

Extrachromosomale DNA in Bakterien

Von Werner Goebel[*]

In vielen Bakterienzellen treten zusätzlich zur chromosomalen DNA, welche die genetische Information der Zelle enthält, kleinere ringförmige DNA-Faktoren auf, die als Plasmide oder Episomen bezeichnet werden. Diese genetischen Elemente verleihen der Zelle zusätzliche biochemische Fähigkeiten. Beschrieben werden die Fertilitätsfaktoren (F und F'), die Antibiotika-Resistenz-Faktoren (R), die Colicinogenen Faktoren (Col), die Hämolytischen Faktoren (Hly) und andere extrachromosomale DNA-Systeme. Diese kleinen DNA-Moleküle lassen sich isolieren und eignen sich somit besonders, um Fragen der DNA-Replikation und der stabilen Etablierung von genetischem Material in der Bakterienzelle zu untersuchen.

1. Einleitung

Desoxyribonucleinsäure (DNA) enthält die genetische Information jeder teilungsfähigen Zelle und determiniert damit die biochemischen Fähigkeiten der Zelle. Während in Zellen höherer Organismen (eukaryotische Zellen) die DNA in der komplizierten Struktur des Chromosoms im Zellkern vorliegt^[1], existiert sie in der Bakterienzelle in „freier“ Form (prokaryotische Zellen), wobei das DNA-Molekül vermutlich an die Zellmembran gebunden ist^[2]. Obwohl Bakterien keine Chromosomen besitzen, bezeichnet man die bakterielle DNA häufig auch als chromosomale DNA. Die in der DNA enthaltene Information, niedergelegt in Form der Basensequenz (genetischer Code)^[3], wird durch „Transkription“ in Messenger-Ribonucleinsäure (m-RNA) übertragen^[4]. Die Information der m-RNA wird an den Ribosomen^[5] in einem komplizierten, heute aber weitgehend aufgeklärten Vorgang^[6] in Protein übersetzt (Translation). Diese Proteine katalysieren einerseits als Enzyme sämtliche chemische Vorgänge in der Zelle und tragen andererseits als Strukturproteine zum Aufbau der Zelle bei.

Sofern sich die chromosomale DNA der Zelle nicht durch spontane oder mit Chemikalien, UV-Strahlung etc. induzierte Mutationen ändert, bleiben die genetische Information und damit die biochemischen Fähigkeiten der Zelle konstant. Alle Zellen einer Bakterienart sollten sich demnach vollkommen gleich verhalten. Tatsächlich findet man jedoch, daß gelegentlich Individuen auftreten, die zusätzliche biochemische Fähigkeiten zeigen: Manche *E.-coli*-Zellen können in Gegenwart eines oder mehrerer Antibiotika wachsen, andere scheiden Proteine ab, die bakterizid auf andere *E.-coli*-Bakterien wirken, etc. Diese zusätzlichen Eigenschaften unterscheiden sich von chromosomalen Merkmalen in folgenden Punkten: Sie können bei der Zellteilung spontan verloren gehen, allerdings sehr selten. Sie lassen sich durch Behandlung mit Agentien wie Acridinorange^[7], Ethidiumbromid^[8] oder Natriumdodecylsulfat^[9] eliminieren. Umgekehrt können sie in vielen Fällen durch Zellkontakt auch auf andere Bakterien übertragen werden, die bislang diese Merkmale noch nicht besaßen.

Wie man heute weiß, werden diese Eigenschaften nicht von der chromosomalen DNA determiniert, sondern von zusätzlichen DNA-Elementen, die physikalisch getrennt von der chromosomalen DNA in der Bakterienzelle vorliegen und deshalb als „extrachromosomale DNA-Elemente“ oder als Episomen oder Plasmide bezeichnet werden^[10]. Diese genetischen Zusatzelemente können der Zelle unter besonderen Wachstumsbedingungen entscheidende Selektionsvorteile verleihen. Im übrigen ist aber eine Bakterienzelle nicht auf diese Plasmide angewiesen. Man bezeichnet die bakteriellen Plasmide daher als „nicht-essentiell“.

In diesem Fortschrittsbericht soll ein allgemeiner Einblick in die Mannigfaltigkeit dieser extrachromosomalen DNA-Systeme in Bakterien vermittelt werden. Besonderes Gewicht wird dabei auf die physiologische Bedeutung dieser zusätzlichen genetischen Elemente für die Bakterienzelle und auf ihre biochemischen Eigenschaften gelegt. Da die Literatur auf diesem Gebiet sehr umfangreich geworden ist, kann hier nur eine Auswahl geboten werden (Zusammenfassungen siehe^[10–13]).

2. Der Fertilitäts- oder Sex-Faktor (F) von *Escherichia coli*

Die erste Beobachtung, die darauf hindeutete, daß bakterielle DNA von einer Bakterienzelle in eine andere übertragen werden kann, machte Lederberg beim Darmbakterium *Escherichia coli*^[14]. Bei diesem als „Konjugation“ bezeichneten Vorgang lagern sich zwei Bakterienzellen zusammen, von denen die eine als männliche oder Donorzelle, die andere als weibliche oder Empfängerzelle (Rezipient) bezeichnet wird. Dieser Prozeß wird determiniert durch ein extrachromosomales DNA-Element, den F- (Fertilitäts-) oder Sex-Faktor. Durch diese F-DNA werden Merkmale ausgeprägt, die für die Konjugation wesentlich sind. Die F⁺-Zelle (= männliche Zelle) bildet spezifische Zellwandanhänge aus, die als Sex- oder F-Pili bezeichnet werden (Abb. 1). Durch diese kommt der Kontakt mit dem weiblichen F⁻-Bakterium zustande. Ungewiß ist immer noch, ob die F-Pili auch beim Transfer der DNA beteiligt sind.

Die F-Pili besitzen zwei Eigenschaften: Sie prägen eine neue Antigen-Eigenschaft bei der männlichen Bakterienzelle

[*] Priv.-Doz. Dr. W. Goebel
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
der Universität Hohenheim
7 Stuttgart 70, Otto-Sander-Straße 5

le aus^[15], und sie sind spezifische Rezeptoren für bestimmte Bakteriophagen^[16].

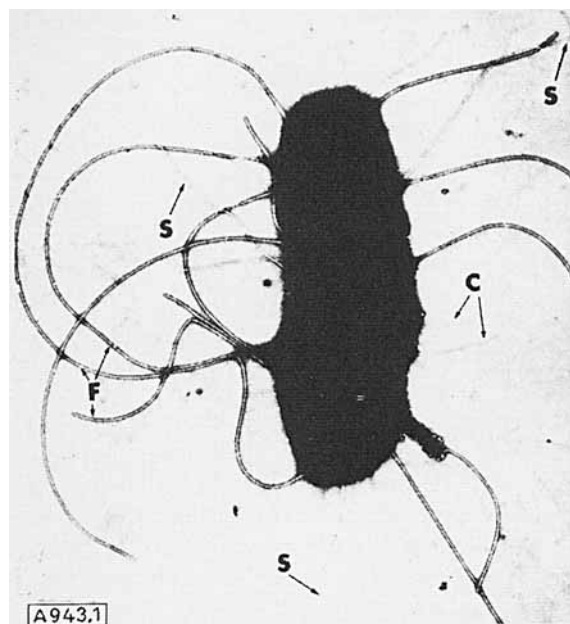


Abb. 1. Männliche (F⁺) Zelle von *Escherichia coli* (nach [7]), S=Sex- oder F-Pili, C=gewöhnliche Pili, F=Flagellen. Vergrößerung ca. 2500-fach.

Während der Konjugation wird in erster Linie die extrachromosomale F-DNA mit hoher Wahrscheinlichkeit ($\approx 100\%$) von der männlichen auf die weibliche Zelle übertragen; gelegentlich kann es dabei auch zu einer Übertragung von chromosomalen Genen kommen. Die Transferierung der F-DNA erfolgt vermutlich nach dem in Abbildung 2 dargestellten „Rolling-circle-Mechanismus“. Dabei wird einer der beiden Stränge der Plasmid-DNA aus der Donorzelle in die Empfängerzelle geschoben. Der komplementäre DNA-Strang bildet sich erst in der Empfängerzelle. Der komplementäre Strang zum zurückgebliebenen DNA-Strang in der Donorzelle wird ebenfalls nachrepliziert^[17, 18].

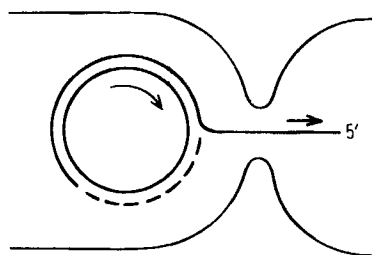


Abb. 2. „Rolling-circle-Modell“ für die Übertragung von Plasmid-DNA bei der Konjugation. Der schwere DNA-Strang des extrachromosomalen Faktors rollt am kovalent geschlossenen komplementären leichten Strang ab und wird durch eine Plasmabücke (F-Pilus?) in die Empfängerzelle geschoben. In der Empfängerzelle erfolgt die Synthese des komplementären DNA-Stranges (nach [17, 18]).

Die F-DNA kann gelegentlich in die chromosomale DNA des Bakteriums integriert werden^[19] und ist dann kovalent gebundener Bestandteil (Abb. 3). In diesem Hfr-Zustand (Hfr=high frequency of recombinants) besitzt die männliche Zelle die Fähigkeit, während der Konjugation auch

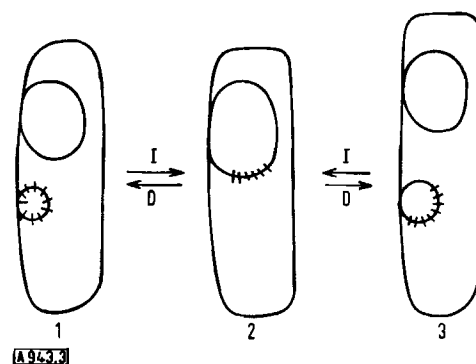


Abb. 3. Integration (I) und Dissoziation (D) des F-Faktors. 1. Männliche (F⁺) Zelle, autonomer F-Zustand; oben: Chromosom, unten: F-Faktor. 2. Die Integration der F-DNA in die chromosomale DNA führt zum Hfr-Zustand. Bei der Dissoziation kann entweder der Ausgangszustand (I) wiederhergestellt werden, oder es entsteht ein F'-Faktor. 3. Männliche (F⁺) Zelle, autonomer F'-Zustand. Der F'-Faktor trägt neben der F-DNA noch einen Abschnitt der chromosomalen DNA.

die chromosomale DNA teilweise oder vollständig auf eine Empfängerzelle zu übertragen.

