

УДК 577.213:579.252.5

РЕПЛИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЛАЗМИД

В. А. САКАНЯН

Обобщены литературные данные о механизмах репликации ДНК и генетической организации репликационных систем многокопийных и малокопийных плазмид. Имеющиеся данные рассмотрены в свете моделей «позитивного» и «негативного» контроля репликации.

Ключевые слова: плазмиды бактериальные, репликация, инициация репликации, контроль репликации, несовместимость плазмид, ДНК.

Плазмиды присутствуют в бактериальной клетке в виде физически разделенных от хромосомы хозяина кольцевых молекул ДНК. Репликация плазмидной ДНК идет полуконсервативно с фиксированной точки, называемой началом вегетативной репликации или *origin*. Репликация исследованных плазмид ColE1, R1, F'lac, λ dv и NR1 осуществляется в течение всего клеточного цикла, и плазмидные матрицы для репликации в клетке отбираются случайным образом. Автономность и способность плазмид стабильно наследоваться в клетках при строго определенном числе копий предполагает, что собственно репликация ДНК и распределение плазмид в дочерние клетки подвержены регуляции. Анализ делеционных мутантов и рекомбинантных производных различных плазмид показывает, что для автономной репликации и контроля числа копий необходим небольшой участок генома, включающий *origin* и прилегающие к нему последовательности ДНК. Этот факт имел принципиальное значение для проведения прецизионных исследований, так как отсутствие несущественных районов в анализируемой плазмидной ДНК снимает нежелательное влияние их генетического фона.

Организация репликационной системы плазмид. Наиболее хорошо изучена репликационная система плазмиды ColE1, имеющей молекулярную длину 6,4 тысячи пар оснований (т. п. о.). Участок ДНК величиной всего 580 пар оснований (п. о.) необходим для автономной репликации плазмиды pBR345—mini-производной плазмиды ColE1 [4, 8]. Репликация ДНК ColE1 иницируется в районе *origin*, идет однонаправленно и завершается в течение двух минут [50, 70]. В обычных условиях плазмидная ДНК присутствует в клетках в 20—30 копиях, но при инкубации клеток с хлорамфениколом может амплифицироваться до 3000 копий [11]. Плазмидная репликация происходит также в обработанных хлорамфениколом клетках при их инфекции гибридными фак-ColE1 репликациями [19, 35] и в бесклеточных экстрактах, полученных из бесплазмидного штамма [87]. Эти данные свидетельствуют о том, что как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* в синтезе ДНК ColE1 не-

участвуют позитивно действующие полипептиды, кодируемые самой плазмидой. Однако описаны *ts* мутации, нарушающие репликацию плазмиды ColE1 [13, 37]. Поэтому можно полагать, что в репликации ColE1 участвует все же белок, кодируемый плазмидой, либо такие *ts* мутации возникли в результате нарушения вторичной структуры молекул РНК, участвующих в репликации ДНК (см. дальше).

Генетические и биохимические исследования показывают, что в репликации плазмиды ColE1 большое значение имеют продукты, кодируемые хромосомой хозяина. Репликация плазмиды ColE1 в клетках и бесклеточных экстрактах зависит от ДНК-полимеразы I [38, 74]. Синтез ДНК ColE1 чувствителен к рифампицину, в условиях *in vitro* требует всех четырех рибонуклеотид-трифосфатов и полностью блокируется антителами к РНК-полимеразе [12, 36]. В синтезе ДНК ColE1 участвует также РНК-аза H [32]. Этот фермент образует 3'-ОН концы в результате эндонуклеотического расщепления РНК в РНК/ДНК гибридах [7]. Плазмиды ColE1 испытывают потребность в ДНК-полимеразе I, РНК-полимеразе и РНК-азе H на ранних этапах репликации ДНК [32]. Это позволило предположить и в последующем доказать, что инициация репликации ColE1 осуществляется через образование РНК-затравок.

РНК-полимераза катализирует на H-нити образование уникального транскрипта, расположенного в районе ДНК до *origin* репликации. (В синтезе ДНК ColE1 тяжелая H-нить является ведомой, а легкая L-нить—ведущей). Синтез транскрипта идет в том же направлении, в котором движется репликационная вилка (рис. 1). После процессинга транскрипта с помощью РНК-азы H образуется продукт длиной 555

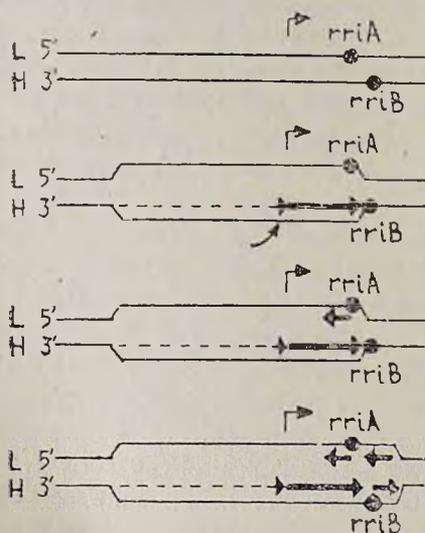


Рис. 1. Инициация репликации ДНК ColE1. Пунктирной стрелкой обозначена РНК-затравка для ДНК-полимеразы I; изогнутой стрелкой—завершение процессинга РНК-затравки РНК-азой H; длинной толстой стрелкой—6S L-фрагмент; короткой толстой стрелкой—дискретные РНК-затравки для ДНК-полимеразы III; прямоугольной стрелкой—*origin* и направление репликации.

нуклеотидов, который служит затравкой для ДНК-полимеразы I при синтезе по крайней мере первых 100 нуклеотидов [33]. Точка на ДНК, соответствующая переходу РНК в ДНК, собственно является сайтом *origin*, как это показано в опытах *in vitro* [5]. Синтезируемая промежуточная форма репликационной нити известна под названием 6S L-

фрагмента [65]. Синтез ведущей нити далее элонгируется с помощью ДНК-полимеразы III [74].

На ранних стадиях синтеза ДНК важно также участие ДНК-гиразы [24]. Если реакция протекает на открытых кольцевых молекулах ДНК ColE1 в присутствии РНК-полимеразы, РНК-азы H и ДНК-полимеразы I, но без ДНК-гиразы, синтеза ДНК не наблюдается [32].

Образование однонитевого 6S L-фрагмента [65] и тот факт, что после формирования РНК-затравки репликация становится устойчивой к рифампицину и синтез ДНК приобретает прерывистый характер [75], позволили предположить участие в репликации ColE1 еще одного механизма, аналогичного превращению однонитевой ДНК некоторых фагов *E. coli* в двунитевую молекулу ДНК.

Известно, что конверсия ДНК фага ФХ174 является рифампицин-устойчивым процессом и происходит с участием праймосомы, состоящей из семи белков—продуктов генов *dnaG* (праймазы), *dnaB*, *dnaC*, и также полипептидов *p*, *p'*, *p''* и *i* [44]. Праймосома формируется в специфическом месте однонитевой ДНК в результате иницирующего взаимодействия *p'* белка с определенной последовательностью фаговой ДНК. Двигаясь вдоль ДНК, праймосома генерирует короткие РНК-затравки.

