



Plazmidy bakterii mlekowych

Piotr Walczak

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, Łódź

Plasmids of lactic acid bacteria

Summary

The role and significance of natural plasmids existing in lactic acid bacteria (LAB) from genus *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc* in their metabolic diversity and industrially important properties have been described. Molecular organization of plasmids, their mechanisms of replication and metabolic activity were discussed in detail with particular stress put on their common features such as structure similarity, segregational and structural stability, biochemical traits and the presence of insertion sequences. The role of plasmid borne IS elements on plasmid stability and adaptative properties of LAB were also discussed.

Key words:

lactic acid bacteria, plasmids, RCR, theta.

1. Wstęp

U wielu szczepów bakterii mlekowych, zarówno z rodzaju *Lactobacillus* jak i *Lactococcus* oraz *Leuconostoc*, spotyka się często od kilku do kilkunastu plazmidów, których wielkość waha się w granicach od 2 do 120 tpb. Małe plazmidy 2-5 tpb są zazwyczaj kryptyczne i trudno określić ich funkcję w komórkach, natomiast duże zawierają geny kodujące metabolizm laktozy (1-5), aktywność proteinazową (6-9), produkcję bakteriocyn (10-18), oporność na bakteriocyny (19), oporność na antybiotyki i sole metali ciężkich (20-22), geny metabolizmu cytrynianu (23,24), syntezę zewnątrzkomórkowych polisacharydów (25), oporność na bakteriofagi (26-30) oraz wiele innych aktywności biochemicznych. Ze względu na przemysłowe znaczenie tych bakterii,

Adres do korespondencji

Piotr Walczak,
Wydział Biotechnologii
i Nauk o Żywności,
Instytut Technologii
Fermentacji
i Mikrobiologii,
Politechnika Łódzka,
ul Wólczańska 171/173,
90-530 Łódź;
e-mail:
pwalczak@p.lodz.pl

biotechnologia

3 (70) 118–143 2005

zwłaszcza w przetwórstwie mleka, badanie plazmidów kodujących technologicznie ważne cechy metaboliczne takie, jak asymilacja laktozy i metabolizm cytrynianu, stają się intensywnie rozwijaną dziedziną genetyki i biotechnologii. Nie bez znaczenia jest fakt, że bakterie mlekowe są uważane jako genetycznie bezpieczne dla człowieka i to sprawia, że podejmowane są próby ich użycia do biosyntezy heterologicznych białek, wykorzystywanych jako dodatki do żywności. Działalność ta wiąże się w pierwszym etapie z otrzymaniem wektorów dopuszczonych do stosowania w żywności (*food grade vectors*), których cały materiał genetyczny pochodzi z bakterii mlekowych i nie zawiera genów oporności na antybiotyki stosowane w lecznictwie i weterynarii. Posiadanie takiego wektora pozwala na konstruowanie plazmidów zawierających technologicznie ważne geny i ich wprowadzanie do przemysłowych szczepów bakterii mlekowych w celu ulepszenia i stabilizacji ich cech produkcyjnych oraz wytwarzania nowych nie znanych dotąd produktów. Podejmowane są próby konstruowania wektorów, zawierających geny amylazowe lub celulazowe, zdolnych do replikacji u *Lactobacillus plantarum* po to, aby wykorzystać tak przygotowany szczep jako starter do inokulacji kiszonki roślinnej, np. z trawy, w celu polepszenia jej jakości i ochrony przed rozwojem niepożądanego mikroflory (31).

2. Charakterystyka plazmidów bakterii mlekowych

Wiele funkcji metabolicznych komórek bakterii mlekowych uzależnione jest od obecności plazmidów. Plazmidy bakterii mlekowych cechują się niezwykłą powszechnością i biologicznym zróżnicowaniem. Mogą występować w komórce w różnej liczbie kopii charakterystycznej dla danego plazmidu i szczepu bakterii. W komórkach bakterii z rodzaju *Lactococcus* liczba plazmidów może wahać się zależnie od szczepu od 2 do 11, najczęściej spotyka się od 4 do 7, o wielkości od około 2×10^3 par zasad do ponad $1,0 \times 10^5$ par zasad. Funkcja plazmidów w komórce zależy od rodzaju genu lub genów jakie zawiera plazmid oraz w mniejszym stopniu, od liczby jego kopii. Nie tylko wielkość różnicuje plazmidy bakterii mlekowych, ale również sposób replikacji. W plazmidach może być zakodowane około 10% informacji genetycznej komórki.

Geny plazmidowe odpowiedzialne są za:

- fermentację laktozy,
- biosyntezę i aktywację proteaz oraz peptydaz,
- fermentację cytrynianu i produkcję diacetylu,
- produkcję bakteriocyn, np. laktokokcyn A, B, M, laktycyny 3147,
- oporność na jony metali ciężkich, np. kadmu,
- mechanizmy oporności na bakteriofagi,
- system restrykcji/modyfikacji,
- produkcję zewnątrzkomórkowych polisacharydów,
- oporność na antybiotyki i bakteriocyny.

Plazmidy bakterii mlekowych można podzielić na dwie grupy w zależności od sposobu ich replikacji:

- plazmidy o małych rozmiarach (<5 tpz), replikujące wg mechanizmu σ lub inaczej RCR (*Rolling Circle Replication*),
- plazmidy o znacznych rozmiarach (>5 tpz) ulegające replikacji θ (*Theta Replication*).

Oba typy plazmidów występują bardzo często równocześnie u tych samych szczepów bakterii mlekowych, przy czym plazmidy sigma są zazwyczaj kryptyczne lub zawierają geny oporności na antybiotyki, a plazmidy theta kodują różne ważne metaboliczne funkcje komórek.

3. Charakterystyka plazmidów typu sigma

W minionym dwudziestolecu izolowano liczne plazmidy z bakterii gramdodatnich, które poddano szczegółowym badaniom. Wiele z nich posiada wspólne cechy zwłaszcza homologiczne sekwencje białek i DNA oraz wspólne funkcje. Charakterystyczne dla replikacji RCR jest powstawanie jednoniciowego DNA jako produktu przejściowego, wykrywanego w lizatach komórkowych i stanowiącego kryterium klasyfikacji do tej grupy. Nagromadzenie się kolistego ss-DNA odpowiadającego jednej nici monomeru plazmidu zostało stwierdzone u wielu plazmidów bakterii z rodzajów *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc* (32,33), jak również u *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* i *Streptomyces lividans* (34-37). Mechanizm replikacji typu toczącego się koła, po raz pierwszy zaproponowano dla bakteriofagów *E. coli* (38) zawierających ss-DNA posiadających wiele cech wspólnych z niektórymi plazmidami, a szczególnie homologię białek replikacyjnych i organizację ORI (36). Minus origin replikacji (M-O), różny od plus origin replikacji, jest miejscem inicjacji konwersji ss-DNA do ds-DNA. Interesującym faktem jest, że wiele plazmidów ss-DNA jest zdolnych do replikacji w komórkach dwu lub więcej gospodarzy (32,39-41), ale ich minus origin (M-O) funkcjonuje jedynie w komórkach organizmu macierzystego. Minus origin (M-O) typu palA plazmidów *Staphylococcus* pT181, pC194 i pE194 oraz M-O plazmidu pLS1 bakterii *Streptococcus* są nieaktywne u *Bacillus subtilis*, a M-O typu palA plazmidu pC194 jest nieaktywny u *Streptococcus pneumoniae* i *E. coli* (32). Ze szczepu *Staphylococcus aureus* wyizolowano plazmid pUB110 i odkryto, że jest zdolny do replikacji u bakterii *Bacillus subtilis* (38,41). Charakteryzuje się on dużą liczbą kopii (około 50 na komórkę) oraz stosunkowo wysoką stabilnością u *Bacillus subtilis* (42). Plazmidy pUB110 i pC194 odznaczają się dużą homologią sekwencji DNA w miejscu plus origin oraz białek replikacyjnych Rep (36). Plus origin replikacji obu plazmidów funkcjonuje podobnie, lecz ich M-O są całkowicie niezgodne, gdyż w przeciwieństwie do innych plazmidów, minus origin pUB110 funkcjonuje w komórkach *Staphylococcus* jak i *Bacillus*.

Plazmidy sigma składają się z trzech modułów strukturalnych:

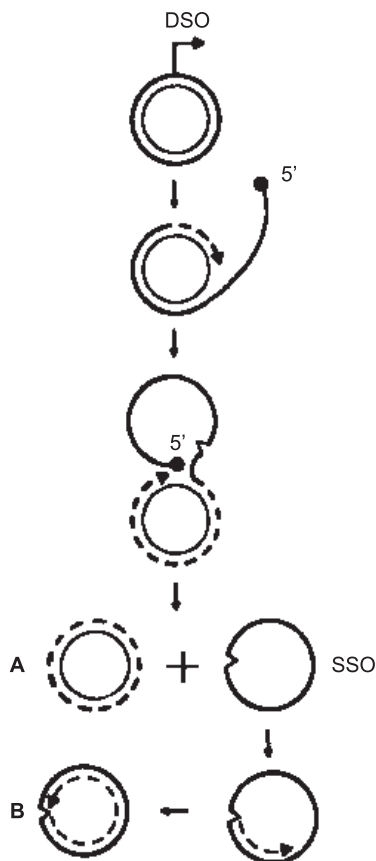
1. Gen *rep*, kodujący białko inicjatorowe i region DNA rozpoznawany przez białko Rep. Region ten zawiera miejsce startu replikacji nici prowadzącej (nazywany miejscem startu „+”, lub *Double Strand Origin* – DSO).
2. Region DNA zawierający palindromiczny układ nukleotydów, który stanowi miejsce startu replikacji nici opóźnionej (nazywany miejscem startu „-”, lub *Single Strand Origin* – SSO).
3. Jedna lub więcej otwartych ramek odczytu kodujących różne białka odpowiedzialne za oporność na antybiotyki, procesy mobilizacji koniugacyjnej lub rekombinacji.

