

## **Plazmidy a ich replikácia v bakteriálnych kultúrach používaných v potravinárskom priemysle**

JÁN KRAHULEC - KATARÍNA KYSELÁ - MIROSLAVA KRETOVÁ

**SÚHRN.** Bakteriálne kultúry rodov *Acetobacter*, *Lactobacillus* a *Lactococcus* majú široké využitie v potravinárstve a v moderných biotechnológiach. K pochopeniu genetického vybavenia potravinársky významných baktérií prispeje štúdium plazmidov buniek, ako aj spôsoby regulácie replikácie extrachromozómových plazmidových genetických elementov. Z hľadiska súčasných moderných biotechnológií je potrebné venovať pozornosť aj tvorbe klonovacích vektorov vhodných pre prenos a expresiu génov v spomenutých baktériách na báze vlastných kryptických plazmidov.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** plazmidový replikón; *Acetobacter*; *Lactobacillus*; *Lactococcus*; replikácia plazmidov

Bakteriálne kultúry rodov *Acetobacter*, *Lactobacillus* a *Lactococcus* sú zdrojom viacerých potravinársky významných enzýmov ( $\alpha$ -amyláza,  $\beta$ -galaktozidáza, proteináza, sacharáza) potrebných pri premene organických substrátov na mnohé významné produkty, medziprodukty a aditívne látky [1-7].

Pre jednotlivé bakteriálne druhy sú charakteristické rozdiely v génovej výbave chromozómu. Navyše sa bakteriálne druhy a kmene líšia rôznymi extrachromozómovými elementami, ktoré sa v nich nachádzajú. Plazmidy, ktoré sa podieľajú na fenotypovom prejave jednotlivých bakteriálnych druhov, resp. kmeňov sa navzájom odlišujú veľkosťou, počtom kópií na bunku, či štruktúrou génov. Z hľadiska funkčnosti plazmidov má nesmierny význam práve oblasť minimálneho replikónu, ktorá zabezpečuje autonómnú replikáciu plazmidu a počet kópií na chromozóm hostiteľskej bunky.

Zvýšený záujem o štúdium potravinársky významných baktérií je spôsobený rozvojom nových molekulárno-biologických technológií, ktoré vyžadujú

---

Mgr. Ján KRAHULEC, Mgr. Katarína KYSELÁ, Mgr. Miroslava KRETOVÁ, Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava.

jú hlbšie poznanie genetickej výbavy baktérií, analýzu génov, replikónových oblastí plazmidov a konštrukciu nových klonovacích systémov na báze nových replikónov.

### Plazmidové vybavenie v bunkách *Acetobacter*

Prevažná väčšina baktérií octového kvasenia vo svojich bunkách obsahuje kryptické plazmidy s nie vždy známym vplyvom na život bunky, ktorých veľkosť sa pohybuje od jednej kilobázy až po niekoľko desiatok kilobáz (tab. 1). Baktérie *Escherichia coli* spravidla obsahujú iba jeden druh plazmidu, kým rod *Acetobacter* môže obsahovať širokú paletu plazmidov [8-16]. V troch rodoch octových baktérií sa viac ako 90 % opísaných plazmidov nachádza v kmeňoch schopných octového kvasenia. Nedávne experimenty potvrdili predpoklady, že väčšie plazmidy majú určitý vzťah k niektorým metabolickým pochodom bunky a kódujú niektoré významné metabolické dráhy, napr. pre biokonverziu glukózy na celulózu, metabolizmus acetánu a iné [17-19].

Tak, ako mnohé prirodzené plazmidy z buniek *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp. a ďalších bakteriálnych druhov tvoria základ pre konštrukciu klonovacích vektorov využívaných v molekulárnej biológii, tak aj replikačné oblasti plazmidov buniek rodov *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Frauteuria* sa začínajú využívať pri konštrukcii klonovacích vektorov. Ako príklad môžeme ukázať prvé konštruované vektory pTA5001A (23,5 kb) a pTA5001B (23 kb) z *Acetobacter aceti* No. 1023. Pri ich konštrukcii sa využili replikóny z plazmidov *Acetobacter* a *Escherichia coli*, čím sa pripravili

TAB. 1. Distribúcia plazmidov v kmeňoch *Acetobacter pasteurianus*.

TAB. 1. Distribution of plasmids in *Acetobacter pasteurianus* strains.

Kmeň <sup>1</sup>		Počet plazmidov na bunku <sup>2</sup>	Molekulová hmotnosť plazmidov <sup>3</sup> [10 <sup>6</sup> g.mol <sup>-1</sup> ]
<i>A. pasteurianus</i>	IFO 3223	8	0,9; 1,0; 2,0; 2,6; 3,6; >17; >17
<i>A. pasteurianus</i>	ATCC 33443	1	19
<i>A. pasteurianus</i>	ATCC 7839	3	1,5; 3,5; 7,5
<i>A. pasteurianus</i>	IAM 12073	3	1,7; 1,7; 1,8
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>estumensis</i>	IFO 13751	2	6,5; 10
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>lavaniensis</i>	IFO 13753	3	1,0; 11; >17
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>paradoxus</i>	IFO 13754	2	1,9; 4,3
<i>A. pasteurianus</i>	2374	3	2,1; 4,3; 6
<i>A. pasteurianus</i>	3612	1	19

1 - strain, 2 - number of plasmids per cell, 3 - molecular weight of plasmids.

dvojreplikónové kyvadlové (shuttle) vektory pre klonovanie v obidvoch bakteriálnych druhoch [11]. Iným príkladom je plazmid pAC1 z buniek *Acetobacter pasteurianus* 3612 veľký 18,5–19 kb [20]. Na malom fragmente EcoRI (2,5 kb) má lokalizovaný minimálny replikón. Táto oblasť sa využila pri konštrukcii niekoľkých klonovacích vektorov vhodných pre klonovanie do niektorých gramnegatívnych, ale aj grampozitívnych baktérií [21–24].

