Plazmidowe systemy stabilnego dziedziczenia

Dziedziczenie doskonałe

MICHAŁ DMOWSKI
Instytut Biochemii i Biofizyki, Warszawa
Polska Akademia Nauk
mdmowski@ibb.waw.pl

Dr Michał Dmowski pracuje w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów IBB PAN, gdzie zajmuje się badaniami nad plazmidami bakteryjnymi. W swojej pracy doktorskiej scharakteryzował nietypowy system partycyjny plazmidu pSM19035 z bakterii *Streptococcus pyogenes*

Poznanie działania plazmidowych systemów stabilnego dziedziczenia pozwoli na skuteczną walkę z groźnymi zakażeniami wywołanymi przez bakterie oporne na większość znanych antybiotyków

Od jakiegoś czasu medycyna na całym świecie boryka się z problemami groźnych zakażeń szpitalnych, z którymi trudno jest walczyć. Szczepy bakterii opornych na „wszystko" to prawdziwa plaga. Główna broń człowieka w walce z mikrobami - antybiotyki - jest w tym wypadku nieprzydatna. Jak to się dzieje, że bakterie oporne są na tak wiele antybiotyków naraz? Winne są plazmidy - cząsteczki DNA, które jedna bakteria może szybko i bez trudu przekazać drugiej. Na dodatek dzięki wyrafinowanym systemom molekularnym plazmidy są bardzo stabilnie utrzymywane w komórce bakteryjnej.

Czym są plazmidy?

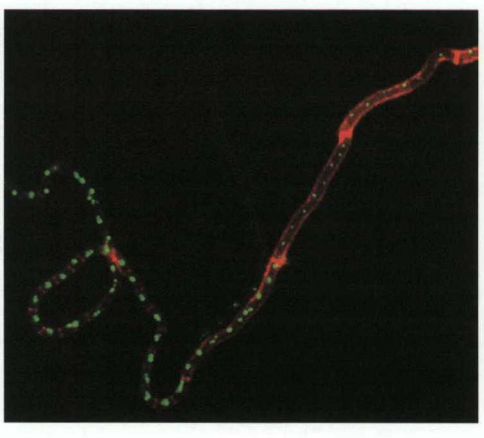
Plazmidy bakteryjne są autonomicznymi cząsteczkami DNA wielkości od kilku do kilkuset tysięcy par zasad. Dla porównania, genom pałeczki okrężnicy *Escherichia coli* modelowego organizmu ma wielkość około 4,7 miliona par zasad. Plazmidy w odróżnieniu od chromosomu(-ów) nie są niezbędne do życia bakterii, ale często niosą geny, których obecność może w pewnych warunkach środowiska być dla gospodarza bardzo przydatna: właśnie warunkujące oporność na antybiotyki czy kodujące szlaki metaboliczne pozwalające na wykorzystanie określonych związków. Występują one w komórce w różnej liczbie kopii (od jednej do kilkudziesięciu).

Aby zrozumieć problem stabilnego dziedziczenia plazmidów, trzeba najpierw uświadomić sobie, że te cząsteczki, oprócz dostarczania przydatnych genów, stanowią pewne obciążenie metaboliczne dla komórki gospodarza. Mała liczba kopii może ograniczać to obciążenie, choć takie rozwiązanie ma też swoje wady. Jeżeli w komórce bakterii obecnych jest niewiele cząsteczek plazmidu, które losowo rozchodzą się do komórek potomnych, istnieje prawdopodobieństwo, że po podziale jedna z dwóch komórek potomnych odziedziczy wszystkie cząsteczki plazmidu, a druga żadnej. Do obliczenia prawdopodobieństwa powstania komórki bezplazmidowej można posłużyć się wzorem: $P = 2^{(1-n)}$, gdzie n oznacza liczbę kopii plazmidu. A zatem dla plazmidu występującego w dwóch kopiach prawdopodobieństwo to wynosi 0,25, dla obecnego w dziesięciu kopiach jest ponad sto razy mniejsze, dla obecnego zaś w dwudziestu kopiach spada ponad sto tysięcy razy. Wysokie prawdopodobieństwo utraty plazmidu w trakcie podziału komórki ogranicza jego rozprzestrzenianie: w populacji bakterii nie zwiększa się liczba komórek niosących plazmid, ich udział w rosnącej populacji spada.