Replikacja RCR przebiega w kilku etapach:

1. Replikacja rozpoczyna się w momencie przecięcia nici (+) w miejscu rozpoznawanym przez białko inicjujące replikację (region DSO).
2. Koniec 5' nici (+) połączony z białkiem inicjującym odwija się, a koniec 3' ulega przedłużaniu dzięki aktywności komórkowej polimerazy DNA (linia przerywana od miejsca nacięcia). Powstaje intermediat przypominający literę sigma.
3. Po całkowitej rundzie replikacji nici (-), białko replikacyjne rozpoznaje sekwencję końcową plazmidu pokrywającą się z sekwencją początkową i łączy oba końce odwiniętej nici (+), wytwarzając w ten sposób jednoniciowe DNA nici (+), (ss-DNA).
4. Synteza nici opóźnionej (-) na matrycy kolistego jednoniciowego DNA nici (+). Inicjacja syntezy odbywa się w miejscu SSO, rozpoznawanym przez odpowiednie białka komórki gospodarza. Doprowadzają one do syntezy starterowego RNA, niezbędnego do replikacji DNA. Powstaje forma ds-DNA plazmidowego drugiej części plazmidu, która kończy kompletny cykl replikacyjny. Jeżeli nic (+) nie jest przekształcana do formy ds-DNA, to replikacja RCR nie jest wydajna ponieważ wytwarzany jest tylko jeden plazmid ds-DNA oraz następuje akumulacja ss-DNA.
5. Zaburzenia etapu 3 i 4 polegają na tym, że nie łączą się ze sobą końce 5' i 3' tej samej nici po dokonaniu pełnego cyklu replikacji nici (-), mogą natomiast prowadzić do powstawania multimerów plazmidów typu „głowa do ogona” o wysokiej masie cząsteczkowej HMW (*high-molecular-weight*) (43).

Schemat mechanizmu replikacji plazmidów sigma przedstawiono na rysunku 1.

Plazmidy replikujące według mechanizmu toczonego się koła, tj. pWV01, pWC1, pCI411, pUB110, pC194, czy pT181, wytwarzają multimery wielkocząsteczkowe HMW. Tworzenie form HMW jest stymulowane obecnością obcego DNA w obrębie plazmidu. Inerty DNA z *E. coli* oraz przypadkowe fragmenty chromosomalnego DNA *Staphylococcus aureus* powodują powstanie form HMW. W przypadku plazmidu pKTH10, składającego się z plazmidu pUB110 z insercją sekwencji nukleotydów kodujących α -amylazę pochodzącą z genomu *B. amyloliquefaciens*, również obserwuje się powstanie form HMW (44). Trawienie multimerów wielkocząsteczkowych endonukleazami restrykcyjnymi prowadzi do powstania form liniowych plazmidu (ds-DNA).



Rys. 1. Schemat replikacji plazmidów według mechanizmu „obracającego się koła” (RCR). A, B – plazmidy potomne, DSO – *double strand origin*, SSO – *single strand origin*. Pozostałe objaśnienia w tekście.

Przyjmuje się, że HMW składa się z tandemowych multimerów typu „głowa do ogona”, które w nienaruszonych komórkach, najprawdopodobniej przybierają kształt litery sigma lub dużych kolistych konkatamerów. Około 90% plazmidu może występować w formie HMW. Formy HMW powstają, wtedy gdy plazmid replikuje z wytworzeniem ss-DNA (32,45).

4. Charakterystyka plazmidów typu theta

Drugą grupę stanowią plazmidy o małej liczbie kopii replikujące według jedno- lub dwukierunkowego mechanizmu θ (theta). Są one bardzo stabilne, liczba ich kopii jest dokładnie kontrolowana i wynosi od jednej do kilku na komórkę. Plazmidy tego typu nadają się do konstruowania stabilnych wektorów do klonowania genów u bakterii mlekowych. W odróżnieniu od poprzednich, plazmidy typu θ wykazują

wąskie spektrum gospodarzy i replikują jedynie w obrębie tego samego rodzaju lub blisko spokrewnionych. Do tej grupy należą np. pCI305 (46), pCI528 (47), pWVO2 (48), pUCL22 (49) i pUCL287 (50).

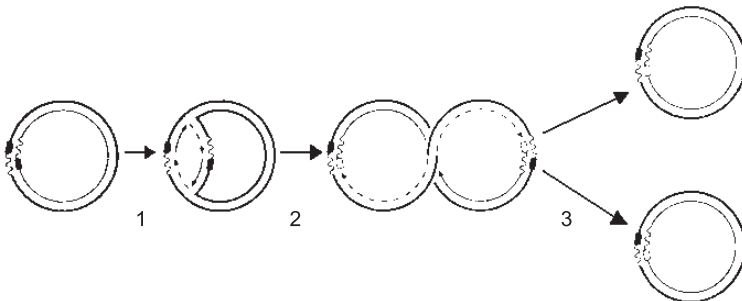
W odróżnieniu od replikacji RCR nie powstaje tu jednoniciowy DNA, a miejsca startu nici prowadzącej i opóźnionej są położone blisko siebie i nie stanowią odrębnych modułów. Proces replikacji może przebiegać równocześnie na obu kowalencyjnie zamkniętych niciach DNA. Ciągłość nici jest przerywana tylko podczas rozdziału końcowego produktu replikacji – dimeru w formie dwóch ogniw łańcucha, do dwóch form monomerycznych. Replikacja theta może przebiegać jedno- lub dwukierunkowo. Plazmidy θ cechuje różnorodność w wykorzystywaniu różnych czynników komórek gospodarza w procesie inicjacji replikacji. Na tej podstawie plazmidy θ podzielono na trzy grupy:

1. Kodują własne białko inicjatorowe (Rep) i posiadają charakterystyczny odcinek DNA stanowiący region inicjacji replikacji. Replikacja tych plazmidów przypomina sposób replikacji chromosomu. Miejsce startu replikacji stanowi charakterystyczny układ nukleotydów, tworzący szereg bezpośrednich powtórzeń tzw. iteronów oraz jedno lub więcej układów nukleotydów tworzących tzw. „DnaA-box”. Inicjacja replikacji wymaga odpowiedniej interakcji białek Rep i DnaA z rozpoznawanymi przez nie sekwencjami nukleotydowymi.

2. Nie kodują białka inicjatorowego, nie zawierają miejsca startu replikacji. Replikacja zapoczątkowana jest przez odpowiednią obróbkę transkryptu syntetyzowanego przez polimerazę RNA gospodarza, który jest następnie użyty jako starter replikacji DNA nici prowadzącej. Replikację rozpoczyna polimeraza I DNA, a następnie kontynuuje ją polimeraza III DNA.

3. Kodują białko inicjatorowe, ale nie zawierają miejsca startu replikacji. Wymagają do replikacji polimerazy I DNA (33,51).

Schemat mechanizmu replikacji plazmidów theta przedstawiono na rysunku 2. Dotychczas opisane w literaturze plazmidy theta bakterii mlekowych zaliczyć należy do pierwszej grupy ze względu na występowanie sekwencji DnaA-box i iteronów.



Rys. 2. Schemat replikacji plazmidów według mechanizmu theta. 1, 2 – etapy replikacji, 3 – rozdział plazmidów potomnych.

5. Niestabilność strukturalna i segregacyjna plazmidów

Dla utrzymania się plazmidów w bakteryjnych liniach komórkowych są istotne dwa procesy:

- a) wierna replikacja plazmidów zachodząca przynajmniej raz w cyklu komórkowym,
- b) dokładne rozdzielanie plazmidów między komórki potomne.

W konkretnym gospodarzu i w określonych warunkach wzrostu, każdy plazmid występuje w specyficznej liczbie kopii na jedną komórkę. Utrzymanie określonej liczby kopii zależy przede wszystkim od systemu regulacji replikacji. Plazmidy utrzymywane w jednym egzemplarzu na komórkę są dziedziczone równie stabilnie, jak plazmidy o wysokiej liczbie kopii, co świadczy o precyzji mechanizmu zwanego rozdzielaniem (partition). Komórki mogą tracić plazmidy na skutek działania różnych czynników. Do przyczyn niestabilności plazmidów zalicza się:

- powstawanie jednoniciowego DNA podczas replikacji typu sigma,
- nierównomierny rozdział plazmidów do komórek potomnych podczas podziałów komórkowych (partition),
- mutacje,
- obecność sekwencji insercyjnych w strukturze plazmidów,
- podwyższona temperatura (replikony wielu plazmidów są temperaturowrażliwe, a wysoka temperatura zatrzymuje replikację).

Plazmidy można podzielić na grupy niezgodności (*incompatibility*). Grupa niezgodności składa się z plazmidów, które nie są zdolne do wspólnego utrzymania się w tej samej linii komórkowej. Plazmidy należące do tej samej grupy niezgodności są zazwyczaj blisko spokrewnione i wykazują co najmniej częściową homologię DNA. W zjawisku niezgodności plazmidowej najważniejszą rolę odgrywa regulacja replikacji. Jeżeli system kontrolujący replikację rozpoznaje dwa plazmidy jako identyczne, plazmidy te są niezgodne. W przypadku gdy plazmid występuje w 1-2 kopiach na komórkę, mechanizm jest następujący: po jednym cyklu replikacyjnym plazmidu system regulacyjny uniemożliwia zapoczątkowanie następnego cyklu, dopóki nie nastąpi podział komórkowy. Dlatego też, każda z komórek siostrzanych może dziedziczyć tylko jeden z dwóch plazmidów należących do tej samej grupy niezgodności. W tej sytuacji drugi plazmid zostaje bardzo szybko wyeliminowany z linii komórkowej. Drugim systemem odgrywającym rolę w zjawisku niezgodności jest system regulujący dokładne rozdzielanie plazmidów do komórek potomnych. Gdy dwa plazmidy są rozpoznawane przez ten system jako identyczne, wtedy tylko jeden z nich będzie dokładnie rozdzielony pomiędzy komórki siostrzane, a rozdzielaniem drugiego będzie rządził przypadek. Końcowym efektem w tym przypadku będzie również utrata jednego z plazmidów (52).

Cechą specyficzną niektórych plazmidów jest ich zdolność do przenoszenia własnej kopii z komórki gospodarza (dawcy) do komórki, która tego plazmidu nie zawiera (biorca). W procesie tym konieczne jest wytworzenie pary koniugacyjnej. W tym celu w bakteriach gramdodatnich plazmidy koniugacyjne determinują synte-

zę feromonów płciowych wywołujących zlepianie się komórek. Następnie obserwuje się przeniesienie jednoniciowego DNA (ss-DNA) poprzez porę powstającą w wyniku lokalnej fuzji powłok obu komórek. Replikacja koniugacyjna zachodzi według modelu obracającego się koła (*rolling-circle-replication* – RCR) (53,54).

