

Monika Kosik

Replikacja plazmidów bakteryjnych i terapia antyplazmidowa

Replication of bacterial plasmids and antiplasmid therapy

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

STRESZCZENIE

Liczne geny oporności na antybiotyki kodowane są w plazmidach przenoszonych przez drobnoustroje chorobotwórcze. Ze względu na rosnącą lekooporność bakterii, badania plazmidów mają kluczowe znaczenie w poszukiwaniu nowych sposobów zwalczania wielolekoopornych drobnoustrojów. Podstawowym procesem, któremu podlegają plazmidy jest replikacja, zapewniająca przekazywanie materiału genetycznego do komórek potomnych. W komórkach gospodarzy liczba kopii plazmidów jest utrzymywana na określonym poziomie, za co odpowiada system kontroli replikacji. Elementy tego systemu stanowią cel dla terapii antyplazmidowych, których zadaniem jest wyeliminowanie z komórek gospodarzy plazmidów, a wraz z nimi genów oporności.

Słowa kluczowe: plazmid, replikacja, kontrola replikacji, niezgodność, terapia antyplazmidowa

ABSTRACT

Multiple resistance genes are coded on plasmids transferred by pathogenic microorganisms. Due to increasing drug resistance among microorganisms studying on plasmids provides data useful in searching for new methods of eradication of multidrug resistant bacteria. Replication is a fundamental process that leads to inheritance plasmids by host cells. Replication control system maintains the number of plasmid copies on a certain level in the host cells. The elements of control system become targets for antiplasmid therapies, which try to eradicate plasmids from host cells together with resistance genes.

Key words: plasmid, replication, control of replication, incompatibility, antiplasmid therapy

1. Wprowadzenie

Antybiotyki są stosowane w powszechnym leczeniu od ponad 60 lat i stały się jednym z filarów współczesnej medycyny, wyraźnie ograniczając śmiertelność z powodu zakażeń bakteryjnych. Wraz z szerokim zastosowaniem antybiotyków zaobserwowano jednak narastanie oporności wśród drobnoustrojów, co znacząco przyczyniło się do obniżenia ich skuteczności. W latach 60., na skutek wprowadzenia do użytku ampicyliny, poważnym problemem klinicznym stała się oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* wynikająca z produkcji β -laktamaz kodowanych w plazmidach. Wprowadzanie do leczenia aktywniejszych i o szerszym spektrum antybiotyków skutkowało pojawianiem się nowych genów oporności i rozprzestrzenianiem β -laktamaz zdolnych do hydrolizy

cefalosporyn III generacji oraz monobaktamów. Obecnie odporne drobnoustroje znajdują się na wszystkich kontynentach, z wyjątkiem Antarktydy. Wielolekooporne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* nie wykazują wrażliwości na większość znanych antybiotyków, a coraz szersze używanie karbapenemów może doprowadzić do rozprzestrzenienia oporności także na tę grupę antybiotyków [1].

Badania plazmidów, mechanizmów ich replikacji oraz przekazywania mają kluczowe znaczenie w poszukiwaniu sposobów rozwiązania kwestii lekooporności, która stanowi poważny problem kliniczny na całym świecie. Dostarczają także cennych danych dla już istniejących koncepcji terapii antyplazmidowych, które stanowią interesującą alternatywę dla konwencjonalnego leczenia zakażeń bakteryjnych [2].

2. Replikacja plazmidów

Plazmidy są pozachromosomalnymi cząsteczkami DNA zdolnymi do samodzielnej replikacji, które powszechnie występują w królestwie *Prokaryota*, a ponadto są obecne u organizmów z królestw *Archea* i sporadycznie u *Eucaryota*. Mogą stanowić znaczącą ilość całkowitego DNA mikroorganizmu, reprezentując nawet 25% materiału genetycznego niektórych archeonów [3]. Naturalnie występujące plazmidy różnią się między sobą wielkością oraz liczbą kopii przypadających na komórkę gospodarza [4, 5, 6]. Posiadają geny niezbędne do stabilnego utrzymywania się w komórce, takie jak geny inicjacji i kontroli replikacji oraz przekazywania komórkom potomnym. Mogą także nieść geny użyteczne dla komórek gospodarza, jak geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, czynniki wirulencji oraz geny szlaków metabolicznych degradujących związki organiczne, które zapewniają komórkom gospodarza selekcyjną przewagę w niesprzyjających warunkach [7, 8].

Replikacja jest podstawowym procesem, którym podlegają plazmidy, aby mogły być dziedziczone przez komórki potomne. Geny potrzebne do autonomicznej replikacji i jej kontroli stanowią replikon podstawowy. Składa się on zazwyczaj z miejsca startu replikacji, genów *cop* i *inc* związanych z kontrolą inicjacji replikacji oraz genów *rep* kodujących plazmidowe białka potrzebne do inicjacji replikacji [8].

Wyróżniono trzy podstawowe mechanizmy replikacji plazmidów kolistych: theta, toczonego się koła i odsuwanej nici [4, 9]. Zarówno u bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych odkryto także plazmidy liniowe, które replikują według odmiennych mechanizmów: z użyciem białka terminalnego, według modelu inicjacji ze środka cząsteczki lub z utworzeniem wolnego końca 3'OH przez nacięcie nici DNA [10, 11].