L- и H-нити ДНК плазмиды ColE1 и ее производного pBR322, клонированные на однонитевых ДНК-содержащих фагах, оказались способными превращаться в двунитевую ДНК [60, 94]. Конверсия ДНК иницируется с двух специфических сайтов на L- и H-нитях, обозначенных *gIIA* (*rifampicin resistant initiation*) и *gIIB* соответственно. Существование двух иницирующих сайтов на противоположных нитях ДНК ColE1 позволяет предположить значительную независимость инициации двух нитей. Возможно, по ходу синтеза 6S L-фрагмента расплетается ДНК и открывается сайт *gIIA* на L-нити (рис. 1). Праймосома связывается с этим сайтом и генерирует синтез коротких РНК-затравок H-нити. Поскольку 3'-ОН конец 6S L-фрагмента перекрывает район локализации *gIIB* сайта в H-нити, то этот сайт в свою очередь может иницировать связывание праймосомы с последующим синтезом РНК-затравок L-нити.

Элонгация синтеза ДНК ColE1 осуществляется с помощью ДНК-полимеразы III [74]. По достижении ДНК-полимеразы III терминирующего участка ДНК, которым является все тот же район *origin*, она возможно, участвует в удалении РНК-затравки. После достраивания бреши в L-нити с помощью ДНК-полимеразы I концы нитей соединяются ДНК-лигазой [29]. Терминация репликации представляется более сложным процессом, который еще требует детального изучения.

Ряд данных говорит против участия иницирующих сайтов *gIIA* и *gIIB* в *in vivo* вегетативной репликации плазмиды ColE1. Делеционные мутанты плазмиды pBR322, лишенные этих сайтов, несмотря на 3-кратное уменьшение числа копий, стабильно наследуются в дочерних клетках [92]. Предполагается, что при плазмидной репликации *p'*-контактирующими сайтами могут выступать и менее специфические последовательности. Возможно, *gIIA* и *gIIB* являются сайтами конверсии мо-

близкой однострелковой ДНК плазмиды ColE1 в двустрелковую форму ДНК в реципиентной клетке [60].

Особый тип плазмид представлен в виде конъюгативного R-фактора R6K. Формально R6K может рассматриваться как промежуточная форма между многокопийными и малокопийными плазмидами. Несмотря на большой размер (38 т. п. о.), эта плазида представлена в клетке в 20—30 копиях. Плазида R6K характеризуется необычным типом репликации. В клетках плазида R6K реплицируется преимущественно с одного origin—*oriA*, несмотря на присутствие в геноме еще двух участков—*oriB* и *oriY* [17, 51]. Точки начала репликации расположены на расстоянии ~1 т. п. о. друг от друга, причем *oriY* занимает центральное положение между двумя другими origin. Репликация ДНК R6K идет однонаправленно в сторону асимметрично расположенного по отношению к *oriA* уникального терминирующего сайта. Затем репликация следует в другом направлении из того же origin и завершается в сайте терминирования [16, 51]. Такой последовательно двунаправленный тип репликации, возможно, характерен только для плазмиды R6K, так как клонированный в составе ColE1 терминирующий участок ДНК не придает репликации этой плазмиды двунаправленного характера, хотя наблюдается задержка в движении репликационной вилки [41].

Фрагмент ДНК размером 2,5 т. п. о., содержащий сайты *oriA*, *oriB* и *oriY*, может быть выделен в виде автономного репликона [42]. Для репликации ДНК R6K *in vitro* необходим транс-действующий фактор, так как синтез ДНК протекает только в присутствии экстракта из R6K-штамма. Более того, если экстракт получен из штамма, содержащего *ts* по репликации плазмиды R6K, то и *in vitro* синтез ДНК будет носить температурочувствительный характер [30]. Этот позитивно действующий фактор был идентифицирован как белок с мол. весом 35.000 и обозначен π [40]. Ген *piG*, кодирующий белок π , локализуется рядом с *oriY*. Ген *piG*, будучи в клонированном состоянии, обеспечивает автономную репликацию фрагмента ДНК, который содержит только *oriY*, но не *oriA* или *oriB* [43]. Зависимость инициации репликации в участках *oriA* и *oriB* от присутствия в ДНК участка *oriY* предполагает наличие цис-активного события, происходящего в районе *oriY*. Это может быть транскрипция РНК в направлении *oriA* и *oriB* с промоторов, локализованных в районе *oriY*. Образующиеся транскрипты или опосредованные ими процессы могут запускать вегетативную репликацию с *oriA* и/или *oriB*. При отсутствии участков *oriA* и *oriB* или в обычных условиях с низкой частотой инициация репликации осуществляется непосредственно и с *oriY* [15, 31].

Другие крупные плазмиды также имеют сложную организацию репликационной системы. В геноме F-фактора (94 т. п. о.) имеется два района, способных автономно существовать в виде mini-репликона. Один из них расположен в районе 32,6—35,4 F [47], другой в районе 40,3—49,4 F карты плазмиды F [49]. (Для координат карты F-фактора принято обозначение F). Наследование mini-F репликона, несущего район 32,6—35,4 F, характеризуется нестабильностью, зависимостью от ДНК-полимеразы I и устойчивостью к акридиновому окраске [47]. По-

видимому, этот район определяет вторичные репликационные функции, тогда как аналогичный район в геноме ColV-K94 выступает как первичный репликон [55].

Детальный анализ mini-F репликона, несущего район 40,3—49,4 F, показал, что он содержит два участка origin. Один из них—ori-1, или oriV, локализован при 42,6 F [21], а другой—ori-2, или oriS,—при 45,1 F [36]. Как ori-1, так и ori-2 функциональны в клетках [21]. Делегированием участка ori-1 из mini-F репликона получен более маленький репликон величиной всего 2,3 т. п. о., который охватывает район ДНК с координатами 44,1—46,4 F и содержит участок ori-2 [36, 59]. Участок ori-2 поддерживается во фрагменте величиной 1140 п. о. в автономном состоянии, если в клетке присутствует транс-действующий фактор, кодируемый сцепленным с ori-2 сегментом ДНК [84]. Этим фактором может быть белок с мол. весом 29.000 дальтон, который в клетках синтезируется в небольшом количестве [59].

В геноме R-фактора R6-5 (100 т. п. о.) также обнаружено три участка—герА, В и С, которые определяют функции наследования и поддержания плазмидной ДНК [82]. Однако для автономной репликации плазмиды достаточен небольшой участок ДНК, несущий герА, origin и ген сор, контролирующий число копий [81].

Способность ряда плазмид стабильно наследоваться в неродственных бактериях свидетельствует о независимости их репликационных функций от функций бактерии-хозяина и/или биологической адаптации их репликационных систем к различному цитоплазматическому окружению. К таким плазмидам с широким спектром хозяев относятся представители Inc P, Q и W-групп грам-отрицательных бактерий, а также некоторые плазмиды грам-положительных бактерий. Наиболее хорошо изучена репликационная система Inc P плазмиды RP4 или RK2.

