

Renata Wolinowska

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
02-007 Warszawa, ul. Oczki 3, tel. 22 6280822, e-mail: rwolinowska@wum.edu.pl

Wpłynęło w czerwcu 2008 r.

1. Wprowadzenie. 2. Plazmidy kryptyczne. 3. Plazmidy koniugacyjne. 4. Integracja do chromosomu. 5. Megaplazmidy i plazmidy metaboliczne. 6. Podsumowanie

Archaeal Plasmids

Abstract: Numerous plasmids can be found in the cells of *Archaea*, most of them have cryptic phenotypes. Among cryptic plasmids isolated from *Crenarchaeota*, a pRN1 family has been identified. These plasmids encode a unique replication protein, harbouring both primase and DNA polymerase activity. Plasmid pSSVx of that family may be packaged into capsids of fusellovirus, due to the presence of two viral genes in its structure. The investigated conjugative plasmids were found in *Sulfolobus* species. Conjugation differs from that known for bacterial cells. Both in cryptic and conjugative plasmids, integrase gene, enabling specific plasmid integration into chromosomal DNA, may be found. In some of these integrases, attachment site is placed inside the open reading frame encoding the integrase. Integrases found in cryptic plasmids of the pRN1 family are homologous to integrases of *Archaea* viruses. In cells of halophilic and methanogenic *Archaea*, big plasmids and megaplasmids have been found that carry genes necessary for cell activity.

1. Introduction. 2. Cryptic plasmids. 3. Conjugative plasmids. 4. Chromosomal integration. 5. Megaplasmids and metabolic plasmids. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Archaea*, integracja, plazmidy koniugacyjne, plazmidy kryptyczne

Key words: *Archaea*, chromosomal integration, conjugative plasmids, cryptic plasmids

1. Wprowadzenie

Archeony, zwane wcześniej archebakteriami, zasiedlają najbardziej niedostępne i nieprzyjazne dla życia regiony Ziemi, w których żyją tylko nieliczne gatunki bakterii, a organizmy eukariotyczne nie występują wcale. Wśród *Archaea* spotykamy wszystkie odmiany organizmów ekstremofilnych.

Halofilne *Archaea* rozwijają się w zbiornikach z bardzo słoną wodą, takich jak Morze Martwe. Acidofile rosną w pH niższym niż 3 i są często termofilne, alkalofile żyją w pH wyższym niż 10 i są często halofilne. Ekstremalne termofile, takie jak *Pyrolobus fumarii*, występują w hypertermalnych kominach na dnie mórz, gdzie temperatura przekracza 100°C. Natomiast psychrofile żyją w zimnej wodzie morskiej i na Antarktydzie.

Archeony metanogenne, takie jak *Methanobacterium thermoautotrophicum*, są termofilne i bezwzględnie beztlenowe. Posiadają unikatową właściwość, jaką jest metanogeneza – zdolność do pozyskiwania energii z redukcji dwutlenku węgla do metanu [9].

Archaea przez dziesięciolecia były uważane za bakterie, co wynikało głównie z morfologii ich komórek. Analiza rybosomalnego RNA, zaproponowana przez Carla Woesego [34], pozwoliła na wyłonienie trzeciej gałęzi ewolucyjnej – domeny: oprócz *Bacteria* i *Eukarya* pojawiły się *Archaea*. Nazwa *Archaea*,

nadana przez Woese'go nawiązuje do najstarszego okresu w dziejach Ziemi – archaiku (ang. Archaean) i początków życia.

Ilość informacji na temat *Archaea* gwałtownie rośnie w ostatnich latach. Identyfikowane są nowe gatunki archeonów, ale wiele danych pochodzi z analizy próbek pochodzących wprost ze środowiska. Poszukuje się w nich rRNA i genomowego DNA, który następnie jest sekwencjonowany i analizowany komputerowo, bez konieczności izolacji i hodowli organizmu, z którego pochodzi [8, 31]. Ponad 75% dostępnych obecnie sekwencji rRNA dla archeonów pochodzi od organizmów, które nigdy nie zostały wyhodowane [28]. Badania środowiskowe pozwoliły ustalić, że przedstawiciele *Archaea* żyją we wszystkich środowiskach; w morzach, wodach słodkich, osadach dennych, glebie, na korzeniach roślin, w przewodach pokarmowych przeżuwaczy i bezkręgowców [18, 28], a także w jamie ustnej i jelitach ludzi [19]. Te dane sprawiają, że konieczne jest nowe spojrzenie na mikroorganizmy z domeny *Archaea*, gdyż nie da się dłużej traktować ich tylko jako ekstremofili – żywych skamienielin z czasu początków życia na Ziemi. Szacuje się, że komórki *Archaea* mogą stanowić od 10 do 20% całej biomasy Ziemi [8, 28]

Obecnie domenę *Archaea* dzieli się na cztery jednostki, określane jako typy lub królestwa – *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Nanoarchaeota* i *Korarchaeota* [13, 26].

