowane są w regionie *tra* (Tra1) w dwóch jednostkach transkrypcyjnych *traJHGFEDCBA* i *traKLM*, których przeciwnie

skierowane promotory obejmują *oriT* (miejsce inicjacji transferu koniugacyjnego). Kompleks relaksazy TraJ/TraI/TraK wiążąc się do *oriT* i wprowadzając jednoniciowe nacięcie jednocześnie pełni funkcję autoregulatora obydwu promotorów. Drugi multicistronowy operon *trb* (Tra2) koduje funkcje Mpf. Produktem pierwszego genu tego operonu – *trbA* jest białko represorowe, które jest głównym regula-



Ryc. 4. Regulacja ekspresji operonów transferu koniugacyjnego w plazmidzie pTiC58 z *A. tumefaciens*.

OccR i TraR są aktywatorami transkrypcji, do swojej funkcji wymagają niskocząsteczkowych kofaktorów – specyficznych opin, produktu uszkodzonych komórek roślinnych (OccR) i pochodnej laktonu homoseryny AAI (TraR). Ekspresja *traR* jest zależna od kompleksu OccR-opiny. Autoinduktor AAI jest produktem syntazy TraI. Niski poziom podstawowy AAI jest niewystarczający do aktywacji TraR ale wzrasta wraz ze wzrostem liczby komórek-dawców (gęstością populacji). Przekroczenie poziomu progowego indukuje kaskadę wydarzeń transkrypcyjnych poprzez autoindukcję *traI* i *traR*. Wiązanie TraR-AAI w regionie promotora *traItrb* indukuje transkrypcję również z przeciwnie skierowanego promotora operonu *repABC* odpowiedzialnego za replikację wegetatywną i aktywny rozdział plazmidów.

torem promotorów *tra* i *trb* (ZATYKA i współaut. 1994). Ekspresja operonu *trb* jest regulowana także przez globalny regulator KorB (następny rozdział) dzięki temu ekspresja operonów transferu koniugacyjnego jest sprzężona z ekspresją pozostałych operonów plazmidu. Gospodarze plazmidów IncP-1 są w ciągłej gotowości do transferu koniugacyjnego. Synteza piliny i zbudowanie pilusa zachodzi natychmiast po zasiedleniu nowego gospodarza. Jedna z nici DNA w obrębie *oriT* plazmidu jest nacięta i tylko oddziaływanie relaksazy z *oriT* zapobiega relaksacji cząsteczki DNA. Kontakt z potencjalnym biorcą jest więc natychmiast uwieńczony rozpoczęciem replikacji koniugacyjnej i transferem jednej nici do biorcy.

Inny bardzo ciekawy system koniugacyjny, o którym należałoby wspomnieć jest reprezentowany przez plazmidy Ti z *Agrobacterium tumefaciens* (ZECHNER i współaut. 2000). Plazmidy Ti kodują dwa systemy koniugacyjne: pierwszy, składający się z kilku multicistronowych operonów *vir* umożliwiający transfer około 20kb T-DNA do komórek roślinnych i drugi, czterooperonowy *tra/trb* odpowiedzialny za koniugację między komórkami bakterii. Do indukcji ekspresji operonów *virA*, *virB*, *virD* i *virG* potrzebne są sygnały z uszkodzonych komórek roślinnych. Aktywacja ekspresji regulonu *vir* zależy od VirA i VirG, białek należących do dwu składnikowego systemu regulacyjnego. Do ekspresji genów *tra/trb* wymagana jest kombinacja sygnałów z komórek roślinnych i

informacji o gęstości populacji dawcy (ang. quorum sensing). Pierwszym genem dwunastogenowego operonu *trb* jest *traI* kodujący syntazę autoinduktora AAI (ang. N-3-oxo-octanoyl-L-homoserine lactone) (Ryc. 4). Autoinduktor AAI jest kofaktorem białka TraR, aktywatora transkrypcji operonów *traAFB*, *traCDG*, *traM*, *trb* i *occ*. Indukcja ekspresji *tra/trb* przebiega dwu etapowo: specyficzne opiny produkowane przez uszkodzone komórki roślinne w połączeniu z białkami regulatorowymi (np. OccR w pTiR10) aktywują transkrypcję operonu *occ* i produkcję TraR (*traR* ostatni gen operonu *occ*). Niski podstawowy poziom syntezy induktora AAI przez TraI jest jednak niewystarczający do aktywacji TraR, dopiero wzrost gęstości populacji dawcy i addytywny efekt induktora AAI jest w stanie zmienić konformację białka TraR na aktywator transkrypcyjny m.in. dla własnego operonu a także operonu *trb* i tym samym *traI*.

