

MIROSLAWA WŁODARCZYK

Zakład Genetyki Bakterii,

Instytut Mikrobiologii

Uniwersytet Warszawski

Nowy Świat 67, 00-046 Warszawa

E-mail: mira@plearn.edu.pl

WYMIANA MATERIAŁU GENETYCZNEGO I REKOMBINACJA U BAKTERII

APARAT JĄDROWY BAKTERII

Bakterie to organizmy prokariotyczne (*Prokaryota*); od wszystkich pozostałych organizmów żywych (*Eukaryota*), odróżniają się specyficzną strukturą swego aparatu jądrowego. Cała podstawowa informacja genetyczna zawarta jest u bakterii w jednej, kuliście zamkniętej cząsteczce dwuniciowego DNA, powszechnie zwanej chromosomem bakteryjnym (a przez niektórych, dla odróżnienia od tego co rozumiemy pod pojęciem chromosomu eukariotycznego, genoforem). Wielkość chromosomu bakteryjnego mierzona liczbą tysięcy par zasad (tzw. kb) zawiera się w przedziale od 700 do blisko 10 000 kb. Dla *Escherichia coli* (pałeczki okrężnicy), będącej modelowym organizmem w badaniach genetycznych bakterii, wartość ta wynosi 4700 kb i odpowiada długości 1400 μm . Długość chromosomu przewyższa więc ponad tysiąc razy długość komórki, co bezpośrednio wskazuje na konieczność silnej kondensacji DNA. Chromosom bakteryjny uorganizowany jest w komórce w tzw. nukleoid, będący funkcjonalnym, lecz nie strukturalnym odpowiednikiem jądra (nucleus) komórki eukariotycznej. Nukleoid zajmuje jedynie część objętości komórki, mimo, że nie jest z cytoplazmy wydzielony błoną ograniczającą. Podwójna helisa DNA w nukleoidzie jest superspiralnie skręcona i z udziałem stabilizującego ją RNA i białek tworzy kilkadziesiąt domen (pętli) o dużym stopniu autonomii strukturalnej (PETTIOHN 1996).

Ważną cechą chromosomu bakteryjnego, odróżniającą go od chromosomów eukariotycznych, jest to, iż stanowi jeden samodzielny replikon. Występuje w nim bowiem tylko jeden

funkcjonalny punkt startu replikacji (*oriV*), od którego zaczyna się powielanie cząsteczki DNA. W wyniku replikacji chromosomu powstają jego dwie identyczne kopie, rozdzielane następnie do komórek potomnych w czasie amitotycznego podziału komórkowego.

Wiele bakterii, poza podstawową informacją genetyczną zawartą w chromosomie, dysponuje dodatkową pulą informacji genetycznej niesionej przez plazmidy. Są to zlokalizowane w cytoplazmie, niewielkie cząsteczki DNA zdolne do autonomicznej, niezależnej od chromosomu replikacji, czyli będące samodzielnymi replikonami. Wachlarz cech kodowanych przez geny o plazmidowej lokalizacji jest szeroki i różnorodny, a jego prezentacja nie mieści się w profilu niniejszego opracowania. Istotne jest, iż wśród tych cech znajduje się warunkowanie zdolności bakterii do koniugacji - paraseksualnego procesu, o którego mechanizmie i znaczeniu będzie mowa dalej.

HAPLOIDALNOŚĆ BAKTERII

Prokaryota są haploidami i w żadnej fazie cyklu życiowego nie występuje u nich naturalna diplofaza. Nawet spotykane u niektórych bakterii dość złożone cykle rozwojowe (np. u *Caulobacter* lub u bakterii śluzowych) mają zupełnie inny charakter niż cykle rozwojowe *Eukaryota* i nie wiążą się nigdy z wytwarzaniem fazy diploidalnej. Nie ma u nich także typowego procesu płciowego, a procesy paraseksualne, które umożliwiają rekombinację, praktycznie nie prowadzą do powstania kompletnej zygoty, a jedynie do wytworzenia tzw. merozygoty (częściowej zygoty), w której tylko niewielka część informacji genetycznej jest zduplikowana.