Zapobiec utracie

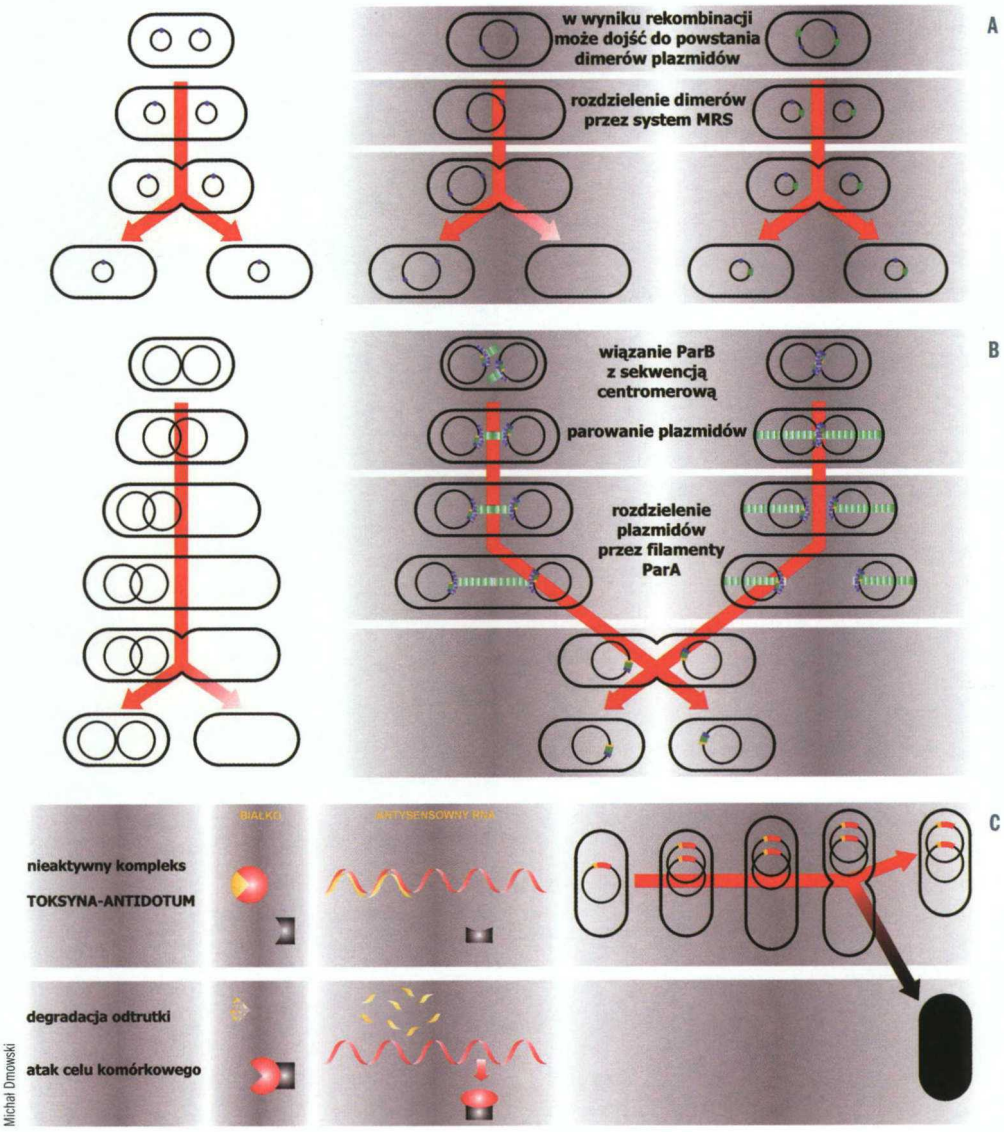
Plazmidy wykształciły wiele systemów zapewniających im przetrwanie. Najważniejszym jest ten umożliwiający powielanie, czyli replikację powiązaną ze ścisłą regulacją liczby kopii w komórce.

W wypadku plazmidów niskokopiowych ich utracie zapobiegają specjalne systemy wa-



Dagmara Jakimowicz, Agnieszka Kois, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska

Kluczowym zdarzeniem jest utworzenie segregosomu - związanie białka ParB w regionie centromerowym. Z ParB oddziałuje ParA. Na zdjęciu grzybnie powietrzne bakterii *Streptomyces coelicolor*. Zielone kropki to segregosomy (kompleksy białka ParB w fuzji z białkiem GFP)



System MRS (A), rozdzielając plazmidowe dimery, umożliwia losową migrację cząsteczek plazmidu do przyszłych komórek potomnych. System PAR (B) aktywnie wspomaga segregację plazmidów do przyszłych komórek potomnych. System PSK (C) zapewnia eliminację z populacji komórek, które nie odziedziczyły plazmidu

runkujące stabilne utrzymywanie w komórce gospodarza. Niektóre plazmidy zawierają też zestaw genów kodujących system transferu koniugacyjnego, dzięki którym mają zdolność przechodzenia do innej komórki bakteryjnej.