Euryarchaeota są królestwem najbardziej zróżnicowanym, zawiera ono archeony metanogenne, halo-filne oraz gatunki termofilne i psychrofilne. Do tego królestwa należą, omawiane w poniższym tekście: rząd *Thermococcales* z rodzajem *Pyrococcus*, archeony metanogenne z rodzajami *Methanococcus* i *Methanobacterium*, ekstremalne termofile, jak *Pyrococcus furiosus*, oraz archeony halofilne – *Haloferax volcanii*, *Halo-bacterium* sp. i *Natronobacterium*.

Crenarchaeota grupuje ekstremalne termofile i nie-liczne psychrofile. Należą do nich omawiane poniżej rodzaje *Sulfolobus* i *Acidianus*. Do *Sulfolobus* należą organizmy tlenowe, acydofile, o optymalnej temperaturze wzrostu ok. 80°C. Gatunki z tego rodzaju izolowano z gorących, siarkowych źródeł na Islandii, we Włoszech, Japonii, Nowej Zelandii, Rosji i Stanach Zjednoczonych. W środowisku naturalnym drobno-ustroje te są chemolitoautotrofami, pozyskują energię przeprowadzając, w warunkach tlenowych, związki siarki w kwas siarkowy. Potrafią funkcjonować także jako heterotrofy wykorzystujące różne związki organiczne jako źródło węgla i azotu. W warunkach laboratoryjnych organizmy te dają się względnie łatwo hodować na podłożach płynnych i stałych. Są modelowymi przedstawicielami *Archaea*. *S. solfataricus* i *S. acidocaldarius*, wyizolowane z gorących źródeł Parku Yellowstone, są najlepiej scharakteryzowanymi przedstawicielami tej grupy [5].

Nanoarchaeota zawiera pojedynczy gatunek *Nanoarchaeum equitans*. Jest to bezwzględny symbiont, zależny od gatunku *Ignicoccus hospitalis*, archeona należącego do *Crenarchaeota* [14, 15]. Genom *N. equitans* o wielkość 491 tys. par zasad (kpz) jest rekordowo mały i bardzo silnie upakowany, 95% jego objętości to sekwencje kodujące [33]. Według jednych autorów jest to prawdopodobnie pierwszy z wielu gatunków, które niebawem zostaną odkryte [25], według innych autorów wydzielanie nowego królestwa jest w tym przypadku przedwczesne i nieuzasadnione [13, 18].

Typ *Korarchaeota* grupuje sekwencje kwasów nukleinowych uzyskane z analizy próbek środowiskowych. Dane te należy traktować jako cenne, ale wstępne informacje [3, 18].

2. Plazmidy kryptyczne

Ilość informacji na temat plazmidów obecnych w komórkach *Archaea* jest niewielka, zwłaszcza jeśli porównać ją z ilością danych na temat plazmidów bakteryjnych. Można jednak sądzić, że plazmidy występują u tych organizmów powszechnie; w rzędzie *Thermococcales*, należącym do intensywnie badanej grupy metanogenów, stwierdzono plazmidy u 20% badanych szczepów [11]. Większość wyizolowanych i zbadanych

plazmidów są to plazmidy kryptyczne, kilka z nich zostało w całości zsekwencjonowanych.