Haploidalność bakterii powoduje, że każda zmiana zapisu informacji genetycznej będąca wynikiem mutacji objawi się w odpowiednich warunkach jako natychmiastowa, lub nieznacznie tylko opóźniona zmiana fenotypu. Z tego właśnie względu, zmienność mutacyjna, jako źródło genetycznej różnorodności odgrywa u bakterii niewątpliwie większą rolę niż u organizmów diploidalnych, u których uszkodzenie jednego allelu genu, nie powoduje z reguły natychmiastowych skutków. Stwierdzenia tego nie zmienia nawet fakt funkcjonowania u bakterii bardzo licznych mechanizmów, dzięki którym wiele pierwotnych, potencjalnie mutagennych, uszkodzeń DNA ulega naprawie.

REKOMBINACJA GENETYCZNA — DEFINICJA I OGÓLNE ZASADY

Rekombinacja jest procesem o fundamentalnym znaczeniu w biologii. Funkcjonuje ona u wszystkich organizmów żywych, spełniając dwie pozornie przeciwstawne funkcje, zapewniając zarówno zachowanie identyczności genomów w kolejnych pokoleniach, jak i stanowiąc ważne źródło genetycznej różnorodności.

Najogólniej, rekombinację genetyczną możemy określić jako proces, dzięki któremu elementy genetyczne z dwóch różnych źródeł spotykają się, tworząc nowe kombinacje genów. Na poziomie molekularnym, termin rekombinacja oznacza dla nas przeniesienie informacji genetycznej zawartej w jednej cząsteczce DNA do innej. W najbardziej klasycznym schemacie dzieje się to poprzez wymianę odcinków między homologicznymi cząsteczkami DNA, a proces określamy mianem rekombinacji homologicznej, ogólnej lub uprawnionej. Tworzenie nowych kombinacji genów może zachodzić także podczas rekombinacji tak zwanej nieuprawnionej, kiedy to mimo ograniczenia homologii oddziałujących odcinków do bardzo krótkich sekwencji, lub jej zupełnego braku, następuje przerwanie ciągłości cząsteczki DNA i połączenie jej z inną, co daje w konsekwencji wytworzenie nowego układu genów. Obydwa typy rekombinacji różnią się ponadto zespołem uczestniczących w nich enzymów.

Warunkiem bezwzględnie koniecznym do zajścia rekombinacji homologicznej jest wytworzenie stanu przynajmniej częściowej diploidalności, stąd też proces ten u haploidalnych, rozmnażających się przez amitotyczny podział organizmów, nie jest tak powszechny jak u organizmów eukariotycznych. Z kolei jednak, prowadzenie szczegółowej analizy mechanizmów rekombinacji na poziomie molekularnym możliwe jest praktycznie tylko na modelach

bakterii i wirusów, proces jest bowiem zbyt skomplikowany do kompleksowego badania u eukariontów.

Bakterie, mimo braku typowego rozmnażania płciowego, dysponują szeregiem mechanizmów, zwanych procesami paraseksualnymi, dzięki którym może być osiągnięty stan częściowej diploidalności niezbędny do zajścia rekombinacji. Najważniejsze z nich to koniugacja, transformacja i transdukcja. Procesem najbardziej zbliżonym do procesu płciowego eukariontów jest koniugacja.

Poniżej przedstawione zostaną, w ogólnych zarysach, drogi wprowadzania do komórki bakteryjnej (biorcy) DNA pochodzącego z innej komórki (dawcy), a dopiero potem omówione sposoby jego integracji do genomu biorcy, prowadzące do wytworzenia zrekombinowanego chromosomu i w konsekwencji, fenotypowo różnego od „rodziców”, rekombinanta.