В отличие от всех описанных плазмид у RP4 в районе origin не сгруппированы все функции, необходимые для автономной репликации [66, 78]. Минимальный район ДНК, который может быть изолирован из генома RP4 в виде автономного репликона без прерывания естественного хода жизненно важных участков ДНК, имеет величину 8 т. п. о. [2]. Он включает в себя два ранее идентифицированных участка—oriV, с которого начинается односторонняя репликация ДНК [52], и trfA (trans-acting replication function), который кодирует транс-действующий продукт, необходимый для автономной репликации mini-плазмид, содержащих только район origin величиной около 400 п. о. [22, 79]. Информация, кодируемая этими двумя участками, достаточна для наследования плазмидного генома не только в клетках *E. coli*, но и в клетках таких неродственных бактерий, как *Pseudomonas* и *Rhizobium* [2, 67]. Разбросанный характер генов репликационной системы показан и для других Inc P плазмид—R751 [53] и R906 [1]. Возможно, это является особенностью плазмид с широким спектром хозяев.

В отличие от плазмид с узким спектром хозяев инициация репликации IncQ плазмиды с широким спектром хозяев RSF1010 (8,9 т. п. о.) в системе *in vitro* не зависит от РНК-полимеразы клетки хозяина. Кро-

же того, добавление к бесклеточным экстрактам *P. aeruginosa* ДНК-полимеразы I и ДНК-гиразы *E. coli* частично восстанавливает репликацию плазмиды ColE1 [18]. Возможно, именно различие в специфичности этих ферментов у грам-отрицательных бактерий ограничивает спектр репликации ColE1-подобных плазмид с узким спектром хозяев в пределах Enterobacteriaceae и родственных микроорганизмов.

Регуляция репликации плазмидной ДНК. Впервые существование активного механизма регуляции репликации было продемонстрировано Жакобом с соавт. [34]. Они выдвинули концепцию репликона, согласно которой молекула ДНК является регуляторной единицей репликации. В контроле репликации участвуют два различных компонента — структурный ген, кодирующий транс-действующий белок-инициатор, и цис-активный оператор репликации (репликатор), который специфически узнается инициатором. Эта гипотеза, известная под названием модели «позитивной» регуляции репликации, предполагает также существование специфической связи между реплицирующейся ДНК (в участке гена инициатора) и мембраной. Из-за присутствия на мембране строго определенного числа таких сайтов в клетке одновременно может находиться только ограниченное число копий одной и той же плазмиды. Две родственные плазмиды, конкурируя за эти сайты, исключают репликацию друг друга, что фенотипически выражается в их несовместимости.

Предложена также модель «негативной» регуляции репликации ДНК [64], по которой ключевая роль принадлежит белку-репрессору (или другому транс-действующему элементу). Репрессор специфически соединяется с оператором и ингибирует инициацию синтеза ДНК. Во время клеточного роста снижается критический уровень репрессора (поэтому модель еще называют «моделью разведения репрессора»), и иницируется новый раунд репликации. Структурный ген для репрессора располагается непосредственно за точкой репликации, и он сразу же активируется после дубликации ДНК. Родственные плазмиды имеют одинаковый ген репрессора и одинаковую мишень для него. Поэтому при соответствующей концентрации репрессора ингибируется синтез ДНК одной из плазмид, что также фенотипически выражается в их несовместимости.

Исследования, проведенные на различных плаزمидах, показывают, что действительная картина регуляции репликации ДНК значительно сложнее. Не вызывает лишь сомнения (как это следует из обеих моделей), что плазмидный репликон кодирует информацию, функционально значимую для своей репликации в цис- и транс-положениях.

Два участка генома ColE1 кодируют информацию, необходимую для регуляции репликаций. Один из них расположен до origin репликации и входит в состав минимального района ДНК, способного обеспечить автономную репликацию плазмиды [28]. Этот участок промоторирует синтез транскрипта РНК I длиной 108 нуклеотидов [48]. Транскрипция РНК I начинается с сайта, расположенного в L-нити и терминируется тесно с сайтом инициации транскрипции РНК-затравки для ДНК-полимеразы I [56]. Таким образом, кодирующая РНК I после-

доказательность ДНК полностью перекрывается на противоположной нити с кодирующей РНК-затравку последовательностью. Анализ кодирующих возможностей района расположения РНК-затравки и РНК I показывает, что этот район не транслируем из-за присутствия терминирующих кодонов трансляции в обоих направлениях и во всех трех рамках считывания [62]. Это позволило предположить, что регуляция инициации репликации плазмиды ColE1 происходит с участием РНК I [14].

Доказательство участия РНК I в регуляции репликации ДНК ColE1 основано на биохимических и генетических данных. Во-первых, очищенный транскрипт РНК I в условиях *in vitro* блокирует созревание РНК-затравки для ДНК-полимеразы I образованием РНК/РНК гибрида [88]. Во-вторых, мутации, изменяющие число копий ColE1, картируются в кодирующей РНК I последовательности ДНК [14, 45, 58, 85]. Спонтанная реверсия, вернувшая число копий одного из инсерционных высококопийных мутантов на прежний уровень, связана с потерей вставки и синтезом нормального транскрипта РНК I [14].

Некоторые высококопийные мутации плазмиды ColE1 оказались транс-рецессивными в отношении плазмиды дикого типа [57, 69]. Снижение числа копий высококопийных мутантов в присутствии ингибирующего продукта, кодируемого плазмидой дикого типа, является доказательством негативного характера регуляции репликации ДНК ColE1. Увеличение числа кодирующих РНК I последовательностей путем клоирования соответствующего участка ДНК в несущественном районе плазмиды ColE1 приводит к пропорциональному снижению числа плазмидных копий. При этом пропорционально увеличивается и количество транскрибируемых молекул РНК I [57]. Такая зависимость числа копий плазмиды от числа кодирующих РНК I последовательностей свидетельствует о значении «критического уровня» РНК I транскриптов в негативной регуляции репликации.

Чтобы выделить транс-доминантные мутанты плазмиды ColE1, имеющие измененную мишень для потенциального репрессора плазмидной репликации, Цезарени с сотрудниками разработали изящный подход [9, 45], используя для этой цели так называемую фазмиду—гибрид, полученный *in vivo* интеграцией в геном фага λ плазмиды, содержащей att сайт. Такая молекула упаковывается в головку фага λ , и соответственно плазмидные последовательности ДНК могут быть внесены в различные бактерии в результате фаговой инфекции. Фазмида способна размножаться на гомоиммунном лизогене вследствие тигрования фагового репрессора (в клетке имеются дополнительные копии оператора λ , возникающие в результате репликации гибрида с плазмидного origin). Присутствие в лизогенном штамме резидентной плазмиды той же группы несовместимости предотвращает литическое развитие фазмиды, так как ее репликация ингибируется репрессором резидентной плазмиды. Следовательно, только фазмида с мутировавшей мишенью для репрессора будет спасаться от ингибирования и она будет вирулентна по отношению к клеткам, содержащим резидентную плазмиду. По этой схеме были получены svir мутанты (supervirulent).

Если мутанты способны существовать в виде автономного репликона, то плазмидную часть можно эксцизировать из фазмиды в клетках с конститутивным синтезом λ -интегразы.