Bardzo intensywnie badaną grupą archeonów jest rodzaj *Sulfolobus*, w tym gatunki *S. islandicus*, *S. solfataricus* i *S. tokodaii* [20]. Plazmidy wyizolowane z rodzaju *Sulfolobus* tworzą rodzinę pRN. W jej skład wchodzi pRN1, pRN2, pSSVx i pHEN7, pochodzące z *Sulfolobus islandicus* (REN1H1) [11], oraz pDL10, wyizolowany z *Acidianus ambivalens* [16]. Plazmidy występują w komórkach gospodarzy w formie autonomicznych cząsteczek lub są zintegrowane z chromosomem. Te ostatnie wykryto w genomach *S. solfataricus* (pXQ1) i *S. tokodaii* (pST1, pST3) [30]. Mają wielkość od 5,0 do 7,8 kpz. Plazmidy pDL10 i pSSVx występują w stosunkowo wysokiej liczbie kopii – od 15 do 35 na komórkę, mogą występować w formie zrelaksowanej lub superskręconej. W każdym z tych plazmidów można wyróżnić konserwowany obszar o wielkości 4–4,5 kpz, który może funkcjonować jako minireplikon. Obszar ten koduje trzy charakterystyczne białka: białko RepA – warunkujące replikację plazmidu, białko CopG (ang. copy control protein) – regulujące liczbę kopii plazmidu i białko PlrA (plasmid regulator A), silnie wiążące się z DNA [11]. Dla plazmidu pRN1 wykazano istnienie czterech ważnych transkryptów. Pierwszy powstaje po transkrypcji genów *copG* i *repA*, drugi genu *plrA*, dwa kolejne są antytranskryptami komplementarnymi do 5'końcowej części pierwszego i drugiego transkryptu. Obecność antysensownego RNA powoduje, poprzez komplementację matrycowego RNA, ograniczenie ekspresji genów *copA*, *repA* i *plrA* [4]. Podobny mechanizm jest wykorzystywany w przypadku regulacji replikacji kryptycznych plazmidów bakteryjnych. Białko CopG w postaci tetrameru wiąże się z sekwencją o długości 12 par zasad (pz), w obrębie której znajduje się punkt startu transkrypcji genów *copG* i *repA*. Jest to drugi mechanizm ograniczający ekspresję genów *copG* i *repA* [11]. Podobne właściwości wykazuje białko PlrA, wiąże się ono z sekwencją powyżej kodującego go genu. W plazmidzie stwierdzono dwie takie sekwencje, oddalone od siebie o 65 pz; podobna struktura znajduje się także w plazmidach koniugacyjnych *Archaea*. Białko PlrA wiążąc się z DNA tworzy multimeryczny kompleks [20].

Produkt genu *repA* jest białkiem o unikatowej strukturze i funkcji. Jest to duże białko, zbudowane z 900–1000 aminokwasów, kodujący go gen stanowi jedną trzecią lub nawet połowę wielkości plazmidów z rodziny pRN. Szczegółowym badaniom poddano gen *repA* zlokalizowany w plazmidzie pRN1. 255 aminokwasów stanowiących N-końcową część białka ma aktywność primazy i polimerazy DNA. Jest zdolne do syntezy *de novo* starterów złożonych z 8 deoksynukleotydów, następnie, dzięki aktywności polimerazy

DNA syntetyzowany jest łańcuch DNA o długości tyśięcy zasad. Badając aktywność produktu sklonowanego genu *repA* wykazano, że aminokwasy w pozycji 111 (asparagina), 113 (glutamina), 171 (asparagina) są krytyczne dla aktywności enzymu i że centrum aktywne jest wspólne dla obu aktywności – primazy i polimerazy DNA [21]. Fragment obejmujący aminokwasy 550–800 białka RepA posiada aktywność helikazy o polarności 3'-5'. Sekwencja wykazuje homologię do helikaz z superrodziny III, utworzonej z białek kodowanych przez plazmidy bakteryjne i wirusy. N-końcowa część białka, posiadająca podwójną aktywność primaza/polimeraza, nie wykazuje żadnej homologii do znanych białek [20]. Stwierdzono podobieństwo do primazy innego archeona, *Pyrococcus furiosus*, ale ogranicza się ona do czterech zasad w centrum aktywnym enzymu [2]. Tak nieznaczna homologia może wynikać zarówno z daleko posuniętej ewolucyjnej dywergencji białek pochodzących od wspólnego przodka, jak i z ewolucyjnej konwergencji.

Białko RepA stanowi nowy typ białka replikacyjnego. Właściwości domeny mającej aktywność primazy/polimerazy wskazują, że powstała ona niezależnie od primaz i polimeraz DNA opisanych dla świata bakterii i eukariontów. Wstępny schemat replikacji plazmidów z rodziny pRN składałby się z następujących etapów: białko RepA lub kompleks RepA-PlrA rozpoznaje punkt startu replikacji, następnie domena helikazowa białka RepA rozwija DNA w obszarze startu replikacji dzięki energii pozyskiwanej z ATP. Aktywność primazy białka RepA pozwalałaby na syntezę starterów z deoksynukleotydów. Elongację nici może prowadzić białko RepA dzięki swojej aktywności polimerazy DNA. Białko RepA wykazuje niską efektywność katalityczną, dodatkowo nie stwierdzono u niego ani aktywności nukleolitycznej 3'-5', ani 5'-3'. Możliwe jest zatem, że opisane wyżej enzymy inicjują replikację plazmidów z rodziny pRN i jest ona kontynuowana przez maszynę replikacyjną komórki gospodarza. Aktywność białka CopG ogranicza ilość białka replikacyjnego RepA w komórce, spada więc częstość inicjacji replikacji, co prowadzi do zmniejszenia liczby kopii plazmidu w komórce. Zjawiska te składają się na opisywaną wcześniej aktywność białka CopG jako regulatora liczby kopii plazmidu [20].