Systemy zapewniające utrzymywanie plazmidów w populacji dzieli się na trzy grupy w zależności od sposobu działania. Są systemy rozdziału form oligomerycznych - MRS (ang. *multimetr resolution system*), partycyjne - PAR (ang. *partition*), oraz posegregacyjnego zabijania komórek bezplazmidowych - PSK (ang. *postsegregational killing*), zwane też systemami toksyna-antidotum - TA.

Przeciw katastrofie dimerów

Działanie systemu rozdziału multimerów umożliwia dziedziczenie plazmidu jedynie albo aż na poziomie zgodnym z liczbą kopii. Wyjaśnienie tego zjawiska należy rozpocząć od omówienia sposobu regulacji liczby kopii plazmidu. Systemy kontrolujące ją w pewnym sensie „odliczają" liczbę miejsc startu replikacji (*ori*). Te miejsca startu występują w plazmidach pojedynczo. Tak więc liczba *ori* odpowiada liczbie kopii plazmidu. Niestety, w wyniku zdarzeń rekombinacyjnych cząsteczki plazmidu mogą się ze sobą łączyć w większe struktury (dimery, trimery, tetramery). Odliczanie miejsc startu replikacji prowadzi wtedy do błędnych „wniosków", gdyż liczba cząsteczek podlegających dziedziczeniu jest mniejsza niż liczba *ori*. Powstałe w ten sposób struktury utrudniają swobodne migrowanie w komórce wszystkich kopii plazmidu, co może doprowadzić do tego, że po podziale jedna z komórek potomnych odziedziczy np. dimer, a druga nie odziedziczy plazmidu wcale. To zaburzenie dziedziczenia ulega wzmocnieniu w wyniku zjawiska tzw. katastrofy dimerów. Powielanie każdego z *ori* zachodzi z równym prawdopodobieństwem (wybór jest losowy). W konsekwencji prawdopodobieństwo inicjacji replikacji każdego dimeru będzie dwa razy

większe niż monomerów, co doprowadzi do przewagi liczebnej tych pierwszych.

Skutkom powstawania multimerów i wzrostowi częstości powstawania komórek bezplazmidowych zapobiega system MRS. Głównym aktorem jest tu enzym - miejscowo specyficzna rekombinaza, resolwaza, która wiąże się z sekwencją DNA - *res*. Po związaniu się z DNA resolwaza rozdziela cząsteczkę na pojedyncze plazmidy. Dzięki temu każdy swobodnie migruje do komórek potomnych, co umożliwia ich losowy rozdział.

Systemy partycyjne

Mechanizm działania systemów partycyjnych PAR często jest porównywany do procesów zachodzących w trakcie rozdziału siostrzanych chromosomów w komórkach eukariotycznych w czasie podziału.

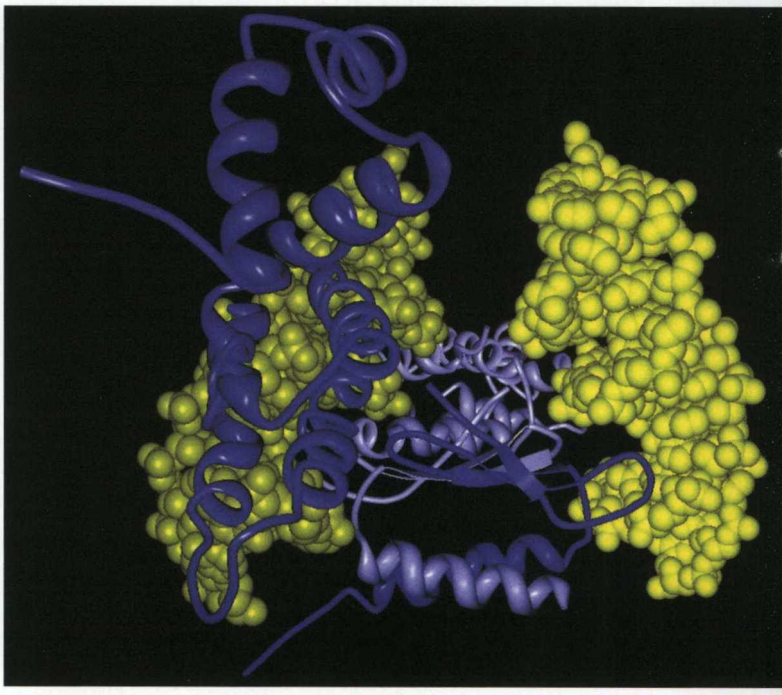
Bakteryjne systemy partycyjne kodowane są przez dwa geny (*parA* i *parB* - nazewnictwo ujednolicone na potrzeby ogólnego opisu), które zwykle stanowią jeden operon, a ich ekspresja jest ściśle regulowana. Białkowe produkty tych genów to ParA i ParB.