System koniugacyjny indukowany nie gęstością populacji dawcy, ale obecnością w odpowiednim stężeniu potencjalnych biorców reprezentują plazmidy z bakterii *Enterococcus faecalis* np. pAD1 czy pCF10. Bakterie wydzielają niskocząsteczkowe feromony specyficzne w stosunku do określonego dawcy (gospodarza plazmidu), które osiągając progowe stężenie indukują syntezę substancji agregacyjnej u dawcy i ekspresję operonów koniugacyjnych tego plazmidu. Bez obecności feromonu operony te podlegają ścisłej negatywnej kontroli.

GLOBALNA REGULACJA – SYSTEMY KOORDYNUJĄCE WSZYSTKIE PROCESY ŻYCIOWE PLAZMIDU

W cyklu życiowym plazmidu poszczególne procesy wymagają sekwencji wydarzeń transkrypcyjno-translacyjnych czyli derepresji kolejnych operonów. Najważniejszym jednak aspektem regulacyjnym wydaje się być skoordynowana represja wszystkich funkcji plazmidowych tak, aby gospodarz nie przegrał walki o przeżycie i umożliwił plazmidom dalsze rozprzestrzenianie się w populacji. Koordynacja różnych funkcji plazmidu może być wynikiem organizacji genów w operony np. w plazmidach typu RepABC autoregulowane operony *repABC*, które kodują białko RepC (niezbędne do inicjacji replikacji) kodują również dwa białka odpowiedzialne za aktywny rozdział kopii plazmidu do komórek potomnych: RepAB (RAMIREZ-ROMERO i współaut. 2000). Innym

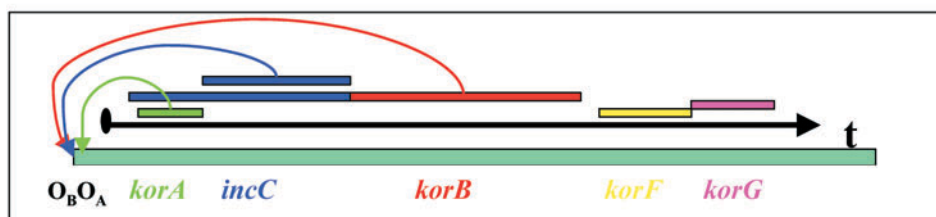
przykładem organizacji przestrzennej ułatwiającej koordynację ekspresji jest występowanie regionów promotorowych inicjujących transkrypcję w przeciwnych kierunkach (ang. divergent promoters) ze wspólnymi miejscami wiązania dla efektorów. Takie promotory najczęściej występują między operonami uczestniczącymi w tym samym procesie (operony Dtr w plazmidach IncP-1 czy IncN) (ZECHNER i współaut. 2000), ale również między operonami np. replikacji wegetatywnej i operonami transferu koniugacyjnego (pTi58, IncP-1 czy IncP-9) (LI i FARRAND 2000, JAGURA-BURDZY i THOMAS 1994, GREATER i współaut. 2000). Tutaj ciekawym przykładem może być wspomniany już plazmid pTiC58 (Ryc. 4), w którym indukcja za pomocą sy-

gnałów z uszkodzonych komórek roślinnych, w połączeniu z sygnałem gęstości populacji komórek z plazmidem, indukuje system transferu koniugacyjnego (LI i FARRAND 2000). Komplex TraR-AAI wiążąc się w regionie przeciwnie skierowanych promotorów *trb* i *repABC* indukuje również operon aktywnego rozdziału i replikacji wegetatywnej plazmidu.