2.1. Mechanizm theta

Replikacja typu theta została najdokładniej poznana u bakterii Gram-ujemnych, ale występuje także u bakterii Gram-dodatnich, m. in. z rodzaju *Streptococcus*, *Enterococcus* czy *Lactococcus*. Nazwa pochodzi od podobieństwa form pośrednich obserwowanych w mikroskopie elektronowym do greckiej litery theta – Q. Inicjacja replikacji może postępować z jednego lub kilku *ori* jednocześnie i przebiegać jedno- lub dwukierunkowo. Rozpoczyna się od rozplecenia macierzystych nici DNA i przyłączenia starterów RNA. Synteza potomnej nici DNA na jednej z nici macierzystych odbywa się w sposób ciągły (nić prowadząca), a na drugiej w nieciągły (nić opóźniona) w widelkach replikacyjnych. Z pewnymi wyjątkami plazmidy replikujące się według mechanizmu theta wymagają udziału plazmidowego białka inicjacyjnego Rep [4, 9] (Ryc. 1).

2.2. Mechanizm toczonego się koła

Replikacja typu toczonego się koła (RC, z ang. rolling circle) bywa nazywana także modelem sigma. Według tego mechanizmu replikują się plazmidy bakterii Gram-dodatnich np. pT181 ze *Staphylococcus aureus*, pIJ101 ze *Streptococcus lividans*, ale także plazmidy niektórych bakterii Gram-ujemnych, m.in. *Helicobacter pylori* czy *Shigella sonnei*, archeonów oraz genomy niektórych bakteriofagów [9, 12]. Replikacja rozpoczyna się od przecięcia jednej z nici w miejscu dso (z ang. double strand origin) i utworzenia wolnej grupy 3'OH, która stanowi starter w replikacji nici wiodącej. Replikacja ta postępuje do momentu osiągnięcia miejsca dso, a w tym czasie druga nić macierzysta jest odsuwana od nici wiodącej. Jako rezultat replikacji nici wiodącej powstaje dsDNA utworzone z nici macierzystej i nici potomnej oraz jednoniciowa forma pośrednia ssDNA. Replikacja ssDNA przebiega przez przyłączenie startera RNA do miejsca sso (z ang. single strand origin), które znajduje się w innym położeniu niż dso. W przypadku zaburzenia replikacji nici opóźnionej w komórce gromadzą się jednoniciowe formy pośrednie, które można wykryć metodami fizycznymi [4, 9, 13] (Ryc. 2).