Zgromadzone dane nie pozwalają na przypisanie plazmidom z rodziny pRN żadnego ze znanych modeli replikacji. W przypadku plazmidów pGT5 i pRT1, wyizolowanych z różnych gatunków z rodzaju *Pyrococcus* wykazano, że replikują się one według modelu toczącego się koła (ang. rolling circle replication) [10, 32]. Plazmid pNB101, pochodzący z haloarcheona *Natronobacterium* sp., także replikuje się według modelu toczącego się koła, ale posiada unikatowy system regulacji replikacji [36].

Plazmidy pHEN7 i pDL10 zawierają dodatkowe ramki odczytu o nieznannej funkcji. Są one otoczone sekwencjami TTAGAATGGGGATTC. Sekwencję tę i sekwencje do niej zbliżone określa się jako R_m . Występują one także w małych plazmidach, pRN1 i pRN2, dwie takie sekwencje są rozdzielone kilkoma parami zasad. Uważa się, że rekombinacja z udziałem tych obszarów jest odpowiedzialna za rearanżacje w cząsteczce plazmidu. Polegają one na odwracalnym włączaniu fragmentów DNA do cząsteczki plazmidu, co jest źródłem zmienności w populacji plazmidów [25]. Bardzo wysoką stabilnością strukturalną i segregacyjną charakteryzuje się plazmid pIT3, wyizolowany z *S. solfataricus* IT3. Plazmid pIT3 jest niekiedy zaliczany do rodziny pRN, ale ze względu na szereg unikatowych właściwości bywa też z niej wydzielany [27]. Analiza genomowego DNA *Archaea* wskazuje na wysoką częstość „tasowania” informacji genetycznej, znaczny udział mają w tym elementy mobilne, a zwłaszcza sekwencje insercyjne [7, 6].

Plazmidy pTAU4, pTIK4 i pORA1, pochodzące z *S. neozealandicus*, posiadają homologiczny obszar, obserwowany tylko w tych cząsteczkach, co może być związane z ich specyficnością względem gospodarza. Plazmidy te różnią się pomiędzy sobą w zakresie białek replikacyjnych, pTIK4 i pORA1 zawierają homologi genu *repA*, kodującego opisaną wcześniej domenę primaza/polimeraza, a w strukturze plazmidu pTAU4 nie stwierdzono takiego genu. Plazmid ten niesie gen kodujący białko MCM (ang. minichromosome maintenance) homologiczne do helikazy eukariontów. Odkrycie genu kodującego białko MCM w plazmidzie pTAU4 i obecność w C-końcowej części białka RepA obszaru wykazującego homologię do eukariotycznych helikaz z superrodziny III sugeruje, że krytyczne plazmidy *Archaea* wymagają aktywności helikazy do replikacji [20].

Unikatowy sposób rozprzestrzeniania opisano dla plazmidu pSSVx, wyizolowanego z *S. islandicus* REY15/4; wykorzystuje on aktywność jednego z wirusów *Archaea*. Wirusy występujące w komórkach *Sulfolobus* dzieli się na cztery rodziny: *Fuselloviridae*, *Rudiviridae*, *Lipothrixviridae* i *Guttaviridae*. Najlepiej poznana grupa to *Fuselloviridae*, wirusy, których genom ma wielkość ok. 15 kpb., a kapsyd – kształt wrzeciona. Ich replikacja i uwalniania do środowiska nie powoduje lizy komórek gospodarza. Spośród 18 ramek odczytu, które kodują białka konserwowane w tej grupie wirusów, tylko w przypadku czterech ustalono funkcję. Trzy białka stanowią element strukturalny kapsydu, a czwarte jest integracją odpowiedzialna za włączanie genomu wirusa do chromosomu gospodarza [20]. Plazmid pSSVx może być pakowany do kapsydów fusellowirusa SSV2, który występuje w szczepie REY15/4. Jest to związane z obecnością w strukturze

Tabela I

Plazmidy archeonów metanogennych

Archeon	Plazmid	Wielkość (kpz)	Sekwencja* lub publikacja
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> Marburg	pME2001	4,5	X1720
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ZH3	pME2200	6,2	[22]
<i>Methanobacterium thermoformicicum</i> THF	pFV1	13,5	[23]
<i>Methanobacterium thermoformicicum</i> Z-245	pFZ1	11	[23, 24]
<i>Methanobacterium thermoformicicum</i> FTF	pFZ2	11	[24]
<i>Methanococcus maripaludis</i>	pURB500	8,3	U47023
<i>Methanococcus</i> st. AG86	pURB900	20	[35]
<i>Methanococcus jamnasachii</i>	pURB800	64	L77118
<i>Methanococcus jamnasachii</i>	pURB801	18	L77119
<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	pC2A	5,5	U78295