Plazmidy IncP-1 przez wiele lat reprezentowały jedyny w swoim rodzaju majstersztyk regulacyjny (PANSEGRAU i współaut. 1994, THORSTED i współaut. 1998). Ich system regulacyjny charakteryzuje się ogromną złożonością. Niewątpliwie najbardziej uderzającą cechą tego systemu jest istnienie centralnego operonu kontroli *korAB(FG)incC* (ang. *cco*-central control operon) kodującego trzy globalne białka regulatorowe: KorA, KorB i IncC (spośród pięciu do tej pory dokładnie scharakteryzowanych w plazmidach IncP-1) (Ryc. 5). Białka te determinują istnienie tzw. regulonów – grup operonów kontrolowanych przez ten sam globalny regulator. Dodatkowo wiele operonów na plazmidzie podlega autogennej represji. Istnienie regulonów nakładających się na siebie i na lokalne obwody autoregulacyjne sprawia, że każdy promotor jest reprimowany przez przynajmniej dwa represory a niektóre z nich jak *trfAp* czy *kfrAp* przez pięć czy sześć (Ryc. 6). Zachodzące na siebie systemy regulacyjne (ang. multivalent regulatory network) zapewniają bardzo ścisłą kontrolę promotorów, które zwykle mają sekwencje zbliżone do consensus i bardzo wysoki poziom ekspresji. Istnienie takich nakładających się obwodów regulacyjnych to z pewnością doskonały mechanizm buforujący – uszkodzenie jednego z nich nie prowadzi do „ucieczki” promotora spod kontroli. Wreszcie wiele spośród regulatorów wydaje się działać kooperacyjnie: niezależnie działając obniżają poziom ekspresji promotora kilka razy a działając wspólnie nawet kilkaset razy. Przez wiele lat uważano, że posiadanie przez IncP-1 tak silnych promotorów (nieklonowalnych w nieobecności represorów) jest niezbędnym warunkiem ekspresji operonów w różnych gospodarzach – jak wspomniano plazmidy IncP-1 mogą się replikować we wszystkich bakteriiach Gram-ujemnych. Być może jest to prawdą, ale badania ekspresji genów plazmidowych w rozmaitych gospodarzach nie wykazały aż tak wielkich różnic w powinowactwie RNA polimeraz do sekwencji tych promotorów.

W przypadku najlepiej zbadanego systemu regulacyjnego plazmidu RK2 (IncP-1α) globalny regulator KorC (85 aminokwasów, aa) kontroluje ekspresję trzech operonów uczestniczących w stabilizacji plazmidu poprzez represję promotorów: *klcA*, *kleA* i *kleC* (Ryc. 5). Sekwencja palindromowa rozpoznawana przez KorC (O_C) 5'TAGGGCATAATGCCCTA3' pokrywa się z sekwencją -10 promotorów i KorC jest dla tych promotorów nadrzędnym represorem.

KorA (101aa) reguluje siedem operonów m.in. trzy regulowane przez KorC a także inne odpowiedzialne za stabilne dziedziczenie *klaABC*, *kfrAupf54.8upf54.4*, *korABincCkorFG* i wegetatywną replikację (*ssbtrfA*). KorA rozpoznaje palindrom (O_A) 5'TTTAGCTAAA3', który albo zachodzi na sekwencję -10 promotorów (*klaAp*, *korAp* i *trfAp*) albo poprzedza sekwencję -35 (*klcAp*, *kleAp*, *kleCp*, *kfrAp*). W pierwszej grupie promotorów „bezbłędny” palindrom jest 12 nukleotydowy, powiększony o skrajne 5'G i 3'C. W przypadku O_A występujących w pobliżu -35 tylko w *kfrAp* jest 12 nukleotydowy palindrom ale z wewnętrznym błędem (ang. mismatch). Badania hierarchii wiązania KorA do operatorów wykazały 10-krotnie większe powinowactwo białka do 12-perfekcyjnego palindromu niż do 10 nukleotydowego lub 12 z „błędem” (JAGURA-BURDZY i THOMAS 1995). Badania te wykazały również, że dodatkowe sekwencje poprzedzające palindrom modulują powinowactwo represora. Podzielono więc miejsca O_A na dwie klasy w zależności od siły wiązania KorA. Oddziałując z klasą pierwszą O_A (wiązanie w obrębie consensus -10) KorA jest głównym represorem dla danego promotora, oddziaływania z klasą drugą są słabsze i dla takich promotorów KorA jest drugorzędnym represorem. Ponieważ stężenie KorA w komórkach podlega fluktuacjom taka hierarchia wiązania zapewnia hierarchię represji/derepresji poszczególnych operonów. Unikalna i interesująca jest funkcja KorA w regionie pomiędzy operonami *ssbtrfA* (wegetatywna replikacja) a *trb* (transfer koniugacyjny – funkcje Mpf) (JAGURA-BURDZY i THOMAS 1994). Wiążąc się do pojedynczego operatora O_A pomiędzy przeciwnie skierowanymi zachodzącymi na siebie promotorami *trfAp* i *trbAp* (ang. face to face divergent promoters) KorA hamuje wegetatywną replikację i jednocześnie podnosi poziom ekspresji *trbA* kodującego represor wszystkich operonów koniugacyjnych. Nie działa jednak jako bezpo-