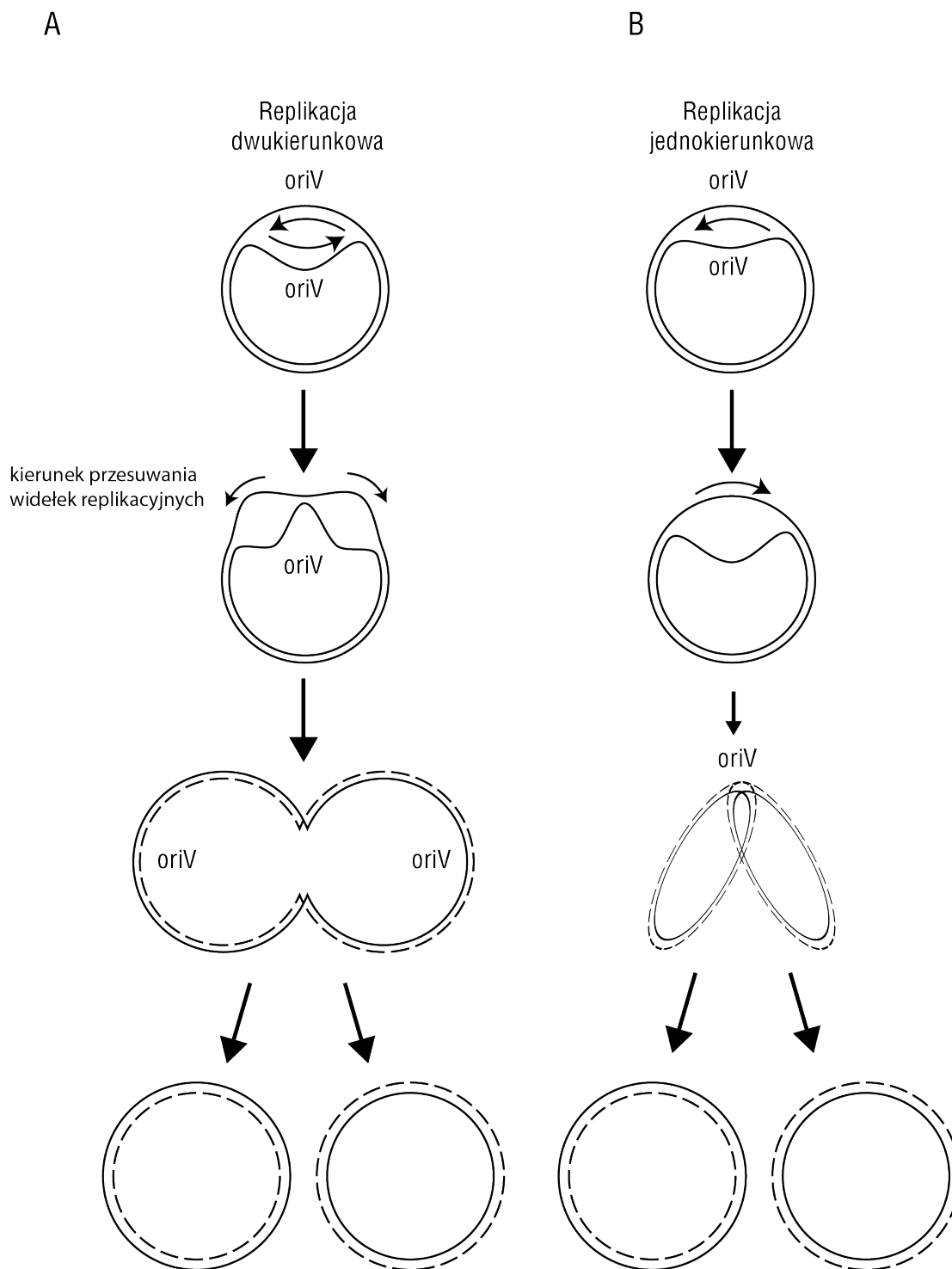
2.3. Mechanizm odsuwanej nici

Mechanizm odsuwanej nici – nazywany także mechanizmem pętli D – został najlepiej poznany dla plazmidów z grupy IncQ, których przedstawicielem jest plazmid RSF1010. Wymagają one trzech plazmidowych białek inicjacyjnych. Związanie się kompleksu plazmidowych czynników replikacyjnych z *ori* prowadzi do odsłonięcia rejonów ssi (z ang. single strand initiation) na każdej nici (ssiA i ssiB) i przyłączenia startera. Replikacja z każdego miejsca ssi może zacząć się niezależnie, a jej postępowanie prowadzi do odsuwania niereplikowanej aktualnie nici. Replikacja odsuwanej nici następuje w późniejszym czasie, po odsłonięciu na niej miejsca ssi [4, 9].

3. Kontrola replikacji plazmidów

Plazmidy są utrzymywane w komórkach na określonym poziomie, a tempo ich replikacji musi być związane z szybkością wzrostu komórki. Zbyt wolne namnażanie plazmidu może prowadzić do jego utraty w komórkach potomnych, natomiast zbyt wiele powstających kopii obciąża metabolicznie komórkę i powoduje spowolnienie jej wzrostu, a nawet obumarcie. Jednocześnie plazmidy nie replikują się synchronicznie z chromosomem bakteryjnym [14]. W plazmidach istnieją mechanizmy kontroli liczby kopii, regulujące częstotliwość replikacji. Elementy systemu kontroli replikacji stanowią zazwyczaj determinanty niezgodności plazmidów [8]. Dotychczasowe badania pozwoliły wyodrębnić trzy podstawowe systemy regulacji inicjacji replikacji [15]:

- z udziałem antysensownego RNA
- z udziałem antysensownego RNA i białek
- z udziałem białek łączących się z iteronami.



Ryc. 1. Mechanizm replikacji typu theta: A – replikacja dwukierunkowa, B – replikacja jednokierunkowa (zmodyfikowany, wg [4]).

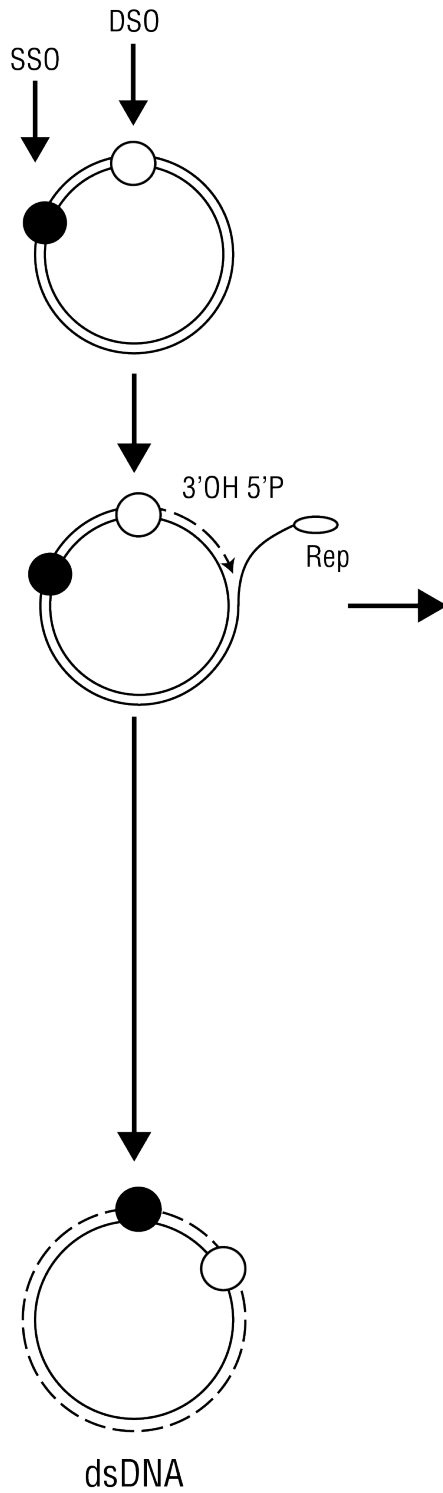
Fig. 1. Replication by theta mechanism: A – two-way replication, B – one-way replication (modified [4]).