* Numer zgłoszenie do bazy danych GenBank NCBI (National Centre for Biotechnology Information, Stany Zjednoczone)

pSSVx dwóch ramek odczytu, homologicznych do ORF-ów występujących w genomie fusellowirusów. Plazmid pSSVx jest więc naturalnym, wywodzącym się z *Archaea*, odpowiednikiem fagemidów, wektorów stworzonych na potrzeby inżynierii genetycznej przez połączenie genów fagów i plazmidów bakteryjnych. Wszystkie opisane dotychczas plazmidy z rodziny pRN zostały wyizolowane z komórek *Crenarchaeota*. Plazmidy te nie wykazują istotnej homologii do znanych plazmidów *Archaea* i *Eubacteria* [11].

W przypadku archeonów metanogennych plazmidy obserwowano zarówno w szczepach gatunków termofilnych jak i mezofilnych (tab. I). Dostępne są tylko nieliczne informacje na temat tych cząsteczek: występują w niskiej liczbie kopii w komórce, posiadają dużą liczbę odwróconych i prostych sekwencji powtórzonych, związanych z replikacją lub rekombinacyjną zmiennością plazmidów [17]. Ustalono pełną sekwencję nukleotydową plazmidu pURB500 z *Methanococcus maripaludis* i stwierdzono, że zawiera on 18 ramek odczytu. Tylko jednej z nich udało się przypisać potencjalną aktywność produktu: jest to integraza [22].

3. Plazmidy koniugacyjne

Plazmidy koniugacyjne wyizolowane z komórek *S. islandicus* mają wielkość od 24,6 do 41,2 kpz. Dotychczas przeanalizowano 15 plazmidów, które podzielono na klasy; plazmidy należące do jednej klasy wykazują znaczną homologię sekwencji nukleotydowej.

Ustalono pełną sekwencję nukleotydową sześciu plazmidów koniugacyjnych [12 i NC005969.1]. Wykazują one znaczne podobieństwa w strukturze. Najbardziej konserwowane geny są zebrane w dwa klaster. W pierwszym z nich zlokalizowane jest sześć genów, stanowiących podstawę aparatu koniugacyj-

nego *Archaea*. Drugi klaster zawiera siedem genów, w tym geny *copG* i *plrA*, które związane są z replikacją, oraz gen *int* kodujący integrazę. Gen *copG* występuje zarówno w plazmidach kryptycznych jak i koniugacyjnych, stwierdzono także jego obecność w genomach wirusów *Archaea*. Gen *plrA* obecny jest również we wszystkich analizowanych dotychczas plazmidach koniugacyjnych *Archaea*. Konserwowana jest także odwrócona powtórzona sekwencja, do której wiąże się białko PlrA, oraz dystans, 65 pz, oddzielający dwie takie sekwencje. Stopień konserwowania tych struktur wskazuje na znaczenie ich funkcji dla komórki [11].

W sekwencji plazmidów z rodziny pING (*S. islandicus*) stwierdzono obecność sekwencji powtórzonych. W przypadku plazmidu pING1 jest to sekwencja TAAACTGGGGAGTTTA. W innych plazmidach koniugacyjnych stwierdzono podobne sekwencje powtórzone, zawierające charakterystyczny motyw czterech reszt guaninowych. W obrębie tych sekwencji może dochodzić do rekombinacji, prowadzących do powstawania delecyjnych form plazmidów. Analogiczne zjawisko opisano dla plazmidów kryptycznych [11].

Zjawisko partycji nie jest dostatecznie zbadane w przypadku plazmidów koniugacyjnych. W strukturze kilku plazmidów znaleziono geny kodujące homologi, lub fragmenty homologów, białek ParA i ParB oraz klaster krótkich powtórzonych sekwencji, które mogą być obszarem wiązania ParB. Można sądzić, że w tych przypadkach mechanizm partycji jest analogiczny do tego obserwowanego w komórkach bakteryjnych.

Opisano rozprzestrzenianie się plazmidów na drodze koniugacji. W tym przypadku nie dochodzi do formowania pili, koniugacja zachodzi poprzez rozległy kontakt komórek. Przebiega dość wydajnie, prowadząc do rozprzestrzenienia się plazmidu na całą hodowlę archeona, plazmidy replikują się do wysokiego poziomu 20–40 kopii na komórkę. W strukturze plaz-

midów dochodzi często do rearanzacji. W wyniku tych procesów niektóre plazmidy tracą geny *parA* i *parB*, co skutkuje spadkiem stabilności plazmidów, a niekiedy ich gubieniem. Delecyjne pochodne plazmidów koniugacyjnych mogą podlegać kokoniugacji.