Durch Dissoziation kann die F-DNA aus dem integrierten Hfr-Zustand wieder in den autonomen extrachromosomalen F⁺-Zustand übergehen. Dabei kann der F-Faktor gelegentlich Abschnitte der chromosomalen DNA mitnehmen^[20]. Auf diese Weise entstehen F'-Faktoren (Abb. 3), die außer den F-Eigenschaften (z. B. Pilusbildung, Phagenspezifität, Transfereigenschaften) chromosomale Merkmale tragen. So besitzt z. B. der F'-lac-Faktor alle Gene, die zur Ausprägung und Regulierung der Enzyme für den Lactose-Abbau notwendig sind. F'-gal codiert neben den F-Eigenschaften alle Enzyme für den Abbau der Galaktose.

Der F-Faktor und einige F'-Faktoren sind mittlerweile nach Methoden, die in Abschnitt 9 ausführlich besprochen werden, isoliert worden. Es handelt sich um große ringförmige DNA-Moleküle.

Freifelder bestimmte aufgrund der Umwandlungsgeschwindigkeit von „supercoiled“ F-DNA in ringoffene F-DNA (siehe Abschnitt 9) durch Röntgenstrahlen das Molekulargewicht von F-DNA zu 45×10^6 Daltons (D) und die von F'-DNAs zu 51×10^6 bis 81×10^6 D^[21]. Andere Autoren, die vor allem Elektronenmikroskopie und Sedimentationsanalyse zur Bestimmung des Molekulargewichts der F-DNA heranzogen, fanden 62×10^6 D^[22]. F'-Faktoren sind, wie zu erwarten, größer. Für den F'-Faktor F'-Col-V-Col-B-trp-cys, der außer der F-DNA die Colicinenen Faktoren Col V und Col B (siehe Abschnitt 5) sowie die Gene für die Enzyme der Tryptophan- und Cysteinbiosynthese trägt, haben sorgfältige Messungen ein Molekulargewicht von 107×10^6 D ergeben^[23]. F'-lac-DNA besitzt nach der Sedimentationsanalyse ein Molekulargewicht von 130×10^6 D. Die Zahl von F- und F'-Faktoren in der *E.-coli*-Zelle ist klein und dürfte nicht mehr als eine bis zwei Kopien pro Bakterienzelle betragen^[24].

3. Antibiotika-Resistenz-Faktoren (R) von Enterobakterien

Extrachromosomale DNA-Faktoren, die besondere Beachtung wegen ihrer potentiellen Gefahr für den Menschen

gefunden haben, sind die Antibiotika-Resistenz-Faktoren, kurz R-Faktoren genannt. Das Phänomen der übertragbaren multiplen Antibiotika-Resistenz in Enterobakterien wurde erstmals von *Watanabe* beschrieben^[25, 26] und hängt mit dem Auftreten der R-Faktoren zusammen. Diese besitzen, ähnlich wie die F- und F'-Faktoren, Fertilitäts- und Transfer-Eigenschaften und können damit das Merkmal der multiplen Antibiotika-Resistenz durch Konjugation auf geeignete Rezipienten übertragen. Als Empfängerzellen für die Übertragung von R-Faktoren dienen dabei vor allem die Bakterien, die zur Klasse der Enterobacteriaceae gehören. Dazu zählt als bekanntester Vertreter das im allgemeinen harmlose Darmbakterium *Escherichia coli*. Unter ihnen befinden sich aber auch Bakterien, die als ausgesprochen pathogen anzusehen sind, wie *Salmonella typhimurium*, der Erreger der Gastroenteritis, *S. typhi*, der Typhuserreger, *S. paratyphi*, der Erreger des Paratyphus; ferner die *Shigella*-Stämme, die ebenfalls zu den pathogenen Enterobakterien zu zählen sind (z. B. *Shigella dysenteriae*, Erreger der Ruhr und der schweren Diarrhoe). Diese Krankheiten, allgemein als Salmonellosen und Shigellosen bezeichnet, können endemisch auftreten. Wie gefährlich der Verlauf dieser Krankheiten sein kann, wenn die Erreger R-Faktoren tragen, hat sich bereits in einigen Fällen gezeigt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Nachweis von R-Faktor tragenden Salmonellen in vier Epidemien (modifiziert nach [27]). A = Ampicillin, S = Streptomycin, K = Kanamycin, C = Chloramphenicol, T = Tetracyclin, Su = Sulfonamide.

Erregerstämme	Ausbruch der Epidemie in	Dauer der Epidemie von	nachgewiesene R-Faktoren mit folgenden Resistenzen	% resistenter Stämme	Häufigkeit der Übertragung auf sensitive <i>E. coli</i> in 24 h
<i>S. Oranienburg</i> R 4-5	Paris	1963-1968	ASKCTSu	66	10 ⁻³
			SKCTSu	17	10 ⁻²
			AS	3	10 ⁻¹
<i>S. Derby</i> R 7	Lyon	1963-1964	ASK TSu	30	10 ⁻¹
			AS TSu	10	10 ⁻¹
			A	3	10 ⁻¹
<i>S. Panama</i> R 11	Paris	1965-1968	A K T	24	10 ⁻¹
			A T	32	10 ⁻¹
			A	3	10 ⁻¹
<i>S. Stanleyville</i> R 32	Dakar	1966-1967	ASKCTSu	78	10 ⁻⁴

Neben den Enterobakterien können *in vitro* auch *Pseudomonas*-Arten, *Pasteurella*-Stämme (z. B. *Pasteurella pestis*, Pesterreger) und *Vibrio*-Stämme (z. B. *Vibrio cholerae*, Choleraerreger) als Rezipienten für R-Faktoren auftreten^[28, 29]. Allerdings haben neuere Untersuchungen an R-Faktoren tragenden *Vibrio-cholerae*-Stämmen gezeigt, daß, mit einer Ausnahme (R-ts-I-Faktor), alle übertragenen R-Faktoren in diesem Wirt instabil sind und nach einigen Generationen wieder verloren gehen^[30].

Neben Enterobakterien hat man auch natürlich vorkommende R-Faktoren-tragende *Pseudomonas*-Stämme isoliert^[31, 32]. Bedingt durch die intensive Anwendung von Antibiotika in der Medizin und in der Tierernährung sind Antibiotika-resistente Enterobakterien heute sehr weit verbreitet^[10]. Unter Laborbedingungen können die R-Faktoren mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit in alle ge-

nannten Rezipienten übertragen werden; über die Häufigkeit der Übertragungen von R-Faktoren von Bakterienzelle zu Bakterienzelle im menschlichen oder tierischen Organismus weiß man relativ wenig^[33]. Prinzipiell ist aber nicht auszuschließen, daß z. B. im Darmtrakt des Menschen die Übertragung von multipler Antibiotika-Resistenz auf Salmonellen oder Shigellen durch R-Faktoren tragende *Escherichia coli*-Bakterien möglich ist. Selbst eine geringe Übertragungshäufigkeit in dieser Richtung kann sich, bei gleichzeitiger Anwendung von Antibiotika, durchaus negativ auswirken, da unter diesem Selektionsdruck nur die Antibiotika-resistenten Salmonellen oder Shigellen überleben.

R-Faktoren werden heute wegen ihrer Wirkung, die sie auf den F-Faktor ausüben, in zwei Gruppen eingeteilt: Rfi⁺-Faktoren und Rfi⁻-Faktoren.

Transferiert man Rfi⁺-Faktoren in einen F⁺-Stamm, so werden die F-Eigenschaften, wie Pilus-Bildung und damit die Fähigkeit zur Konjugation und zur Transferierung, gehemmt (fi⁺ = „fertility inhibition“ positiv)^[34, 35]. Man nimmt an, daß die DNA derartiger R-Faktoren einen cytoplasmatischen Repressor codiert, der auch auf F-DNA einwirken kann. Rfi⁻-Faktoren dagegen hemmen nach Übertragung in einen F⁺-Stamm die F-Eigenschaften nicht. Sie hemmen aber die Pilus-Bildung und die Transfe-

rierbarkeit des Fertilitätsfaktors Col I (siehe Abschnitt 5).

In einigen Fällen hat man zeigen können, daß der vollständige R-Faktor aus zwei DNA-Abschnitten zusammengesetzt ist, die man als Resistenz-(R-)Determinante und Resistenz-Transfer-Faktor (RTF) bezeichnet. So findet bei der Übertragung von R-Faktoren aus R⁺-*E. coli*-Bakterien in das Enterobakterium *Proteus mirabilis* eine Dissoziation der zunächst einheitlichen R-DNA in zwei unterscheidbare ringförmige DNA-Moleküle statt^[36, 37] (Abb. 4 und 5). Das kleinere DNA-Molekül (MG 10 × 10⁶ bis 12 × 10⁶ D) hat die Eigenschaften der R-Determinante: Es prägt multiple Antibiotika-Resistenz aus, besitzt aber keine Transfereigenschaften. Bakterienzellen, die dieses Plasmid tragen, sind Antibiotika-resistent, können diese Resistenz aber nicht weiter übertragen. Das größere DNA-Molekül

(MG 55×10^6 D) ist vermutlich der RTF-Teil: Es besitzt Transfereigenschaften, prägt aber keine Antibiotika-Resistenz aus. Bakterienzellen, die nur dieses Plasmid tragen, sind nicht mehr Antibiotika-resistent, können aber ähnlich wie F^+ -Bakterien dieses Plasmid auf Empfängerzellen übertragen.

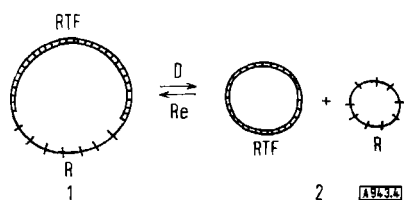


Abb. 4. Dissoziation (D) und Rekombination (Re) eines kompletten R-Faktors (1) in RTF-Teil und R-Determinante (2).