О локализации мутаций в мишени для репрессора плазмиды ColE1 говорит тот факт, что многокопийные *sviG* варианты транс-доминантны—число их копий не уменьшается в присутствии в клетке плазмиды дикого типа. В то же время *sviG* мутанты совместимы с плазмидой дикого типа и друг с другом, но несовместимы в отношении собственного репликона. Следовательно, у *sviG* мутантов изменена не только мишень для репрессора, но каждый из них синтезирует к тому же измененный репрессор, который неактивен в отношении мишени родительской плазмиды и других *sviG* мутантов, но активен в отношении собственной мишени [9]. Аналогичное заключение сделано и на основании анализа высококопийных производных плазмиды ColE1, преимущественно выделенных как *inc⁻* мутанты [85]. Мутации *inc⁻* и *sviG* оказались кластрированными в двух местах кодирующей РНК I последовательности ДНК [45, 85].

Таким образом, мутация в мишени вызывает комплементарное изменение самого репрессора. Однако при таком изменении специфичности механизма контроля числа копий и несовместимости сам механизм контроля остается функциональным. Это является примером биологической адаптации плазмидного генома—несмотря на эволюцию, геном обеспечивает сохранение своей функции [45].

Каким же образом РНК I выполняет роль репрессора в регуляции репликации? Возможный механизм был подсказан первичной структурой самого транскрипта [45]. РНК I имеет высокую степень внутренней симметрии [56], которая в нормальных физиологических условиях может придать молекуле форму тРНК—структуры с тремя двунитевыми стеблями и тремя однонитевыми петлями (рис. 2). Такая же структура может формироваться в комплементарной РНК I области предшественника РНК-затравки. Структура «клеверного листка» способна к активному взаимодействию с нуклеиновой кислотой по типу «кодон—антикодон» взаимодействия между тРНК и мРНК.

Важность вторичной структуры РНК I в осуществлении ингибирующего действия транскрипта на инициацию репликации вытекает из следующих наблюдений. Большинство одиночных мутаций, приводящих к повышению числа копий ColE1-производных, затрагивают петли и представляют собой трансзицию Г-Ц→А-Т [45, 46, 85]. Известно, что свободная энергия водородных связей между А и У нуклеотидами слабее, чем между Г и Ц. Поэтому у мутантов можно ожидать снижение контактирующей способности петель. Действительно, у высококопийных мутантов изменения, затрагивающие петли «клеверного листка», снижают способность РНК I ингибировать формирование РНК-затравки и снижают чувствительность самой затравки к ингибирующему действию РНК I [85]. Причем следует отметить, что ингибирующее влияние РНК I не связано с воздействием на инициацию или элонгацию транскрипции предшественника РНК-затравки, а обусловлено нарушением формирования РНК/ДНК гибрида между затравкой и

матрицей ДНК [88] из-за нарушения процессинга РНК-затравки [86].

Петли транскрипта РНК I имеют разную функциональную значимость, так как транс-рецессивные высококопийные мутации картируются в районе расположения петли III [57, 69], тогда как транс-доминантные мутации—в центральной петле II [45, 46]. Это можно объяснить только тем, что мутации в петле III влияют на способность репрессора ингибировать репликацию, но не влияют на чувствительность РНК-затравки к действию транскрипта РНК I, а мутации в петле II комплементарно отражаются как на свойствах репрессора, так и на мишени для него. Возможно, всего 7 оснований определяют специфичность взаимодействия между РНК I-репрессором и РНК-затравкой—5 оснований в петле II и 2 основания в петле III «клеверного листка» [46].

Последовательность ДНК, соответствующая стеблю и петле I «клеверного листка», гомологична обратному ориентированному участку в кодирующей РНК-затравку последовательности ДНК. Этот участок ДНК отстоит от основания стебля петли I приблизительно на 70 нуклеотидов в сторону *origi*n. Спаривание оснований между указанными гомологичными участками предшественника РНК-затравки может привести к образованию более стабильной структуры с петлей IV (рис. 2).

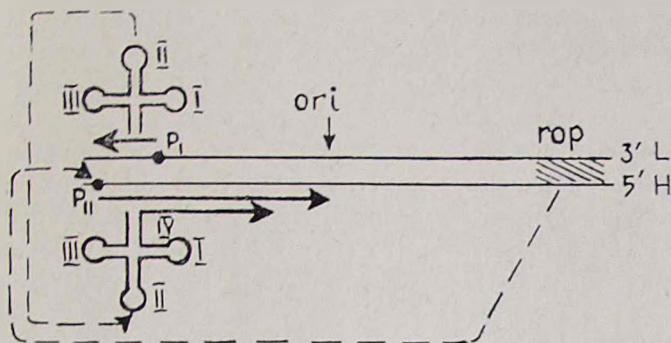


Рис. 2. Модель негативной регуляции инициации репликации плазмиды ColE1. Сокращения обозначают: P_I—промотор для транскрипта РНК I; P_{II}—промотор для РНК-затравки; I, II, III—петли в РНК I и предшественнике РНК-затравки; IV—расположение петли IV в последовательности предшественника РНК-затравки.

чем стебель петли I. Не исключено, что именно спаривание РНК I с предшественником РНК-затравки блокирует образование потенциально более стабильной структуры в самом предшественнике, которая важна для созревания РНК-затравки [85].

Другой участок, вовлеченный в регуляцию репликации ColE1, расположен в несущественном для плазмиды районе. Делеции, затрагивающие участок ДНК на расстоянии приблизительно 600 п. о. за районом *origi*n репликации, приводят к увеличению числа копий [90]. Это повышение копийности комплементируется родственной плазмидой дикого типа, что говорит о кодировании в делетированном участке диффундирующего продукта, негативно регулирующего репликацию в транс-положении. Продукт соответствующего гена, обозначенного *rop* (repressor of primer) ингибирует транскрипцию с клонированного про-

мотора предшественника РНК-затравки, но не транскрипта РНК I [10]. В *mini*-клетках *E. coli* удалось идентифицировать продукт гена *gor*. Им оказался небольшой полипептид из 63 аминокислот с мол. весом 6.500 дальтон. Однако в физиологических условиях белок, возможно, присутствует в виде димера.

Ингибирующим действием на транскрипцию предшественника РНК-затравки плазмиды ColE1 обладают также *Rep* белки плазмиды pMB1 (в большей степени) и плазмид ColK и CloDF 13 (в меньшей степени). Нуклеотидные последовательности генов *gor* плазмид ColE1 и pMB1 очень похожи, они отличаются лишь 11 одиночными заменами, расположенными в третьей позиции кода, что не изменяет кодируемую аминокислоту [10].

Таким образом, плаزمида ColE1 обладает двумя механизмами регуляции инициации репликации (рис. 2). Оба механизма осуществляются по принципу негативной регуляции с участием двух различных по природе веществ—молекулы РНК и молекулы низкомолекулярного полипептида. Биологический смысл такой дублированной регуляции и порядок функционирования регуляторных механизмов репликации пока остается неясным.

Поскольку репликация многокопийных плазмид типа ColE1 подвержена действию механизмов строгой регуляции, то используемый относительно таких геномов термин «плазмиды с ослабленным контролем регуляции» лишен смысла.