3.1. Antysensowny RNA

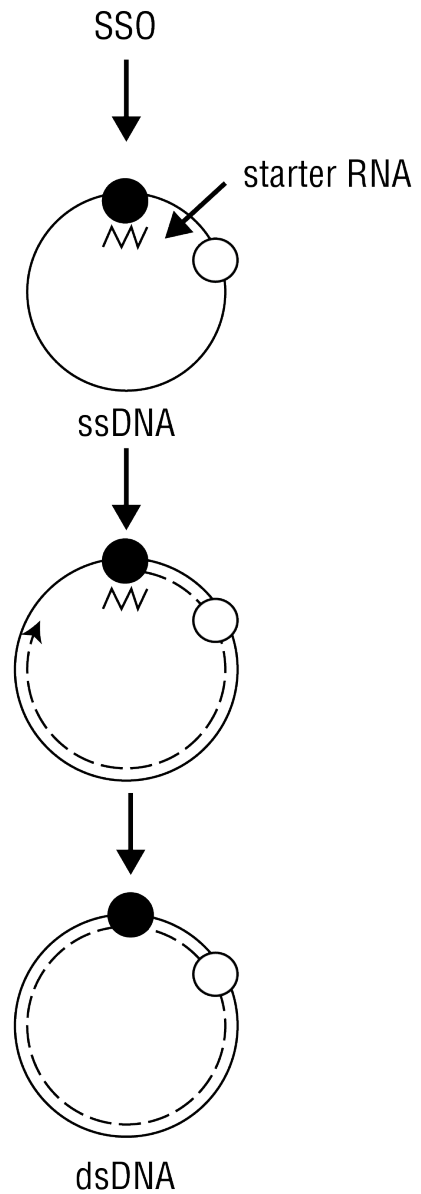
Regulacji replikacji z wykorzystaniem antysensownego RNA (ctRNA) podlegają małe plazmidy typu ColE1, plazmid *Staphylococcus aureus* pT181 i jego pochodne oraz niektóre plazmidy z grupy IncF [4, 9]. System ten jest szeroko rozpowszechniony wśród plazmidów replikujących się według różnych mechanizmów, ale

posiadających wspólną strukturę w obszarze kontrolnym: dwa przeciwnie ukierunkowane promotory, z których jeden odpowiada za syntezę RNA niezbędnego do prowadzenia replikacji, a drugi kieruje syntezą inhibitorowego ctRNA. Antysensowny RNA jest komplementarny do obszaru końca 5'RNA niezbędnego do replikacji. Ważną cechą tego systemu jest fakt, że inhibitorowe RNA jest

A



B



Ryc. 2. Replikacja według mechanizmu toczącego się koła: A – synteza nici wiodącej, B – synteza nici opóźnionej (zmodyfikowany, wg [4]).

Fig. 2. Rolling – circle replication: A – synthesis of the leading – strand, B – synthesis of the lagging – strand (modified [4]).

syntetyzowane ze znacznie większą częstotliwością niż RNA niezbędne do replikacji. Hamowanie replikacji następuje przez tworzenie kompleksu RNA – ctRNA i zniesienie aktywności RNA inicjacyjnego [15].

3.2. Antysensowny RNA i białka

W tej grupie można wyróżnić dwie kategorie:

- plazmidy, w których głównym elementem kontroli jest antysensowny RNA, a białka pełnią jedynie pomocniczą rolę
- plazmidy, w których zarówno ctRNA jak i białka pełnią ważną rolę kontrolną, ale działają na różne elementy docelowe.

Do pierwszej grupy zaliczane są plazmidy należące do rodziny IncFII z ich przedstawicielem plazmidem R1, w których kontrola replikacji jest sprawowana na poziomie syntezy białka inicjacyjnego RepA [15].

Druga kategoria – plazmidy, w których zarówno ctRNA jak i białka pełnią ważną rolę kontrolną, ale działają na różne elementy docelowe, obejmuje plazmidy bakterii z rodzaju *Streptococcus* m. in. pMV158 i jego pochodne oraz pIP501. System kontroli replikacji wymaga udziału białka Cop oraz antysensownego RNA [9].

3.3. Iterony

Iterony są powtórzonymi sekwencjami DNA długości około 20 par zasad, zlokalizowanymi w rejonie replikacyjnym. Są obecne w plazmidach kolistych replikujących się według wszystkich trzech mechanizmów [4]. Do plazmidów iteronowych należy m. in. plazmid F, P1, R6K, RK2, pSC101. Iterony stanowią jedne z głównych determinant niezgodności. Zazwyczaj występują po kilka, rzadko kilkanaście w regionie *ori* i są miejscem wiązania plazmidowego białka inicjacji replikacji Rep. Iterony znajdujące się poza regionem origin nie są potrzebne do inicjacji replikacji, ale pełnią ważną rolę kontrolną. Natomiast iterony zlokalizowane w regionie *ori* pełnią obydwie funkcje – inicjacyjną i kontrolną [4]. Iterony obecne w tych samych plazmidach zachowują wysoki stopień konserwacji, natomiast te występujące w różnych plazmidach mają fragmenty homologiczne, które mogą wskazywać na ich pokrewieństwo ewolucyjne [14].

Celem kontroli replikacji jest utrzymanie liczby kopii plazmidu przypadających na komórkę w wąskich granicach, dlatego system musi szybko reagować na zwiększenie liczby kopii przez zmniejszenie częstotliwości replikacji. W procesie kontroli plazmidów iteronowych współdziałają trzy mechanizmy:

- Kajdankowanie – zwiększenie liczby kopii powoduje wzrost prawdopodobieństwa utworzenia struktury kajdanek, która sterycznie blokuje inicjację replikacji,
- Konkurencja między monomerami a dimerami białka Rep, z których pierwsze pełnią funkcję inicjatorów, a drugie inhibitorów,

- Ograniczenie ilości białka inicjatorowego – autoregulacja procesu transkrypcji oraz zmniejszanie stężenia wolnego białka przez łączenie się z iteronami [16].