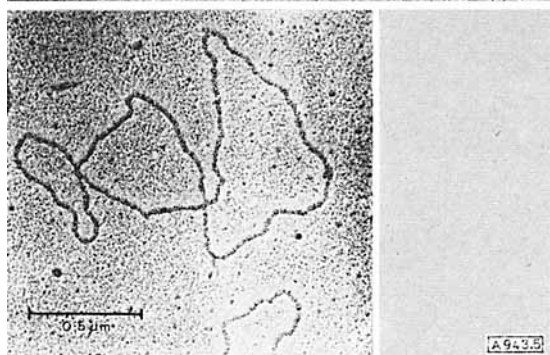
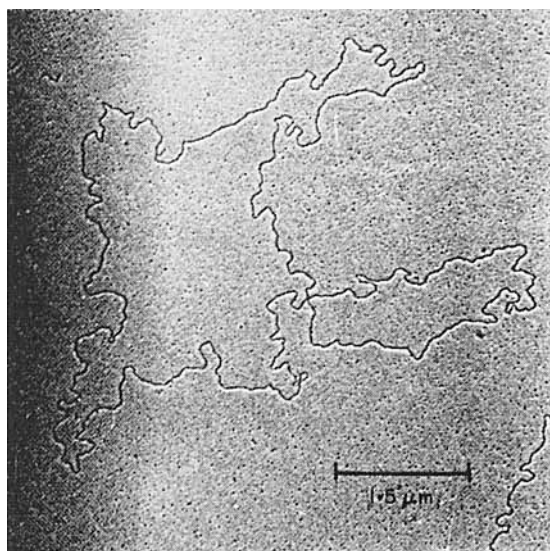


Abb. 5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von DNA-Molekülen nach Aufspaltung eines R-Faktors in RTF-Teil (oberes Bild) und R-Determinante (unteres Bild) bei der Übertragung in *Proteus mirabilis* (nach [37]).

Die DNA der R-Determinante trägt Gene, welche die Produktion von spezifischen Antibiotika-inaktivierenden Enzymen codieren. Chloramphenicol wird durch eine R-spezifische Acetylase inaktiviert^[38, 39], die das Antibiotikum an den Hydroxygruppen der Seitenkette acetylieren kann und es dadurch für die Zelle inaktiv macht (Abb. 6). Weitere R-spezifische Enzyme sind für die Inaktivierung von Ampicillin (β -Lactamase), Streptomycin (Phosphorylase), Neomycin und Kanamycin (Acetylasen) nachgewiesen worden^[40–42]. Eine Resistenz gegen Tetracycline und Sulfonamide wird dadurch hervorgerufen, daß die Aufnahme

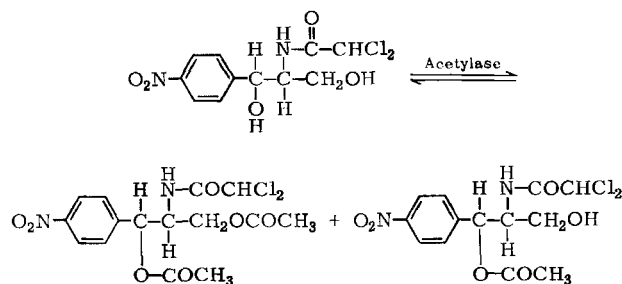


Abb. 6. Inaktivierung von Chloramphenicol durch die von einem R-Faktor determinierte Acetylase.

dieser Antibiotika unter dem Einfluß von R-Faktoren in die Zelle gehemmt wird^[43, 44]. Die molekulare Natur dieser Permeabilitätsbarriere ist noch unbekannt. Das Ausmaß dieser multiplen Antibiotika-Resistenz, hervorgerufen durch R-Faktoren, hängt von der Zahl der Resistenzgene und damit von der Zahl der inaktivierenden Enzyme ab. Ein R-Faktor kann also einer Zelle übertragbare Antibiotika-Resistenz gegen ein einziges Antibiotikum (z. B. Tetracyclin) oder gegen sechs und mehr Antibiotika zugleich (z. B. Chloramphenicol, Streptomycin, Ampicillin, Sulfonamide, Neomycin, Kanamycin usw.) verleihen.

4. Penicillinase-Plasmide von Staphylococcen

Penicillin-resistente Staphylococcen-Stämme sind weit verbreitet. Diese Resistenz wird durch das Auftreten der „Penicillinase-Plasmide“ hervorgerufen, deren molekulare Eigenschaften vor allem Novick sowie M. H. Richmond bei *S. aureus* untersuchten^[45, 46]. Diese Penicillinase-Plasmide sind eine Klasse von extrachromosomalen DNA-Elementen, die dem als Resistenz-(R-)Determinante bezeichneten Teil von R-Faktoren in Enterobakterien (siehe Abschnitt 3) ähneln. Das Molekulargewicht dieser Plasmide liegt zwischen 15×10^6 und 18×10^6 D^[47]. Zusätzlich zur Resistenz gegen Penicillin determinieren sie häufig auch Resistenz gegen Erythromycin und gegen Schwermetall-Ionen wie Cd^{2+} , As^{3+} , Hg^{2+} ^[48].

Die Resistenz gegenüber Penicillin beruht auf der Bildung von Penicillinasen, Enzymen, die durch Penicillin induzierbar sind^[49]. Penicillinase-Plasmide lassen sich aufgrund ihrer gegenseitigen Verträglichkeit in einer Bakterienzelle in zwei Kompatibilitätsgruppen (siehe Abschnitt 8) einteilen. Diese Plasmide können nicht nur im extrachromosomalen, autonomen Zustand existieren, sondern sie können auch gelegentlich in das Wirtschromosom oder in ein anderes in der Wirtszelle vorhandenes Plasmid integriert werden^[50]. Diese Plasmide sind nicht selbst übertragbar wie die R-Faktoren von Enterobakterien, sondern werden vermutlich durch Bakteriophagen von Bakterienzelle zu Bakterienzelle übertragen. Ein derartigen Übertragungsvorgang bezeichnet man als Transduktion.

5. Colicinogene Faktoren (Col) von *Escherichia coli*

Eine große Anzahl natürlich vorkommender *E. coli*-Stämme trägt extrachromosomale DNA-Elemente, Col-Fakto-

ren genannt, welche u.a. die Produktion von Colicinen determinieren. Die Colicine sind extrazellulär auftretende, antibiotisch wirksame Proteine^[51] mit interessanten Wirkungsweisen. Ihre Wirkung beschränkt sich auf Colicin-sensitive *E.-coli*-Stämme und eng verwandte Enterobacteriaceae, bei denen sie die Proteinbiosynthese, die RNA- und DNA-Synthese sowie die oxidative Phosphorylierung hemmen können. Für die Wirkungsweise der Colicine ist ein Modell vorgeschlagen worden, das eine indirekte Beeinflussung des biochemischen Wirkungsortes durch das Colicin vorsieht^[52–54]. Diese Vorstellung beruht auf folgenden experimentellen Befunden:

Colicin-Moleküle adsorbieren sich an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die Abtötungskurve von sensiblen Bakterien durch Colicine folgt einer Ein-Treffer-Kinetik, d.h. ein adsorbiertes Colicinmolekül kann mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit die letale Wirkung hervorrufen. Die Wirkung der gebundenen Colicinmoleküle läßt sich aufheben, wenn die Zellen kurz nach der Adsorption mit Trypsin behandelt werden.

Aus diesen experimentellen Befunden ist gefolgert worden, daß alle Colicine an der Außenseite der cytoplasmatischen Membran bleiben und von dort indirekt die biochemischen Wirkungsorte beeinflussen. Alle biochemischen Veränderungen, die nach der Adsorption von Colicin in sensiblen Zellen zu beobachten sind, betreffen die Biosynthese von Makromolekülen wie DNA, RNA und Proteinen oder die oxidative Phosphorylierung. Alle diese Prozesse sind mit der Zellmembran verknüpft. Daraus hat man geschlossen, daß die Bindung eines Colicinmoleküls an die Membran primär an der Rezeptorstelle eine Veränderung verursacht, die ihrerseits die Übertragung eines Signals an den Wirkungsort (Proteinbiosynthese, Nucleinsäuresynthese, oxidative Phosphorylierung) auslöst. Der Mechanismus dieser indirekten Übertragung ist unbekannt. Nach dieser Vorstellung gelangt das Colicin nicht in das Zellinnere.

Neuere Untersuchungen über die Wirkungsweise von Colicin E₃, welches die Proteinbiosynthese blockiert, deuten allerdings auch auf eine direkte Wirkung des Colicins auf den biochemischen Wirkungsort hin: In vitro kann Colicin E₃ die 16S-r-RNA fragmentieren^[55, 56].

Ein Teil der colicinogenen DNA-Faktoren hat ähnlich wie der F-Faktor und die R-Faktoren Transfereigenschaften^[57, 58]. Einige dieser Faktoren prägen ähnliche Pili aus wie der F-Faktor. Der colicinogene Faktor I (Col I) dagegen ist ein völlig anderer Transferfaktor. Auch er determiniert die Produktion von Pili (I-Pili), die sich aber morphologisch, durch ihre Antigeneigenschaften und durch ihre Adsorptionsfähigkeit für spezifische Bakteriophagen von F-Pili unterscheiden^[59, 60].

6. Andere extrachromosomale DNA-Faktoren mit Transfereigenschaften

Neben den drei großen Klassen von gut untersuchten extrachromosomalen DNA-Elementen [F (F⁺), R- und Col-Faktoren] gibt es einige weitere extrachromosomale Faktoren mit Transfereigenschaften.

6.1. Hämolytische Faktoren (Hly) von *E. coli*

Einige pathogene *E.-coli*-Stämme zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Hämolsine zu produzieren. (Hämolsine sind Proteine, die Erythrocyten lysieren können, siehe Abb. 7.) Zwischen der Fähigkeit zur Hämolsinbildung und der Pathogenität dieser Stämme scheint eine direkte Beziehung zu bestehen^[61]. H. W. Smith wies als erster nach,

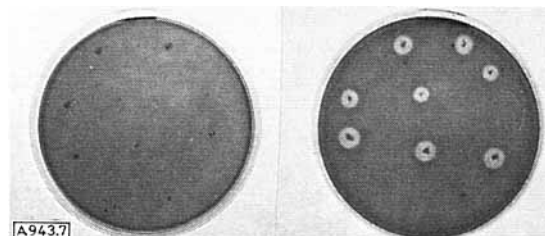


Abb. 7. Blutagar-Platte mit hämolytischen und nichthämolytischen Kolonien von *Escherichia coli*. Links: Nichthämolytischer Wildstamm, rechts: Hämolytischer Wildstamm.

daß zumindest in einigen hämolytischen *E.-coli*-Stämmen die Fähigkeit zur Hämolsinbildung transferierbar ist und demnach vermutlich ebenfalls durch extrachromosomale DNA determiniert wird^[62]. Wir konnten kürzlich aus hämolytischen *E.-coli*-Bakterien zwei extrachromosomale DNA-Elemente (Hly-Faktoren) isolieren^[63, 64], die entweder getrennt oder zusammen auftreten können. Ihre Molekulargewichte sind verschieden (40×10^6 bis 45×10^6 und 60×10^6 bis 65×10^6 D); beide tragen die Determinante für die Hämolsinproduktion. Die größere hämolytische DNA besitzt dereprimierte Transfereigenschaften, während die Übertragung der kleineren hämolytischen DNA meist reprimiert ist.