6. Molekularna organizacja plazmidów bakterii mlekowych

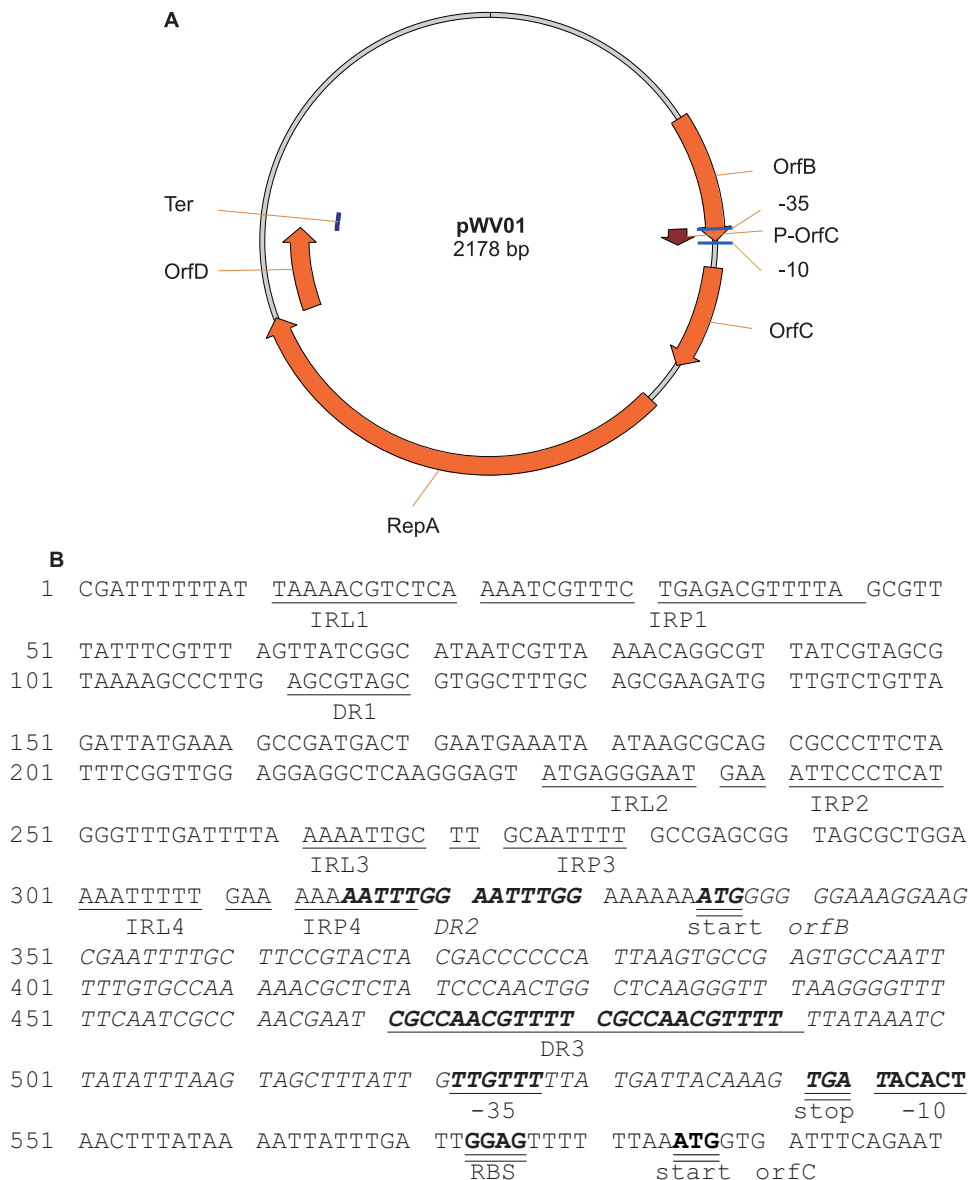
6.1. Plazmidy typu RCR

Poniżej przedstawiono przykłady organizacji strukturalnej plazmidów bakterii mlekowych replikujących wg mechanizmu RCR.

Jednym z najwcześniej opisanych plazmidów RCR tych bakterii był mały plazmid pWV01 (2178 pz), nie kodujący żadnych cech obserwowanych fenotypowo (55).

Na rysunku 3A przedstawiono jego organizację strukturalną. Plazmid zawiera w swojej budowie trzy otwarte ramki odczytu (*orfB*, *orfC*, *orfD*), promotor transkrypcji (P) zawierający regiony -35 i -10, ρ niezależny terminator transkrypcji oraz regiony SSO i DSO.

Na rysunku 3B przedstawiono sekwencję DNA poprzedzającą gen *orfC* (*repA*), która zawiera elementy strukturalno-regulacyjne. Odwrócone powtórzenia występujące w pozycjach 12-45, 228-250, 301-319, 399-413 mogą tworzyć struktury szpilek do włosów spełniające rolę regulacyjną w procesie replikacji plazmidu.



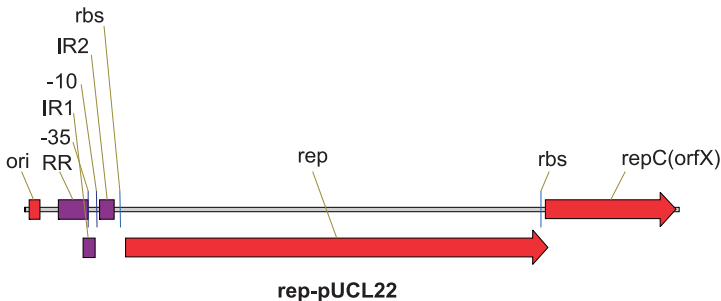
Rys. 3. A – Organizacja strukturalna plazmidu pWV01 bakterii *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

repA – gen kodujący białko replikacyjne, OrfB, OrfC, OrfD – otwarte ramki odczytu, Ter – terminator, P-OrfC – promotor genu OrfC, -35, -10 – sygnały promotora. B – Struktury poprzedzające gen *repA* (orfC). IRL1, IRP1, IRL2, IRP2, IRL3, IRP3, IRL4, IRP4 – lewe i prawe strony odwróconych powtórzeń, DR1, DR2, DR3 – bezpośrednie powtórzenia, RBS – miejsce wiązania rybosomu, start orfB (orfC), – kodon startowy genu *orfB* (orfC), OrfB – otwarta ramka odczytu, PR – promotor genu *orfC* (*repA*). Na podstawie (55).

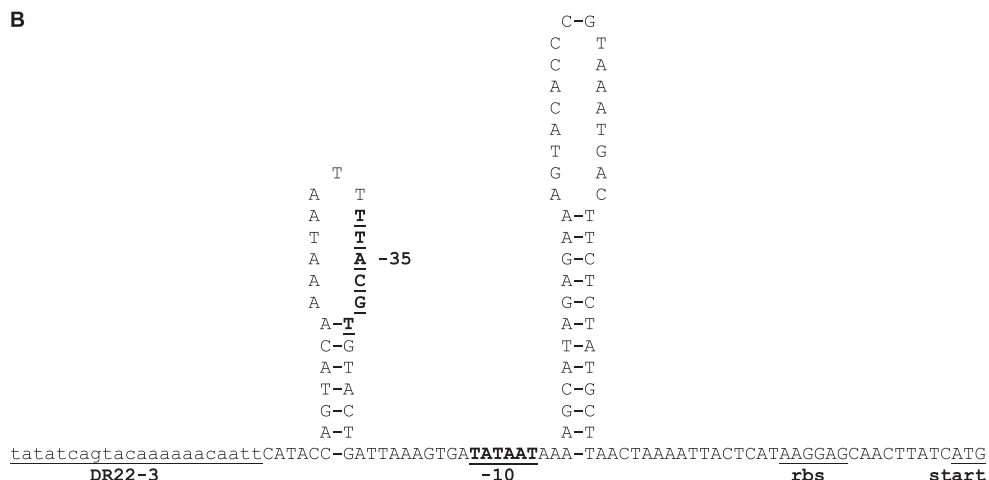
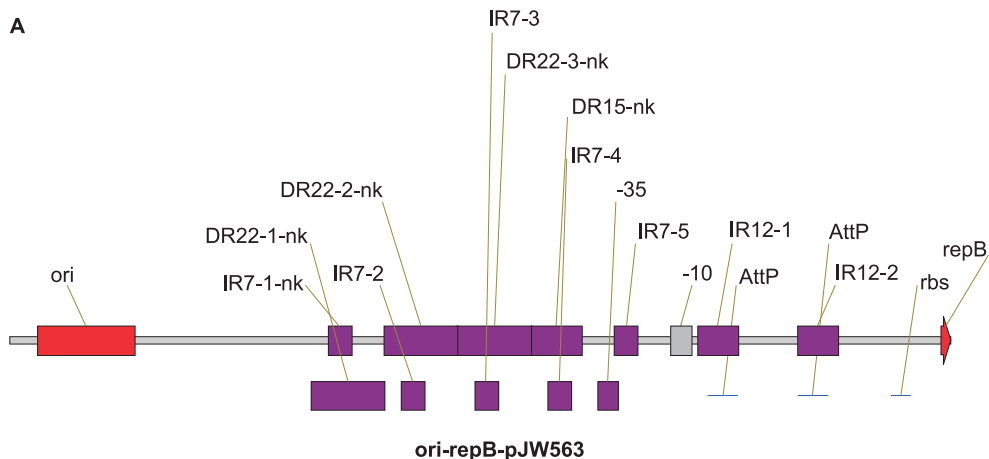
6.2. Plazmidy typu theta

Plazmidy replikujące wg mechanizmu theta są zwykle większe od plazmidów RCR, a ich wielkość waha się od ok. 5 tpz do więcej niż 100 tpz. Tak duże struktury genetyczne pozwalają na kodowanie oprócz funkcji podstawowej, którą jest autonomiczna replikacja, również wielu funkcji metaboliczno-fizjologicznych. Za proces replikacji odpowiada minimalny replikon składający się z odcinka DNA zawierającego miejsce startu inicjacji replikacji oraz wszystkie sekwencje fizycznie do niego przylegające, które są pod jego kontrolą i replikują się razem z nim. Replikon może zawierać również sygnały kończące replikację. Minimalny replikon plazmidów theta zawiera origin replikacji będący odcinkiem DNA o długości około 300 pz oraz gen *repB* kodujący syntezę białka inicjatorowego, które uczestniczy w procesie „rozplatania” podwójnej nici DNA i tworzenia „oczka replikacyjnego”. Szczegóły dotyczące organizacji strukturalnej minimalnego replikonu plazmidów theta przedstawione zostaną na kilku wybranych przykładach.

Jednym z tego typu plazmidów występujących w komórkach *Lactococcus lactis* jest duży plazmid proteinazowo-laktozowy pUCL22. Jego minimalny replikon składa się z sekwencji ORI poprzedzającej gen *repB* oraz genu *orfX* (*repC*), który prawdopodobnie koduje białko regulatorowe procesu replikacji i uczestniczy w regulacji liczby kopii plazmidu. Na rysunku 4 pokazano fragment tego plazmidu zawierający region *ori*, gen kodujący białko replikacyjne (*repB*) oraz gen *repC* (*orfX*) (49). Istotną częścią minimalnego replikonu jest fragment DNA zawierający origin replikacji (*ori*) – miejsce inicjacji replikacji, w strukturze którego wyróżnia się specyficzne sekwencje do których przyłączają się białka inicjatorowe. Powodują one zmiany w strukturze DNA ułatwiające otwarcie się tzw. „oczka” oraz regulują przyłączanie się białek replikacyjnych niezbędnych do rozpoczęcia syntezy DNA.