4. Niezgodność plazmidów

Ważnym elementem charakterystyki plazmidu jest klasyfikacja do odpowiedniej grupy niezgodności (niekompatybilności z ang. incompatibility, Inc), która opiera się na różnicach w systemie kontroli replikacji i liczby kopii [4, 8]. Plazmidy, które mają wspólne mechanizmy kontroli są klasyfikowane do tej samej grupy niezgodności i nie mogą być stabilnie przekazywane do komórek potomnych tej samej linii. Natomiast plazmidy o różnych systemach kontroli replikacji są zazwyczaj zgodne, co oznacza, że mogą stabilnie współistnieć w komórce gospodarza i być przekazywane komórkom potomnym [8]. Niezgodność ukazuje pokrewieństwo plazmidów posiadających zbliżone systemy kontroli [5, 8].

4.1. Molekularne podstawy niezgodności plazmidów

Replikacja plazmidów zachodzi losowo, więc w przypadku obecności w komórce gospodarza plazmidów o wspólnym systemie kontroli replikacji, mogą one zostać rozpoznane jako ten sam plazmid. Wówczas dochodzi do replikacji tylko jednego z plazmidów, który zostaje przekazany komórkom potomnym, natomiast drugi ulega eliminacji. Z tego powodu plazmidy należące do tej samej grupy niezgodności nie mogą trwale współistnieć w komórce gospodarza. Elementy systemu replikacyjnego odpowiedzialne za eliminację jednego z plazmidów są nazywane determinantami niezgodności i w zależności od typu plazmidu mogą być bardzo zróżnicowane. Rozpoznanie determinanty niezgodności można dokonać przez klonowanie określonych fragmentów analizowanego plazmidu w odpowiednim wektorze i badanie ich wpływu na stabilność macierzystego plazmidu. Wykazano, że determinanty niezgodności mogą znajdować się w minimalnym regionie replikacyjnym lub poza nim i stanowią je m. in. czynniki regulujące liczbę kopii (*cop*), *dso*, iterony, a w przypadku bakterii Gram-dodatnich cząsteczki antysensownego RNA (ctRNA) lub miejsce startu replikacji (*ori*). Niezgodność może być również wynikiem podobieństwa systemów aktywnego rozdziału (partycji), gdy tworzą się heterogenne pary plazmidów, a każdy z plazmidów jest segregowany do innej komórki potomnej [8, 9].

5. Klasyfikacja plazmidów

System klasyfikacji plazmidów oparty na niezgodności został rozwinięty w latach 70. [8]. Wyróżniono ponad 30 grup niezgodności dla *Enterobacteriaceae* oraz kilkanaście dla *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Klasyczny sposób sprawdzania niezgodności polega na wprowadzeniu badanego plazmidu na drodze koniugacji, transdukcji lub transformacji do szczepu

niosącego inny plazmid o znanej grupie Inc. Dwa plazmidy muszą posiadać różne markery selekcyjne, aby możliwe było śledzenie ich rozdziału do komórek potomnych. Selekcja jest zazwyczaj przeprowadzana dla badanego plazmidu, a komórki potomne są sprawdzane na obecność wcześniej posiadanego plazmidu. Jeśli plazmid ten został wyeliminowany przez nowo wprowadzony, oznacza to, że plazmidy należą do tej samej grupy niezgodności [8, 9].

W latach 80. Couturier wraz z zespołem wprowadzili system klasyfikacji oparty na typowaniu replikonów metodą hybrydyzacji DNA – DNA [8]. Takie podejście jest technicznie prostsze i szybsze niż klasyczne badanie niezgodności. Pozwala na sklasyfikowanie plazmidów koniugacyjnych i niekoniugacyjnych oraz plazmidów złożonych zawierających kilka replikonów. Ma jednak pewne ograniczenia. Początkowo sondy konstruowano, klonując restrykcyjne fragmenty 19 podstawowych replikonów w wysokokopiiowych wektorach plazmidowych. Sondy różniły się wielkością od 304 do 2250 pz, podczas gdy większość znanych determinant niezgodności ma wielkość ok. 100 pz. Oznacza to, że sondy zawierały także geny lub ich fragmenty niebędące determinantami niezgodności. W przypadku bardzo zbliżonych sekwencji nukleotydowych mogą wystąpić wówczas cross – hybrydyzacje, co prowadzi do obniżenia specyficzności [8, 17, 18]. Obecnie możliwe jest zastosowanie bardziej zaawansowanych metod otrzymywania sond, np. za pomocą PCR, co sprawia, że są one projektowane precyzyjniej, a specyficzność hybrydyzacji wzrasta. Dostępne są także banki replikonowych sond molekularnych znanych grup plazmidów, które można wykorzystać do badania nieznanymi plazmidów metodą hybrydyzacji [4].

Od lat 90. zaczęto rozwijać typowanie replikonów oparte na metodzie PCR (PBRT, z ang. PCR – based replicon typing). Pierwsze prace dotyczyły badania bakterii środowiskowych, a primery zaprojektowano do czterech grup niezgodności: IncN, IncP, IncQ i IncW [19]. Następnie Carattoli z zespołem zastosowali metodę PBRT do badania replikonów największych rodzin plazmidów występujących u *Enterobacteriaceae*: FIA, FIB, FIC, HI2, HI1, I1- γ , L/M, N, W, Y, P, A/C, T, X, K, B/O. Zaprojektowali także primery FrepB i FIAs wykrywające warianty FII, FIII, FIV i FVI grupy FII replikonów [18]. Mimo dużej specyficzności i szybkości wykonania [20], metoda PBRT również ma ograniczenia wynikające z faktu, że opiera się na plazmidach należących do znanych grup Inc, co utrudnia identyfikację odmiennych lub nowych plazmidów [18]. Obecnie metoda PBRT jest szeroko wykorzystywana w typowaniu replikonów wielolekoopornych patogenów [20, 21, 22].