Минимальный репликон плазмиды R6K состоит из двух компонентов—гена *rig*, кодирующего позитивно-действующий белок π , и участка *ori γ* , являющегося потенциальной мишенью для белка π [43]. Дополнительно можно отметить, что синтез ДНК R6K в условиях *in vitro* ингибируется избытком плазмидной ДНК [30]. Следовательно, активность белка π снижается из-за его титрования в результате связывания с большим количеством мишеней. С другой стороны, число копий *ori γ ⁺*-плазмид *in vivo* не зависит от того, присутствует ли *rig* ген в одной копии, когда он интегрирован в хромосоме хозяина, или во многих копиях в составе многокопийной плазмиды [43]. Значит, концентрация белка π определяет копийность *ori γ ⁺*-плазмид, что говорит об ауторегулируемом механизме экспрессии π белка. Эти данные позволили предположить двойственную функцию белка π —участие как в инициации репликации, так и в контроле числа копий плазмидной ДНК.

В участке *ori γ* -плазмиды R6K обнаружено 8 прямых повторов, состоящих из 22 п. о. каждый (рис. 3), 7 из которых расположены друг за другом, а между ними находятся другие, более короткие повторы из 13 п. с. каждый [71, 72, 76]. Общее число коротких повторов достигает 14, два из которых располагаются в промоторе *rig* гена [25, 76]. Эти повторы отсутствуют в участках *ori α* и *ori β* [40]. Делеция одного из повторов в большом кластере приводит к снижению копийности репликона, тогда как при более протяженной делеции жизнеспособного репликона не образуется. Следовательно, повторы участвуют в регуляции репликации ДНК [40].

Повторы плазмиды R6K участвуют непосредственно в инициации репликации и регуляции инициации репликации с участием белка π [76 и Д. Хелински, личное сообщение]. Во-первых, такие же корот-

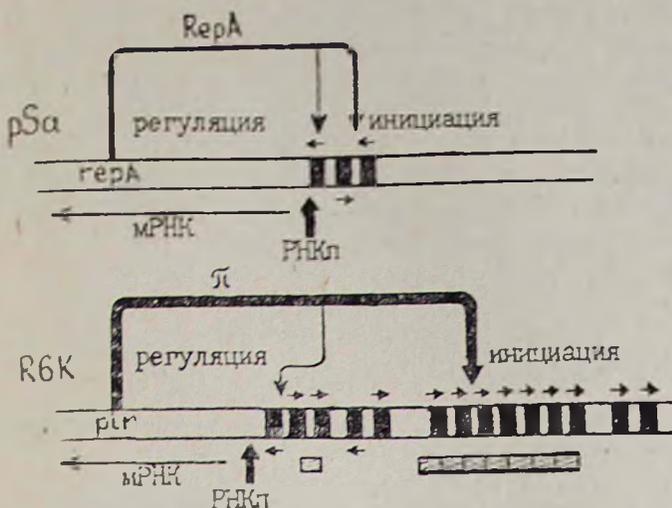


Рис. 3. Организация участка origin плазмид pSa и R6K. Черными прямоугольниками обозначены повторы из 13 п. о., короткие стрелки отмечают их ориентацию. Локализация 8 повторов из 22 п. о. отмечена заштрихованными прямоугольниками. Толщина стрелок отражает эффективность функционирования белков-инициаторов у двух плазмид.

кие повторы обнаружены в районе origin малокопийной плазмиды pSa, и плазмиды R6K (скорее кодируемый ею белок π) комплементирует дефектную по репликации герА мутацию родственной плазмиды pSa. Во-вторых, мутации в прямых повторах влияют на связывание π белка с ДНК и инактивируют репликационную функцию origin репликона R6K. Различное число коротких повторов в origin плазмид pSa и R6K может отражать различную афинность этих участков в отношении плазмидо-кодируемых белков-инициаторов репликации—RepA и π , соответственно, копияность этих плазмид. Предполагается, что в низких концентрациях белок π связывается с прямыми повторами и инициирует репликацию ДНК. В высоких же концентрациях белок связывается с повторами промотора своего же гена и препятствует связыванию РНК-полимеразы. Кроме того, белок π в высоких концентрациях может остановить непосредственно и репликацию ДНК, связываясь с повторами, участвующими в инициации репликации (Д. Хелински, личное сообщение).

Участие палиндромов и прилежащих последовательностей ДНК в регуляции инициации репликации показано и для F-фактора. В участке ori-2 имеется два взаимно обратных ориентированных кластера прямых повторов. Один кластер состоит из 4 повторов, каждый из которых содержит 19 п. о., другой—из 5 аналогичных повторов, по 22 п. о. (рис. 4). Между кластерами имеется кодирующая последовательность для белка в 29.000 дальтон и 3 последовательности с откры-

тыми рамками считывания для кодирования гипотетических белков в 9.000 дальтон [59, 83]. В этом же участке кроме *ori-2* находятся локусы *inc*, *cop* и *aos*⁺ (чувствительность к акридиноранжу). *Cop*-мутанты *mini-F* репликона можно разделить на два класса [68]: химически индуцированные мутации, которые картируются вне повторов, повышают копиюность более чем в 10 раз, не влияя на чувствительность к акридиноранжу и оказывают негативное действие на экспрессию локусов *incB* и *incC*; индуцированные транспозоном *Tn3* мутации, локализующиеся непосредственно в правом кластере повторов, приводящие к небольшому повышению копиюности, вызывающие устойчивую к акридиноранжу репликацию и инактивирующие функции локуса *incC*. Такое различие между копиюными мутантами говорит в пользу присутствия в указанном участке двух *cop* генов (рис. 4).

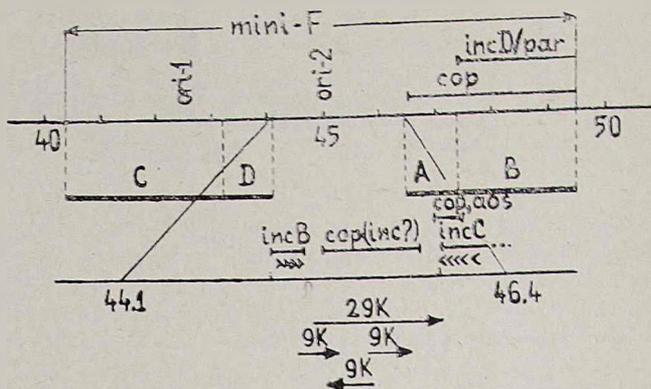


Рис. 4. Структура *mini-F* репликона. Открытыми стрелками отмечены прямые повторы, состоящие из 19 п. о. и 22 п. о. А, В, С, D—идентифицированные белки; 29 К—белок в 29.000 дальтон; 9 К—гипотетические белки в 9.000 дальтон.

Повышение числа копий *mini-F* репликона наблюдается и при удалении всех 5 повторов правого кластера [89]. Более того, соединение правого кластера повторов с остатком автономного репликона в любой из двух ориентаций в геноме *pBR322* приводит к уменьшению числа копий плазмиды при отключении *ColE1*—репликационных функций. Значит, правый кластер повторов участвует в контроле числа копий *mini-F* репликона независимо от ориентации [89].