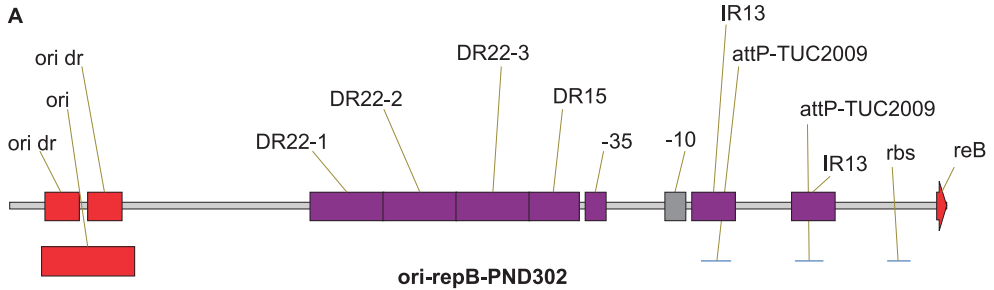


Rys. 4. Fragment plazmidu pUCL22 zawierający gen białka replikacyjnego. *ori* – miejsce inicjacji startu replikacji nici prowadzącej, RR – region prostych powtórzeń, -35 -10 – sygnały promotora, IR1, IR2 – odwrotne powtórzenia, rbs – miejsca wiązania rybosomów, *repB* – gen kodujący białko replikacyjne, *RepC* (*orfX*) – gen kodujący białko regulatorowe procesu replikacji. Na podstawie sekwencji GenBank Accession X60454.



Rys. 5. A – Organizacja strukturalna sekwencji DNA plazmidu pJW563 *Lactococcus lactis* W56 poprzedzającej gen białka replikacyjnego *repB*. ori – origin replikacji, DR22-x-nk – proste powtórzenia 22 pz., DR15-nk – fragment DR22 o dł. 15 pz., IR7 1-5 – odwrócone powtórzenia o dł. 7 pz., IR12 1-2 – odwrócone powtórzenia o dł. 12 pz., -35 i -10 – odpowiednie sygnały promotora, RBS – miejsce wiązania rybosomów, AttP – sekwencje AttP fagów bakterii mlekowych, repB – kodon start genu *repB*. B – Możliwe struktury typu „lodyżki z pętelką” w obrębie promotora genu *repB* replikonu plazmidu pJW563. Na podstawie sekwencji GenBank Accession X96951 (56).

Kolejnym plazmidem replikującym wg mechanizmu theta jest plazmid *Lactococcus lactis* pJW563 o wielkości 11,5 tpz kodujący geny systemu restrykcji/modyfikacji (56). Na rysunku 5A przedstawiono szczegóły budowy regionu poprzedzającego gen *repB* białka replikacyjnego. Region ten jest bardzo podobny strukturalnie do analogicznego regionu plazmidu pUCL22 i zawiera analogiczne struktury. Różnice dotyczą



B

T
T G
T C
T A
C G
C A
A G
A C
A A
A-T
A-T
A-T
G-C
A-T
A-T
G-C
T-A
A-T
C-G
G-C
A-T

TatagtgtagaaaaTATTCGGAATACTATACTTGTTTTGATATAATAAAA-TAACCAAAATTACTCACAAAGGAGCAATTACTATG
DR15 -35 -10 rbs start

Rys. 6. A – Organizacja strukturalna sekwencji DNA plazmidu pND302 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* M71 poprzedzającej gen białka replikacyjnego *repB*. ori – origin replikacji, ori dr – proste powtórzenia w obrębie ori, DR22-x – proste powtórzenia 22 pz., DR15 – fragment DR22 o dł. 15 pz., IR13 1-2 – odwrócone powtórzenia o dł. 13 pz., -35 i -10 – odpowiednie sygnały promotora, RBS – miejsce wiązania rybosomów, attP-TUC2009 – sekwencje AttP faga TUC2009 bakterii mlekowych, repB – kodon start genu *repB*. B – Możliwa struktura typu „łodyżki z pętelką” w obrębie promotora genu *repB* replikonu plazmidu pND302. Na podstawie sekwencji GenBank Accession U79032.

wyłącznie kolejności zasad w prostych i odwróconych powtórzeniach, długości tych powtórzeń, oraz sekwencji promotorowej. Odwrócone powtórzenia tej sekwencji IR7-4 i IR7-5 oraz IR12-1 i IR12-2 mogą tworzyć drugorzędowe struktury DNA typu „łodyżka z pętelką”; przedstawiono to na rysunku 5B.

Następnym plazmidem replikującym według mechanizmu theta jest plazmid pND302 o wielkości 8,8 tpz. występujący u bakterii *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* M71, który koduje oporność komórek na jony kadmu (57). Strukturę replikonu tego plazmidu przedstawiono na rysunku 6A. Region promotorowy plazmidu różni się od poprzednich tym, że nie występują w nim odwrócone powtórzenia IR10-4 i IR10-5. Powoduje to, że w obrębie sygnału -35 promotora nie tworzy się pierwsza „spinka

Tabela 1

Powtórzenia sekwencji DNA występujące w wybranych replikonach typu theta bakterii *Lactococcus lactis*

Plazmid	DR22	DRx/22	IR1	IR2	Accession
1	2	3	4	5	6
pCD4	TTTAAGGACAGAAAAATCGATG TATAAGGACAGAAAAATCGATG	TATAAGGACAGAAAA	TATAAGGAC	GCATAGAGAA	NC002748
pUCL22	TTTATACACTAGAAAAAGCGATG TATATCACTACAAAAAGCGATG	TATATCACTACAAAA	ATCACTACA	GCATAGAGAA	X60454
pWV04	TTTATAGCAGAAAAATCGATG TATATAGCAGAAAAATCGATG	TATATAGCAAAAA	ATATAGCAAAA	GCATAGAGAAAT	-
pWV05	TTTATAGCACAAAAACGATG TATATAGCACAAAAACGATG	TATATAGCAAAAAAAC	TATAGCAACA	AAGCATAGAGAA	-
pIL7	TATATAGCACAAAAACGATG	TATATAGCAAAAA	TATAGCAACA	GACATAGAGAA	Z25475
pIL103	TTTAAACCCATACAAAAACTGT TTTATAGCCATACAAAAACTGT	TTTATAGCCATACAAAA	ATAGCCATAC	GCATAGAGAA	AF013595
pIL105	TAAACAGTCACAAAAATCGATG TATACAGTCACAAAAATCGATG	TATACAGT	TATACAGTAC	AGCATAGAGAA	AF116286
pSL2	TATACAGTCACAAAAATCGATG TTTGTGACTCTATGATCGATG TATACGAGTCACAAAAATCGATG	TACACAGT	TACACAGTAC	GCATAGAGAA	X56550
pC1305	TATATACCACAAAAACGATG CATACACCACAAAAACGATG	CATATACCAAC	ATATACCAAC	AAGCATGAAAGAA	M74063
pVS40	TATAGCGTATGAAAAACGATG	TATAGCGTATGAAAAAACT	ATAGCGTATG TATAGCGTAT	GCATAGAGAA	L02920
pK214	TATATGCCGAAAAAAACGATG	TATATGCCGAAAAAAAACT	TATGCCGAAA	CATAGAGAA	X92946
repB1 pNZ4000	TATATGCCGAAAAAAACGATG	TATATGCCGAAAAAAAACT	TATGCCGAAA	AGCATAGAGAAATTT	AF036485
repB2 pNZ4000	TTTATAGCAGAAAAATCGATG TATATAGCAGAAAAATCGATG	TATATAGCAAAAA	ATATAGCAAAA	GCATAGAGAAAT	AF036485

1	2	3	4	5	6
pC1528	TATATAGCATAAAAAACTGTG AATATAGCATAAAAAACTGTG	TATATAGCATAAAAAAA	ATATAGCATAAAA	AAGTATGAAGAA	L06274
repB3 pNZ4000	AATATAGCATAAAAAACTGTG TATATAGCATAAAAAACTGTG	TATATAGCATAAAAAAA	ATAGCATAAA	AAGTATGAAGAA	AF036485
repB4 pNZ4000	TTTATAGATACTAAAAATCGATG TATATAGATACTAAAAATCGATG	TATATAGATACT	TATAGATACTT	GCCATAGAGAAAT	AF036485
pFV1201	TATATAGATACTAAAAATCGATG	TATATAGATACT	TATAGATACTT	GCCATAGAGAAAT	X96949
pND502	TATAGGTGTAGAAAAAACTGTG	TATAGGTGTAGAAAA	-----	AAGCATGAAGAAA	U79032
pAH82	TATACCTAGAAAAACAATGCT	ATACCTAGAAA	TTCTCTATGCT	AGCATAGAGAA	AF243383
pSRQ900	TATAGGGGTACAAAAAACTGTG	TTAGAAGGTAC	GACTTCTCTATG	CATAGAGAAAATA	AF001314
pJW563	TATAGGGGTACAAAAACAATG TATATCAGTACAAAAACAATG TATATCAGTACAAAAACAAT	CATACCAGTACAAA	CAGTACA	AAGCATAGAGAA	X85168
konsensus	TATATAGNNACAAAAACNATG				

do włosów” (rys. 6B). Przeprowadzono analizę 20 replikonów pochodzących z 17 różnych plazmidów bakterii z rodzaju *Lactococcus*, których sekwencje są publicznie dostępne w internetowych bazach danych. Zestawienie regionów powtórzeń występujących w tych replikonach plazmidów *Lactococcus lactis*, replikujących według mechanizmu theta, przedstawiono w tabeli 1. W tabeli 2 zestawiono sekwencje promotorowe genu białka replikacyjnego *repB* wybranych plazmidów bakterii *Lactococcus lactis* oraz sekwencje rbs poprzedzające kodon START tego genu, a w tabeli 3 zestawiono sekwencje (*ori*) tych replikonów.