Najbardziej pełna metoda charakterystyki plazmidów polega na ustaleniu ich całkowitej sekwencji, dzięki czemu można porównać ją z zsekwencjonowanymi plazmidami dostępnymi w bazie NCBI. Metoda ta jest jednak cza-

sochłonna i dość kosztowna, szczególnie w przypadku analizowania dużych sekwencji.

6. Typy replikonów a oporność drobnoustrojów

Wiele plazmidów zawiera geny determinujące oporność drobnoustrojów na antybiotyki i chemioterapeutyki. Możliwość przyporządkowania rodzajów oporności do plazmidów o określonych typach replikonów staje się cennym narzędziem w śledzeniu rozpowszechniania oporności wśród bakterii. Już badania Couturier z zespołem ukazały, że większość plazmidów o istotnym znaczeniu klinicznym – odpowiedzialnych za produkcję toksyn, czynników inwazyjności czy oporności – należy do grup niezgodności IncF oraz IncI1 i zazwyczaj zawiera kilka replikonów [8]. Rozwój technik opartych na metodzie PCR pozwolił na typowanie licznych szczepów klinicznych i weterynaryjnych oraz szukanie powiązań między opornością a rodzajem replikonu [17].

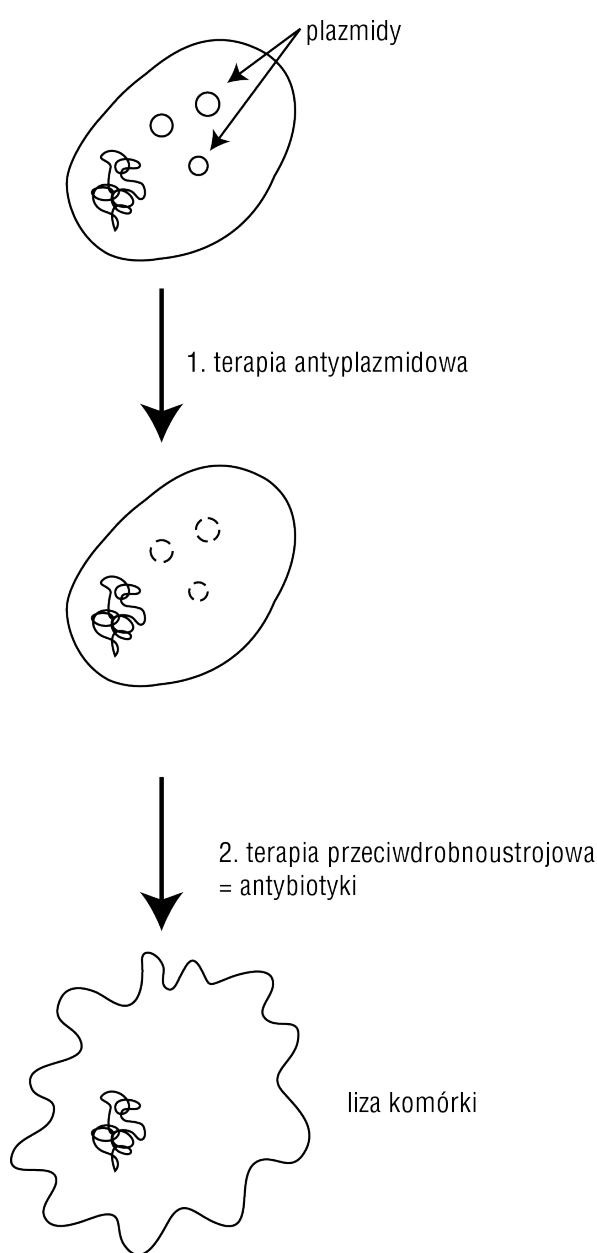
Różnorodność plazmidów zawierających geny oporności na antybiotyki jest w rodzinie *Enterobacteriaceae* duża, ale można wyróżnić grupy plazmidów szeroko rozpowszechnionych lub związanych z określonym rodzajem oporności. Plazmidy IncFII, IncN, IncHI-2, IncL/M oraz IncI1 zawierają geny β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), IncA/C – β -laktamaz AmpC. Oporność na karbapenemy jest przenoszona głównie na plazmidach rodzin IncW, IncL/M, IncN i IncA/C, a oporność na chinolony i/lub aminoglikozydy – IncF, IncL/M, IncI1 oraz IncU i IncQ dla próbek środowiskowych. Często plazmidy te niosą kilka genów oporności jednocześnie, co powoduje selekcjonowanie szczepów wielolekoopornych. Plazmidy te są izolowane z wielu gatunków bakterii, pochodzących z różnych źródeł i odległych krajów, co może sprzyjać szerzeniu się zachorowań epidemicznych. Obserwuje się, że rozpowszechnienie tych plazmidów jest związane z populacjami bakterii podlegających presji antybiotykowej, natomiast wśród izolatów od zdrowych ludzi i zwierząt niepoddanych takiej presji ich występowanie jest niewielkie [20, 21, 23]. Wyjątkiem jest rodzina plazmidów IncF, które są szeroko obecne w naturalnej florze przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt, niezależnie od niesionych genów oporności. Jest to prawdopodobnie związane z dodatkowymi czynnikami przenoszonymi w plazmidach, które sprawiają, że plazmidy te są zachowywane w komórkach gospodarza nawet przy braku presji. Poznanie pełnej sekwencji wielu plazmidów IncF wskazuje na przenoszenie genów podnoszących wirulencję komórek gospodarza, takich jak: system wychwyty żelaza, transportery ABC, operony deaminazy rafinozy i argininy czy produkcja toksyn. Nabywanie genów oporności na antybiotyki przez plazmidy niosące geny wirulencji może stanowić narzędzie w ewolucji plazmidów i kolonizowaniu nowych gospodarzy [17]. Rozprzestrzenianiu się plazmidów między