MECHANIZMY WPROWADZANIA EGZOGENNEGO DNA DO KOMÓREK BAKTERII

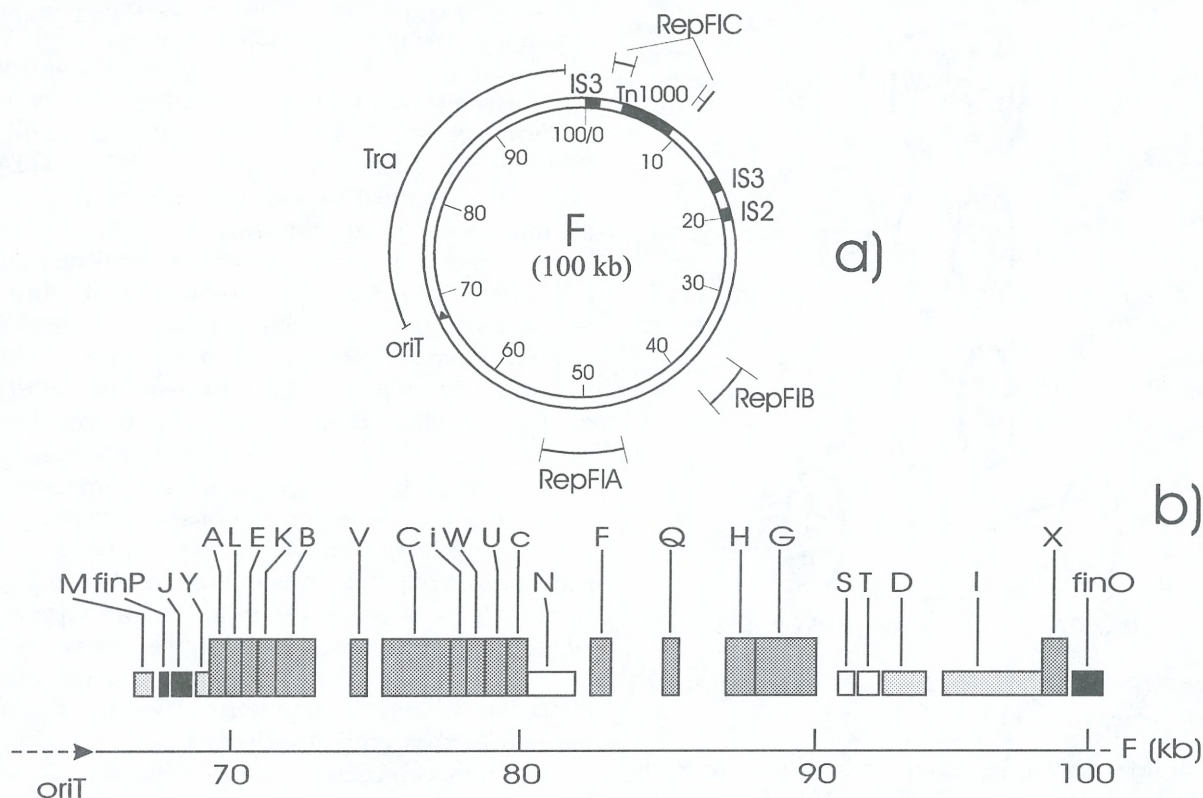
Koniugacja u *Escherichia coli*; przebieg i genetyczne uwarunkowanie