W pierwszym z dwóch klastrów obserwowanych w strukturze plazmidów koniugacyjnych zlokalizowane jest sześć genów związanych z koniugacją. Dwa z nich wykazują niewielką homologię do genów kodujących bakteryjne białka TraG i TrbE, które uczestniczą w przemieszczaniu jednoniciowego DNA przez błony komórkowe. Motywy Walkera (A i B) wskazują, że białka te mogą hydrolizować ATP, uzyskując w ten sposób energię. Trzecie białko zawiera liczne domeny transmembranowe, które mogą tworzyć pory w błonach komórek gospodarza [11]. Wydaje się, że stosunkowo niewielka liczba białek uczestniczy w procesie koniugacji archeonów, a koniugacja przebiega według innego mechanizmu niż ten opisany dla proteobakterii [20].

4. Integracja do chromosomu

Plazmidy kryptyczne i koniugacyjne *Archaea* mogą kodować integrazy, których aktywność umożliwia odwracalne włączanie plazmidu do DNA chromosomalnego. Miejscem integracji jest najczęściej gen tRNA, podobnie jak w przypadku bakterii, ale integrazy nie wykazują istotnej homologii sekwencji do integras bakterijnych.

Integrazy wykryto u fusellowirusa SSV1 występującego w komórkach *Sulfolobus*, potem homologiczne geny znaleziono w genomach wielu wirusów z tej rodziny [20]. Wydaje się, że plazmidy, w tym plazmidy z rodziny pRN, wykorzystują ten typ integrazy. Miejsce *att* (ang. attachment site), w którym cząsteczka plazmidu zostanie rozcięta, by zostać włączona do chromosomu, znajduje się w obrębie ramki odczytu kodującej integrasę (*int*), w jej początkowej części. Proces integracji prowadzi do uszkodzenia genu, a sekwencja włączona jest oflankowana fragmentami genu integrazy (*intN* i *intC*). Taki obraz stwierdzono dla plazmidów pXQ1 (*S. solfataricus*) i pST1 (*S. tokodaii*). Powstałe w wyniku integracji fragmenty genu *int* znajdowano w genomach różnych archeonów w wielu kopiach, flankują one obszary DNA o wielkości od 4 do 67 kbp. Znajdują się tam zintegrowane plazmidy, ale także geny kodujące enzymy metaboliczne. Ten rodzaj integracji prowadzi do uszkodzenia genu integrazy, jest więc nieodwracalny. Zapewne włączony fragment może zostać wycięty, gdy integrasa zostanie wytworzona dzięki obecności plazmidu, niosącego nieuszkodzony gen, lub obecności wirusa. Komórki *S. acidocaldarius* mają zdolność wymiany materiału genetycznego. Aktywność ta jest łączona z obecnością w ich genomie

plazmidu pSAC3, który otaczają fragmenty *intN* i *intC* integrazy. Opisano także plazmid pST3, należący do rodziny pRN, w przypadku którego miejsce integracji jest zlokalizowane poza sekwencją kodującą genu *int* [11].

Aktywność integrazy kodowanej przez plazmidy koniugacyjne także prowadzi do integracji do chromosomu. Najlepiej zbadanym przykładem jest plazmid pNOB8 pochodzący z *S. solfataricus* [30]. W przypadku plazmidów koniugacyjnych nie dochodzi do rozbicia na części genu integrazy w momencie włączania do chromosomu. Niektórzy autorzy dzielą integrazy na dwie klasy: typ NOB8 – nie podlegające podziałowi przy integracji i typ SSV, w przypadku którego następuje rozerwanie genu *int* [20].

5. Megaplazmidy i plazmidy metaboliczne

Plazmidy o wysokiej masie cząsteczkowej obserwowano w komórkach wielu szczepów halofilnych archeonów. *Haloferax volcanii* niesie trzy plazmidy o wielkości 690, 442 i 86 kbp. W komórkach *Halobacterium* NRC-1 stwierdzono obecność dwóch plazmidów, które określa się jako minichromosomy, gdyż mają wielkość 365 i 191 kbp i zawierają geny niezbędne do funkcjonowania komórki. Duża część ich sekwencji (145 kbp) jest identyczna. Postuluje się, że powstały z połączenia trzech różnych plazmidów, a następnie zostały powiększone przez włączenie genów chromosomalnych przy udziale sekwencji insercyjnych. *Halobacterium salinarium* posiada plazmid pHH1, który zawiera region *vac* grupujący geny warunkują formowanie się kanalików gazowych. Gaz gromadzący się w kanalikach umożliwia komórkom regulowanie poziomu zanurzenia w wodzie, co zapewnia im dostateczny dostęp do światła. Mikroorganizm ten rozwinął niezwykle system pozwalający mu na syntezę ATP z ADP dzięki reakcji fotochemicznej, zachodzącej na błonie cytoplazmatycznej komórki. W plazmidach *Methanobacterium thermoformicicum* zlokalizowano dwa różne systemy restrykcja-modyfikacja [11, 23, 24].