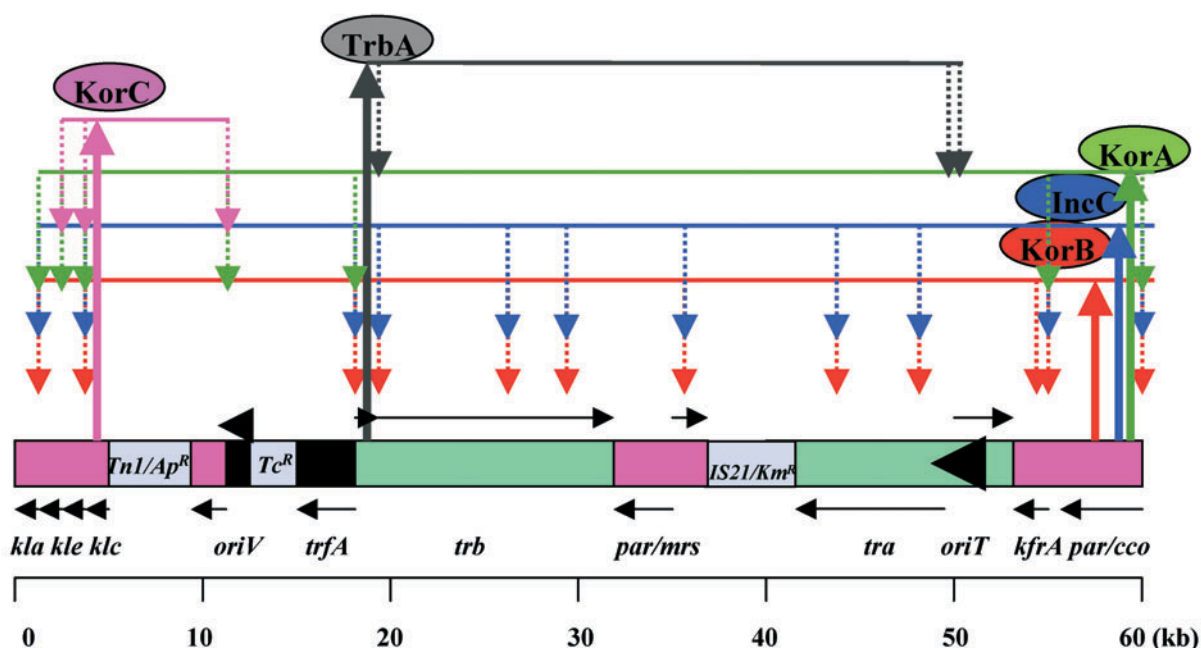
Ryc. 5. Centralny operon kontroli plazmidu RK2 (IncP-1α).

KorA jest zakodowane w 5' końcu genu *incC* w innej ramce odczytu. Gen *incC* koduje dwie różnej długości formy IncC, z których dłuższa ma właściwości regulatorowe a krótsza jest wystarczająca do uczestnictwa w aktywnym rozdziale kopii plazmidu. *korF* i *korG* nie są zakonserwowane w podgrupie IncP-1β, ich rola jako globalnych regulatorów wymaga potwierdzenia. O_A i O_B reprezentują miejsca wiązania dla KorA i KorB w promotorze.

średni aktywator transkrypcji *trbAp* tylko pośrednio uniemożliwiając RNAP tworzenie otwartych kompleksów (izomeryzację) w sekwencji -10 *trfAp* ułatwia cząsteczkom RNAP podążającym po przeciwnej nici od *trbAp* elongację w kierunku genu struktury *trbA*.

TrbA jak wspomniano jest podstawowym represorem operonów transferu koniugacyjnego (ZATYKA i współaut. 1994). Białko jest stosunkowo małe (121 aa) z tego 35 C-końcowych

aminokwasów jest ściśle zakonserwowane między KorA i TrbA. TrbA jako jedyny spośród globalnych regulatorów plazmidów IncP-1 przez długi czas nie miał zidentyfikowanego miejsca wiązania ponieważ jego operator O_T w przeciwieństwie do O_A, O_C czy O_B w żadnej z lokalizacji nie jest perfekcyjnym palindromem. Badania w grupie C. M. THOMAS (dane nieopublikowane) wykazały, że zastąpienie w plazmidzie RK2 palindromu O_T z błędem przez palin-



Ryc. 6. Genom RK2 (IncP-1α) z zaznaczonymi miejscami oddziaływań pięciu globalnych regulatorów: KorA, KorB, IncC, KorC i TrbA.