różnymi rodzajami bakterii sprzyja zdolność do koniugacji. Plazmidy grup IncF, IncP, IncHI-1, IncI1 i IncN są plazmidami koniugacyjnymi, podczas gdy plazmidy IncQ nie są zdolne do samodzielnej koniugacji, ale mogą być z dużą wydajnością przekazywane w obecności plazmidu pomocniczego. Plazmidy różnią się także zdolnością do replikowania się w komórkach gospodarzy. Te należące do IncF występują tylko w rodzinie *Enterobacteriaceae*, natomiast plazmidy IncA/C, IncP i IncQ mogą się stabilnie utrzymywać w szerokim spektrum gospodarzy. Taka zdolność wynika z obecności trzech mechanizmów: uniwersalności replikacji plazmidu, kodowaniu na plazmidzie własnych białek replikacyjnych oraz posiadaniu przynajmniej dwóch typów replikonów, które ograniczają wystąpienie niezgodności [24]. Plazmidy IncF potrzebują do swojej replikacji wielu białek gospodarza: DnaB, DnaC, DnaG, gyrazy, SSB i polimerazy, stąd ich występowanie ograniczone jest do wąskiej grupy gospodarzy. Plazmidy IncQ są w większej mierze samowystarczalne, gdyż niosą geny białek niezbędnych do swojej replikacji – RepA, RepB i RepC – i mogą dzięki temu zasiedlać licznych gospodarzy – od *Enterobacteriaceae* poprzez *Mycobacterium*, *Streptomyces* do cyanobakterii, a nawet komórek roślinnych i zwierzęcych [25].

7. Terapia antyplazmidowa

Klasyfikacja plazmidów na podstawie niezgodności/typów replikonów dostarcza ważnych informacji o potencjalnym spektrum gospodarzy oraz przenoszonych genach oporności. Na tej podstawie można stwierdzić, że gen kodujący β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym CTX – M w plazmidzie IncFII nie zostanie przekazany bakteriom np. z rodzaju *Pseudomonas*, gdyż plazmidy te są ograniczone jedynie do rodziny *Enterobacteriaceae*, ale jeśli będzie umiejscowiony na plazmidzie IncA/C, jest to możliwe [17, 24]. Wiedza o powszechności niektórych typów replikonów w przenoszeniu genów oporności jest bardzo użyteczna. Pojawiają się koncepcje leczenia antyplazmidowego, które ma oddziaływać na elementy systemów kontroli replikacji, prowadząc do destabilizacji plazmidu i jego eliminacji. Komórka bakteryjna wraz z plazmidem traciłaby geny kodujące oporność na antybiotyki, co umożliwiłoby skuteczne leczenie pacjenta. To nowe podejście terapeutyczne może przywrócić do lecznictwa niektóre z antybiotyków porzuconych ze względu na szeroko rozpowszechnioną oporność [2]. W niektórych przypadkach już sama terapia antyplazmidowa mogłaby okazać się wystarczająca do wyleczenia pacjenta. *Bacillus anthracis*, wywołujący bardzo poważną chorobę – węglik, nie zagraża życiu ludzkiemu, gdy jest pozbawiony dwóch plazmidów pXO1 i pXO2. Podobnie jest u *Klebsiella pneumoniae*, gdzie obecność plazmidu tysiącrotnie podnosi zjadliwość bakterii [2, 26, 27].

Celem większości stosowanych antybiotyków i chemioterapeutyków są jedynie trzy procesy w komórce



Ryc. 3. Schemat koncepcji terapii antyplazmidowej.

Fig. 3. Outline of the antiplasmid therapy.

bakteryjnej: budowa ściany komórkowej, synteza białek lub blokowanie enzymów zaangażowanych w procesy metaboliczne i proces replikacji. Rozwój metod molekularnych pozwolił na poszukiwanie nowych miejsc docelowych w komórkach bakteryjnych. W przypadku plazmidów celem terapii mogą stać się dwa mechanizmy regulujące liczbę kopii: kontrola replikacji przy udziale antysensownego RNA oraz system postsegregacyjnej eliminacji komórek bezplazmidowych (system addykcyjny). Leczenie antyplazmidowe oparte na systemie kontroli przez ctRNA polega na wprowadzeniu do komórki bakteryjnej małej cząsteczki organicznej, która oddziałując z miejscem wiązania antysensownego RNA, powodowałaby zatrzymanie replikacji plazmidu i jego eli-

minację z komórki gospodarza. System postsegregacyjnej eliminacji komórek bezplazmidowych polega na tym, że na plazmidzie kodowane jest białko, zwane truczną (toksyna) oraz antidotum (antytoksyna). Gdy do komórki potomnej zostanie przekazany plazmid, syntetyzowane jest antidotum, które neutralizuje toksynę. Natomiast w przypadku nieobecności plazmidu, dochodzi do śmierci komórki, ponieważ nie powstaje antidotum, a toksyna blokuje białko replikacyjne. Terapia antyplazmidowa zakłada wprowadzenie do komórki cząsteczki, która blokowałaby łączenie toksyny z antytoksyną i prowadziła do śmierci komórki, mimo posiadania przez nią plazmidu [2].