Возможно, в регуляции числа копий плазмиды *F* участвует также район ДНК с координатами 46,2—49,2 *F*, так как делеция этого района приводит к повышению копиюности в 1,5—2 раза [68].

Несмотря на большую информацию о структурной организации жизненно важных участков генома *F*, тонкие механизмы регуляции репликации плазмидной ДНК во многом еще неясны. С одной стороны, в нем участвует транс-комплементирующий участок ДНК, кодирующий белок в 29.000 дальтон (возможно, действие белка позитивное). Будучи интегрированным в хромосоме или в *F* репликоне, этот участок поддерживает число копий *ori-2*⁺ плазмид на уровне, характерном для

родительской плазмиды. Из трех представителей *inc F I* группы—R386, R778 и R455—только последний частично комплементирует функции транс-действующего фактора [84]. Интересно, что плазмиды R386 и R778, в отличие от R455, не имеют гомологии с транс-активным участком F-фактора [63]. С другой стороны, гены плазмиды дикого типа в транс-положении комплементируют *cor⁻* мутации, что является свидетельством негативного контроля репликации плазмиды F [39]. Репрессором инициации репликации может быть один из гипотетических полипептидов с мол. весом 9.000 дальтон.

Негативный контроль репликации показан и для плазмиды R1 как в комплементационном тесте *cor⁻* мутантов с плазмидой дикого типа [91], так и по ингибированию репликации многокопийных *amb⁺* мутантов в присутствии в клетке строгого *amb⁺* супрессора [26]. Существование среди так называемых «безудержных» («runaway») *ts*-мутантов (они реплицируются без регуляции числа копий при высокой температуре) *inc*-доминантных вариантов говорит о том, что регуляция репликации плазмиды R1 осуществляется по принципу действия репрессора на мишень репликации, а не по принципу ауторегуляции [27].

У плазмиды с широким спектром хозяев RP4 мишенью для позитивно действующего фактора, кодируемого *trfA* участком, является *oriV*. Возможно, синтез этого фактора осуществляется по принципу ауторегуляции, так как *trfA* участок, будучи представленным одной копией в хромосоме бактерии, тем не менее обеспечивает репликацию *oriV⁺* репликаона на уровне 4—5 копий, характерном для плазмиды RP4 [77].

В участке *origin* плазмиды RP4 обнаружено 8 прямых повторов, состоящих из 17 пар оснований каждый, которые сгруппированы в два кластера по 3 и 5 повторов [73]. Между этими кластерами обнаружены последовательности, специфичные для транскрипции РНК (рис. 5).

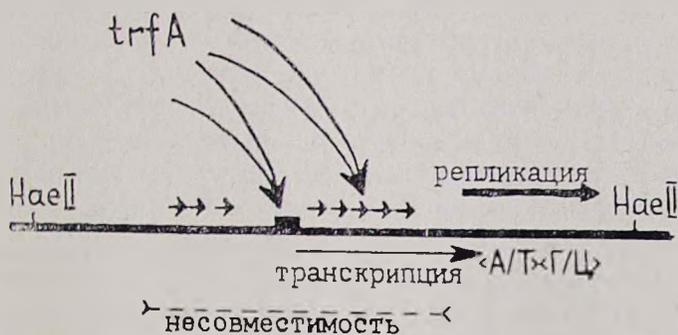


Рис. 5. Возможная роль последовательностей района *origin* плазмиды RP4. Короткие стрелки показывают положение прямых повторов; темный прямоугольник—положение Прибою-бокса; А/Т и Г/Ц—положение богатых этими нуклеотидами участков. Большие стрелки показывают возможные мишени действия транс-действующих продуктов гена *trfA*.

Возможно, аналогично плазмиде ColE1 (см. выше) синтезируемый транскрипт после процессинга выступает в качестве затравки для синтеза ДНК, или аналогично ДНК фага λ [20] осуществляет транскрип-

ционную активацию дальше отстоящего участка, вовлеченного в инициацию репликации. Во всяком случае, делеция в Г-Ц богатой последовательности, идентифицированной в этом участке, отражается на репликационных свойствах плазмиды.

Отсутствие разработанных *in vitro* систем репликации для крупных плазмид является серьезным препятствием для проверки многих предположений о механизмах инициации репликации и регуляции репликации плазмидной ДНК.

Несовместимость плазмид. Феномен несовместимости лежит в основе общепринятой классификации плазмид по группам несовместимости, так как предполагает родственность плазмидных репликонов. Согласно гипотезам «позитивного» и «негативного» контроля репликации, несовместимость должна реализовываться теми же механизмами, которые контролируют число копий.

Плазмиды ColE1, p15A, RSF1030 и CloDF13 имеют гомологию в жизненно важных участках генома и характеризуются рядом общих свойств, вплоть до регуляции образования РНК-затравки для репликации ДНК. Тем не менее эти плазмиды относятся к разным группам несовместимости.

Показано, что РНК I транскрипты этих плазмид не способны взаимно ингибировать образование РНК-затравок [88]. Следовательно, репрессор РНК I ColE1-подобных плазмид характеризуется строгой специфичностью. Эта специфичность определяется петлями «клеверного листка», так как мутации, влияющие на свойства несовместимости, затрагивают структуру петель [45, 57, 85]. Более того, как отмечалось выше, единственная замена нуклеотида в структуре центральной петли репрессора РНК I приводит к изменению специфичности плазмиды—появлению мутанта со свойствами новой группы несовместимости [45, 85]. Интересно, что появление новой группы несовместимости не обязательно сопровождается повышением числа копий плазмидной ДНК. Однако это не означает, что изменение свойств несовместимости произошло без участия механизма контроля числа копий плазмиды ColE1. Единственная описанная такая мутация вызывает трансзицию А-Т→Г-Ц. Следовательно, эта мутация приводит к более строгому ингибированию образования РНК-затравки в результате более эффективного контакта между нуклеотидами РНК-затравки и репрессора РНК I и, соответственно, вместо ослабления—к усилению контроля числа копий [9, 45].

Как ни странно, продукт гена *gor* ColE1-подобных плазмид не участвует в экспрессии несовместимости. Плазмиды ColE1 и ColK, синтезируя перекрестно-действующие репрессоры транскрипции РНК-затравки, тем не менее полностью совместимы [10, 90].

Таким образом, несовместимость ColE1-подобных плазмид определяется специфичностью взаимодействия ингибитора РНК I с мишенью предшественника РНК-затравки, и для ColE1-подобных плазмид несовместимость не отражает существующую их родственность.

Более сложными представляются организация и функционирование генов, участвующих в экспрессии несовместимости крупных плазмид.

мид. Предполагается, что несовместимость у крупных плазмид связана с функциями специального механизма распределения. Однако, в отличие от «позитивного» контроля репликации, сайты распределения не связаны с репликационной системой плазмид, и распределение плазмидных реплик в дочерние клетки происходит в результате случайного выбора [61].