Na mapie zaznaczono: funkcje replikacji wegetatywnej jako *oriV* i *trfA*, determinanty oporności na tetracyklinę (Tc^R), penicylinę (Pn^R) i kanamycynę (Km^R), region *par/mrs* kodujący system *psk* i *mrs*, region *par/cco* czyli centralny operon kontroli biorący udział w aktywnym rozdziale kopii plazmidu oraz dodatkowe funkcje stabilizacyjne – *kla*, *kle* i *klc*.

drom perfekcyjny powoduje kilkusetkrotne obniżenie zdolności takiego wariantu RK2 do transferu koniugacyjnego. Błędy nagromadzone więc zostały prawdopodobnie celowo na drodze ewolucji aby utrzymać ekspresję reprimowanych przez TrbA operonów na stosunkowo wysokim poziomie. Jednak TrbA nie jest represorem dającym odpowiedź wszystko albo nic, współczynnik represji przy nadprodukcji TrbA waha się od 3 do 10 razy trudno więc było zrozumieć konieczność obniżania i tak słabej represji poprzez nagromadzanie mutacji w miejscu wiązania. Dopiero badania nad ostatnim na liście globalnym regulatorem KorB zdają się wyjaśniać ten paradoks.

KorB jest największym białkiem spośród represorów IncP-1, składa się z 358 aminokwasów. Tworzy dimery, tetramery i kompleksy wyższego rzędu (WILLIAMS i współaut. 1993). W formie dimerycznej rozpoznaje 13 nukleotydowy palindrom O_B 5'TTTAGC(G/C)GCTAAA3', który w niektórych przypadkach zawiera dodatkową parę 5'G-3'C odpowiedzialną za zwiększone powinowactwo KorB (KOSTELIDOU i THOMAS 2000). O_B występuje 12 razy w genomie RK2 ale tylko dla 6 miejsc wykazano rolę regulacyjną KorB jako represora transkrypcji. W zależności od lokalizacji względem sekwencji promotorowych podzielono O_B na trzy klasy. Klasa pierwsza to miejsca znajdujące się w pobliżu sekwencji -35 (*trfAp*, *korAp* i *klaAp*). Promotory te powstały prawdopodobnie wskutek duplikacji ponieważ nie tylko ściśle zakonserwowane są ich istotne części (sekwencje -35, -10), ale również lokalizacja miejsc wiązania O_A i O_B względem promotora i względem siebie (33 nukleotydów między centrami symetrii palindromów). Represja tych trzech promotorów przez KorB określana jako „proksymalna” zachodzi poprzez bezpośrednie oddziaływanie z RNAP związaną z promotorem i jej „uwieszenie” (ang. RNAP arrest) i nie wymaga dimeryzacji KorB ani obecności C-terminalnych 100aa. Klasa druga O_B to miejsca występujące w pewnym oddaleniu od promotora od 100nt poniżej miejsca startu transkrypcji (*trbAp*) do około 200nt powyżej tego miejsca (*kfrAp*, *kleAp*, *trbBp*). Represja tych promotorów określana jest mianem „represji na dystans” i wymaga obecności domeny dimerizacyjnej/tetrameryzacyjnej w KorB (JAGURA-BURDZY i współaut. 1999a). Wreszcie trzecia klasa to miejsca O_B oddalone około 1kb od znanego promotora; dotychczas nie wykazano dla nich funkcji regulacyjnej. Spośród sześciu

miejsz tej klasy cztery są równomiernie rozmieszczone w operonach *tra* i *trb*, jedno w regionie stabilizacyjnym *par/mrs* i jedno (o sugerowanej funkcji centromeru, WILLIAMS i współaut. 1998) między genami o nieznanej funkcji (*upf54.4-upf54.8*). Hierarchia wiązania KorB do operatorów wskazuje największe powinowactwo do *trfAp*, najslabsze do O_B z klasy trzeciej. KorB jest znacznie słabszym represorem niż KorA ale ma większe spektrum działania: reprimuje operony uczestniczące w wegetatywnej replikacji, transferze koniugacyjnym i stabilnym dziedziczeniu. Koordynuje więc wszystkie procesy życiowe plazmidu. Ważnym aspektem, który należy podkreślić jest kooperatywne oddziaływanie KorB z innymi globalnymi regulatorami: KorA i TrbA. Oddziaływania te zależą od N-końca KorB i zakonserwowanego (85% homologii) C-końca KorA i TrbA (KOSTELIDOU i współaut. 1999, ZATYKA i współaut. 2001). I właśnie te oddziaływania kooperacyjne mogą odgrywać tak istotną rolę w regulacji ekspresji genów: nieznaczne fluktuacje w poziomie jednego z kooperantów, niewielkie zmiany w jego strukturze i w powinowactwie do operatora są potęgowane w sygnale końcowym, kooperacyjnym.