### Plazmidové vybavenie v bunkách *Lactococcus*

Z buniek *Lactococcus* bolo v poslednom období izolovaných a pomerne podrobne charakterizovaných niekoľko rôznych plazmidov (tab. 2). Porovnaním ich replikačných oblastí - minimálnych replikónov sa ukazuje, že ide o plazmidy s príbuzným genetickým základom. Replikácia plazmidov je závislá na prítomnosti niekoľkých replikačných proteínov kódovaných samotným plazmidom.

Jedným z úzkospektrálnych plazmidov je pWV02 (3,8 kb) izolovaný z baktérie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. V priebehu replikácie sa nepozorovala prítomnosť ssDNA, čo nasvedčuje tomu, že sa nereplikuje mechanizmom rotujúcej kružnice. Replikačné intermediáty analyzované dvojrozmernou elektroforézou potvrdili, že plazmid pWV02 sa replikuje  $\theta$ -mechanizmom. Tieto výsledky ukázali, že aj v bunkách *Lactococcus* sa plazmidy môžu replikovať týmto mechanizmom [25].

Oveľa komplikovanejší je plazmid pNZ4000 (40 kb) z *Lactococcus lactis* NIZO B40. Obsahuje štyri funkčné replikóny, ktoré sú v samostatných plazmidoch schopné replikácie v bunkách *L. lactis* [26]. Všetky štyri replikačné oblasti sú homologické a patria do rodiny  $\theta$ -replikónov [27]. Pre replikáciu plazmidu postačuje jeden z týchto replikónov. Jedným z predpokladov vzniku takejto štruktúry replikónu je spojenie niekoľkých plazmidov počas konjugácie. Tvrdenie sa opiera o prítomnosť kompletných, ale aj čiastočných kópií sekvencií *IS-S1* prítomných na plazmide [28]. Všetky 4 replikóny sú kompatibilné, ale vykazujú rozdiel v usporiadaní. Plazmid pNZ4000 obsahuje aj dve funkčné miesta *oriT*.

Úzkospektrálny kryptický plazmid pCI305 (8,7 kb) bol izolovaný z buniek *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317. Z doterajších výsledkov je zrejmá len skutočnosť, že kóduje jeden replikačný proteín (repB) na úseku 1158 bp s veľkosťou 46 kDa [29,30].

Replikačná oblasť plazmidu pSK11L (78 kb) z *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 bola popísaná na fragmente PvuII veľkom 14,8 kb. Delečnou analýzou sa podarilo minimalizovať replikačnú oblasť (2,3 kb) medzi štiep-

TAB. 2. Distribúcia plazmidov v kmeňoch rodov *Lactobacillus* a *Lactococcus*.  
 TAB. 2. Distribution of plasmids in strains from genera *Lactobacillus* and *Lactococcus*.

Kmeň <sup>1</sup>	Plazmid <sup>2</sup>	Veľkosť molekuly plazmidu <sup>3</sup> [kb]
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Wg2	pWV02	3,8
<i>Lactococcus lactis</i> NIZO B40	pNZ4000	40
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	pSK11L	78
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	pJW563	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CNR270	pUCL22	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL 57-1	pND324	3,6
<i>Lactococcus</i> sp.	pWV01	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 2204	pWC1	2,8
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> UC317	pCI305	8,7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> FR52	pFR18	1,8
<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH683	pLC2	2,5
<i>Lactobacillus heigardii</i>	pLAB1000	3,3
<i>Lactobacillus heigardii</i>	pLAB2000	9,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM1904	pLP1	2,1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	pLM3	5,7
<i>Lactobacillus pentosum</i> MD353	p353-2	2,4
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8014	p8014-2	1,9

1 - strain, 2 - plasmid, 3 - molecular weight of plasmids.

nými miestami pre restričné endonukleázy ScaI a SpeI. Organizácia replikónu pSK11L je podobná replikónu s plazmidom pCI305, z čoho sa usudzuje, že aj plazmidy sa budú rovnako replikovať  $\theta$ -mechanizmom [31].

Podobnú veľkosť replikačnej oblasti 2,3 kb má aj plazmid pJW563 z ďalšieho kmeňa *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Porovnaním replikačnej oblasti a replikačných proteínov kódovaných plazmidom pCI305 a pJW563 sa ukázala vysoká homológia (viac ako 80 %) s podobnými oblasťami aj v ďalších plazmidoch z buniek *Lactococcus*, ktoré sa replikujú  $\theta$ -mechanizmom [32].

Plazmid pUCL22 z *Lactococcus lactis* CNR270 subsp. *lactis* kóduje proteín Rep22A pozostávajúci z 388 aminokyselín, ktorý sa pri autokatalytickej regulácii špecificky viaže na regulačnú oblasť replikónu a podieľa sa na replikácii plazmidu [33].

Plazmid pND324 (3,6 kb) patrí do rodiny plazmidov, ktoré sú svojou štruktúrou podobné plazmidom izolovaným z *Lactococcus lactis* replikujúcim sa  $\theta$ -replikačným mechanizmom. Na plazmide bola identifikovaná komplementárna oblasť ku génu pre RepB proteín (antisense RNA - ctRNA), ktorá slúži na reguláciu počtu kópií plazmidu v bunke. V prípade

mutácie génu zodpovedného za syntézu ctRNA, dochádza k 1,8-násobnému zvýšeniu počtu kópií plazmidu v bunke. Podobná promótorová sekvencia ctRNA bola identifikovateľná aj u ďalších 12 študovaných plazmidov. Autori predpokladajú, že plazmidy by sa tiež mohli replikovať  $\theta$ -mechanizmom [34].

Jednovláknový počiatok replikácie charakterizujúci replikáciu mechanizmom rotujúcej kružnice bol identifikovaný na plazmide pWW01 z *Lactococcus* sp. Funkčný replikón je na úseku 250 bp a niektoré obrátené opakovania sú podobné s repetíciami bakteriofágu  $\Phi$ X174 z buniek *E. coli*. Doteraz nie je jasné, ako dochádza k premene replikovanej ssDNA na dsDNA, keď nie je nutná prítomnosť RNA polymerázy. Predpokladá sa nejaký alternatívny doteraz nepopísaný mechanizmus replikácie [35].