Tabela 2

Sekwencje promotorów genu białka replikacyjnego *repB* wybranych plazmidów bakterii *Lactococcus lactis* oraz sekwencje rbs

Plazmid	-35		-10	RBS	Accession
pCD4	TTGAAT	TACTGTCCTTATTTTGA	TATAAT	AAAGGAG	NC002748
pUCL22	TTGTAT	ATGTAGTGATTAAGTGG	TATATG	AAAGGAG	X60454
pWV04	ACTAAT	TTCTTGCTATATTATGA	TATAAT	AAAGGAG	–
pWV05	TTGATT	ATGTTGCTATAAATTG	TATAAT	AAAGGAG	–
pIL7	TTGTCT	GTGTTGCTATAATGTGG	TACAAT	AAAGGAG	Z25475
pIL103	TTGAGA	TAGTATGGGTATTTTGTG	TATAAT	AAAGGAG	AF013595
pIL105	TTGTAT	TTGTGACTGTATATAG	TATAAT	AAAGGAG	AF116286
PSL2	TTGTAT	TTGTGACTGTATATAG	TATAAT	AAAGGAG	X56550
pCI305	TTGTTT	CGTTGGTATATAATGA	TATAAT	AAAGGAG	M74063
pVS40	TTGATA	GATATACGGTATTCTGA	TACAAT	AAAGGAG	L02920
pK214	TAGAGT	GTTTCGGCATAATATGG	TATAAT	AAAGGAG	X92946
repB1 pNZ4000	TAGAGC	GTTTCGGCATAATATGG	TATAAT	AAAGGAG	AF036485
repB2 pNZ4000	ACTAAT	TTCTTGCTATATTATGA	TATAAT	AAAGGAG	AF036485
pCI528	TCATCA	TTTATGCTATATTATGA	TATAAT	AGAGGAG	L06274
repB3 pNZ4000	TCATCA	GTTTATGCTATATTATGA	TATAAT	AGAGGAG	AF036485
repB4 pNZ4000	TTGAAA	AAGTATCTATAAATTGA	TATAAT	AAAGGAG	AF036485
pFV1201	TTGAAA	AAGTATCTATAAATTGA	TATAAT	AAAGGAG	X96949
pND302	TTCGGA	ATACTATACTTGTTTTGA	TATAAT	AAAGGAG	U79032
pAH82	TTGTGT	TACTAGGCATATAATGA	TATAAT	AAGGAG	AF243383
pSRQ900	TTGAAC	AGGTACCGCTGTTTGA	TATAAT	AAAGGAG	AF001314
pJW563	TTACGT	GTAAGTATTAAGTGA	TATAAT	AAGGAG	X85168

Tabela 3

Struktura origin replikacji (*ori*) wybranych replikonów typu θ bakterii *Lactococcus lactis*

Plazmid	Sekwencja ORI	Accession
1	2	3
pCD4	TATACTATTATCATATATATTTTAACTTTTGTCTTTT	NC002748
pUCL22	TATTTATATTATCTTATATATTTTAACTTTTGTCTTTT	X60454
pWV04	TATACTATTATCATATATATTTTAACTTTTGTCTTTT	–
pWV05	TATTTATATTATCTTATATATTTTAACTTTTGTCTTTT	–

1	2	3
pIL7	TATTATATATTTATCATATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	Z25475
pIL103	TATATTAATTTATATATATATATTTTAATCTTTTATCTTTT	AF013595
pIL105	TATTATTATTATCCTATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	AF116286
PSL2	TATTATATATTTATCATATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	X56550
pCI305	TATTATATATTTATCTTATATATTTTAATCTTTTATCTTTT	M74063
pVS40	TATATTAATTTATCATATATATTTTAATCTTTTATCTTTT	L02920
pK214	TATATTAATTTATCTTATATATTTTAATCTTTTATCTTTT	X92946
repB1 pNZ4000	TATATTAATTTATCTTATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	AF036485
repB2 pNZ4000	TATATCTATTTATCATATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	AF036485
pCI528	TATATTAATTTATCATATATATTTTAATCTTTTCTCTTTT	L06274
repB3 pNZ4000	TATATTAATTTATCATATATATTTTAATCTTTTCTCTTTT	AF036485
repB4 pNZ4000	TATTATATATTTATCCTATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	AF036485
pFV1201	TATTATTATTATCTTATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	X96949
pND302	TATATTAATTTATCATATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	U79032
pAH82	TATTATATTATCTTATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	AF243383
pSRQ900	TATATATATATTTATCTTATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	AF001314
pJW563	TTTATATATTTATCCTATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	X85168
konsensus	TATNNAATTTATCTTATATATTTTAATCTTTTGTTCTTTT	

Analizowane replikony mają bardzo podobną budowę strukturalną. Standardowy replikon składa się z regionu *ori* wraz z obszarem promotorowym genu *repB*, elementów regulacyjnych procesów replikacji i transkrypcji oraz genów *repB* i *repC*, które tworzą strukturę operonu. Klasycznym przykładem takiego replikonu jest replikon plazmidu proteinazowo-laktozowego pUCL22.

Operon *repBC* ulega transkrypcji pod kontrolą wspólnego regulowanego promotora. Gen *repB* koduje białko replikacyjne, które zapoczątkowuje proces replikacji plazmidu poprzez przyłączenie się do sekwencji *ori* i tworzenie „oczka” replikacyjnego. Gravesen i wsp. (58), porównując sekwencję aminokwasów białka repB pochodzącą z wielu różnych plazmidów stwierdzili, że ma ona bardzo konserwatywną budowę, a drobne różnice strukturalne występują jedynie w C-końcowej części tego białka. Drugi gen operonu *repC* (*orfX*) jest również bardzo konserwatywny, a białko RepC zawiera motyw helisa-skręt-helisa, typowy dla białek wiążących DNA. Uważa się, że białko to uczestniczy w procesie regulacji liczby kopii plazmidu. U wielu plazmidów bakterii mlekowych gen *repC* występuje w formie przyciętej (*truncated*) i dlatego, jak się wydaje, nie jest on niezbędny do replikacji plazmidu.

Przedstawiona analiza wybranych plazmidów replikujących według mechanizmu theta wskazuje, że typowy replikon tego rodzaju składa się z następujących elementów:

1. Origin (miejsce inicjacji replikacji) o długości 41-43 par zasad. Region ten jest bogaty w zasady A+T, a bezpośrednio przed nim znajduje się 6-10-nukleotydowa sekwencja zasad bogata w G+C.

2. Obszaru między origin a powtórzeniem ($3,5 \times 22$ p.z.) – około 60 – 80 par zasad o zróżnicowanej sekwencji, przy czym na jego początku występują w przewadze zasady A+T.

3. Bezpośredniego powtórzenia DR22 (iteron), złożonego z trzykrotnie powtórzonej sekwencji 22 par zasad oraz z niepełnego kawałka tej sekwencji o długości od 8 do 19 pz. Sekwencja DR22 na swoim początku i końcu jest bardzo konserwatywna.

4. W regionie $3,5 \times$ DR22 znajduje się krótsze proste powtórzenie (DR7-13) występujące czterokrotnie. Sekwencja ta jest powtórzona piąty raz w orientacji odwróconej poza regionem $3,5 \times$ DR22. Czwarte i piąte odwrócone powtórzenie tej sekwencji tworzy strukturę „łodyżki z pętelką”.

5. W regionie pętliki tego odwróconego powtórzenia występuje sygnał – 35 promotora genu *repB*. Poza pierwszym odwróconym powtórzeniem na nici głównej DNA znajduje się sygnał -10 promotora tego genu. Typowy promotor genu *repB* ma następującą strukturę 5'-TTGTNN-16-18 pz.- TATAAT-3'.

6. Za miejscem -10 występuje para odwróconych powtórzeń o długości od 10 do 15 pz., tworząca drugą strukturę łodyżki z pętelką. W obrębie tych powtórzeń występują konserwatywne dziewięcionukleotydowe sekwencje homologiczne do sekwencji AttP różnych fagów bakterii mlekowych.

7. Miejsce wiązania rybosomu rbs znajduje się za drugą łodyżką z pętelką, kilka par zasad bezpośrednio przed kodonem startowym genu *repB* i ma następującą strukturę 5'-AAAGGAG-3'.

W analizowanych replikonach znaleziono trzy różne sekwencje AttP:

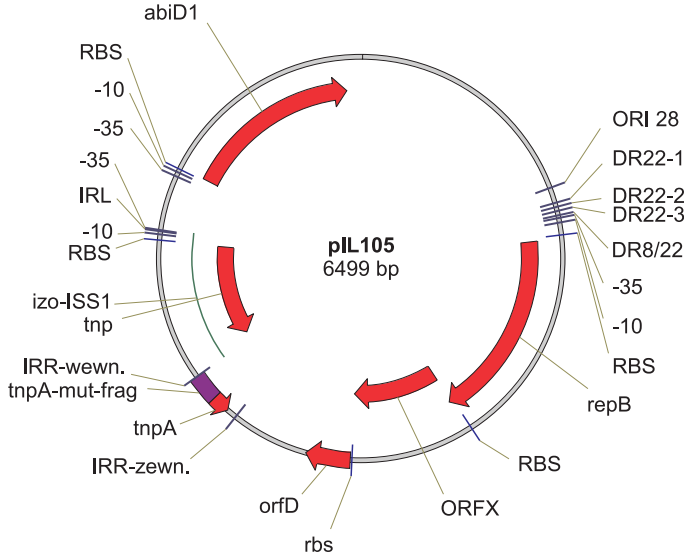
5'-TATGAAGAA-3' – fagi sk1, BK5-T, r1t.

5'-CATGAAGAA-3' – fag Tuc2009.

5'-CATAGAGAA-3' – fagi c2, bIL67.