Wiązanie KorB do O_B jest stabilizowane obecnością innego globalnego regulatora, produktu centralnego operonu kontroli *cco*: IncC-1, chociaż IncC nie wiąże się do DNA bezpośrednio (JAGURA-BURDZY i współaut. 1999b). IncC i KorB należą odpowiednio do rodzin białek ParA i ParB i pełnią istotną funkcję w stabilnym dziedziczeniu plazmidów IncP-1 stanowiąc ich system aktywnego rozdziału kopii plazmidów do komórek potomnych (MOTALLEBI-VESHAREH i współaut. 1990). Fakt, że obydwa białka pełnią jednocześnie rolę globalnych regulatorów przez wiele lat był unikalnym wśród plazmidów przykładem koncentracji funkcji (sugerowano również rolę KorB w przestrzennym upakowaniu DNA).

Ostatnio wykazano, że białko Omega z pSM19035 (bakterie Gram-dodatnie) jest globalnym regulatorem funkcji replikacyjnych/ ilości kopii plazmidu (*copS*), funkcji stabilizacyjnych (operon posegregacyjnego zabijania: epsilon/zeta) i operonu delta i być może jest również składnikiem aparatu aktywnego rozdziału (DE LA HOZ i współaut. 2000) (Ryc. 3). Plazmidy IncP-1 ze swoim złożonym systemem regulacyjnym nie są więc może wcale unikalne, a koordynacja różnych funkcji plazmidu jest zjawiskiem bardziej uniwersalnym niż myślano.

PODSUMOWANIE

Organizacja przestrzenna w duże jednostki transkrypcyjne zapewnia możliwość koordynacji ekspresji genów uczestniczących w tym samym procesie. Ułożenie tych jednostek transkrypcyjnych względem siebie np. z promotorami w tym samym regionie ale skierowanymi przeciwnie pozwala na zastosowanie tego samego elementu regulacyjnego do skoordynowanej ekspresji operonów uczestniczących w podobnych lub zupełnie innych procesach. Autogenna represja zachodząca w miarę syntezy produktów i utrzymanie ekspresji na niskim, podstawowym poziomie zapewnia najbardziej ekonomiczne rozwiązania bez potrzeby zewnętrznych sensorów. Autoregulacja, chociaż wydaje się najprostszą strategią, nie zawsze może jednak zaspokoić wymagania regulacyjne. W większości plazmidów koniugacyjnych (IncP-1, IncQ, IncI1) kompleks relaksazy jest zazwyczaj autoregulatorem operonów Dtr dzięki lokalizacji *oriT* w regionie promotorowym. Trudniej wyobrazić sobie zachodzenie autoregulacji poprzez końcowy produkt operonu Mpf (kompleks białek tworzących pilus). Uzasadnione jest tu pojawienie się białek o funkcji regulatorowej kodowanych przez operon *mpf* (IncP-1, IncF, IncN). Plazmidy IncP-1 idą jakby o krok dalej skupiając geny regulatorowe w jednym operonie (autoregulowanym), co więcej niektóre z białek represorowych mają do spełnienia dodatkowe funkcje w biologii plazmidów IncP-1 (aktywny rozdział kopii plazmidów do komórek potomnych).

Z punktu widzenia ewolucji istnienie regulatorowego RNA jest idealnym rozwiązaniem: umożliwia zachodzenie zmian równocześnie w sekwencji „regulatora” i celu, na który ten regulator działa. Szczególnie cenne może to być przy zjawisku niezgodności plazmidów (kontrola replikacji). Mutacja w anty-

sensownym RNAI w plazmidach typu ColeI to równocześnie mutacja w inicjatorowym RNAII tej kopii plazmidu, siła oddziaływań między komplementarnymi cząsteczkami RNA nie ulegnie zmianie ale zmienia się siła oddziaływań regulatorowego RNAI z pozostałymi kopiami plazmidu co może pozwolić różnym wariantom na współistnienie w tej samej komórce gospodarza. Regulacja przy udziale antysensownego RNA ma jeszcze inne zalety: jest bardziej czuła i podlega szybszym zmianom niż regulacja przy udziale białek. Niewątpliwie może być mniej dyskryminująca w wyborze właściwego celu i pewnie dlatego większość systemów opartych na regulacji antysensownym RNA zawiera również białkowe składniki.

Intrygującą cechą regulacji ekspresji genów plazmidowych jest osiągnięcie wyważonej równowagi (ang. fine tuning) między tym co niezbędne do przetrwania w gospodarzu i tym co może obniżyć zdolność przeżycia gospodarza. Plazmidy IncP-1 zdolne do replikacji i stabilnego dziedziczenia w wielu odmiennych gatunkach bakterii są tutaj niezastąpionym przykładem do perfekcji opanowanej techniki regulacji ekspresji genów. Istnienie złożonej sieci regulacyjnej, nakładających się na siebie regulonów koordynujących wszystkie procesy życiowe czy kooperacyjne działanie regulatorów buforuje niespodziewane zmiany środowiska.