В F-факторе идентифицировано несколько локусов, функции которых отражаются на свойствах несовместимости. На рис. 4 видно, что в кластерах прямых повторов участка *ori-2* картируются локусы *incB* и *incC*. Как отмечалось ранее, прямые повторы непосредственно участвуют в регуляции репликации. Правый кластер, охватывающий локус *incC*, будучи клонированным на разных векторах, в зависимости от числа копий детерминирует разный уровень несовместимости [89]. Возможно, локусы *incB* и *incC*, являясь специфическими сайтами связывания, определяют свойства несовместимости через титрование репликационных компонентов или через блокирование репликационных сайтов. В таком случае несовместимость выступает как некое последствие истинных функций этих локусов.

Вне участка жизненно важных генов репликона *mini-F* обнаружен еще один локус—*incD*. Небольшой размер этого локуса (всего 0,3 т. п. о.) предполагает, что ни один из четырех идентифицированных полипептидов для *mini-F* репликона [93] не ответствен за активность *incD*. Этот локус проявляет *inc*-доминантность в отношении функций поддержания многокопийного вектора, в котором он клонирован. Рекомбинантные плазмиды, несущие *incD* локус, теряются из дочерних клеток с более высокой частотой, чем исходный вектор [23]. Причина этого эффекта не установлена, однако это наблюдение, наряду с другими данными, позволяет предположить, что локус *incD* участвует в процессе распределения плазмидных реплик в дочерние клетки.

Результаты гибридизационного анализа подтверждают сложность организации и функционирования *inc* генов плазмид FI группы. Как и странно, наиболее общим для этих плазмид является локус *incE*, расположенный в участке вторичного репликона [47], тогда как другие *inc* локусы встречаются у различных плазмид в разных комбинациях [6].

Результаты изучения плазмид других групп подтверждают, что несовместимость может реализоваться не только через механизмы контроля репликации, но и механизмы распределения плазмидных реплик, как и другие, пока неидентифицированные процессы [3, 54, 80].

Таким образом, репликация ДНК является одним из важнейших процессов, определяющих стабильное наследование и поддержание в бактериальных клетках плазмидного генома. Различные плазмиды характеризуются уникальными особенностями как в отношении организации репликационных систем, так и в регуляции инициации репликации ДНК. Многие стороны репликации плазмид остаются неясными, и можно надеяться, что с разработкой *in vitro* систем репликации для крупных плазмид будет яснее биологический смысл организации и функционирования плазмидных репликонов.

Репликация бактериальных плазмид осуществляется по тем же фундаментальным принципам, что и репликация геномов более развитых организмов. Более того, в районе origin хромосом некоторых бактерий обнаружены палиндромные структуры, идентичные плазмидным палиндромам. Это предполагает существование общих регуляторных элементов у репликонов разного уровня организации. Поэтому изучение репликации на модели бактериальных плазмид имеет большое значение, тем более что небольшой молекулярный вес плазмид, легкость манипулирования с ними способствуют изучению таких сторон репликации ДНК, которые невозможны на других объектах. Выяснение молекулярных основ регуляции репликации плазмидной ДНК важно также с точки зрения конструирования усовершенствованных векторов для генной инженерии.

Автор благодарен доктору Д. Хелински (США) за предоставление неопубликованных данных.

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, г. Ереван

Поступило 20.IV 1984 г.

ԲԱԿՏԵՐԻԱԿ ՊԼԱՉՄԻԴՆԵՐԻ ՌԵՊԼԻԿԱՑԻԱՆ

Վ. Ա. ՍԱԲԱՆՅԱՆ

Հոդվածում ընդհանրացված են գրական տվյալները բազմօրինակ և քիչ օրինակ պլազմիդների ԴՆԹ-ի ռեպլիկացիայի և ռեպլիկացիոն սիստեմների գենետիկական կառուցվածքի մասին: Եղած տվյալները վերլուծված են պլազմիդների ռեպլիկացիայի և անհամատեղելիության ֆենոմենի «պոզիտիվ» և «նեգատիվ» կոնտրոլի մոդելների հիման վրա:

REPLICATION OF BACTERIAL PLASMIDS

V. A. SAKANYAN

Literature data on the mechanisms of DNA replication and genetical organization of replication systems of plasmids have been presented. Data are discussed from the point of view of modes of replication for "positive" and "negative" control and the expression of incompatibility of bacterial plasmids.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Азарян Н. Г., Саканян В. А. Биолог. ж. Армения, 36, 836—841, 1983.
2. Добровольски П., Рябченко Л. Е., Чернышева И. П., Саканян В. А., Алиханян С. И. Докл. АН СССР, 268, 700—705, 1984.
3. Саканян В. А., Крупенко М. А., Рябченко Л. Е., Пермогоров В. И., Алиханян С. И. Генетика, 15, 972—983, 1979.
4. Backman K., Betlach M., Boyer H. W., Yanofski S. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43, 69—76, 1978.
5. Bastia D. Nucleic Acids Res., 4, 3123—3142, 1977.

5. Bergquist P. L., Lane H. E. D., Malcolm L., Dornard R. A. J. *Gen. Microbiol.*, 128, 223-240, 1982.
7. Berkower I., Lels J., Hurewitz J. *J. Biol. Chem.*, 248, 5914-5921, 1973.
8. Bellvar F., Bellach M. C., Heyneber H. L., Shine J., Rodriguez R. L., Boyer H. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5265-5269, 1977.
9. Cesareni G. *Mol. Gen. Genet.*, 184, 40-45, 1981.
10. Cesareni G., Muesing M. A., Politsky B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6313-6317, 1982.
11. Clewett D. B. *J. Bacteriol.*, 119, 667-675, 1972.
12. Clewett D. B., Evenchick E., Cranston Y. W. *Nature New Biol.*, 237, 29-31, 1972.
13. Collins J., Yanofsky S., Hellinski D. R. *Mol. Gen. Genet.*, 167, 21-28, 1978.
14. Conrad S. E., Campbell J. L. *Cell*, 18, 61-71, 1979.
15. Crosa J. H. *J. Biol. Chem.*, 255, 11075-11077, 1980.
16. Crosa J. H., Luttropp L. K., Falkow S. *J. Mol. Biol.*, 124, 443-458, 1978.
17. Crosa J. H., Luttropp L. K., Falkow S. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43, 111-120, 1979.
18. Diaz R., Staudenbauer W. L. *Nucleic Acids Res.*, 10, 4587-4702, 1982.
19. Donoghue D. J., Sharp P. A. *J. Bacteriol.*, 133, 1287-1294, 1978.
20. Dove W. F., Inokuchi H., Stevens W. F. *The bacteriophage lambda*, Hershey A. D. (ed.), 747-760, Cold Spring Harbor, New York, 1971.
21. Elchenlaub R., Flgurski D., Helinski D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1138-1141, 1977.
22. Flgurski D. H., Hellinski D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1648-1652, 1979.
23. Gardner R. C., Malcolm L., Bergquist P. L., Lane H. E. D. *Mol. Gen. Genet.*, 188, 345-352, 1982.
24. Gellert M., O'Dea M. H., Itoh T., Tomizawa J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 4474-4478, 1976.
25. Germino J., Bastia D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5475-5479, 1982.
26. Gustafsson P., Nordstrom K. *Plasmid*, 1, 134-144, 1978.
27. Gustafsson P., Drelstg H., Molin S., Nordstrom K., Uhlin B. E. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43, 419-425, 1979.
28. Hashimoto-Gotoh T., Inselburg J. *J. Bacteriol.*, 139, 638-659, 1979.
29. Hobom G. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 82, 93-142, 1981.
30. Inuzuka M., Hellinski D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5381-5385, 1978.
31. Inuzuka N., Inuzuka M., Hellinski D. R. *J. Biol. Chem.*, 255, 11071-11074, 1980.
32. Itoh T., Tomizawa J. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43, 409-417, 1979.
33. Itoh T., Tomizawa J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2451-2454, 1980.
34. Jacob F., Brenner S., Cuzin F. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 329-348, 1963.
35. Kahn M., Hellinski D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2250-2254, 1978.
36. Kahn M. L., Flgurski D., Ito L., Hellinski D. R. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43, 93-103, 1979.
37. Kingsbury D. T., Hellinski D. R. *Genetics*, 76, 1-16, 1973.
38. Kingsbury D. T., Hellinski D. R. *J. Bacteriol.*, 114, 1116-1123, 1973.
39. Kline B. C., Seelke R. W. *Mol. Gen. Genet.*, 187, 218-224, 1982.
40. Kotter R. *Plasmid*, 5, 2-9, 1981.
41. Kotter R., Hellinski D. R. *J. Mol. Biol.*, 124, 425-441, 1978.
42. Kotter R., Hellinski D. R. *Plasmid*, 1, 571-580, 1978.
43. Kotter R., Inuzuka M., Hellinski D. R. *Cell*, 15, 1199-1208, 1978.
44. Kornberg A. *DNA replication*. W. A. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
45. Lacatena R. M., Cesareni G. *Nature*, 294, 623-626, 1981.
46. Lacatena R. M., Cesareni G. *J. Mol. Biol.*, 170, 635-650, 1983.
47. Lane D., Gardner R. C. *J. Bacteriol.*, 139, 141-151, 1979.
48. Levine A. D., Rupp W. D. *Microbiology-1978*, Schlessinger D. (ed.), 163-166, Washington, D. C., American Society Microbiology, 1978.
49. Lovett M. A., Hellinski D. R. *J. Bacteriol.*, 127, 982-987, 1976.