In Anwesenheit der kleineren DNA werden auch die Transfereigenschaften der größeren gehemmt. Vermutlich wird von der kleineren DNA ein cytoplasmatischer Transfer-Repressor codiert, der auch auf die größere DNA wirken kann. Beide hämolytische DNA-Faktoren zeigen weitgehende Homologien in ihrer Nucleotidsequenz, wie Hybridisierungsexperimente ergaben. Es ist daher zu vermuten, daß die kleinere DNA entweder durch Abspaltung einiger DNA-Abschnitte aus der größeren hervorging oder die größere DNA durch Integration von zusätzlicher DNA aus dem kleineren Faktor entstand.

6.2. Andere Faktoren

Weitere genotypische Merkmale, die vermutlich durch übertragbare Plasmide vererbt werden, sind die Fähigkeit zur Enterotoxinbildung^[65] sowie zur Produktion von K-88-Antigen^[66] in *E. coli*. Auch die H₂S-Produktion in *E. coli*^[67] und der Abbau von D-Campher und Octan durch *Pseudomonas*-Arten^[68] sollen durch extrachromosomale übertragbare DNA-Elemente determiniert werden. Interessanterweise scheinen auch beim Pflanzentumor-erzeugenden Bakterium *Rhizobium trifolii* die genetischen Elemente, welche die Effektivität (Eff⁺) und die Infektiosität (Inf⁺) determinieren, extrachromosomaler Natur zu sein^[69].

7. Plasmide mit unbekannten Eigenschaften

Aus der Fülle von Plasmiden, denen bisher keine biochemischen Eigenschaften zugeordnet werden konnten, sei hier nur eine interessante Gruppe herausgegriffen, nämlich die der minicirculären DNA-Plasmide. Diese DNA-Moleküle zeichnen sich durch ihre ungewöhnliche Kleinheit aus. Ihre Molekulargewichte schwanken zwischen ca. 1×10^6 und 3×10^6 D. Eine mögliche genetische Information dieser DNA-Moleküle wäre damit auf ein bis sechs Gene beschränkt. Das erste Plasmid dieser Gruppe isolierten Cozzarelli et al. aus *E. coli* 15^[70]. Weitere Plasmide mit ähnlicher Größe wurden aus Wildstämmen von *E. coli* isoliert und charakterisiert^[71] (Abb. 8). Interessanterweise zeigen

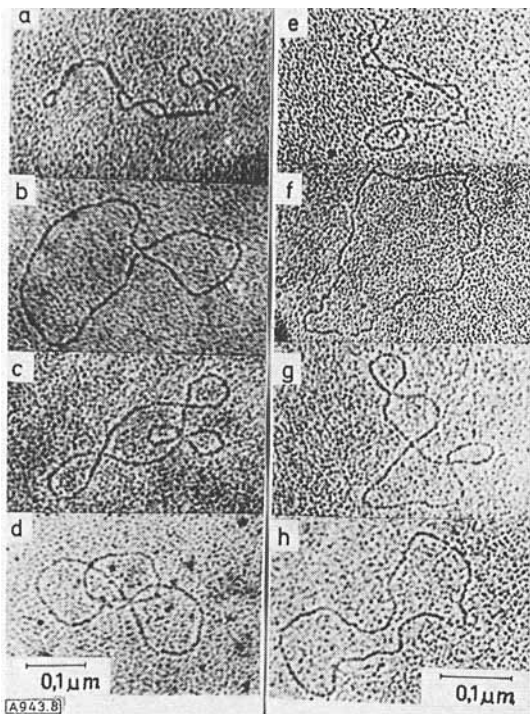


Abb. 8. Minicirculäre DNA, isoliert aus zwei Wildstämmen von *E. coli*. a–d: „Supercoiled“ (a) und ringoffene (b–d) DNA aus *E. coli* SC 78 (Konturlänge $1.2 \pm 0.05 \mu\text{m}$). e–h: Supercoiled (e) und ringoffene (f–h) DNA aus *E. coli* SC 79 (Konturlänge $0.95 \pm 0.05 \mu\text{m}$) (nach [71]).

diese minicirculären Plasmide aus *E. coli* weitgehende Sequenzhomologien untereinander wie auch mit dem bereits besprochenen kleinen colicinogenen Faktor E 1 (Col E 1)^[71].

8. Kompatibilität zwischen bakteriellen Plasmiden

Eine Bakterienzelle kann gleichzeitig als Wirt für mehrere verschiedene extrachromosomale DNA-Faktoren dienen, wenn diese Plasmide miteinander verträglich sind. Es hat sich aber gezeigt, daß zwei sehr eng verwandte DNA-Elemente nicht stabil nebeneinander zu existieren vermögen. So können in einer *E. coli*-Zelle zwei verwandte F-Faktoren, R-Faktoren, Col-Faktoren, Penicillinase-Plasmide, aber auch ein F-Faktor in einer Hfr-Zelle, nicht gleichzeitig stabil etabliert werden.

Man unterteilt aufgrund dieses Phänomens die Plasmide in Inkompatibilitäts-Gruppen. Vertreter einer solchen Gruppe sind miteinander unverträglich, während zwei Plasmide, die verschiedenen Gruppen angehören, von demselben Wirt getragen werden können^[72, 73, 45]. Als Grund für die Inkompatibilität nimmt man an, daß Plasmide über spezifische Anheftungs- oder Replikationsstellen, vermutlich an der Membran^[74], verfügen, die eine Voraussetzung für die stabile Etablierung von Plasmiden sind (siehe Abschnitt 11).

Von *S. aureus* konnten temperatursensitive Mutanten isoliert werden, die nicht mehr in der Lage waren, Plasmide einer Kompatibilitätsgruppe bei der höheren Temperatur stabil zu etablieren, wohl aber solche einer anderen und umgekehrt^[75]. Man nimmt an, daß diese Mutanten bei der restriktiven Temperatur keine funktionsfähigen Membranstellen für die Plasmide der betroffenen Kompatibilitätsgruppe besitzen. Offensichtlich steht in der Bakterienzelle nur eine begrenzte Anzahl derartiger Anheftungs- oder Replikationsstellen für eine bestimmte Gruppe von Plasmiden zur Verfügung. Ein Plasmid, das in eine Zelle eindringt, in der diese Stelle(n) bereits von einem anderen Plasmid derselben Kompatibilitätsgruppe besetzt ist (sind), kann deshalb in diesem Wirt nicht repliziert und bei der Zellteilung nicht weitergegeben werden.

9. Physikalische Eigenschaften und Isolierungsmethoden

Der Gehalt an extrachromosomaler DNA in Plasmid-tragenden Bakterienzellen beträgt im allgemeinen ungefähr 0.5–3% bezogen auf die chromosomale DNA. Die meisten Methoden zur Abtrennung von extrachromosomaler DNA von chromosomaler DNA gehen von der Tatsache aus, daß alle bisher gefundenen bakteriellen Plasmid-DNA-Moleküle in einer kovalent geschlossenen, verdrehten, „supercoiled“ Konformation vorliegen. Durch einen Bruch in einem der beiden DNA-Stränge („nick“), der entweder mechanisch (z. B. durch Scherkräfte) oder enzymatisch durch „nickende“ Endonucleasen^[76, 77] erfolgen kann, geht diese kompakte Konformation in die weiträumigere ringoffene Konformation über (Abb. 9). In der „supercoiled“ Konformation besitzt das ringförmige DNA-Molekül physikalische Eigenschaften, die es von ringoffenen und linearen DNA-Molekülen unterscheiden:

Die Anfälligkeit gegenüber Scherkräften ist geringer; die Sedimentationsgeschwindigkeit in einem neutralen Dichtegradienten ist höher^[78]. Die beiden Stränge eines „supercoiled“ DNA-Moleküls lassen sich unter Denaturierungsbedingungen (pH=11.5–12.5 oder Erhitzen über den Schmelzpunkt) nicht voneinander trennen, da sie topologisch verbunden sind. Dadurch erfolgt bei der Neutralisierung auf pH=7.0–8.0 bzw. der Abkühlung eine rasche Renaturierung^[79, 80]. Bei pH=12.5 nimmt das denaturierte Molekül, mit noch immer topologisch verbundenen Strängen, eine sehr komplizierte Struktur an^[80], in der es eine ungefähr doppelt so hohe Sedimentationsgeschwindigkeit wie in neutraler Lösung in der „supercoiled“ Konformation besitzt^[81]. Außerdem ist bei pH=12.5 die Schwimmdichte der DNA in dieser kompakten Konformation um

0.08 g/cm³ gegenüber der Schwimmdichte der „supercoiled“ DNA-Konformation in neutraler Lösung erhöht, während die Schwimmdichte der denaturierten Stränge der ringoffenen Form gegenüber derjenigen der nativen Form nur um 0.06 g/cm³ ansteigt^[82–84].

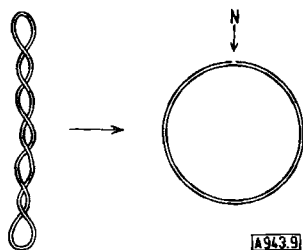


Abb. 9. Übergang einer DNA aus der „supercoiled“ Konformation in die ringoffene Konformation. Der Einstrangbruch oder „Nick“ (N) kommt durch Endonucleasen oder mechanische Einwirkung zustande.

„Supercoiled“ DNA bindet intercalierende, d.h. sich einschubende Farbstoffe (z.B. Ethidiumbromid) schwächer als ringoffene und lineare DNA^[85,86]. Da mit der Bindung von Ethidiumbromid an DNA eine Erniedrigung der Schwimmdichte der DNA verbunden ist, nimmt die Dichte von „supercoiled“ DNA relativ weniger ab als die einer entsprechenden ringoffenen oder linearen Form^[85].

Die meisten Methoden zur Isolierung von extrachromosomaler DNA machen von den beschriebenen Eigenschaften Gebrauch. Im folgenden kann nur eine kurze Beschreibung der Prinzipien der wichtigsten Methoden gegeben werden.