Wspomniane przykłady sprzężenia systemów koniugacyjnych plazmidów Ti czy plazmidów feromono-zależnych z obecnością potencjalnych dawców/biorców czy czynnikami ze środowiska sygnalizują istotną nową dziedzinę badań nad plazmidami: relacje plazmid a środowisko z możliwościami manipulacji w przyszłości odpowiedziami plazmidów.

THE ROLE OF REGULATION OF GENE EXPRESSION IN PLASMID STABILITY

S u m m a r y

Plasmid survival relies heavily on the regulation of gene expression assuring the balance between the necessity of a certain level of plasmid genetic information being expressed and minimalization of the metabolic burden imposed on the host. The most commonly used regulatory mechanisms are autogenous repression and antisense RNA-mRNA interactions which provide the systems with economy, simplicity, sensitivity and possi-

bility of rapid response to internal and external changes.

IncP-1 plasmids are described in more detail as the paradigm of a multivalent regulatory network, responsible for tight repression, coordination and fine-tuning of almost all plasmid functions and providing simultaneously a high level of security to plasmid genome.

Appropriate recognition and use of environmental stimuli as very important factors in plasmid biol-

ogy is nicely exhibited by Ti plasmids of *Agro-*

bacterium tumefaciens and pheromone-responsive plasmids of *Enterococcus faecalis*.

LITERATURA

- CHATTORAJ D. K., 2000. *Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical*. Mol. Microbiol. 37, 467–476.
- 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.
- DEL SOLAR G., ESPINOZA M., 2000. *Plasmid copy number control: an ever-growing story*. Mol. Microbiol. 37, 492–500.
- DEL SOLAR G., GIRALDO R., RUIZ-ECHEVARRIA M. J., ESPINOZA M., DIAZ-OREJAZ R., 1998. *Replication and control of circular bacterial plasmids*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 434–464.
- ESPINOZA M., COHEN S., COUTURIER M., DEL SOLAR G., DIAZ-OREJAZ R., GIRALDO R., JANNIERE L., MILLER, C., OSBORN M., THOMAS C. M., 2000. *Plasmid replication and copy number control*. [W:] *The Horizontal Gene Pool*. THOMAS C. M. (red.) Amsterdam, Harwood Academic Publishers 1–47.
- FRANCH T., GERDES K., 2000. *U-turns and regulatory RNAs*. Curr. Opin. Microbiol. 3, 159–164.
- GERDES K., AYORA S., CANOSA I., CEGŁOWSKI P., DIAZ-OREJAZ R., FRANCH T., GULTYAEV A. P., BUGGE JENSEN R., KOBAYASHI I., MACPHERSON C., SUMMERS D., THOMAS C. M., ZIELENKIEWICZ U., 2000a. *Plasmid maintenance systems*. *The Horizontal Gene Pool*. THOMAS C. M. (red.) Amsterdam, Harwood Academic Publishers, 49–85.
- GERDES K., MOLLER-JENSEN J., JENSEN R. B., 2000b. *Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny*. Mol. Microbiol. 37, 455–466.
- GREATED A., TITOK M., KRASOWIAK R., FAIRCLOUGH R., THOMAS C. M., 2000. *The replication and stable inheritance functions of IncP-9 plasmid pM3*. Microbiol. 146, 2249–2258.
- HEINEMANN J. A., SPRAGUE G. F. Jr., 1989. *Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast*. Nature 340, 205–209.
- JAGURA-BURDZY G., THOMAS C. M., 1994. *KorA protein of promiscuous plasmid RK2 controls a transcriptional switch between divergent operons for plasmid replication and conjugative transfer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10597–10575.
- JAGURA-BURDZY G., THOMAS C. M., 1995. *Purification of KorA protein from broad host range plasmid RK2: definition of a hierarchy of KorA operators*. J. Mol. Biol. 253, 39–50.
- JAGURA-BURDZY G., MACARTNEY D. P., ZATYKA M., CUNLIFFE L., COOKE D., HUGGINS C., WESTBLADE L., FARHAT K., THOMAS C. M., 1999a. *Repression at a distance by the global regulator KorB of the promiscuous IncP plasmids*. Mol. Microbiol. 32, 519–532.
- JAGURA-BURDZY G., KOSTELIDOU K., POLE J., KHARE D., JONES A., WILLIAMS D. R., THOMAS C. M., 1999b. *IncC of broad-host-range plasmid RK2 modulates KorB transcriptional repressor activity in vivo and operator binding in vitro*. J. Bacteriol. 181, 2807–2815.
- KOSTELIDOU K., THOMAS C. M., 2000. *The hierarchy of KorB binding at its twelve binding sites on the broad host range plasmid RK2 and modulation of this binding by IncC1 protein*. J. Mol. Biol. 295, 411–422.
- KOSTELIDOU K., JONES A.C., THOMAS C. M., 1999. *Conserved C-terminal region of the global regulator KorA of promiscuous plasmid RK2 is required for co-operativity between KorA and a second RK2 global regulator, KorB*. J. Mol. Biol. 289, 211–221.
- LEDERBERG J., TATUM E.I., 1946 *Gene recombination in Escherichia coli*. Nature 158, 558.
- LI P.L., FARRAND S.K. 2000. *The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the rep-ABC family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system*. J. Bacteriol. 182, 179–188.
- MOLLER-JENSEN J., BUGGE JENSEN R., LOWE J., GERDES K. 2002. *Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament*. The EMBO J. 21, 3139–3127.
- MOTALLEBI-VESHAREH M., ROUGH D. A., THOMAS C. M., 1990. *A family of ATPases involved in active partitioning of diverse bacterial plasmids*. Mol. Microbiol. 4, 1455–1463.
- MUKHOPADHYAY S., CHATTORAJ D. K. 2000. *Replication-induced transcription of an autorepressed gene: the replication initiator gene of plasmid P1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 7142–7147.
- PANSEGRAU W., LANKA E., BARTH P., FIGURSKI D. H., GUINEY D.G., HAAS D., HELINSKI R. R., SCHWAB H., STANISICH V. A., THOMAS C. M., 1994. *Complete nucleotide sequence of Birmingham IncPa plasmids: compilation and comparative analysis*. J. Mol. Biol. 239, 623–663.
- RAMIREZ-ROMERO M. A., SOBERON N., PEREZ-OSEGUERA A., TELLEZ-SOSA J., CEVALLOS M. A., 2000. *Structural elements required for replication and incompatibility of the Rhizobium etli symbiotic plasmid*. J. Bacteriol. 182, 3117–3124.
- THISTED T., SORENSEN 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, 859–873.
- THORSTED P. B., MACARTNEY D. P., AKHTAR P., HAINES A. S., ALI N., DAVIDSON P., STAFFORD T., POCKLINGTON M. J., PANSEGRAU W., WILKINS B. M., LANKA E., THOMAS C. M., 1998. *Complete sequence of the IncPβ plasmid R751: implications for the evolution and organi-*