Białko ParA jest ATPazą, czyli jest zdolne do hydrolizy ATP - przenośnika energii w układach biologicznych. Liczne białka typu ParA są zdolne do tworzenia filamentów i spiralnych struktur w komórkach bakteryjnych, co ma kluczowe znaczenie w procesie rozdziału plazmidów.

W przeciwieństwie do białek ParA, białka ParB nie wykazują wysokiej homologii i mają bardziej różnorodne struktury. Wspólną cechą wszystkich białek ParB jest zdolność do wiązania się z DNA w miejscu *parS* zwanym sekwencją lub regionem centromerowym. Jest on układem powtórzonych sekwencji nukleotydowych (o różnej liczbie i długości). Te sekwencje są specyficzne dla każdego sytemu partycyjnego i są rozpoznawane tylko przez „własne" białko ParB. Znane są też plazmidowe systemy partycyjne, w których białko ParB wiąże się w wielu miejscach, często oddalonych od genów *par* i rozproszonych. Przykładem jest plazmid pSM19035 z bakterii *Streptococcus pyogenes*, w którym obecne są trzy miejsca wiązania białka typu ParB. Podobnie jest w przypadku plazmidu RK2 (dwanaście miejsc wiązania) czy profaga N15 (cztery sekwencje *parS*).

Wydaje się, że sposób działania systemów partycyjnych jest podobny niezależnie od rodzaju kodowanych białek i organizacji genetycznej regionu *par*. Kluczowym zdarzeniem jest utworzenie segregosomu, czyli partycyjnego kompleksu nukleoproteinowego powstającego w regionie centromerowym. Wiążą się tutaj tworzące dimery białka ParB. Z ParB oddziałuje drugi białkowy komponent systemu - ParA. Przed podziałem komórki dochodzi do sparowania plazmidów w miejscu, w którym powstanie przegroda rozdzielająca komórki potomne. Następnie dochodzi do rozdzielenia pierwotnie sparowanych plazmidów w wyniku ich rozpychania lub rozciągania przez białko ParA. Proces ten jest zależny od wiązania i hydrolizy ATP przez ATPazę ParA stymulowanej przez białko ParB.

Michał Dmowski



Struktura pokazująca sparowane przez białko ParB (niebieskie) cząsteczki plazmidu P1 (żółte). Białka ParB wiążą się z DNA plazmidów w regionach centromerowych (*parS*)

Systemy PAR zidentyfikowano też w bakteryjnych chromosomach. Tam występują liczne regiony centromerowe rozsiane po całym genomie. Co ciekawe, najczęściej wykorzystywana w badaniach modelowa bakteria *Escherichia coli* w swym chromosomie nie zawiera systemu partycyjnego. Natomiast u *Pseudomonas aeruginosa* najprawdopodobniej białko ParA bierze udział również w innych procesach komórkowych.

Trucizna i antidotum

Bakteryjne układy TA/PSK najczęściej kodowane są przez operon, w którym pierwszy gen koduje labilną odtrutkę, a drugi stabilną

truciznę. Systemy toksyna-antidotum klasyfikuje się w zależności od rodzaju kodowanej przez nie odtrutki. Odtrutka może być RNA komplementarnym do mRNA toksyny (np. *hok-sok* plazmidu R1) lub podobnie jak trucizna białkiem i wtedy tworzy z nią nieaktywny kompleks (np. *kid-kis* plazmidu R1). Toksyny są najczęściej inhibitorami gyraz (enzymów niezbędnych do replikacji DNA) lub RNazami hamującymi translację mRNA.