Počiatok replikácie kryptického plazmidu pWC1 (2,8 kb) z buniek *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2204 nie je homologický s replikónmi z plazmidov pFX3 a s pCI305. Plazmid je kompatibilný s obidvoma plazmidmi a replikón kóduje replikačný proteín s 316 aminokyselinami. Okrem buniek *Lactococcus* je plazmid schopný replikovať sa mechanizmom rotujúcej kružnice aj v bunkách *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*, ale nie v bunkách *E. coli* [36].

### Plazmidové vybavenie v bunkách *Lactobacillus*

*Lactobacillus fermentum* je jednou z baktérií mliečneho kysnutia, ktoré sa najčastejšie vyskytujú v zažívacom trakte hlodavcov, ošípaných a tiež človeka. Bol z nich izolovaný a charakterizovaný plazmid pLEM3 (5,7 kb) s génom rezistencie na erytromycín. Porovnaním primárnej štruktúry plazmidu sa dokázala jeho príbuznosť s plazmidmi rodiny pC194, ktorá sa replikuje mechanizmom rotujúcej kružnice. Oblasť génu kódujúceho rezistenciu na erytromycín pochádza z konjugatívneho transpozónu *Tn1545* [37].

Plazmidy p353-2 (2,4 kb) z *Lactobacillus pentosus* MD353 a p8014-2 (1,9 kb) z *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 sú identické na 81,5 % a nesú charakteristické oblasti v počiatku replikácie na (+)-vlákne, ako aj na (-)-vlákne dvojvláknovej molekuly plazmidu, ktoré zodpovedajú mechanizmu replikácie rotujúcou kružnicou. Počiatok replikácie (-)-vlákna plazmidu má schopnosť meniť ssDNA na dsDNA. Plazmidy pLPE323, pLPE350 a pLPC37 odvodené od plazmidov p353-2 a p8014-2 replikónu sú štruktúrne a segregácie stabilné v *Lactobacillus pentosus* MD353, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 a v *Lactobacillus casei* ATCC 393 [38].

Oblasť potrebná na replikáciu plazmidu pLA103 z *Lactobacillus acido-*

*philus* TK8912 obsahuje otvorený čítací rámec (*orfA*) pre proteín s 282 aminokyselinami. Proteín je homologický s proteínom z plazmidu izolovaného z *Pediococcus halophilus* [39].

Bakteriálny kmeň *Lactobacillus curvatus* LTH683, pôvodne izolovaný z tepelne neopracovanej salámy, obsahuje kryptický plazmid pLC2. Zistená sekvencia a genetická organizácia celého plazmidu veľkého 2489 bp sa použila ako základ na konštrukciu série vektorov pre bunky *Lactobacillus*. Replikónová oblasť plazmidu pLC2 má homologické poradie nukleotidov so sekvenciami plazmidov z grampozitívnych baktérií replikujúcich sa mechanizmom rotujúcej kružnice. Plazmid má tri otvorené čítacie rámce pre kódovanie proteínov. Prvý a tretí proteín nie je homologický s proteínmi grampozitívnych baktérií, naproti tomu druhý proteín má veľmi vysokú homológiu. Podobne ako v predchádzajúcom prípade sa replikón plazmidu pLR2 využil na konštrukciu vektorov pre klonovanie v laktobaciloch [40].

Plazmid pLR2 sa využil aj na konštrukciu dvojreplikónových kyvadlových vektorov pre klonovanie do buniek *Escherichia coli* a priemyselne využívanej baktérie *Lactobacillus casei*. Plazmid sa replikuje mechanizmom rotujúcej kružnice a stabilita v bunkách *L. casei* sa zvyšuje, keď je jeden z dvoch aktívnych počiatkov replikácie invertovaný [41].

Na konštrukciu kyvadlových vektorov založených na endogénnom replikóne bol využitý malý kryptický plazmid pLP1 z *Lactobacillus plantarum* CCM1904. Pre replikáciu plazmidu v grampozitívnych bunkách je nevyhnutne potrebný vlastný Rep proteín [42].

### Mechanizmy replikácie bakteriálnych plazmidov

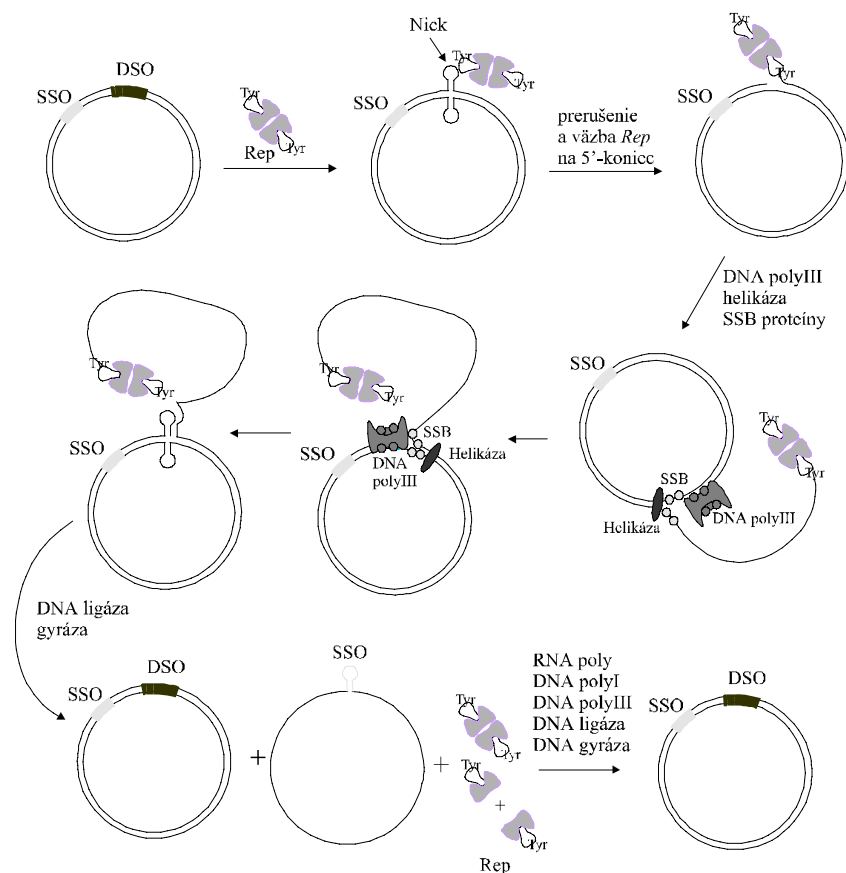
Z hľadiska molekulárno-biologických štúdií má nesmierny význam štúdium replikačných oblastí jednotlivých plazmidov. Je dôležité poznať štruktúru a funkciu minimálnych replikačných oblastí plazmidov, aby sme sa mohli bližšie oboznámiť s princípmi replikácie a regulácie replikácie študovaných plazmidov.