6. Podsumowanie

Archaea stanowią trzecią, najpóźniej odkrytą domenę życia. Ewolucja tych organizmów przebiegała w znacznym stopniu niezależnie od ewolucji pozostałych domen. *Archaea* posiadają szereg właściwości niespotykanych u innych istot żywych. Jest to specyficzna budowa błon komórkowych, własny system enzymów związanych z replikacją DNA, odwrotna gyraza DNA, zapewniająca właściwy stopień zwinięcia DNA u archeonów termofilnych oraz zdolność do metanogenezy archeonów metanogennych.

Stwierdzenie licznej obecności archeonów poza środowiskami ekstremalnymi na pewno zwiększy zainteresowanie tą grupą drobnoustrojów. Trwają badania mające na celu ustalenie wpływu *Archaea* na zdrowie ludzi. Zważywszy na ich niezależną ewolucję można mieć nadzieje, że są to organizmy niepatogenne, ale z drugiej strony brak takich danych może wynikać z braku technik pozwalających na hodowanie tych drobnoustrojów. Opublikowano wyniki badań, które pozwalają wiązać obecność *Archaea* z rozwojem parazytozy [19].

Analiza plazmidowego DNA jest bardzo interesującym obszarem badawczym. Plazmidy *Archaea* posiadają właściwości, które różnią je od plazmidów bakteryjnych. Badania nad plazmidowym DNA to pierwszy krok konstrukcji narzędzi do badań molekularnych nad archeonami. Istnieją już dobre wektory plazmidowe *Archaea*, które umożliwiają przeprowadzanie podstawowych manipulacji genetycznych [1, 11, 17, 20]. Enzymy pochodzące z organizmów ekstremofilnych, ze względu na ich unikatowe cechy, znalazły już wiele zastosowań przemysłowych. Białko Myc, uzyskane z archeonów, znalazło zastosowanie w testach onkologicznych do poszukiwania przeciwciał w surowicy pacjentów, gdyż wykazuje cenną, szczególnie silną reaktywność. Należy jednak pamiętać, że w genomach tych *Archaea*, które w całości zostały zsekwencjonowane, 25–40% genów pozostaje nierozpoznanych, nie przypisano im żadnej funkcji [28]. Liczby te wskazują, jak wiele w przypadku *Archaea* jest jeszcze do odkrycia. Zapewne dotychczas zbadane zostały głównie zjawiska najbardziej podobne do znanych ze świata bakterii i eukariontów.