50. Lovett M. A., Katz L., Helinski D. R. *Nature*, 251, 337-340, 1974.
51. Lovett M. A., Sparks R. B., Helinski D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2905-2909, 1975.
52. Meyer R., Helinski D. R. *Biochem. Biophys. Acta*, 478, 109-113, 1977.
53. Meyer R. J., Shapiro J. A. *J. Bacteriol.*, 143, 1362-1373, 1980.
54. Meyer R., Hinds M. J. *Bacteriol.*, 152, 1075-1090, 1982.
55. Mitra G., Palchaudhuri S. *Mol. Gen. Genet.*, 193, 349-357, 1984.
56. Morita M., Oka A. *Eur. J. Biochem.*, 97, 435-443, 1979.
57. Moser D. R., Campbell J. L. *J. Bacteriol.*, 154, 809-818, 1983.
58. Muesing M., Tamm J., Shepard H. M., Polisky B. *Cell*, 24, 235-242, 1981.
59. Murotsu T., Matsubara K., Sugisaki H., Takanami M. *Gene*, 15, 257-271, 1981.
60. Nomura N., Low R. L., Ray D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3153-3157, 1982.
61. Novick R. P., Schwesinger M. *Nature*, 262, 623-626, 1976.
62. Oka A., Nomura N., Morita M., Sugisaki H., Sugimoto K., Takanami M. *Mol. Gen. Genet.*, 172, 151-159, 1979.
63. Palchaudhuri S., Maas K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1190-1194, 1977.
64. Pritchard R. H., Barth P. T., Collins J. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 19, 263-297, 1968.
65. Sakakibara Y., Tomizawa J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1403-1407, 1974.
66. Sakanyan V. A., Yakubov L. Z., Alikhanian S. I., Stepanov A. I. *Mol. Gen. Genet.*, 165, 331-341, 1978.
67. Schmidhauser T. J., Filutowicz M., Helinski D. R. *Plasmid*, 9, 325-330, 1983.
68. Seelke R. W., Kline B. C., Trawick J. D., Ritts G. D. *Plasmid*, 7, 163-179, 1982.
69. Shepard H. M., Gelfand D. H., Polisky B. *Cell*, 18, 267-275, 1979.
70. Sherratt D. J., Helinski D. R. *Eur. J. Biochem.*, 37, 95-99, 1973.
71. Stalker D. M., Kolter R., Helinski D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1150-1154, 1979.
72. Stalker D. M., Kolter R., Helinski D. R. *J. Mol. Biol.*, 161, 33-43, 1982.
73. Stalker D. M., Thomas C. M., Helinski D. R. *Mol. Gen. Genet.*, 181, 8-12, 1981.
74. Staudenbauer W. L. *Mol. Gen. Genet.*, 149, 151-158, 1976.
75. Staudenbauer W. L., Lanka E., Schuster H. *Mol. Gen. Genet.*, 162, 243-249, 1978.
76. Tait R. C., Kado C. I., Rodriguez R. L. *Mol. Gen. Genet.*, 192, 32-38, 1983.
77. Thomas C. M. *Plasmid*, 5, 10-19, 1981.
78. Thomas C. M., Meyer R., Helinski D. R. *J. Bacteriol.*, 141, 213-222, 1980.
79. Thomas C. M., Stalker D. M., Helinski D. R. *Mol. Gen. Genet.*, 181, 1-7, 1981.
80. Timmis K. N., Andres I., Slocombe P. M. *Nature*, 273, 27-32, 1978.
81. Timmis K. N., Cabello F., Cohen S. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2242-2246, 1975.
82. Timmis K. N., Cabello F., Cohen S. N. *Mol. Gen. Genet.*, 162, 121-130, 1978.
83. Tolun A., Helinski D. R. *Cell*, 24, 687-694, 1981.
84. Tolun A., Helinski D. R. *Mol. Gen. Genet.*, 186, 372-377, 1982.
85. Tomizawa J., Itoh T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6096-6100, 1981.
86. Tomizawa J., Itoh T. *Cell*, 31, 575-583, 1982.
87. Tomizawa J., Sakakibara Y., Kakefuda T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1050-1054, 1975.
88. Tomizawa J., Itoh T., Selzer G., Som T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1421-1425, 1981.
89. Tsutsui H., Fujiyama A., Murotsu T., Matsubara K. *J. Bacteriol.*, 155, 337-344, 1983.
90. Twigg A. J., Sherratt D. *Nature*, 283, 216-218, 1980.
91. Uhlin B. E., Nordstrom K. *J. Bacteriol.*, 124, 641-649, 1975.
92. Van der Ende A., Teertstra R., Weisbeek P. J. *J. Mol. Biol.*, 167, 751-756, 1983.
93. Wehlmann H., Eichtenlaub R. *Mol. Gen. Genet.*, 180, 205-211, 1980.
94. Zipursky S. L., Marians K. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6521-6525, 1980.