Plazmidy sú autonómne sa replikujúce extrachromozómové elementy v bakteriálnych bunkách. Replikujú sa jedným z troch základných mechanizmov:  $\theta$ -replikačným mechanizmom, mechanizmom rotujúcej kružnice a mechanizmom prestaveného vlákna. Plazmidy v bunkách octových baktérií sa replikujú prevažne mechanizmom rotujúcej kružnice, naproti tomu druhé dva mechanizmy sú preferované v bunkách grampozitívnych baktérií.

## Replikácia mechanizmom rotujúcej kružnice

Prvá skupina bakteriálnych plazmidov sa v bunkách replikuje spôsobom označeným ako replikácia mechanizmom rotujúcej kružnice (RC), pričom replikácia prebieha z počiatku replikácie iba v jednom smere (obr. 1).

Prvým krokom replikácie je interakcia dvojvláknového počiatku replikácie plazmidu s iniciačnými proteínmi [43]. Počiatok replikácie má veľkosť približne 100 bp a je zložený z dvoch častí: miesta pre väzbu Rep proteínu a miesta prerušenia vlákna, pričom sa začína replikácia výlučne vedúceho vlákna. Obidve časti sú nevyhnutné pre iniciáciu replikácie [44-48].



OBR. 1. Replikácia plazmidu mechanizmom rotujúcej kružnice.  
FIG. 1. Plasmid replication by the rolling circle mechanism.



Rep proteín rozpoznáva a priamo sa viaže na priame alebo obrátené opakovania (iteróny) v počiatku replikácie, kde následne v špecifickom mieste preruší vlákno. V počiatku replikácie sa viažu aj ďalšie hostiteľské proteíny ako DNA helikáza potrebná pri dešpiralizácii plazmidu, SSB proteíny, ktoré zabraňujú reasociácii vlákien DNA a DNA polymeráza III, ktorá zabezpečuje replikáciu celého plazmidu, pričom ako prajmer slúži koniec rodičovského vlákna [47,49,50].

K iniciácii replikácie je potrebné miesto väzby Rep proteínu, ako aj špecifické miesto prerušenia vlákna v *ori* oblasti, pričom pre termináciu je toto miesto väzby neesenciálne. Pri terminácii pokračuje replikácia asi 10 nukleotidov za špecifické miesto prerušenia vlákna a potom nastane samotné prerušenie v špecifickom mieste, ale už na vlákne novovytvorenom Rep proteínom. Na spojení sa zúčastňuje aj Rep proteín, pričom vznikne jedna superšpiralizovaná molekula zložená z jedného dcérskeho a jedného rodičovského vlákna a jeden jednovláknový intermediát.

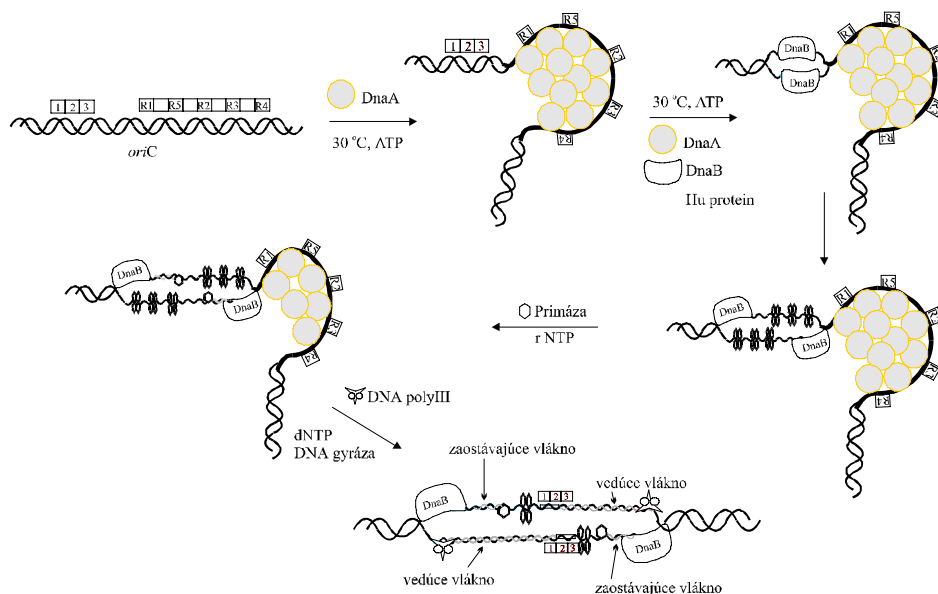
Jednovláknový intermediát sa začína replikovať od jednovláknového počiatku replikácie, ktorých je na plazmide viac typov. Hlavné rozdiely medzi nimi sú v ich rozdielnej sekundárnej štruktúre [51-57]. Pri tvorbe komplementárneho vlákna k jednovláknovému intermediátu sú potrebné hostiteľské proteíny tak ako pri replikácii vedúceho vlákna, navyše RNA polymeráza (primáza) zabezpečí tvorbu RNA prajmerov [51,56,58-61].