7. Organizacja strukturalna dużych plazmidów typu theta

Minimalny replikon to tylko jeden z elementów struktury plazmidów typu theta, którego długość wynosi około 2,2 tpz. Duże plazmidy bakterii mlekowych mają wielkość dochodzącą do 130 tpz. Jakie geny wchodzić zatem w skład tak dużych replikonów? Odpowiedź na to pytanie nie jest prosta, gdyż plazmidy zawarte w komórkach są bardzo plastyczne i w obrębie tego samego szczepu może zmieniać się ich liczba jak i wielkość. Zmiany te spowodowane są zjawiskiem tworzenia kointegratów między plazmidami składowymi i chromosomem oraz odwracalnym ich rozpadem. Cecha ta związana jest z występowaniem w strukturach plazmidów sekwencji insercyjnych odpowiedzialnych za transpozycyjne tworzenie kointegratów i ich rozpad. Jednym z prostszych przykładów plazmidu bakterii mlekowych, który zawiera sekwencje insercyjne jest plazmid pIL105 (59). Na rysunku 7 przedstawiono jego organizację strukturalną. Plazmid ten jest odpowiedzialny za me-

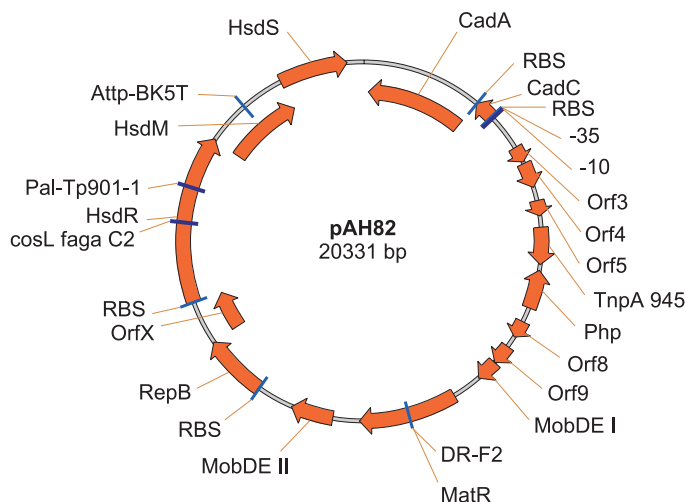


Rys. 7. Funkcjonalna struktura plazmidu pIL105 bakterii *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*.

abiD1 – gen poronnej infekcji fagowej, *ORFX* – gen niepotrzebny do replikacji, *izo-ISS1* – sekwencja insercyjna, *tnpA* – gen transpozazy, *tnpA#* – fragm. genu transpozazy, *tnpA-mut-frag.* – zmutowany fragment genu *tnpA*, IRL i IRR – odwrócone powtórzenia sekwencji insercyjnej, *repB* – gen białka replikacyjnego, DR22-1 do 3 – proste powtórzenia (22 pz.), DR8/22 – fragm. prostego powtórzenia (8 pz.). Na podstawie sekwencji GenBank Accession AF116286.

chanizm poronnej infekcji fagowej uwarunkowany obecnością genu *AbiD1*. Jest to typowy przykład organizacji strukturalnej plazmidów typu theta, który zawiera trzy podstawowe moduły genetyczne, minimalny replikon, sekwencję insercyjną, i gen/geny funkcji metaboliczno-fizjologicznych. Taka modularna budowa plazmidów występuje w większości znanych i opisanych przykładów plazmidów bakterii mlekowych. Ze względu na mechanizmy rekombinacji transpozycyjnej, bardziej złożone plazmidy składają się z tych samych modułów należących do plazmidów składowych. W plazmidach złożonych występują zatem powielone minimalne replikony, kilka tych samych lub różnych sekwencji insercyjnych oraz bloki genów funkcji metabolicznych.

Przykładem bardziej złożonego plazmidu jest plazmid pAH82 o wielkości ok. 21 tpoz, warunkujący oporność komórek na jony kadmu Cd^{2+} , system restrykcji i modyfikacji R/M, syntezę fosfatazy serynowo/treoninowej białek, funkcje mobilizacyjne i geny o nieznanym znaczeniu (60). Na rysunku 8 przedstawiono organizację strukturalną tego plazmidu. Geny *orf8*, *orf9*, *MobDE I*, *MatR*, *MobDE II*, *repB*, oraz *orfX* stanowią fragment plazmidu koniugacyjnego i warunkują funkcje replikacji oraz koniugacyjnego transferu tego plazmidu. Sekwencja insercyjna jest reprezentowana przez *izo-ISS1*. Nie jest znana funkcja genów *orf3*, *orf4*, *orf5*. System restrykcji/modyfikacji R/M typu I kodowany jest przez trzy geny *HsdS*, *HsdM* i *HsdR*, kontrolujące

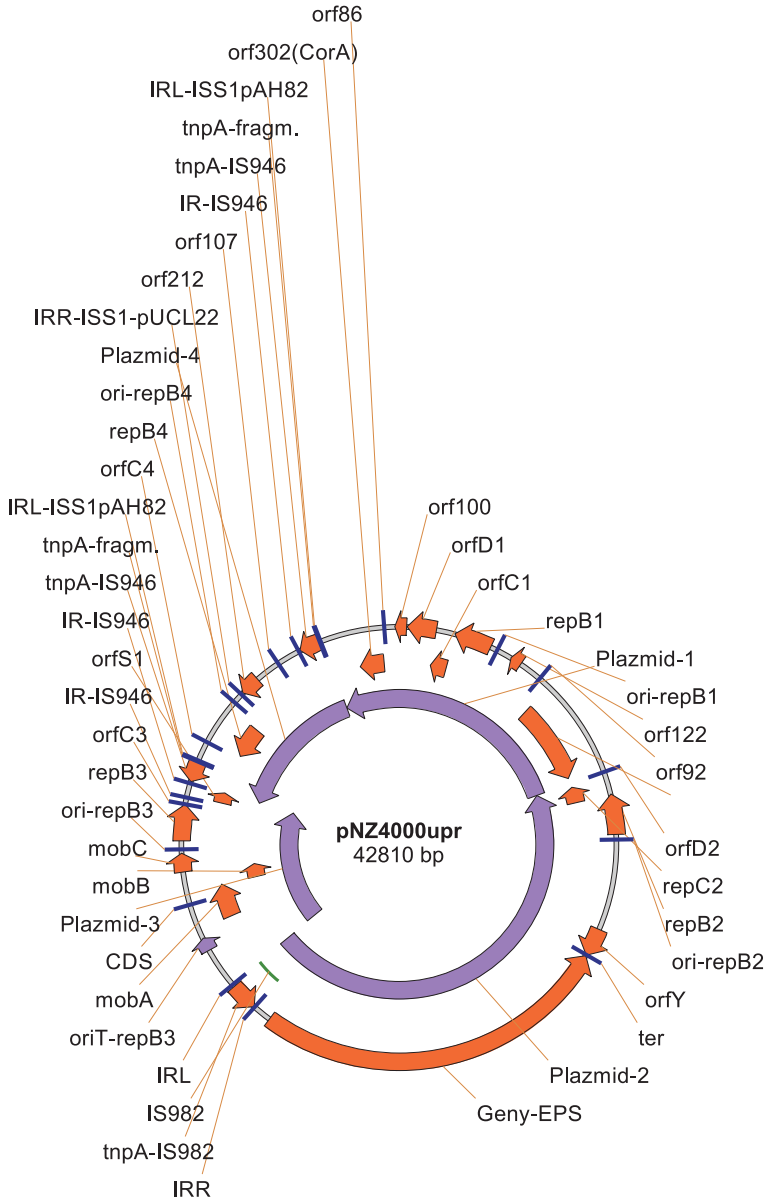


Rys. 8. Mapa funkcjonalna plazmidu pAH82 bakterii *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* DPC220. *CadA* – efflux ATPaza jonów kadmu, *CadC* – regulator oporności na jony kadmu (represor transkrypcji), *Orf3*, *Orf4*, *Orf5* – geny o nieznannej funkcji, *TnpA 945* – transpozaza sekwencji insercyjnej izo-*ISS1*, *Php* – fosfataza serynowo/treoninowa białek, *Orf8*, *Orf9* – geny o nieznannej funkcji, *MobDE I* – relaksaza Mob DEI, *MatR* – maturaza, *MobDE II* – relaksaza Mob DEII, *RepB* – gen białki replikacyjnego, *OrfX* – gen o nieznannej funkcji, *HsdR* – podjednostka restrykcyjna systemu R/M typu I, *HsdM* – podjednostka modyfikująca systemu R/M typu I, *HsdS* – podjednostka specyficzności systemu R/M typu I. Na podstawie sekwencji Gen Bank Accession AF243383.

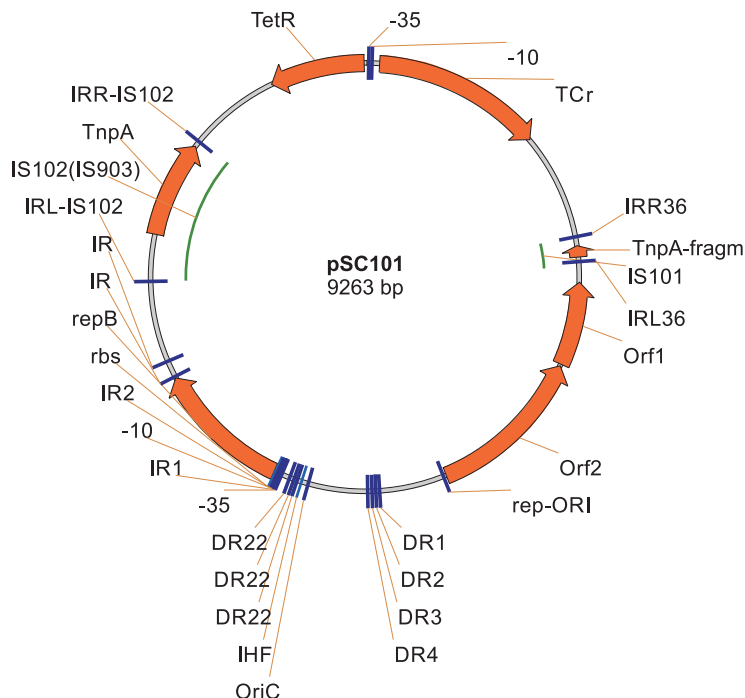
syntezę trzech podjednostek kompleksu enzymatycznego: podjednostki specyficzności, modyfikacji i restrykcji. Geny warunkujące oporność komórek na jony kadmu tworzą strukturę operonu składającą się z dwóch genów *cadC* i *cadA* ulegających transkrypcji ze wspólnego promotora. Podobna organizacja genów oporności na jony kadmu występuje w plazmidzie pND302 bakterii mlekowych (61), oraz w transpozonie *PsiTn554 Staphylococcus aureus* (62) i transpozonie *Tn5422 Listeria monocytogenes* (63,64). Z uwagi na niemal 100% homologię genów *cadC* i *cadA* tych trzech organizmów można sądzić, że cecha ta została przeniesiona ze *Staphylococcus aureus* lub *Listeria monocytogenes* do *Lactococcus lactis* na zasadzie poziomego transferu genów.

Interesującą rzeczą jest fakt, że w obrębie genu *HsdR* występuje sekwencja *cos* faga c2 i palindromowa faga Tp901-1 bakterii mlekowych. Ponadto w genie *HsdM* znajduje się sekwencja *AttP* faga BK5-T (obserwacja własna). Fakty te mogą wskazywać na fagowe pochodzenie genów *Hsd*.