Koniugacją u bakterii nazywamy proces przekazywania materiału genetycznego z komórki do komórki, wymagający bezpośredniego kontaktu partnerów. Dziś wiemy, że proces uwarunkowany jest obecnością w komórce dawcy plazmidu koniugacyjnego, w którego genomie zlokalizowany jest liczny zestaw genów determinujących poszczególne etapy tego złożonego procesu. Po raz pierwszy proces wymiany informacji genetycznej będący następstwem zmieszania dwóch szczepów *Escherichia coli*, różniących się wymaganiami odżywczymi, zaobserwowali w roku 1946 Lederberg i Tatum (WILLETS 1993). W serii eleganckich eksperymentów wyjaśnili oni podstawowe zasady tego procesu, a wśród nich konieczność bezpośredniego kontaktu komórek, jednokierunkowy transfer materiału genetycznego oraz jego związek z obecnością w cytoplazmie komórki dawcy (zwanej także komórką męską) specyficznego czynnika, zwanego wówczas czynnikiem płodności (fertility — stąd nazwa czynnik F, a obecność plazmidu F). Mechanizm koniugacji warunkowanej obecnością plazmidu F i pokoniugacyjnej rekombinacji u *Escherichia coli*, jest poznany najdokładniej ze wszystkich istniejących systemów koniugacji u bakterii. Podstawowe zasady jego funkcjonowania, przedstawione poniżej, można uogólnić na inne systemy koniugacyjne u bakterii gramujemnych, niezależnie od tego, który z licznych plazmidów koniugacyj-

nych je warunkuje (odmienności genetycznej determinacji pewnych etapów procesu koniugacji u bakterii gramdodatnich zostaną omówione oddzielnie).

Plazmid F to kolistą cząsteczka dwuniciowego DNA o wielkości 100 tysięcy par zasad (100 kb), z czego ponad 30% zajmuje region *tra* (od transfer) skupiający geny warunkujące koniugację (FIRTH i współaut. 1996, IPPEN-IHLER i SKURRAY 1993). Uproszczona mapa genetyczna plazmidu F, a także struktura regionu *tra* przedstawiona jest na rycinie 1. Aż kilkanaście

(*traM*, *traI*, *traY* i *traD*), rozpoczyna się od uformowania tak zwanego kompleksu relaksacyjnego w obszarze *oriT* (origin transferu), i wprowadzenia enzymatycznego nacięcia w ściśle określonym miejscu jednej nici DNA tego regionu, przez produkt genu *traI*. To samo białko (TraI) rozwija następnie helisę DNA, a nić z wolnym końcem 5' jest przenoszona do komórki biorcy. Równocześnie z przenoszeniem pojedynczej nici DNA dawcy, następuje w biorcy synteza nici komplementarnej, a także synteza uzupełniająca w komórce dawcy, co powoduje, że komórka



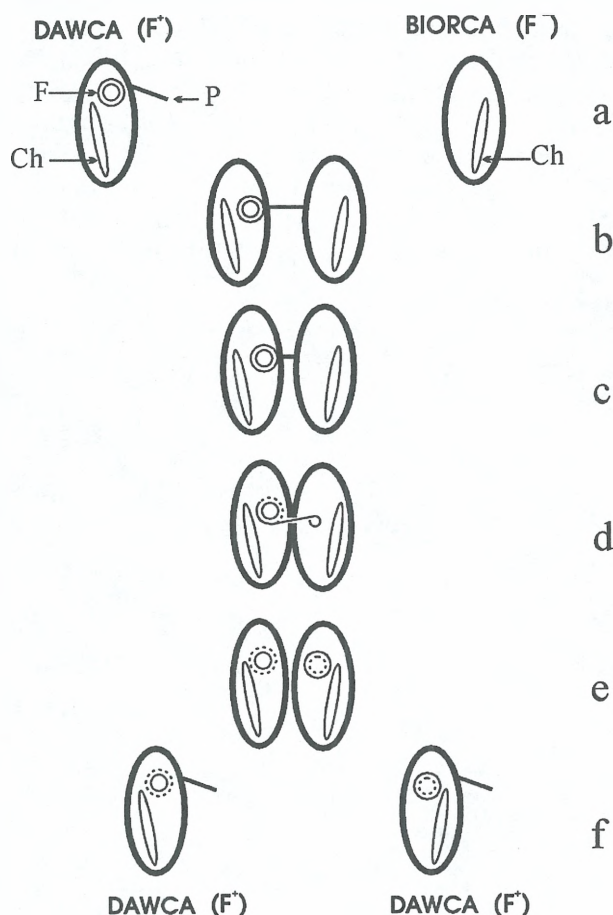
Ryc. 1. Uproszczona mapa genetyczna całego plazmidu F (a) oraz jego regionu *tra* (b).