### Replikácia $\theta$ -mechanizmom

Replikácia bakteriálnych plazmidov  $\theta$ -mechanizmom prebieha z počiatku replikácie v oboch smeroch, pričom nie je potrebné prerušenie molekuly DNA v oblasti *ori* ako pri mechanizme replikácie rotujúcou kružnicou (obr. 2). Na replikácii sa zúčastňujú niektoré proteíny, ktoré zabezpečujú rozpoznávanie oblasti *ori*, vytvorenie v oblasti prajmeru komplexu nukleovej kyseliny s proteínom (predprajmerový komplex), ktorý zabezpečuje proces elongácie a terminácie replikácie.

Prvým iniciačným proteínom je proteín DnaA, ktorý v oblasti *ori* rozpoznáva päť opakujúcich sa sekvencií (R1 až R5), na ktoré sa naviaže 20 až 30 molekúl komplexu DnaA-ATP [61]. Proteín DnaA má afinitu nielen k ATP, ale aj k ADP a AMP. Replikácia však môže prebiehať iba v komplexe DnaA-ATP [62]. Proteíny DnaB a DnaC na opakovaníach R1 až R5 rozpoznávajú komplex DnaA-ATP, na ktorý sa viažu, pričom vytvoria veľkú nukleoproteínovú štruktúru označovanú ako predprajmerový komplex, ktorý je stimulovaný proteínmi HU. Proteín DnaB dešpiralizuje molekulu





OBR. 2. Replikácia plazmidu  $\theta$ -mechanizmom.  
FIG. 2. Plasmid replication by  $\theta$ -mechanism.

DNA v okolí miesta *ori* a následne sa na oddelené vlákna naviažu proteíny SSB, ktoré zabraňujú ich spätnej špiralizácii. Syntéza prajmeru závisí od prítomnosti primázy a štyroch proteínov: DnaA, DnaB, DnaC a DNA gyrázy. Pri elongácii oboch vlákien DNA sa zúčastňuje DNA polymeráza III, ktorej aktivita závisí od úrovne dešpiralizácie molekuly DNA proteínom DnaB [62,63].

Terminácia, podobne ako iniciácia, je opäť trochu zložitejšia a prebieha pomerne pomaly. Po replikácii približne iba tretina replikovaných molekúl vytvorí úplné kruhové monoméry DNA, zvyšok nedokončí terminačnú alebo segregáciu časť replikácie. Spomalenie reakcie má za následok približovanie sa enzýmov k úplnému koncu replikácie, kde pôsobí už veľký topologický tlak. Preto iba jedna tretina konečných reakčných produktov má úplnú  $\theta$ -štruktúru, väčšina z nich obsahuje malý úsek nereplikovaného rodičovského vlákna. Je pravdepodobné, že tieto neskoré replikačné intermediáty sú prekursori k inému väčšiemu produktu reakcie *in vitro*, niekoľkokrát prepletených, katenovaných dimérov [64]. Niekoľkonásobné prepletenie medzi vznikajúcimi vláknami v terminačnom štádiu replikácie je samovoľný proces,

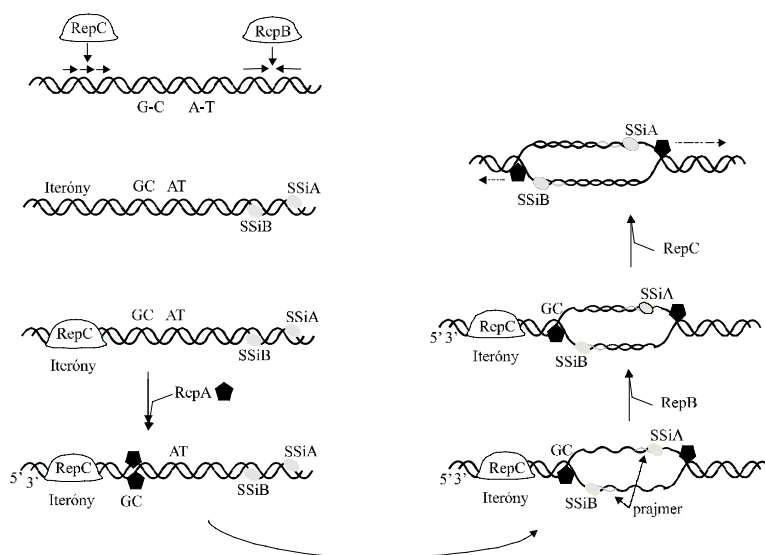
ktorého sa nezúčastňujú DNA topoizomerázy. Za týchto podmienok znásobené topologické väzby medzi rodičovskými vláknami, ktoré existujú v neskorých  $\theta$ -štruktúrach, sú čiastočne alebo úplne transformované do prepletených dvojvláken za replikačnými vidlicami [65].

Na konci replikácie vzniknú dva plazmidy, ktoré majú kompletne rodičovské vlákno a dcérske vlákno s prajmerom a prerušením v mieste ukončenia replikácie. DNA ligáza a DNA polymeráza I prítomné v podmienkach *in vivo* tieto nedostatky odstraňuje.

### Replikácia plazmidov mechanizmom prestavenia vlákna

Tretím možným mechanizmom replikácie je mechanizmus prestavenia vlákna, pričom reprezentantom tohoto typu sú plazmidy inkompatibilnej rodiny IncQ s hlavným reprezentantom plazmidom pRSF1010 [66] (obr. 3). Pri replikácii nedochádza k prerušeniu rodičovského vlákna a každé rodičovské vlákno sa replikuje nezávisle [67].