- sation of the *IncP* backbone. *J. Mol. Biol.* 282, 969–990.
- WAGNER E. G. H., SIMONS R. W., 1994. *Antisense RNA control in bacteria, phages and plasmids*. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 713–742.
- WILLIAMS D. R., MOTALLEBI-VESHAREH M., THOMAS C. M., 1993. *Multifunctional repressor KorB can block transcription by preventing isomerization of RNA polymerase-promoter complexes*. *Nucl. Acids Res.* 21, 1141–1148.
- WILLIAMS D. R., MACARTNEY D. P., THOMAS C. M., 1998. *The partitioning activity of the RK2 central control region requires only IncC, KorB and KorB-binding site O_B3 but other KorB-binding sites form destabilizing complexes in the absence of O_B3*. *Microbiol.* 144, 3369–3378.
- ZATYKA M., JAGURA-BURDZY G., THOMAS C. M., 1994. *Regulation of transfer genes of promiscuous IncPa plasmid RK2: repression of Tra1 region transcription both by relaxosome proteins and by the Tra2 regulator TrbA*. *Microbiol.* 140, 2981–2990.
- ZATYKA M., THOMAS C. M., 1998. *Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements*. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 291–319.
- ZATYKA M., BINGLE L., JONES A. C., THOMAS C. M., 2001. *Cooperativity between KorB and TrbA repressors of broad-host-range plasmid RK2*. *J. Bacteriol.* 183, 1022–1031.
- ZECHNER E. L., DE LA CRUZ F., EISENBRANDT R., GRAHN A. M., KORAIMANN G., LANKA E., MUTH G., PANSEGRAU W., THOMAS C. M., WILKINS B. M., ZATYKA M., 2000. *Conjugative-DNA transfer processes*. [W:] *The Horizontal Gene Pool*. THOMAS C. M. (red.) Amsterdam, Harwood Academic Publishers, 87–174.