Der erste Schritt bei allen Isolierungsmethoden ist eine schonende Lysis der Bakterienzellen; Scherkräfte müssen vermieden und nucleolytische Aktivitäten gehemmt werden. Dazu werden die Bakterienzellen (z.B. *E. coli*) in hypertonischen Pufferlösungen suspendiert und mit Lysozym behandelt. Dieses Enzym bewirkt eine hydrolytische Spaltung des Mureins, eines wesentlichen Bestandteiles der Zellwand der Bakterien. Die so entstandenen Sphäroplasten (Bakterienzellen, die einen wesentlichen Teil ihrer Zellwand verloren haben) werden in Gegenwart von Natrium-äthylendiamintetraacetat (hemmt durch Komplexbildung von Mg²⁺-, Ca²⁺- und Mn²⁺-Ionen die Aktivität von Desoxyribonucleasen) meist durch Detergentien, gelegentlich auch durch osmotischen Schock, oder durch Behandlung mit Alkali lysiert. Als Detergentien haben sich vor allem Natriumdodecylsulfat, Sarkosyl NL-30, Natriumdesoxycholat und die nichtionischen Detergentien Brij 58 und Triton X 100 bewährt. Letztere sind in der Lage, Sphäroplasten von *E. coli* zu lysieren, ohne den Komplex aus Zellmembran und chromosomaler DNA zu zerstören. Dadurch läßt sich dieser Komplex bei relativ niedriger Geschwindigkeit (6000 × g) abzentrifugieren, während die erheblich kleinere extrachromosomale DNA weitgehend im Überstand bleibt. Die erhaltenen Zellsate werden entweder direkt^[87] oder wie beschrieben nach Abzentrifugieren eines großen Teiles der chromosomalen DNA^[88] den weiteren Reinigungsschritten unterworfen.

Das wichtigste Verfahren zur Reinigung von „supercoiled“ DNA dürfte die von Radloff et al. eingeführte Gleichgewichtszentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Gradienten in Gegenwart eines Überschusses an Ethidiumbromid

sein^[85]. Dabei wird die DNA in eine Bande höherer Dichte, welche die „supercoiled“ DNA enthält, und eine Bande mit geringerer Dichte, die lineare und/oder ringoffene DNA enthält, aufgetrennt.

Ein anderes Verfahren macht von der leichten Renaturierbarkeit der „supercoiled“ DNA Gebrauch. Durch alkalische Denaturierung und anschließende Neutralisation werden lineare und ringoffene DNA-Moleküle in einsträngige DNA überführt, während die kovalent geschlossenen DNA-Ringe wieder in die „supercoiled“-Konformation zurückkehren. Durch Filtration durch Nitrocellulose, an der die denaturierte einsträngige DNA zurückgehalten wird, läßt sich die „supercoiled“ DNA abtrennen^[89]. Eine entsprechende Trennung kann man auch durch Chromatographie an benzoylierten oder naphthoylierten DEAE-Säulen erreichen^[90].

Infolge der höheren Anfälligkeit gegenüber Scherkräften (siehe oben) kann man durch mechanisches Rühren lineare chromosomale DNA leichter fragmentieren als die „supercoiled“ extrachromosomale DNA. Durch anschließende Sedimentation im alkalischen Zuckergradienten (siehe unten) können vor allem größere „supercoiled“ DNA-Moleküle wie F- und F'-Faktoren sowie R-Faktoren von der chromosomalen DNA abgetrennt werden^[91,92].

Eine anfänglich häufig benutzte Methode beruht auf der Transferierung von Plasmiden in Wirtszellen, deren DNA eine unterschiedliche Schwimmdichte besitzt (z.B. *Proteus mirabilis*). Die beiden DNA-Spezies lassen sich dann entweder durch mehrmalige Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Gradienten oder durch Chromatographie an Säulen trennen, die mit Kieselgur gefüllt sind, das mit methyliertem Albumin ummantelt ist (MAK-Säule)^[93].

10. Besondere Plasmid-DNA-Moleküle

Die beschriebenen DNA-Reinigungsmethoden ermöglichen das Auffinden einer Reihe interessanter Plasmid-DNA-Formen. Beispiele sind die oligomeren und catenierten DNA-Formen und die DNA-Replikationszwischenprodukte^[94–100].

Unter oligomerer DNA versteht man ringförmige DNA-Moleküle, die aus zwei oder mehr kovalent verbundenen, identischen Genomen bestehen (Abb. 10), während bei catenierten DNA-Molekülen zwei oder mehr Genome durch topologische Bindung (ähnlich wie bei Catena-Verbindungen^[101]) zusammengehalten werden (Abb. 11). Oligomere DNA-Moleküle können, wie die monomere DNA, in der „supercoiled“ Konformation und in der ringoffenen Konformation auftreten. Ihre physikalischen Eigenschaften (mit Ausnahme ihrer Größe) und damit die Isolierungsmethoden sind die gleichen wie die der monomeren Form. Catenierte DNA-Moleküle dagegen können unterschiedliche Konformationen und damit unterschiedliche Eigenschaften annehmen, die sich auf ihre Isolierung auswirken. Bei catenierten Molekülen, die nur aus zwei Partnern bestehen, sind bereits drei Möglichkeiten gegeben.

1. Beide Moleküle liegen in der „supercoiled“ Form vor (Abb. 11a). Ein solches DNA-Molekül hat dieselben Eigen-

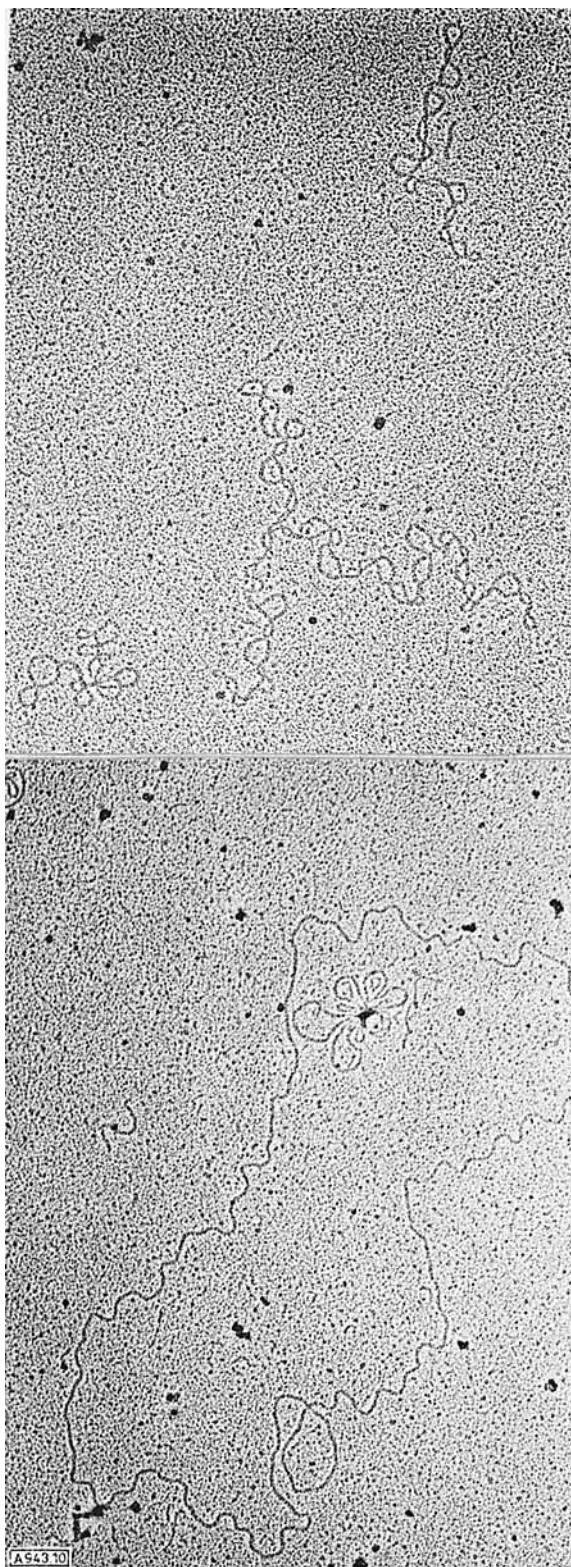


Abb. 10. Oligomere DNA des colicinogenen Faktors E 1 aus *E. coli*. Oben: Zwei „supercoiled“ monomere Col-E₁-DNA-Moleküle und eine „supercoiled“ trimere Form. Unten: Ringoffenes trimeres Col-E₁-DNA-Molekül (nach [99]).

schaften (Sedimentation, Denaturierung, Farbstoffadsorption) wie eine „supercoiled“ oligomere DNA derselben Größe. Die Unterscheidung zwischen beiden ist elektronenmikroskopisch möglich.

2. Beide Moleküle liegen in der ringoffenen Form vor (Abb. 11b). Derartige Moleküle lassen sich durch ihre

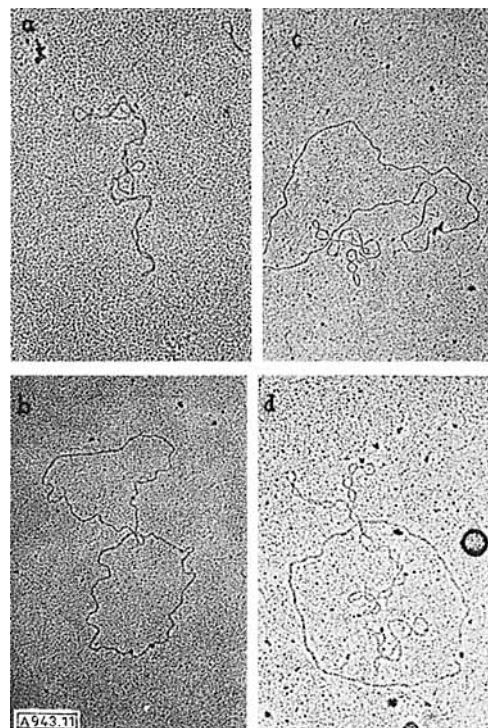
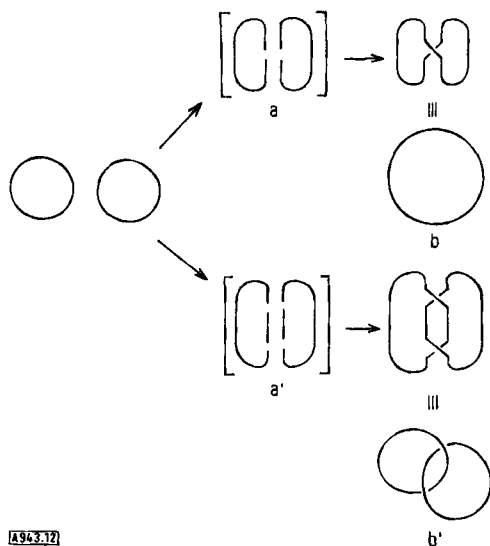


Abb. 11. Catenierte DNA des colicinogenen Faktors E 1 aus *E. coli*. a) Catenat aus zwei topologisch verknüpften „supercoiled“ Col-E₁-Molekülen. b) Catenat aus zwei ringoffenen monomeren Col-E₁-DNA-Molekülen. c) Catenat aus einem „supercoiled“ monomeren und einem ringoffenen dimeren Col-E₁-DNA-Molekül. d) Catenat aus einem „supercoiled“ trimeren und einem ringoffenen dimeren Col-E₁-DNA-Molekül (nach [99]).

physikalischen Eigenschaften nicht von entsprechenden ringoffenen Oligomeren unterscheiden. Auch hier ist eine Differenzierung nur elektronenmikroskopisch möglich.