Minimálny replikón obsahuje tri priame identické opakovania (iteróny) dlhé 20 bp a jedno polovičné opakovanie, úsek 174 bp s prevahou párov G–C, úsek 28 bp obsahujúci prevažne nukleotidové páry A–T, niekoľko



OBR. 3. Replikácia plazmidu mechanizmom prestavenia vlákna.  
FIG. 3. Plasmid replication by the strand displacement mechanism.

neesenciálnych úsekov a dve palindromatické sekvencie *ssiA* a *ssiB*, každé na inom rodičovskom vlákne [66]. Opakovania slúžia ako rozpoznávacie miesto pre proteín RepC, ktorý spolu s RepA helikázou rozpletú dvojvlákno v mieste *ssiA* a *ssiB*. Proteín RepA sa viaže na obidvoch vláknach na úsek obsahujúci prevažne páry A–T v blízkosti proteínu RepC [68,79]. Proteín RepA sa začne pohybovať v smere 5'→3' po molekule DNA, druhá molekula sa už nemôže naviazať, lebo jej bráni proteín RepC, čo spôsobí oddelenie vlákien od seba a aktivujú sa miesta *ssi*. V mieste *ssi* sa vytvorí očko a palindrómová sekvencia je miestom väzby RepB primázy [70]. Proteín RepB vytvorí prajmery na obidvoch vláknach a samotná replikácia potom prebieha nezávisle na obidvoch vláknach v smere 5'→3' [63]. Iniciácia replikácie je úplne nezávislá na hostiteľských proteínoch, pričom pri elongácii sa využívajú proteíny SSB a DNA polymeráza III. Tento mechanizmus je iba zdanlivo podobný  $\theta$ -mechanizmu replikácie. Pri tomto mechanizme replikácie sa jedno i druhé vlákno replikujú nezávisle na sebe, každé plynule v smere 5'→3', vždy ako vedúce vlákno DNA.

## Literatúra

1. WONG, H. C. - FEAR A, L. - CALHOON, R. D. - EICHINGER, G. H. - MAYER, R. - ROSS, P. - BENZIMAN, M. - BEN BASSAT, A. - TAL, R.: Genetic organisation and regulation of the cellulase operon in *Acetobacter xylinum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87, 1990, s. 8130-8134.
2. GRONES, J. - BENCOVÁ, K.: Cloning, production and secretion of  $\beta$ -galactosidase in *Acetobacter pasteurianus*. Folia Microbiologica, 39, 1994, s. 99-104.
3. MAYER, R. - ROSS, P. - WEINHOUSE, H. - AMIKAM, D. - VOLMAN, G. - OHANA, P. - CALHOON, R. D. - WONG, H. C. - EMERICK, A. W. - BENZIMAN, M.: Polypeptide composition of bacterial cycle diguanilyc acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting protein in higher plant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88, 1991, s. 5472-5476.
4. GRONES, J. - TURŇA, J.: Some properties of restriction endonucleases from *Acetobacter pasteurianus*. Biológia (Bratislava), 46, 1991, s. 1103-1108.
5. GRONES, J. - TURŇA, J.: ApaCI, an isoschizomer of BamHI isolated from *Acetobacter pasteurianus*. Nucleic Acids Research, 20, 1992a, s. 3513.
6. GRONES, J. - TURŇA, J.: Some properties of restriction endonuclease ApaBI from *Acetobacter pasteurianus*. Biochimica and Biophysica Acta, 1162, 1993, s. 323-325.
7. GRONES, J. - TURŇA, J.: Isolation of a new restriction enzyme, ApaCI, an isoschizomer of BamHI by *Acetobacter pasteurianus*. Folia Microbiologica, 37, 1992b, s. 353-356.
8. OHMORI, S. - UOZUMI, T. - BEPPU, T.: Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability an *Acetobacter* strain. Agricultural and Biological Chemistry, 46, 1982, s. 381-389.
9. MASUDA, M. - KAWASAKI, H. - TONOMURA, K.: Plasmid in *Gluconobacter*. Hakkokugaku, 61, 1983, s. 15-18.
10. INOUE, T. - FUKUDA, M. - YANO, K.: Efficient introduction of vector plasmids into acetic acid bacteria. Journal of Fermentation Technology, 63, 1985, s. 1-4.

11. OKUMURA, H. - UOZUMI, T. - BEPPU, T.: Construction of plasmid vectors and genetic transformation system for *Acetobacter aceti*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **49**, 1985, s. 1011-1017.
12. TEUBER, M. - SIEVERS, M. - ANDRESEN, A.: Characterisation of the microflora of high acid submerged vinegar fermenters by distinct plasmid profiles. *Biotechnology Letters*, **9**, 1987, s. 265-268.
13. FUJIWARA, M. - FUKUSHI, K. - TAKAI, M. - HAYASHI, J.: Construction of shuttle vectors and a genetic transformation system for cellulose producing bacteria: *Acetobacter xylinum*. In: KENEDY, J. F. - PHILLIPS, G. O. - WILLIAMS, P. A. (Ed.): *Cellulose*. Chichester : Ellis Harwood Ltd., 1989, s. 2083-2090.
14. FUJIWARA, M. - FUKUSHI, K. - TAKAI, M. - HAYASHI, J. - FUKAYA, M. - OKUMURA, H. - KAWAMURA, Y.: Construction of shuttle vectors derivated from *Acetobacter xylinum* for cellulose producing bacterium *Acetobacter xylinum*. *Biotechnology Letters*, **14**, 1992, s. 593-542.
15. GRONES, J. - MAČOR, M.: Schopnosť baktérií viazať a premieňať selén na biologicky využiteľnú formu. *Chemické listy*, **94**, 2000, s. 129-131.
16. TAKEDA, Y. - SHIMIZI, T.: Expression of cytochrome *c-553* (CO) gene that complements the second subunit defficiency of membrane-bound alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxydans* subsp. *α*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **73**, 1992, s. 89-93.
17. VALLA, S. - CAUCHERON, D. H. - KJOSBAKKEN, J.: The plasmids of *Acetobacter xylinum* and their interaction with the host chromosome. *Molecular and General Genetics*, **208**, 1987, s. 76-83.
18. BILSKÁ, V.: Priemyselné využitie octových baktérií a charakterizácia génov zodpovedných za produkciu biotechnologicky významných produktov. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, **35**, 1996, s. 181-191.
19. BILSKÁ, V.: Využitie octových baktérií v biotechnologickom priemysle pri produkcii organických kyselín. *Chemické Listy*, **91**, 1997, s. 483-486.
20. GRONES, J. - ŠKEREŇOVÁ, M. - BEDERKOVÁ, K. - TURŇA, J.: Isolation and characterisation of plasmid pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. *Biológia (Bratislava)*, **44**, 1989, s. 1181-1186.
21. GRONES, J. - ŠKEREŇOVÁ, M. - TURŇA, J.: Preparation of recombinant plasmids with kanamycin resistance in plasmid pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. *Biológia (Bratislava)*, **46**, 1991, s. 673-678.
22. GRONES, J. - TURŇA, J.: Construction of shuttle vectors for cloning in *Escherichia coli* and *Acetobacter pasteurianus*. *Folia Microbiologica*, **37**, 1992, s. 395-400.
23. GRONES, J. - TURŇA, J.: Characterisation of replicon from pAC1 plasmid from *Acetobacter pasteurianus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **191**, 1993, s. 26-31.
24. GRONES, J. - TURŇA, J.: Transformation of microorganisms with the plasmid vector with the replicon from pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **206**, 1995, s. 942-947.
25. KIEWICT, R. - BRON, S. - DE JONGE, K. - VENEMA, G. - SEEGER, J. F.: Theta replication of the lactococcal plasmid pWV02. *Molecular Microbiology*, **10**, 1993, s. 319-327.
26. VAN KRANENBURG, R. - MARUGG, J. D. - WILLEM, N. J. - VAN SWAM, I. I. - DE VOS, W. M.: Molecular characterization of the plasmid encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, **24**, 1997, s. 387-397.
27. SEEGER, J. F. M. - BRON, S. - FRANKE, C. M. - VENEMA, G. - KIEWIET, R.: The majority