Przykładem plazmidu będącego kointegratem czterech plazmidów składowych może być pNZ4000 z *Lactococcus lactis* NIZO B40 o wielkości 42810 pz, warunkujący produkcję zewnątrzkomórkowego polisacharydu (65). Na rysunku 9 przedstawiono schematycznie jego budowę. Plazmid ten zawiera cały operon *eps* składający się z czternastu genów *epsRXABCDEFGHIJKL* ulegających transkrypcji z jednego polici-



Rys. 9. Organizacja strukturalna plazmidu pNZ4000 warunkującego produkcję zewnątrzkomórkowych polisacharydów EPS. Objaśnienia w tekście. Na podstawie sekwencji GenBank Accession AF036485.2.



Rys. 10. Organizacja strukturalna niskokopijnego plazmidu pSC101 bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* warunkujacego opornosc na tetracyklinę. Objasnienia w tekście. Kompilacja na podstawie sekwencji GenBank Accession NC_002056, X00657, K00042, M36272, J01728.

stronowego m-RNA syntetyzowanego pod kontrolą promotora poprzedzajacego gen *epsR*. Bialka operonu *eps* tworzą kompleks enzymatyczny syntetyzujacy wewnatrzkomorkowo pięciocukrową jednostkę budulcową polimeru, transportujacy ją przez membranę cytoplazmatyczną i ścianę komorkową oraz dołączajacy ją do zewnatrzkomorkowej matrycy polimeru. Szczegoly funkcjonowania systemu biosyntezy polisacharydów opisano w pracach Kleerebezem i wsp. (66) oraz van Kranenburg i wsp. (25). W bezposrednim sasiedztwie genu *epsR* znajduje się sekwencja insercyjna *IS982*, co wskazuje, że geny te mogly zostac przeniesione do plazmidu z chromosomu na zasadzie wspomaganey sekwencją insercyjną rekombinacji transpozycyjnej. Plazmid pNZ4000 zawiera rowniez geny systemu transportu jonów kobaltu zgrupowane w strukturze operonu *cbiMQO* oraz oddzielnie wystepujacy gen *corA*, ktorego produkt uczestniczy w transporcie jonów magnezu. Oprócz funkcji metabolicznych kodowanych przez ten plazmid zawiera on rowniez cztery geny *repB*, które wraz z sekwencjami poprzedzajacyimi te geny tworzą w pełni funkcjonalne replikony *repB1*, *repB2*, *repB3* i *repB4*, a kazdy z nich należy do innego plazmidu skladowego. Budowa strukturalna kazdego replikonu jest bardzo podobna i wszys-

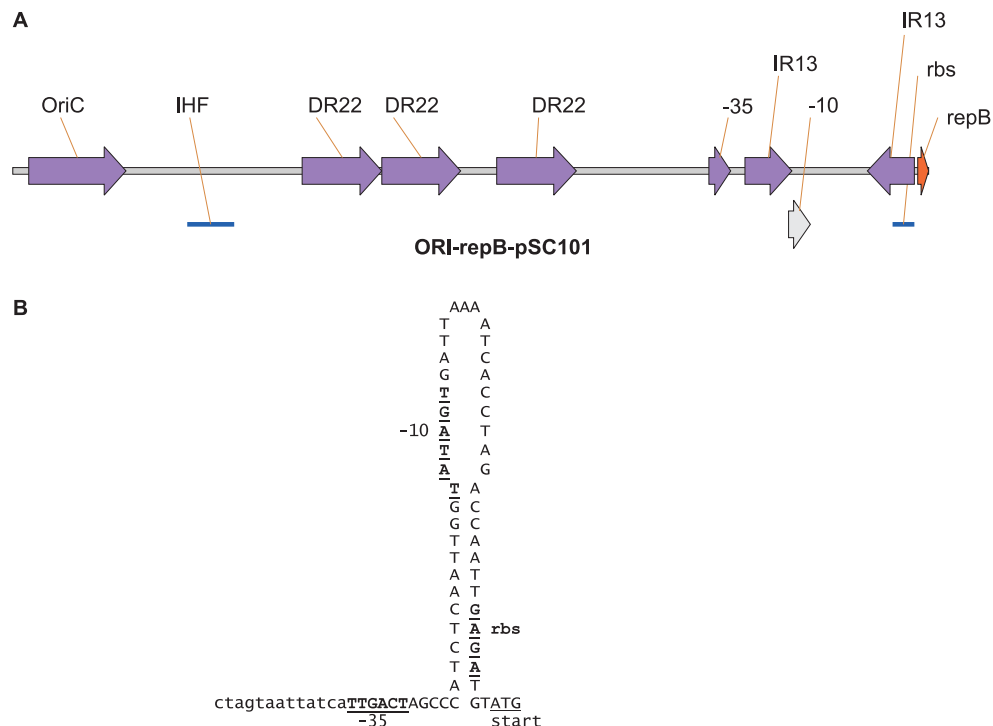
kie warunkują replikację typu theta. Na podstawie podobieństwa minimalnych replikonów ustalono, że *repB1* jest homologiczny do pVS40, *repB2* do pWV04, *repB3* do pCI528, a *repB4* do pFV1201 (65).

Plazmid pNZ4000 może być łatwo przeniesiony do innych szczepów *Lactococcus lactis* na drodze koniugacji i wykazano, że jest on plazmidem mobilizacyjnym. Zidentyfikowano w pobliżu dwóch replikonów (*repB2* i *repB3*) dwa regiony zaangażowane w proces mobilizacji plazmidów i wykryto obecność dwóch sekwencji *oriT* odpowiedzialnych za koniugacyjny transfer plazmidu. Wykazano możliwość koniugacyjnej mobilizacji plazmidu pNZ124 przez każdą z dwóch sekwencji *oriT* plazmidu pNZ4000. Za jedną z sekwencji *oriT* występuje gen *mobA* kodujący białko działające *in-trans*, które zwiększało częstość koniugacyjnego transferu 100-krotnie. Przewidziana sekwencja aminokwasów białka MobA i sekwencje *oriT* wykazywały znaczące podobieństwa odpowiednio do relaksazy i *oriT* plazmidu R64 bakterii *Escherichia coli* (65).

Plazmidy bakterii mlekowych replikujące wg mechanizmu theta nie różnią się w organizacji strukturalnej regionu *ori* od naturalnych plazmidów typu theta bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*. Przykładem tego typu plazmidu funkcjonującego u wymienionych gatunków bakterii jest niskokopiowy plazmid pSC101 warunkujący oporność komórek na tetracyklinę (rys. 10) (67-72). Gen oporności na tetracyklinę *Tc^r* z tego plazmidu wykorzystany został jako marker selekcyjny do skonstruowania tak znanych wektorów plazmidowych bakterii *Escherichia coli* jak pBR322 i pBR325 (73). Oprócz genów oporności na tetracyklinę, plazmid ten zawiera również dwie sekwencje insercyjne *IS102* homologiczną do *IS903* oraz *IS101*. Ta ostatnia zawiera niekompletny (przycięty) gen transpozazy i jest prawdopodobnie nieaktywna. Za funkcje replikacyjne plazmidu odpowiada gen *repB* poprzedzony regionem *ori*, elementami regulacyjnymi odpowiedzialnymi za zjawisko niezgodności (*incompatibility*) i regulowany promotor oraz miejsce wiązania rybosomów. Organizację regionu poprzedzającego gen *repB* przedstawiono na rysunku 11A.

Występowanie regionu *oriC* oraz trzech prostych powtórzeń DR22 jest typową strukturą znajdującą we wszystkich plazmidach replikujących wg mechanizmu theta bakterii mlekowych. Krótki odcinek DNA pomiędzy 2 i 3 DR22 spełnia podobną funkcję jak czwarte niekompletne proste powtórzenie w replikonach bakterii mlekowych wydłużając ten region do ok. 3,5 długości prostego powtórzenia DR22. W obrębie promotora genu *repB* występuje odwrócone powtórzenie IR13, które może powodować powstawanie struktury łożyski z pętelką o budowie przedstawionej na rysunku 11B. Odgrywa ona istotną rolę w procesie autoregulacji transkrypcji genu *repB*.

Porównanie struktury plazmidu pSC101 z analogicznymi strukturami plazmidów bakterii mlekowych pokazuje, że u tych ostatnich występują zazwyczaj dwie łożyski z pętelką. Pierwsza z nich obejmuje obszar promotora, a druga występuje bezpośrednio przed rbs. U plazmidów bakterii mlekowych sygnał -35 promotora leży w obrębie pierwszej pętelki, natomiast obszar -10 na nici głównej. W przypadku plazmidu pSC101 mamy odwrotną sytuację, gdyż sygnał -35 promotora leży na nici



Rys. 11. A – Region poprzedzający gen *repB* plazmidu pSC101. OriC – region homologiczny do OriC *E. coli*, IHF – miejsce wiązania czynnika integracyjnego gospodarza, DR22 – proste powtórzenia, IR13 – odwrócone powtórzenia, -35, -10 – sygnały promotora, rbs – miejsce wiązania rybosomów, *repB* – początek genu białka replikacyjnego. B – Struktura łądźki z pętelką w obrębie promotora i rbs plazmidu pSC101 uczestnicząca w procesie autoregulacji transkrypcji genu *repB*. Na podstawie sekwencji Gen Bank Accession K00042, X00657.

głównej natomiast sygnał -10, w obrębie pętelki. Ponadto w obrębie łądźki tej struktury znajduje się również miejsce wiązania rybosomu. Sekwencja DNA odpowiedzialna za replikację plazmidu pSC101 jest krótsza o około 20 par zasad niż analogiczne sekwencje bakterii mlekowych, co tłumaczy brak drugiej struktury łądźki z pętelką.

Pomimo przedstawionych różnic w budowie sekwencji odpowiedzialnych za inicjację procesu replikacji plazmidów typu theta bakterii gramdodatnich i gramujemnych wydaje się, że mają one wspólne pochodzenie. Jednakże należy podkreślić, że plazmidy theta bakterii mlekowych należą do grupy o wąskim zakresie gospodarzy (*narrow host range*) i mogą funkcjonować jedynie w komórkach bakterii z rodzaju *Lactococcus* lub blisko spokrewnionych rodzajów *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Pediococcus*. U bakterii gramujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* za specyficzność rodzajową plazmidów theta w dużej mierze odpowiada sekwencja IHF (*integration host factor*),

będąca miejscem wiązania czynnika integracyjnego gospodarza. Występuje ona pomiędzy regionem oriC oraz regionem prostych powtórzeń (iteronów) i posiada następującą sekwencję 5'-YAANNNTTGATW-3' (74,75). W pracach tych autorów wykazano, że czynnik integracyjny gospodarza *Escherichia coli* łączy się specyficznie z sekwencjami attP fagów Φ80 i P22 oraz odwróconymi powtórzeniami sekwencji insercyjnej IS1, jak również miejscem „hot spot” IS1 w plazmidzie pBR322. Podobny mechanizm kontroli specyficzności gatunkowej replikonu, jak się wydaje, występuje również u bakterii mlekowych. W tym przypadku rolę czynnika IHF mogą odgrywać transpozazy sekwencji insercyjnych bakterii mlekowych wchodzących w skład struktury plazmidu typu theta. Prawdopodobne jest, że replikon theta wraz z towarzyszącą mu specyficzną sekwencją insercyjną stanowią nierozłączny element niezbędny do replikacji plazmidu. Plazmid typu theta bakterii mlekowych może zatem replikować jedynie w przypadku, gdy zawiera jednocześnie właściwą dla danego replikonu sekwencję insercyjną lub ta sekwencja insercyjna występuje w formie zintegrowanej z chromosomem bakterii gospodarza. Plazmid theta pozbawiony towarzyszącej mu sekwencji insercyjnej może replikować jedynie w komórkach bakterii zawierających chromosomalne kopie tych sekwencji. Teza ta jednak wymaga doświadczalnego udowodnienia.