3. Ein Molekül liegt in der „supercoiled“, das andere in der ringoffenen Konformation vor (Abb. 11c und 11d). Diese catenierten DNA-Moleküle unterscheiden sich charakteristisch aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften von „supercoiled“ und von ringoffener DNA gleicher Größe. Ihre Kapazität, bestimmte Farbstoffmoleküle (Ethidiumbromid) zu binden, liegt logischerweise zwischen der von ringoffener und der von „supercoiled“ DNA. Demzufolge findet man diese DNA-Moleküle in einem CsCl-Ethidiumbromid-Gradienten (siehe Abschnitt 9) in einer mittleren Bande zwischen der schweren bzw. leichten Bande von supercoiled bzw. linearer und ringoffener DNA^[94]. Das Sedimentationsverhalten dieser catenierten DNA-Moleküle in neutraler und alkalischer Lösung unterscheidet sich ebenfalls charakteristisch von dem der „supercoiled“ und der ringoffenen DNA^[94]. Catenierte DNA-Moleküle mit drei und mehr topologisch verknüpften Partnern, die wiederum monomere oder oligomere Formen sein können, sind ebenfalls isoliert worden. Oligomere und catenierte DNA-Moleküle treten bei normalem Wachstum der Bakterien bei den meisten Plasmiden nur in sehr geringen Konzentrationen auf. Eine gesteigerte Bildung dieser DNA-Formen läßt sich jedoch zumindest bei einigen Plasmiden erreichen^[95, 98, 99, 102–104].

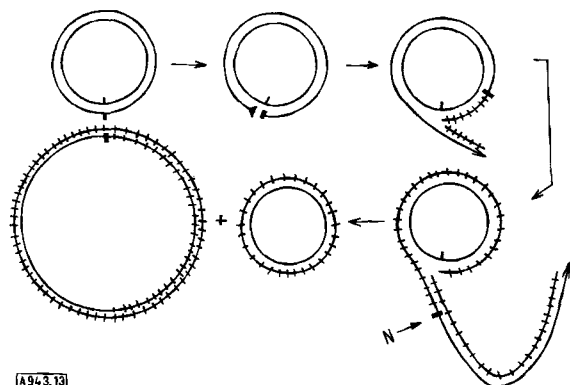
Für die Bildung von oligomeren und catenierten DNA-Formen sind zwei Prozesse vorgeschlagen worden: 1. Rekombination^[94] – hierbei werden zwei Plasmid-DNA-



A943.12

Abb. 12. Rekombinationsmodell zur Entstehung von oligomeren und catenierten DNA-Molekülen (modifiziertes Modell nach [94]). Die kreisförmigen DNA-Moleküle werden entweder einmal (a) oder zweimal (a') gebrochen. Bei einem einfachen Bruch ergibt eine reziproke Verknüpfung ein dimeres DNA-Molekül (b), während bei zweifachem Bruch und reziproker Verknüpfung ein cateniertes DNA-Molekül (b') entsteht.

Moleküle durch Bruch und reziproke Wiedervereinigung verknüpft (Abb. 12) – und 2. fehlerhafte Replikation^[95] (Abb. 13) (siehe Abschnitt 11). Die Frage nach dem rich-



A943.13

Abb. 13. Replikationsmodell für die Entstehung von oligomeren DNA-Formen (modifiziertes Modell nach [95] – siehe dazu auch Abb. 16). Der „Fehler“ bei der Replikation besteht hier darin, daß die Endonuclease (N) den linearen Strang nicht nach der ersten Replikationsrunde, sondern erst nach der zweiten (oder dritten, etc.) Runde schneidet. Durch Ringschluß des linearen Stranges entstehen dann neben einem monomeren DNA-Molekül multiple (oligomere) DNA-Moleküle. — parentale (alte) DNA, ||||| neu replizierte DNA.

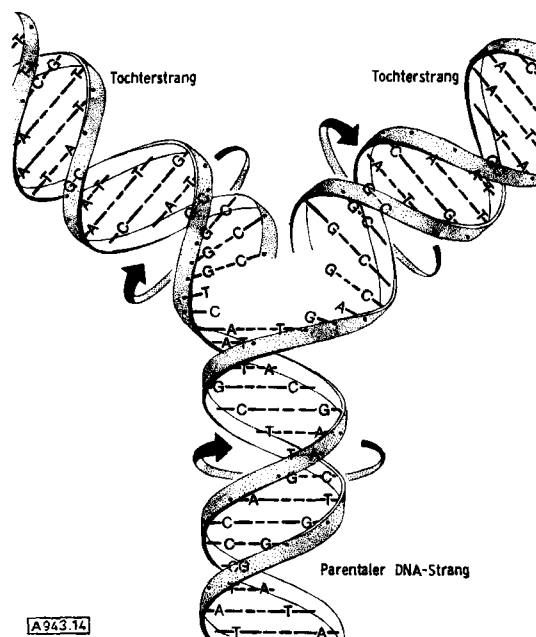
tigen Prozeß kann noch nicht mit Sicherheit beantwortet werden; eine Reihe von Befunden scheint für fehlerhafte Replikation zu sprechen^[95, 105].

11. Replikation extrachromosomaler DNA-Faktoren

Über den Mechanismus der DNA-Replikation in Bakterien, dessen Details noch weitgehend unverstanden sind, gibt es eine Reihe neuerer Zusammenfassungen^[106–109]. Hier sollen nur die groben Umrisse skizziert und bisher bekannte Besonderheiten der Replikation von Plasmid-

DNA hervorgehoben werden. Die Replikation jeder autonomen genetischen Einheit (Replikon)^[74] läßt sich in drei Teilabschnitte zerlegen:

1. Anheftung der DNA an eine spezifische Replikationsstelle, die sich vermutlich an der Zellmembran des Bakteriums befindet^[2].
2. Start (Initiation) der DNA-Synthese^[108], für den sowohl ein positiver^[74] als auch ein negativer^[110] Regulationsmechanismus postuliert wurde.
3. Verlängerung (Elongation) der wachsenden DNA-Kette durch enzymatische Polymerisierung von Desoxyribonucleosidtriphosphaten, wobei die beiden Elternstränge der DNA als Matrizen dienen (Abb. 14)^[111].



A943.14

Abb. 14. Semikonservative Replikation eines linearen DNA-Moleküls.

Sowohl für bakterielle chromosomale DNA als auch für Plasmid-DNA gibt es eine Reihe von Hinweisen, daß spezifische Membrananheftungsstellen existieren (siehe Abschnitt 8).

Als Start für die DNA-Synthese eines kovalent geschlossenen ringförmigen Plasmid-DNA-Moleküls ist ein spezifischer Bruch in einem der beiden DNA-Stränge postuliert worden, der die Trennung der Stränge ermöglicht. Unbekannt ist, ob dieser wichtige Teilschritt von einer positiv (Initiator) oder von einer negativ wirkenden Substanz (Repressor) reguliert wird. Die laufende Neusynthese von zwei Proteinen, die durch Chloramphenicol verschieden beeinflusst wird^[106], ist offensichtlich Voraussetzung für die Initiation der Synthese der chromosomalen DNA in *E. coli*. Chloramphenicol hemmt auch die Initiation der DNA-Synthese von vielen Transferfaktoren. Eine interessante Ausnahme sind die beiden nichttransferfähigen Plasmide, der colicinogene Faktor E₁ und die minicirculäre DNA von *E. coli* 15, die beide in Gegenwart von Chloramphenicol weiterrepliziert werden^[71, 113]. Auch andere Befunde sprechen dafür, daß die Initiation von Plasmid-DNA nicht nach einem einheitlichen Mechanismus abzulaufen scheint^[98, 114].

Wie die Isolierung und die genetische Charakterisierung von temperatursensitiven DNA-Replikationsmutanten gezeigt haben, sind an der Kettenverlängerung (Elongation) von chromosomaler DNA in *E. coli* mindestens vier Proteine beteiligt, deren biochemische Natur jedoch weitgehend unbekannt ist^[112]. Diese Mutanten zeigen bei 30°C eine normale Synthese der chromosomalen DNA, während bei 40–43°C die Replikation dieser DNA eingestellt wird. Biochemische Untersuchungen über die Replikation von Plasmiden in derartigen Replikationsmutanten, bei denen die Elongation defekt ist, haben gezeigt, daß ähnlich wie bei der Initiation auch bei der Elongation charakteristische Unterschiede zwischen den verschiedenen Plasmiden auftreten^[98, 122–124, 127]. Besonders interessant ist dabei die unterschiedliche Abhängigkeit der Plasmid-Replikation von den verschiedenen DNA-Polymerasen von *E. coli*.

Seit der Isolierung einer Mutante (Pol A), die praktisch keine DNA-Polymerase-I-Aktivität (Kornberg-Polymerase) mehr besitzt und trotzdem normales Wachstum und normale Synthese der chromosomalen DNA zeigt^[117], nimmt man an, daß die Polymerase I keine Rolle bei der semikonservativen Replikation der chromosomalen DNA in *E. coli* spielt, sondern ein Reparaturenzym für die DNA ist^[118]. Mittlerweile sind zwei weitere DNA-Polymerasen (II und III) nachgewiesen worden^[119–121]. Kürzlich konnten Gefter et al. zeigen, daß eine Klasse von temperatursensitiven DNA-Replikationsmutanten (dna-E-Mutanten) eine temperatursensitive DNA-Polymerase-III-Aktivität besitzt^[112]. Dieser Befund zeigt, daß der Polymerase III eine wesentliche Funktion bei der semikonservativen DNA-Synthese zukommt. Dieses Enzym scheint auch für die semikonservative Replikation von Transferfaktoren verantwortlich zu sein. Einige experimentelle Befunde sprechen allerdings dafür, daß an der Replikation der bereits erwähnten Plasmide, des colicinogenen Faktors E₁ und der minicirculären DNA von *E. coli* 15 die Polymerase I beteiligt ist^[122–124], während Polymerase III nicht notwendig zu sein scheint. DNA-Polymerase II ist an der Replikation von Plasmid-DNA in keinem der bisher untersuchten Systeme beteiligt^[121a].