W komórce niosącej plazmid z systemem TA produkowane są zarówno trucizna, jak i odtrutka, dzięki czemu trucizna nie może zaatakować celu komórkowego. Gdy w wyniku podziału komórki jedna z potomnych nie otrzyma plazmidu, przez pewien czas mRNA trucizny i odtrutki (systemy typu I) lub białka trucizny i odtrutki (systemy typu II) będą w niej wciąż obecne, jednak nie będą już produkowane. Następnie w systemach typu I RNA odtrutki zostanie zdegradowany, dzięki czemu mRNA trucizny ulegnie translacji, w systemach typu II zaś mniej stabilna odtrutka zostanie zdegradowana, a trucizna uwolniona. Toksyny będą mogły zaatakować cel komórkowy, czego efektem będzie śmierć komórki lub zahamowanie jej wzrostu.

Systemy kodujące toksynę i odtrutkę zidentyfikowano również w bakteryjnych chromosomach (np. *mazE-mazF E. coli*). Wydawać się może, że ich obecność w takim miejscu nie ma sensu, gdyż komórka pozbawiona chromosomu i tak skazana jest na śmierć. Możliwe jednak, że tu funkcją systemu TA jest kontrola wzrostu, np. jego czasowe zahamowanie w warunkach stresu głodowego. Dzięki temu związki odżywcze są używane przez małą część populacji, co umożliwi jej przetrwanie. Inna hipoteza mówi, że toksyny będące RNazami pełnią funkcje regulatorów ekspresji genów. Wreszcie chromosomalne systemy TA mogłyby służyć do utrzymywania genomowych pasożytów, takich jak transpozony koniugacyjne czy bakteriofagi, lub być po prostu trudnymi do usunięcia „śmieciami" uzyskanymi od plazmidów.

Dezaktywacja systemu?

Idealny globalny system odpowiadający za stabilne utrzymywanie plazmidu w populacji bakterii jest trzystopniowy. Po pierwsze system rozdziału oligomerów umożliwia dostarczenie optymalnej liczby cząsteczek plazmidu dostępnych do rozdziału. W drugim etapie system partycyjny zapewnia precyzyjne, symetryczne rozdzielenie plazmidów do przyszłych komórek potomnych. W końcu, w razie gdyby te systemy zawiodły i powstałaby komórka pozbawiona plazmidu, system posegregacyjnego zabijania komórek bezplazmidowych wyeliminuje ją z populacji, zapewniając wzrost jedynie plazmidowych spadkobierców. Ciekawym przykładem integracji systemów stabilizacyjnych plazmidu jest pSM19035 ze *Streptococcus pyogenes*. Jego systemy PAR i PSK oraz gen *copS* regulujący liczbę kopii plazmidu mają wspólny regulator transkrypcji - białko Omega, które pełni również funkcję partycyjnego białka ParB. Białko Omega kodowane jest przez gen ω, który tworzy jeden operon z genami ε i ζ kodującymi system PSK. Inny przykład pochodzi z plazmidu RK2, którego białko partycyjne KorB koordynuje systemy replikacji, partycji i transferu koniugacyjnego.

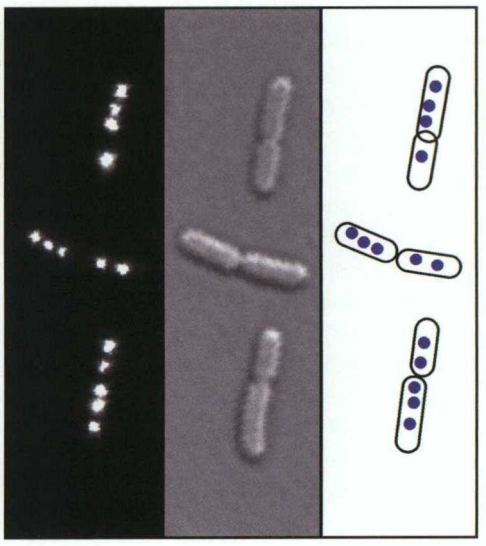
To właśnie te wyrafinowane systemy zapewniające stabilne utrzymywanie plazmidów w komórkach bakterii odpowiadają za problemy z trudnymi do zwalczenia zakażeniami w praktyce klinicznej. Szczegółowe poznanie ich działania daje szanse na opracowanie metod ich dezaktywacji. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

Hayes F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science, 301*, 1496-9.

Hayes F., Barilla D. (2006). The bacterial segrosome: a dynamic nucleoprotein machine for DNA trafficking and segregation. *Nat. Rev. Microbiol., 4*, 133-43.

Małgorzata Łobocka, Olga Juszczuk



Wykorzystując GFP (*Green Fluorescent Protein*) do fuzji z ParB, można w komórkach bakterii (*E. coli*) uwidocznić skupiska białka partycyjnego związanego z DNA w regionie centromerowym *parS* plazmidu