8. Podsumowanie

Plazmidy bakterii mlekowych ze względu na budowę strukturalną minimalnych replikonów stanowią homogeną grupę ruchomych elementów genetycznych przyczyniających się do znacznego zróżnicowania biochemiczno-fizjologicznego szczepów. Są one ponadto przyczyną ogromnej zmienności międzyszczepowej bakterii powodowanej utratą lub nabyciem określonego plazmidu lub jego integracją z chromosomem. Występowanie tych samych genów w chromosomie bakterii, jak i w plazmidach zawierających sekwencje insercyjne świadczy o tym, że w komórkach geny mogą „wędrować” z chromosomu do plazmidu i odwrotnie na zasadzie transpozycji wspomaganą sekwencjami insercyjnymi. Ich obecność jest przyczyną ogromnej plastyczności genetycznej bakterii mlekowych i ich łatwości przystosowania się do zmiennych warunków środowiska. Występowanie tych samych genów w plazmidach, transpozonach lub chromosomach różnych rodzajów blisko spokrewnionych bakterii (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*) wskazuje, że w środowisku bytowania bakterii mlekowych zachodzą ciągle procesy poziomego transferu genów, a plazmidy odgrywają rolę wektorów wspomagających ten transfer. Przedstawione w pracy przykłady dużych plazmidów nie wyczerpują różnorodności genetycznej plazmidów spotykanych w komórkach bakterii mlekowych.

Literatura

1. de Vos W. M., Gasson M. J., (1989), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 1833-1846.
2. de Vos W., Boerrigter I., van Rooijen R. J., Reiche B., Hangstenberg W., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 22554-22560.
3. van Rooijen R. J., de Vos W. M., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 18499-18503.
4. van Rooijen R. J., van Schalkwijk S., de Vos W. M., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 7176-7181.
5. van Rooijen R. J., de Vos W. M., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 2273-2280.
6. Kok J., (1990), *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 15-42.
7. Thomas T. D., Pritchard G. G., (1987), *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 245-268.
8. Kok J., Leenhouts C. J., Haandrikman A. J., Ledebøer A. M., Venema G., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 231-238.
9. de Vos W. M., Vos P., de Haard H., Boerrigter I., (1989), *Gene*, 85, 169-176.
10. Kaletta C., Entian K.-D., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 1597-1601.
11. van Belkum M. J., Hayema B. J., Geis A., Kok J., Venema G., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1187-1191.
12. van Belkum M. J., Hayema B. J., Jeeninga R. E., Kok J., Venema G., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 492-498.
13. van Belkum M. J., Kok J., Venema G., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 572-577.
14. Marugg J. D., Gonzalez C. F., Kunka B. S., Ledebøer A. M., Pucci M. J., Toonen M. Y., Walker S. A., Zoetmulder L. C. M., Vandenberg P. A., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2360-2367.
15. Motlagh A. M., Bukhtiyarova M. B., Ray B. R., (1994), *Letts. Appl. Microbiol.*, 18, 305-312.
16. Stiles M. E., (1994), *J. Dairy Sci.*, 77(9), 2718-2724.
17. Hastings J. W., Sailer M., Johnson K., Roy K. L., Vederas J. C., Stiles M. E., (1991), *J. Bacteriol.*, 173 (23), 7491-7500.
18. van Belkum M. J., Stiles M. E., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (10), 3573-3579.
19. Froseth B. R., McKay L. L., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 804-811.
20. Efstathiou J. D., McKay L. L., (1977), *J. Bacteriol.*, 130, 257-265.
21. Liu C.-Q., Chia G. L., Dunn N. W., (1996), *Direct Submission ACCESSION U78967*.
22. Teuber M., Meile L., Schwarz F., (1999), *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 115-137.
23. Kempler G. M., McKay L. L., (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 316-323.
24. Lopez de Felipe F., Magni C., de Mendoza D., Lopez P., (1995), *Mol. Gen. Genet.*, 246 (5), 590-599.
25. van Kranenburg R., van Swam I. I., Marugg J. D., Kleerebezem M., de Vos W. M., (1999), *J. Bacteriol.*, 181 (1), 338-340.
26. de Vos W. M., Underwood H. M., Davies F. L., (1984), *FEMS Microbiol. Lett.*, 23, 175-178.
27. Benbadis L., Garel J.-R., Hartley D. L., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3677-3678.
28. Hill C., Pierce K., Klaenhammer T. R., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2416-2419.
29. Hill C., Miller L. A., Klaenhammer T. R., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2255-2258.
30. Hill C., (1993), *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 87-108.
31. Scheirlinck T., de Meutter J., Arnaut G., Joos H., Claeysens M., Michiels F., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 534-541.
32. del Solar G., Puyet A., Espinosa M., (1987), *Nucleic Acid Res.*, 15, 5561-5580.
33. del Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarria M. J., Espinosa M., Diaz-Orejaz R., (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 434-464.
34. te Riele H., Michel B., Ehrlich S., (1986a), *EMBO J.*, 5, 631-637.
35. te Riele H., Michel B., Ehrlich S., (1986b), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2541-2545.
36. Gros M.-F., te Riele H., Ehrlich S. D., (1987), *EMBO J.*, 6, 3863-3869.
37. Pigac J., Vajaklija D., Toman Z., Gamulin V., Schrempf H., (1988), *Plasmid*, 19, 222-230.
38. Baas P., Jansz H., (1988), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 136, 31-70.
39. Ehrlich S. D., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1680-1682.
40. Goze A., Ehrlich S., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7333-7337.
41. Gryczan T., Contente S., Dubnau D., (1978), *J. Bacteriol.*, 134, 318-329.

42. Polak J., Novick R., (1982), *Plasmid*, 7, 152-162.
43. Gruss A., Ehrlich S. D., (1989), *Microbiol. Rev.*, 53, 231-241.
44. Vehmaanperä J. O., Korhola M. P., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 456-461.
45. Grus A., Ehrlich S. D., (1988), *J. Bacteriol.*, 170, 1183-1190.
46. Hayes F., Vos P., Fitzgerald G. F., de Vos W. M., Daly C., (1991), *Plasmid*, 25 (1), 16-26.
47. Lucey M., Daly C., Fitzgerald G., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 110 (3), 249-256.
48. Kiewiet R., Bron S., de Jonge K., Venema G., Seegers J. F., (1993), *Mol. Microbiol.*, 10, 319.
49. Frere J., Novel M., Novel G., (1993), *Mol. Microbiol.*, 10 (5), 1113-1124.
50. Benachour A., Frere J., Novel G., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 128 (2), 167-175.
51. Cegłowski P., (1995), *Post. Mikrobiol.*, XXXIV (2), 121-141.
52. Taylor K., Podhajska A., (1989), w: *Biologia molekularna informacja genetyczna*, pr. zb., red. Z. Lasota, PWN, Warszawa, 600-635.
53. Dale J. W., (1994), *Molecular Genetics of Bacteria*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 165-185.
54. Włodarczyk M., (2002), *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych*, 51(3), 241-254.
55. Leenhouts K. J., Tolner B., Bron S., Kok J., Venema G., Seegers J. F., (1991), *Plasmid*, 26 (1), 55-66.
56. Gravesen A., Josephsen J., von Wright A., Vogensen F. K., (1995), *Plasmid*, 34, 105-118.
57. Khunajakr N., Liu C.-Q., Dunn N. W., (1996), Direct Submission, *ACCESSION U79032*.
58. Gravesen A., von Wright A., Josephsen J., Vogensen F. K., (1997), *Plasmid*, 38 (2), 115-127.
59. Anba J., Bidnenko E., Hillier A., Ehrlich D., Chopin M. C., (1995), *J. Bacteriol.*, 177 (13), 3818-3823.
60. O'Sullivan D., Twomey D. P., Coffey A., Hill C., Fitzgerald G. F., Ross P. R., (2000), *Mol. Microbiol.*, 36 (4), 866-875.
61. Liu C.-Q., Chia G. L., Dunn N. W., (1996), Direct Submission. *ACCESSION U78967*.
62. Chikramane S. G., Dubin D. T., (1993), Direct submission *ACCESSION L10909*.
63. Lebrun M., Audurier A., Cossart P., (1994a), *J. Bacteriol.*, 176, 3040-3048.
64. Lebrun M., Audurier A., Cossart P., (1994b), *J. Bacteriol.*, 176, 3049-3061.
65. van Kranenburg R., de Vos W. M., (1998), *J. Bacteriol.*, 180 (20), 5285-5290.
66. Kleerebezem M., van Kranenburg R., Tuinier R., Boels I. C., Zoon P., Looijesteijn E., Hugenholtz J., de Vos W. M., (1999), *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 357-365.
67. Bernardi A., Bernardi F., (1981), *Nucleic Acids Res.*, 9, 2905-2911.
68. Bernardi A., Bernardi F., (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12 (24), 9415-9426.
69. Yamaguchi K., Masamune Y., (1985), *Mol. Gen. Genet.*, 200 (3), 362-367.
70. Yamaguchi K., Yamaguchi M., (1984a), *Gene*, 29 (1-2), 211-219.
71. Yamaguchi K., Yamaguchi M., (1984b), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 30, 347-358.
72. Vocke C., Bastia D., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (21), 6557-6561.
73. Brow M. A. D., Pesin R., Sutcliffe J. G., (1985), *Mol. Biol. Evol.*, 2, 1-12.
74. Gamas P., Chandler M. G., Prentki P., Galas D. J., (1987), *J. Mol. Biol.*, 195, 261-272.
75. Leong J. M., Nunes-Duby S., Lesser C. F., Youderian P., Susskind M. M., Landy A., (1985), *J. Biol. Chem.*, 260, 4468-4477.