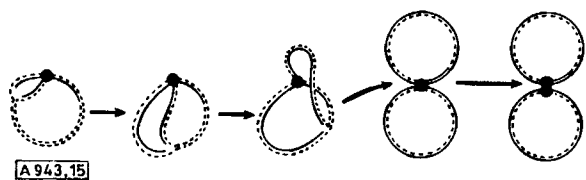


Abb. 15. Replikation eines ringförmigen DNA-Moleküls nach Cairns. Das Modell basiert auf der Annahme, daß die Replikation immer an derselben Stelle beginnt und in dieselbe Richtung verläuft (modifiziert nach [115]).

Für die semikonservative Replikation von ringförmiger Plasmid-DNA sind zwei Modelle vorgeschlagen worden: das klassische „Cairns-Modell“ (Abb. 15)^[115] und das „Rolling-circle-Modell“ (Abb. 16)^[116].

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen sind für Col-E₁-DNA und für minicirculäre DNA von *E. coli* 15 sowohl „Cairns-Strukturen“ als auch „Rolling-circle“-Strukturen (ringförmige DNA-Moleküle mit doppelsträngigem linearem Schwanz) gefunden worden^[197, 103, 104]. So-

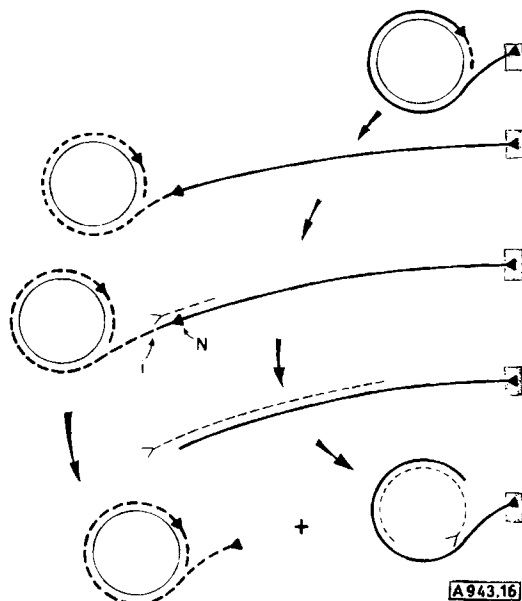


Abb. 16. Replikation eines ringförmigen DNA-Moleküls nach dem „Rolling-circle-Modell“ von Gilbert und Dressler. Ein Strang der ringförmigen, doppelsträngigen DNA wird geöffnet und das freie Ende an einer Membranstelle fixiert. Der gebrochene Strang wird kontinuierlich am abrollenden intakten ringförmigen Strang herausgezogen und schrittweise nachrepliziert (gestrichelte Linie). Bei i beginnt am herausgezogenen Strang die Initiation der Synthese des komplementären Stranges. Eine Endonuclease (N = „Nickase“) trennt die replizierende Struktur so, daß nach Ringschluß des linearen Teils zwei ringförmige DNA-Moleküle entstehen (nach [116]).

mit läßt sich nicht eindeutig entscheiden, welches der beiden Modelle für die Replikation von Plasmid-DNA zutrifft. Möglicherweise können beide gleichzeitig vorkommen.

Die Replikationsweise der verschiedenen Plasmide zeigt deutliche Unterschiede, wenn man das Verhalten der einzelnen Kopien von Plasmid-DNA während eines Zellteilungscycluses verfolgt: Wenn eine Kopie Plasmid-DNA pro Chromosom vorliegt, wird die Plasmid-DNA synchron mit der chromosomalen DNA repliziert, d. h. während die chromosomale DNA einmal repliziert, findet auch genau eine Replikationsrunde der Plasmid-DNA statt. Bei Plasmiden, die in vielen Kopien pro Chromosom vorliegen (z. B. Col E₁, minicirculäre DNA von *E. coli* 15, R-Faktor NR 1 in *P. mirabilis*), wird zwar eine konstante Anzahl von DNA-Kopien repliziert, die einzelnen Kopien werden aber statistisch ausgewählt, d. h. während einer Replikationsrunde des Chromosoms werden einige Kopien einmal, andere zweimal oder mehrfach und eine entsprechende Anzahl von Kopien überhaupt nicht repliziert^[125–127]. Diese statistische Selektion der zu replizierenden Kopien deutet darauf hin, daß entweder weniger spezifische Replikationsstellen an der Zellmembran als DNA-Kopien vorhanden sind oder daß für diese Plasmide überhaupt keine derartigen spezifischen Stellen in der Zelle existieren (siehe Abschnitt 8).

Die hier aufgeführten Befunde sprechen dafür, daß die DNA-Replikation von Plasmiden nicht nach einem einheitlichen Schema abläuft, in dem alle Komponenten gleich sind. Dies könnte zugleich ein Hinweis dafür sein, daß der Bakterienzelle mehr als nur ein einziger DNA-Replikationsmechanismus möglich ist.

12. Schlußbetrachtung

Die Bakterien, allen voran das am besten untersuchte Enterobacterium *Escherichia coli*, verfügen über ein reiches Angebot an extrachromosomaler DNA, die ihnen außer den durch die chromosomale DNA determinierten biochemischen Leistungen zusätzliche Fähigkeiten verleiht. Obwohl diese genetischen Zusatzelemente als „nicht-essenziell“ bezeichnet werden, können sie der Zelle einen entscheidenden Selektionsvorteil bieten. Darüber hinaus soll hier nochmals daran erinnert werden, daß einige Plasmide, vor allem die R-Faktoren, eine nicht zu unterschätzende potentielle Gefahr für den Menschen bilden. Durch ihre Fähigkeit, Antibiotika zu inaktivieren und diese Eigenschaft auch auf andere geeignete Bakterien zu übertragen, entstehen – begünstigt durch die manchmal unüberlegte Anwendung von Antibiotika – immer mehr Antibiotika-resistente Keime auch unter den humanpathogenen Bakterien, die dann einer therapeutischen Behandlung durch Antibiotika nur noch äußerst schwer zugänglich sind. Die spezifischen Eigenschaften dieser Plasmide, wie die leichte Transferierbarkeit von Zelle zu Zelle und die Fähigkeit zur Vergrößerung der informativen Kapazität durch Rekombination, machen sie zu variablen genetischen Systemen, die zur raschen Verbreitung von genetischer Information geeignet sind.

Darüber hinaus sind die Plasmide allgemein aufgrund ihrer relativ geringen Größe geeignete Objekte, um grundlegende Fragen im Zusammenhang mit der Etablierung und der Selbstduplizierung von genetischem Material in Bakterien zu untersuchen. Noch völlig ungeklärt ist die Herkunft dieser genetischen Elemente. Hier kann nur auf Spekulationen verwiesen werden^[12, 128]. Unbekannt ist auch die Natur der meisten Genprodukte, die von Plasmiden determiniert werden.

Mit Sicherheit wird die Untersuchung dieser DNA-Systeme auch in den kommenden Jahren unser Verständnis der genetischen und biochemischen Zusammenhänge in Bakterien bereichern.

Die zitierten eigenen Arbeiten entstanden in Zusammenarbeit mit Fräulein H. Schrempf, Frau B. Royer-Pokora, Frau W. Schroen und den Herren W. Schiess, J. Kreft und K. Kapassakalis und wurden in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie unterstützt. Herrn Prof. Dr. F. Lings danke ich besonders für die finanzielle Unterstützung und für das Interesse an dieser Arbeit.

Eingegangen am 4. August 1972 [A 943]

- [1] J. E. Hearst u. M. Botchan, *Annu. Rev. Biochem.* 39, 151 (1970).
- [2] A. Ryter, *Bacteriol. Rev.* 32, 39 (1968).
- [3] Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31 (1966).
- [4] E. P. Geiduschek u. R. Haselkorn, *Annu. Rev. Biochem.* 38, 647 (1969); Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34 (1969).
- [5] M. Nomura, *Bacteriol. Rev.* 34, 228 (1970).
- [6] P. Lengyel u. D. Söll, *Bacteriol. Rev.* 33, 264 (1969).
- [7] Y. Hirota u. T. Iijima, *Nature* 180, 655 (1957).
- [8] D. H. Bouanchaud, M. R. Scavizzi u. Y. A. Chabbert, *J. Gen. Microbiol.* 54, 33 (1968).
- [9] M. Tomoeda, M. Inuzuka, N. Kubo u. S. Nakamura, *J. Bacteriol.* 95, 1078 (1968).