Chociaż terapia antyplazmidowa dostarcza nowych koncepcji leczenia, wymaga jeszcze wielu badań, zanim stanie się użyteczna klinicznie. Potrzebne są eksperymenty na modelach zwierzęcych, które zweryfikują słuszność takiego podejścia dla ważnych klinicznie szczepów bakteryjnych oraz sprawdzą potencjalne sposoby dostarczania czynnika antyplazmidowego pacjentowi. Problemem

jest także obecność genów oporności w integronach lub transpozonach, które mogą zostać wbudowane w DNA chromosomalny. Jednak i w tym przypadku terapia antyplazmidowa może okazać się przydatna, ograniczając transfer genów oporności między różnymi szczepami czy gatunkami bakterii, gdyż przekazywanie chromosomalnie kodowanej oporności występuje rzadziej niż dla kodowanej w plazmidach. Przeszkodą może być również różnorodność plazmidów i konieczność projektowania odmiennych czynników antyplazmidowych. W takiej sytuacji terapia mogłaby pozostać użyteczna dla pacjentów zakażonych wielolekoopornymi szczepami, pod warunkiem dokładnego poznania systemów kontroli replikacji plazmidów obecnych w tych szczepach. Doprowadzenie terapii antyplazmidowej do zastosowania klinicznego wymaga jeszcze wielu szczegółowych badań, ale jednocześnie oferuje możliwość leczenia zakażeń, na które dziś nie istnieje skuteczna terapia [2] (Ryc. 3).

Piśmiennictwo

- Hawkey PM. *The growing burden of antimicrobial resistance*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008;62: Suppl. 1:i1–i9.
- DeNap JCB, Hergenrother PJ. *Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria*. Organic and Biomolecular Chemistry 2005; 3: 959–966.
- Holmes ML, Pfeifer F, Dyll-Smith ML. *Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon*. Gene 1995; 153:117–121.
- Baj J, Markiewicz Z. (red.). *Biologia molekularna bakterii*. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2006.
- Novick RP. *Plasmid incompatibility*. Microbiological Reviews 1987;51:381–396.
- Włodarczyk M. *Co to jest plazmid?* Kosmos 2002;51:231–240.
- Bergstrom CT, Lipsitch M, Levin BR. *Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids*. Genetics 2000;155:1505–1519.
- Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. *Identification and classification of bacterial plasmids*. Microbiological Reviews 1988;52:375–395.
- Del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R. *Replication and control of circular bacterial plasmids*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1998;62:434–464.
- Meinhardt F, Schaffrath R, Larsen M. *Microbial linear plasmids*. Applied Microbiological Biotechnology 1997; 47:329–336.
- Wróbel B. *Replikacja plazmidów*. Kosmos (2002);51:255–272.
- Soler N, Marguet E, Cortez D, Desnoues N, Keller J, Van Tilbeurgh H. *Two novel families of plasmids from hyperthermophilic archaea encoding new families of replication proteins*. Nucleic Acids Research 2010;1–17.
- Khan SA. *Plasmid rolling – circle replication: recent developments*. Molecular Microbiology 2000;37:477–484.
- Chattoraj DK. *Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical*. Molecular Microbiology 2000;37: 467–476.
- Del Solar G, Espinosa M. *Plasmid copy number control: an ever – growing story*. Molecular Microbiology 2000;37: 492–500.
- Das N, Valjavec-Gratian M, Basuray AN, Fekete RA, Papp PP, Paulsson J. *Multiple homeostatic mechanisms in the control of P1 plasmid replication*. The Proceedings of The National Academy of Sciences 2005;102:2856–2861.
- Caratolli A. *Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2009;53: 2227–2238.
- Caratolli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. *Identification of plasmids by PCR – based replicon typing*. Journal of Microbiological Methods 2005;63:219–228.
- Götz A, Pukall R, Smit E, Tietze E, Prager R, Tschäpe H. *Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR*. Applied and Environmental Microbiology 1996;62:2621–2628.
- Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson JS, Logue CM, White DG, Doetkott C. *Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic Escherichia coli isolates*. Applied and Environmental Microbiology 2007;73:1976–1983.
- Lindsey RL, Fedorka-Cray PJ, Frye JG, Meinersmann RJ. *Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant Salmonella enterica isolates*. Applied and Environmental Microbiology 2009;75:1908–1915.
- Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C. *Replicon typing of plasmids in Escherichia coli producing extended-spectrum β -lactamases*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2009;63:67–71.

23. Sherley M, Gordon DM, Collignon PJ. *Species differences in plasmid carriage in the Enterobacteriaceae*. Plasmid 2003; 49:79–85
24. Zhong Z, Helinski D, Toukdarian A. *Plasmid host-range: restrictions to F replication in Pseudomonas*. Plasmid 2005; 54:48–56
25. Francia VM, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, De la Cruz F. *A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids*. FEMS Microbiology Reviews 2004;28:79–100.
26. Okinaka RT, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster AR, Hill KK, Keim P. *Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes*. Journal of Bacteriology 1999;181:6509–6515.
27. Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. *Bacillus anthracis pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species*. Journal of Bacteriology 2002; 184: 134 – 141

Adres do korespondencji / Mailing address:

Monika Kosik

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa

Tel./Fax 22-621-13-51

mk.kosik@gmail.com