- of lactococcal plasmids carry a highly related replicon. *Microbiology*, *140*, 1994, s. 1291-1300.
28. VAN KRANENBURG, R. - DE VOS, W. M.: Characterization of multiple regions involved in replication and mobilization of plasmid pNZ4000 coding for exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, *180*, 1998, s. 5285-5290.
  29. HAYES, F. - VOS, P. - FITZGERALD, G. F. - DE VOS, W. H. - DALY, C.: Molecular organisation of the minimal replicon of novel, narrow-host-range, lactococcal plasmid pCI305. *Plasmid*, *25*, 1991, s. 16-26.
  30. FOLEY, S. - BRON, S. - VENEMA, G. - DALY, C. - FITZGERALD, G. F.: Molecular analysis of the replication origin of the *Lactococcus lactis* plasmid pCJ305. *Plasmid*, *36*, 1966, s. 125-141.
  31. HORNG, J. S. - POLZIN, K. M. - MCKAY, L. L.: Replication and temperature sensitive maintenance functions of lactose plasmid pSK112 from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Journal of Bacteriology*, *173*, 1991, s. 7573-7581.
  32. GRAVESEN, A. - JOSEPHSEN, J. - VON WRIGHT, A. - VOGENSEN, F. K.: Characterisation of the replicon from the lactococcal theta replicating plasmid pJW563. *Plasmid*, *34*, 1995, s. 105-118.
  33. FRERE, J. - NOVEL, M. - NOVEL, G.: Molecular analysis of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHRZ270 bidirectional theta replicating lactose plasmid pUCL22. *Molecular Microbiology*, *10*, 1993, s. 1113-1124.
  34. DUAN, K. - LIU, C. Q. - SUPPLE, S. - DUNN, N. W.: Involvement of antisense RNA in replication control of the lactococcal plasmid pHD324. *FEMS Microbiology Letters*, *164*, 1998, s. 419-426.
  35. SEEGER, J. F. - ZHAO, A. C. - MEIJER, W. J. - KHAN, S. A. - VENEMA, G. - BRON, S.: Structural and functional analysis of the single-strand origin of replication from the lactococcal plasmid pWV01. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*, 1989, s. 394-400.
  36. PILLIDG, C. J. - CAMBOURN, W. M. - PEARCE, L. E.: Nucleotide sequence and analysis of pWC1, a pC194-type rolling circle replicon in *Lactococcus lactis*. *Plasmid*, *35*, 1996, s. 131-140.
  37. FONS, M. - HEGE, T. - LADIRE, M. - RAIBAUD, P. - DUCLUZEAU, R. - MAGNIS, E.: Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. *Plasmid*, *37*, 1997, s. 199-203.
  38. LEER, R. J. - VAN LUIJK, N. - POSNO, M. - POWELS, P. H.: Structural and functional analysis of two cryptic plasmids *Lactobacillus pentosus* MD353 and *Lactobacillus plantarum* ATCC8014. *Molecular and General Genetics*, *234*, 1992, s. 265-274.
  39. KANATANI, K. - TAHARA, T. - OSHIMURA, M. - SANO, K. - UMEZAWA, C.: Identification of the replication region of *Lactobacillus acidophylus* plasmid pLA103. *FEMS Microbiology Letters*, *133*, 1995, s. 127-130.
  40. KLEIN, J. R. - ULRICH, C. - PLAPP, R.: Characterization and sequence analysis of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus curvatus* LTH683 and its use for construction of new *Lactobacillus* cloning vectors. *Plasmid*, *30*, 1993, s. 14-19.
  41. SHIMIZU-KADOTA, M. - SHIBAHARA-SONE, H. - ISHIDA, H.: Shuttle plasmid vectors for *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli* with a minus origin. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*, 1991, s. 3292-3300.
  42. BOUIA, A. - BRINGEL, F. - FREG, L. - KAMMERER, B. - BELARBI, A. - GUGONVARCH, A. - HUBERT, J. C.: Structural organization of pLP1, a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum* CCM1904. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*, 1991, s. 3292-3300.
  43. KHAN, S. A.: Rolling circle replication of bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *61*, 1997, s. 442-445.