Piśmiennictwo

- Allers T., Mevarech M.: Archaeal genetics – the third way. *Nature Rev. Genet.* **6**, 58–73 (2005)
- Augustin M.A., Huber R., Kaiser J.T.: Crystal structure of a DNA-dependent RNA polymerase (DNA primase). *Nature Struct. Biol.* **8**, 57–61 (2001)
- Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., Pace N.R.: Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9188–9193 (1996)
- Berkner S., Lipps G.: Characterization of the transcriptional activity of the cryptic plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 and regulation of its replication operon. *J. Bacteriol.* **189**, 1711–1721 (2007)
- Bernander R.: The cell cycle of *Sulfolobus*. *Mol. Microbiol.* **66**, 557–562 (2007)
- Brügger K., Redder P., She Q., Confalonieri F., Zivanovic Y., Garrett R.A.: Mobile elements in archaeal genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 131–141 (2002)
- Brügger K., Torarinnsson E., Redder P., Chen L., Garrett R.A.: Shuffling of *Sulfolobus* genomes by autonomous and non-autonomous mobile elements. *Thermophiles*, **32**, 179–183 (2003)
- DeLong E.F., Pace N.R.: Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* **50**, 470–478 (2001)
- Deppenmeier U.: The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**, 223–283 (2002)
- Erauso G., Marsin S., Benbouzid-Rollet N., Baucher M.F., Barbeyron T., Zivanovic Y., Prieur D., Forterre P.: Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon *Pyrococcus abyssi*: evidence for rolling-circle replication in a hyperthermophile. *J. Bacteriol.* **178**, 3232–3237 (1996)
- Garrett R.A., Redder P., Greve B., Brügger K., Chen L., She Q.: Archaeal plasmids (w) Plasmid biology, red. B.E. Funnel, G.J. Phillips, ASM Press, Washington, DC., 2004, s. 377–392
- Greve B., Jensen S., Brügger K., Zillig W., Garrett R.A.: Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea*, **1**, 231–239 (2004)
- Gribaldo S., Brochier-Armanet C.: The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **361**, 1007–1022 (2006)
- Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., Stetter K.O.: A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, **417**, 63–67 (2002)
- Jahn U., Gallenberger M., Paper W., Junglas B., Eisenreich W., Stetter K.O., Rachel R., Huber H.: *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: new insights into a unique, intimate association of two archaea. *J. Bacteriol.* **190**, 1743–1750 (2008)
- Kletzin A., Lieke A., Urich T., Charlebois R.L., Sensen C.W.: Molecular analysis of pDL10 from *Acidianus ambivalens* reveals a family of related plasmids from extremely thermophilic and acidophilic archaea. *Genetics*, **152**, 1307–1314 (1999)
- Lange M., Ahring B.K.: A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 553–571 (2001)
- Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A.: Phylogenetic systematics of microorganisms inhabiting thermal environments. *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1299–1312 (2007)
- Lepp, P.W., Brinig M.M., Ouverney C.C., Palm K., Armitage G.C., Relman D.A.: Methanogenic *Archaea* and human periodontal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6176–6181 (2004)
- Lipps G.: Plasmids and viruses of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*. *Extremophiles*, **10**, 17–28 (2006)
- Lipps G., Röther S., Hart C., Krauss G.: A novel type of replicative enzyme harboring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO J.* **22**, 2516–2525 (2003)
- Luo Y., Leisinger T., Wasserfallen A.: Comparative sequence analysis of plasmids pME2001 and pME2200 of *Methanobacter marburgensis* strains Marburg and ZH3. *Plasmid*, **45**, 18–30 (2001)
- Nölling J., de Vos W.M.: Characterization of the archaeal, plasmid-encoded type II restriction-modification system *MthII* from *Methanobacterium thermoformicum* THF: homology to the bacterial NgoPII system from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **174**, 5719–5726 (1992)
- Nölling J., de Vos W.M.: Identification of the CTAG-recognizing restriction modification systems *MthZI* and *MthFI* from *Methanobacterium thermoformicum* and characterization of the plasmid-encoded *mthZIM* gene. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5047–5052 (1992)

25. Peng X., Holz I., Zilling W., Garrett R.A., She Q.: Evolution of the family of pRN plasmids and their integrase-mediated insertion into the chromosome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **303**, 449–454 (2000)
26. Pikuta E.V., Hoover R.B., Tang J.: Microbial extremophiles and the limits of life. *Critical Reviews in Microbiology*, **33**, 183–209 (2007)
27. Prato S., Cannio R., Klenk H.-P., Contursi P., Rossi M., Bartolucci S.: pIT3, a cryptic plasmid isolated from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* IT3. *Plasmid*, **56**, 35–45 (2006)
28. Robertson Ch.E., Harris J.K., Spear J.R., Pace N.R.: Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 638–642, (2005)
29. She Q., Brügger K., Chen L.: Archaeal integrative genetic elements and their impact on genome evolution. *Res. Microbiol.* **153**, 325–332 (2002)
30. She Q., Phan H., Garrett R.A., Albers S.V., Stedman K.M., Zilling W.: Genetic profile of pNOB8 from *Sulfolobus*: the first conjugative plasmid from an archaeon. *Extremophiles*, **2**, 417–425 (1998).
31. Tringe S.G., Von Mering C., Kobayashi A., Salamov A.A., Chen K., Chang H.W., Podar M., Short J.M., Mathur E.J., Detter J.C., Bork P., Hugenholtz P., Rubin E.M.: Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, **308**, 554–557 (2005)
32. Ward D.E., Revet I.M., Nandakumar R., Tuttle J.H., de Vos W.M., van der Oost J., DiRuggiero J.: Characterization of plasmid pRT1 from *Pyrococcus* sp. strain JT1. *J. Bacteriol.* **184**, 2561–2566 (2002)
33. Waters E., M. Noordewier i wsp.: The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12984–12988 (2003), (cytowana praca jest dziełem 20 autorów)
34. Woese C.R., Fox G.E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088–5090 (1977)
35. Zhao H., Wood A.G., Widdel F., Bryant, M.P., An extremely thermophilic *Methanococcus* from a deep sea hydrothermal vent and its plasmid. *Arch. Microbiol.* **150**, 178–183. (1988).
36. Zhou M., Xiang H., Sun Ch., Li Y., Liu J., Tan H.: Complete sequence and molecular characterization of pNB101, a rolling-circle replication plasmid from the haloalkaliphilic archaeon *Natronobacterium* sp. strain AS7091. *Extremophiles*, **8**, 91–98 (2004)