- [10] G. E. W. Wolstenholme u. M. O'Connor: *Bacterial Episomes and Plasmids*. Churchill Ltd., London 1969.
- [11] J. Scaife, *Annu. Rev. Microbiol.* 21, 601 (1967).
- [12] E. Meynell, G. G. Meynell u. N. Datta, *Bacteriol. Rev.* 32, 55 (1968).
- [13] R. Curtiss III, *Annu. Rev. Microbiol.* 23, 69 (1969); R. P. Novick, *Bacteriol. Rev.* 33, 210 (1969).
- [14] J. Lederberg u. E. L. Tatum, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 11, 113 (1946).
- [15] M. Ishibashi, *J. Bacteriol.* 93, 379 (1967).
- [16] N. D. Zinder, *Annu. Rev. Microbiol.* 19, 455 (1965); L. G. Caro u. M. Schnös, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 56, 126 (1966).
- [17] D. Vapnek u. W. D. Rupp, *J. Mol. Biol.* 53, 287 (1970); 60, 413 (1971).
- [18] D. Vapnek, M. B. Lipman u. W. D. Rupp, *J. Bacteriol.* 108, 508 (1971).
- [19] L. L. Sforza, J. Cavalli, J. Lederberg u. E. M. Lederberg, *J. Gen. Microbiol.* 8, 89 (1953).
- [20] A. J. Clark u. E. A. Adelberg, *Annu. Rev. Microbiol.* 16, 289 (1962).
- [21] D. Freifelder, *J. Mol. Biol.* 35, 95 (1968).
- [22] D. R. Helinski u. D. B. Clewell, *Annu. Rev. Biochem.* 40, 899 (1971).
- [23] F. T. Hickson, T. F. Roth u. D. R. Helinski, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1731 (1967).
- [24] D. Freifelder, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 425 (1968).
- [25] T. Watanabe u. T. Fukasawa, *J. Bacteriol.* 81, 669 (1961).
- [26] T. Watanabe, *Bacteriol. Rev.* 27, 87 (1963).
- [27] Y. A. Chabbert, J. G. Baudens u. D. H. Bouanchaud in [10], S. 234.
- [28] H. S. Ginoza u. T. S. Matney, *J. Bacteriol.* 85, 1177 (1963).
- [29] E. S. Baron u. S. Falkow, *Genetics* 46, 849 (1961).
- [30] T. Yokota, T. Kasuga, M. Kaneko u. S. Kuwahara, *J. Bacteriol.* 109, 440 (1972).
- [31] G. A. J. Ayliffe, E. J. L. Lowbury u. E. Roe, *Nature New Biol.* 235, 141 (1972).
- [32] T. Aohi, S. Egusa, Y. Ogata u. T. Watanabe, *J. Gen. Microbiol.* 65, 343 (1971).
- [33] H. Jarolmen u. G. Kemp, *J. Bacteriol.* 99, 487 (1969).
- [34] T. Watanabe u. T. Fukasawa, *J. Bacteriol.* 83, 727 (1962).
- [35] T. Watanabe, H. Nishida, C. Ogata, T. Arai u. S. Sato, *J. Bacteriol.* 88, 716 (1964).
- [36] T. Nisioka, M. Mitani u. R. Clowes, *J. Bacteriol.* 97, 376 (1969).
- [37] S. N. Cohen u. C. A. Miller, *J. Mol. Biol.* 50, 671 (1970).
- [38] S. Okamoto u. Y. Susuki, *Nature* 208, 1301 (1965).
- [39] W. V. Shaw u. R. F. Brodsky, *J. Bacteriol.* 95, 28 (1968).
- [40] N. Datta u. P. Kontomichalou, *Nature* 208, 239 (1965).
- [41] M. Okanishi, S. Kondo, Y. Susuki, S. Okamoto u. H. Umezawa, *J. Antibiot.* 20, 132 (1967).
- [42] H. Umezawa, M. Ikanishi, R. Utahara, K. Maeda u. S. Kondo, *J. Antibiot.* 20, 136 (1967).
- [43] T. J. Franklin, *Biochem. J.* 105, 371 (1967).
- [44] T. J. Franklin u. S. J. Foster, *Biochem. J.* 121, 287 (1971).
- [45] M. H. Richmond u. J. Johnston in [10], S. 179.
- [46] R. P. Novick, *J. Gen. Microbiol.* 33, 121 (1963).
- [47] M. G. Rush, C. N. Gordon, R. P. Novick u. R. C. Warner, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63, 1304 (1969).
- [48] E. H. Ashershov, *Nature* 210, 804 (1966).
- [49] M. H. Richmond, *J. Mol. Biol.* 26, 357 (1967).
- [50] R. P. Novick, *Fed. Proc.* 27, 29 (1967).
- [51] P. Reeves, *Bacteriol. Rev.* 29, 24 (1965); I. Smarda: *Bacteriocine und bacteriocin-ähnliche Substanzen*. Fischer, Jena 1971.
- [52] M. Nomura u. A. Maeda, *Zentralbl. Bakteriell., Parasitenk., Infektionskr. Hyg., Abt. I Orig.* 196, 216 (1965).
- [53] N. Nomura, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 52, 1514 (1964).
- [54] S. E. Luria, *Angew. Chem.* 82, 947 (1970).
- [55] T. Boon, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2421 (1971).
- [56] M. Nomura, *Nature New Biol.* 234, 133 (1971).
- [57] P. Fredericq in [10], S. 163.
- [58] B. A. D. Stocker, M. Smith u. H. Ozeki, *J. Gen. Microbiol.* 30, 201 (1963).
- [59] S. Edwards u. G. G. Meynell, *Nature* 219, 869 (1968).
- [60] G. G. Meynell u. A. M. Lawn, *Nature* 217, 1184 (1968).
- [61] H. W. Smith, *J. Path. Bact.* 85, 197 (1963).

- [62] H. W. Smith u. S. Halls, *J. Gen. Microbiol.* 47, 153 (1967).
- [63] W. Goebel u. H. Schrempf, *J. Bacteriol.* 106, 311 (1971).
- [64] W. Goebel u. B. Royer-Pokora, noch unveröffentlicht.
- [65] H. W. Smith u. S. Halls, *J. Gen. Microbiol.* 52, 319 (1968).
- [66] I. Orskov u. F. Orskov, *J. Bacteriol.* 91, 69 (1966).
- [67] P. Layne, A. S. L. Hu, A. Balows u. B. R. Davis, *J. Bacteriol.* 106, 1029 (1971).
- [68] A. M. Chakrabarty u. J. C. Gunsulius, *Genetics* 68, S10 (1971).
- [69] F. C. Cannon, L. K. Dunican u. F. O'Gara, *Biochem. J.* 125, 103 P (1971).
- [70] N. R. Cozzarelli, R. B. Kelly u. A. Kornberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 60, 992 (1968).
- [71] W. Goebel u. H. Schrempf, *J. Bacteriol.* 111, 696 (1972).
- [72] A. C. Mac Farren u. R. C. Clowes, *J. Bacteriol.* 94, 365 (1967).
- [73] J. Scaife u. J. D. Gross, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 403 (1962).
- [74] F. Jacob, S. Brenner u. F. Cuzin, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 329 (1963).
- [75] R. P. Novick, *Proc. 5th Int. Congr. Chemother., Wien 1967*, S. 269.
- [76] E. C. Friedberg u. D. A. Goldthwait, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 62, 934 (1969).
- [77] W. Goebel u. D. R. Helinski, *Biochemistry* 9, 4793 (1970).
- [78] W. B. Upholt, H. B. Gray jr. u. J. Vinograd, *J. Mol. Biol.* 62, 21 (1971).
- [79] R. Weil u. J. Vinograd, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 50, 730 (1963).
- [80] P. H. Pouwels, C. M. Knijnenburg, J. Van Rotterdam, J. A. Cohen u. H. S. Jansz, *J. Mol. Biol.* 32, 169 (1968).
- [81] J. Vinograd u. J. Lebowitz, *J. Gen. Physiol.* 49, 103 (1966).
- [82] J. Vinograd, J. Lebowitz, R. Radloff, R. Watson u. P. Laipis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 53, 1104 (1965).
- [83] J. Vinograd, J. Morris, N. Davidson u. W. F. Dove jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 49, 12 (1963).
- [84] J. Vinograd, J. Lebowitz u. R. Watson, *J. Mol. Biol.* 33, 173 (1968).
- [85] R. Radloff, W. Bauer u. J. Vinograd, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1514 (1967).
- [86] J. C. Wang, D. Baumgarten u. B. M. Olivera, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1852 (1967).
- [87] M. Bazaral u. D. R. Helinski, *J. Mol. Biol.* 36, 185 (1968).
- [88] D. B. Clewell u. D. R. Helinski, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 62, 1159 (1969).
- [89] H. S. Jansz, P. H. Pouwels u. J. Schiphorst, *Biochim. Biophys. Acta* 123, 626 (1966).
- [90] T. Komano u. R. L. Sinsheimer, *Biochim. Biophys. Acta* 155, 295 (1968).
- [91] D. Freifelder, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 425 (1968).
- [92] S. N. Cohen u. C. A. Miller, *Nature* 224, 1273 (1969).
- [93] J. D. Mandell u. A. D. Hershey, *Anal. Biochem.* 1, 66 (1960).
- [94] B. Hudson u. J. Vinograd, *Nature* 216, 647 (1967).
- [95] W. Goebel u. D. R. Helinski, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 1406 (1968).
- [96] M. G. Rush, C. N. Gordon, R. P. Novick u. R. C. Warner, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63, 1304 (1969).
- [97] C. S. Lee u. N. Davidson, *Biochim. Biophys. Acta* 204, 285 (1970).
- [98] W. Goebel, *Eur. J. Biochem.* 15, 311 (1970).
- [99] W. Goebel u. J. Kreft, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1699 (1972); unveröffentlichte Ergebnisse.
- [100] J. Inselburg u. M. Fuke, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2839 (1971).
- [101] G. Schill u. A. Lüttringhaus, *Angew. Chem.* 76, 567 (1964); *Angew. Chem. internat. Edit.* 3, 546 (1964).
- [102] S. N. Cohen, R. P. Silver u. A. E. McCoubrey, *Nature New Biol.* 231, 249 (1971).
- [103] J. Inselburg u. M. Fuke, *Science* 169, 590 (1970).
- [104] M. Fuke u. J. Inselburg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 89 (1972).
- [105] W. Goebel, *Biochim. Biophys. Acta* 232, 32 (1971).
- [106] K. G. Lark, *Annu. Rev. Biochem.* 38, 569 (1969).
- [107] R. Calendar, *Annu. Rev. Microbiol.* 24, 241 (1970).
- [108] F. Bonhoeffer u. W. Messer, *Annu. Rev. Genet.* 3, 233 (1969).
- [109] M. Goulian, *Annu. Rev. Biochem.* 40, 855 (1971).
- [110] R. H. Pritchard, P. T. Barth u. J. Collins, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 19, 263 (1969).
- [111] C. C. Richardson, C. L. Schildkraut u. A. Kornberg, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 9 (1963).
- [112] M. L. Gefter, Y. Hirota, T. Kornberg, J. A. Wechsler u. C. Barnoux, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 3150 (1971).
- [113] D. B. Clewell, *J. Bacteriol.* 110, 667 (1972).
- [114] Y. Nishimura, L. Caro, C. M. Berg u. Y. Hirota, *J. Mol. Biol.* 55, 441 (1971).
- [115] J. Cairns, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 43 (1963).
- [116] W. Gilbert u. D. Dressler, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 473 (1968).
- [117] P. De Lucia u. J. Cairns, *Nature* 224, 1164 (1969).
- [118] L. Kanner u. P. Hanawalt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 149 (1970).
- [119] R. Knippers, *Nature* 228, 1050 (1970).
- [120] R. E. Moses u. C. C. Richardson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1557 (1970).
- [121] T. Kornberg u. M. L. Gefter, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 761 (1971).
- [121a] W. Goebel, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [122] D. T. Kingsbury u. D. R. Helinski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1538 (1971).
- [123] W. Goebel, *Nature New Biol.* 237, 67 (1972).
- [124] W. Goebel u. H. Schrempf, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 591 (1972).
- [125] M. Bazaral u. D. R. Helinski, *Biochemistry* 9, 399 (1970).
- [126] R. Rownd, *J. Mol. Biol.* 44, 387 (1969).
- [127] W. Goebel u. H. Schrempf, *Biochim. Biophys. Acta* 262, 32 (1971).
- [128] T. Watanabe, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 182, 126 (1971).