44. GENNARO, M. L.: Functional organization of the plasmid pTl81 replication origin. *Journal of Molecular Biology*, 205, 1993, s. 355-362.
45. GROS, M. F. - TE RIELE, H. - EHRLICH, S. D.: Rolling circle replication of single-stranded DNA plasmid pC194. *EMBO Journal*, 6, 1987, s. 3863-3869.
46. IORDANESCU, S. - PROIAN, S. J.: Replication terminus for *Staphylococcal* plasmids: plasmids pTl81 and pC221 cross-react in the termination process. *Journal of Bacteriology*, 170, 1988, s. 3427-3434.
47. MURRAY, R. W. - KOEPEL, R. R. - KHAN, S. A.: Synthesis of the single-stranded plasmid pTl81 DNA in vitro: initiation and termination of DNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 1989, s. 1051-1057.
48. YASUKAWA, H. - OZAKI, E. - MORITO, S. - MASAMURE, Y.: Initiation and termination of DNA replication of plasmid pKYM via a rolling circle mechanism. *Journal of General and Applied Microbiology*, 40, 1994, s. 377-388.
49. IORDANESCU, S.: Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* chromosomal gene perA, identified by mutations affecting plasmid pTl81 replication. *Molecular and General Genetics*, 241, 1993, s. 185-192.
50. IORDANESCU, S. - BASHEER, R.: The *Staphylococcus aureus* mutation perA3 leads to the accumulation of pTl81 replication initiation complexes. *Journal of Molecular Biology*, 221, 1991, s. 1183-1189.
51. NOVICK, R. P.: *Staphylococcal* plasmids and their replication. *Annual Review of Microbiology*, 43, 1989, s. 537-565.
52. BOE, L. - GROS, M. F. - TE RIELE, H. - EHRLICH, S. D. - GRUSS, A.: Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110. *Journal of Bacteriology*, 171, 1989, s. 3366-3372.
53. GRUSS, A. - ROSS, H. F. - NOVICK, R. P.: Functional analysis of palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 84, 1987, s. 2165-2169.
54. KODAIRA, K. L. - OKI, M. - TAKETO, A. - YASUKAWA, H. - MASAMURE, Y.: Determination of single strand origin of *Shigella sonnei* plasmid pKYM. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1260, 1995, s. 183-190.
55. MADSEN, S. M. - ANDRUP, L. - BOE, L.: Fine mapping and DNA sequence of replication functions of *Bacillus thuringiensis* plasmid pTX14-3. *Plasmid*, 30, 1993, s. 119-130.
56. MEIJER, W. J. J. - VENEMA, G. - BRON, S.: Characterization of single strand origins of cryptic rolling circle plasmid from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 23, 1995, s. 612-619.
57. SEEGER, J. F. M. L. - ZHAO, A. C. - KHAN, S. A. - PEARCE, L. E. - MEIJER, W. J. J. - VENEMA, G. - BORN, S.: Structural and functional analysis of the single strand origin of replication from the lactococcal plasmid pWV01. *Molecular and General Genetics*, 249, 1995, s. 43-50.
58. ZAMAN, S. - RADNEDGE, L. - RICHARDS, H. - WARD, J. M.: Analysis of the site for second strand initiation during replication of the *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Journal of General Microbiology*, 139, 1993, s. 669-676.
59. BIRCH, P. - KHAN, S. H.: Replication of single-stranded plasmid pTl81 DNA in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 1992, s. 290-294.
60. DEMPSEY, L. A. - ZHAO, A. C. - KHAN, S. A.: Localization of the start sites of lagging-strand replication of rolling circle plasmid from Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 15, 1995, s. 679-687.



61. FULLER, R. S. - FUNNELL, B. E. - KORNBERG, A.: The DNA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (oriC) and other DNA sites. *Cell*, 38, 1984, s. 889-900.
62. McMACKEN, C. - SILVER, L. - GEORGOPOULOS, C.: DNA replication. In: NEIDHARDT, F. C. (Ed.): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1987, s. 565-602.
63. VAN DER ENDE, A. - BAKER, T. A. - OGAWA, T. - KORNBERG, A.: Initiation of enzymatic replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome: primase as the sole priming enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 1985, s. 3954-3958.
64. FUNNELL, B. E. - BAKER, T. A. - KORNBERG, A.: Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 1986, s. 5615-5624.
65. LEHMAN, I. R.: DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science*, 186, 1976, s. 790-797.
66. DEL SOLAR, G. - GIRALDO, R. - ECHEVARIA, M. J. R. - ESPINOSA, M. - OREJAS, R. D.: Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1998, s. 434-464.
67. SCHERZINGER, E. - HARING, V. - LURZ, R. - OTTO, S.: Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucleic Acids Research*, 19, 1991, s. 1203-1211.
68. HARING, V. - SCHERZINGER, E.: Replication of the IncQ plasmids. In: Thomas, C. M. (Ed.): *Promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria*. London : Academic Press, 1989, s. 95-124.
69. HARING, V. - SCHOLZ, P. - SCHERZINGER, E. - FREG, J. - DERBISHIRE, K. - HATFULL, G. - WILLETTTS, N. S. - BAGDASARIAN, M.: Protein RepC is involved in copy number control of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 1985, s. 6090-6094.
70. MIAO, D. M. - HONDA, Y. - TANAKA, K. - HIGASHI, A. - NAKAMURA, T. - TAGUCHI, Y. - SAKAI, H. - KAMANO, T. - BAGDASARIAN, M.: A base-paired hairpin structure essential for the broad-host-range plasmid RSF1010. *Nucleic Acids Research*, 21, 1993, s. 4900-4903.

Do redakcie došlo 19.12.2000.

#### **Plasmids and their replication in bacterial cultures used in food technology**

KRAHULEC, J. - KYSELÁ, K. - KRETOVÁ, M.: *Bull. potrav. Výsk.*, 40, 2001, p. 157-171.

**SUMMARY.** Bacterial cultures from the genera *Acetobacter*, *Lactobacillus* and *Lactococcus* play an important role in food production and food biotechnology. Study of plasmids as well as of the regulation of extrachromosomal genetic elements replication contributes to better understanding of the genotypes of bacteria used in food technology. From the point of view of biotechnology, it is necessary to pay attention to the construction of cloning vectors based on own cryptic plasmids, suitable for the gene transfer and expression.

**KEYWORDS:** plasmid replicon; *Acetobacter*; *Lactobacillus*; *Lactococcus*; plasmid replication