ad. a) Na mapie plazmidu zaznaczono lokalizację systemów replikacyjnych (RepFIA, RepFIB i RepFIC), regionu *tra*, punktu początkowego transferu (*oriT*) oraz elementów translokacyjnych IS i Tn. ad b) Na mapie regionu *tra* zaznaczono 16 genów warunkujących syntezę pilusów płciowych (wysokie szare słupki), geny koniugacyjnego metabolizmu DNA (M-Y-D-I), geny odpowiedzialne za stabilizację par i wykluczanie powierzchniowe (N-S-T-G/ gen G pełni podwójną funkcję) oraz geny regulacyjne (J, finP, finO). Pominęto pozostałe geny, których funkcja nie została szczegółowo określona.

spośród genów *tra* związanych jest z syntezą przez komórkę *Escherichia coli* posiadającą plazmid F (zwaną komórką męską typu F⁺), „aparatu koniugacyjnego” w postaci pilusów płciowych — struktur komórkowych typu długich, giętkich wypustek. Pilus płciowy warunkuje rozpoznanie komórki biorcy (określanej jako F⁻ lub żeńska) i wytworzenie z nią fizycznego kontaktu. Po retrakcji pilusa i stabilizacji kontaktu par koniugacyjnych przez produkty białkowe kolejnych genów *tra* (*traN* i *traG*), następuje proces przekazywania plazmidu F do komórki biorcy. Proces ten kontrolowany przez zespół genów „koniugacyjnego metabolizmu DNA”

biorcy zyskuje kopię plazmidu F bez utraty plazmidu przez komórkę dawcy (LANKA i WILKINS 1995). Nadrzędna regulacja całego procesu zależna jest od funkcji genów *traJ* oraz *finP* i *finO*. Tak więc, ten pozornie bardzo prosty proces, trwający zaledwie kilka minut wymaga precyzyjnego współdziałania ponad trzydziestu genów. Jego efektem jest lawinowe rozprzestrzenianie się plazmidu F w populacji komórek F⁻ (mówimy, że czynnik F jest wysoce infekcyjny). W omówionej sytuacji do komórki biorcy przekazywany jest tylko plazmid F (patrz rycina 2), a przekazywanie markerów o lokalizacji chromosomowej i stworzenie sytuacji umożliwiają-

cej proces homologicznej rekombinacji genetycznej (czyli powstanie częściowego diploidu) jest bardzo rzadkie.



Ryc. 2. Etapy koniugacji *Escherichia coli* warunkowanej przez plazmid F.

a) Partnerzy koniugacji; dawca typu F^+ i biorca F^- . b) Oddziaływanie między wierzchołkiem pilusa (P) i powierzchnią komórki F^- . c) Retrakcja pilusa i tworzenie pary koniugacyjnej. d) Stabilizacja kontaktu partnerów i przekazywanie DNA plazmidu F. e) Zakończenie transferu i uzupełniającej syntezy DNA obu nici, rozdzielenie partnerów. f) Zakończenie procesu — obaj partnerzy niosą plazmid F, który mogą przekazywać następnym biorcom. Oznaczenia: Ch — chromosom bakterii, F — plazmid F, P — pilus płciowy. Schemat wykonany bez zachowania proporcji wielkości przedstawionych struktur.

Cechą charakteryzującą wiele plazmidów koniugacyjnych, w tym także plazmid F, jest ich zdolność do pośredniczenia w transferze koniugacyjnym genów o lokalizacji chromosomowej (tzw. mobilizacja chromosomu). W przypadku plazmidu F, wynika to z możliwości jego włączania się do chromosomu bakterii. Mechanizm tego procesu jest złożony, a ważną rolę odgrywają w nim sekwencje insercyjne IS obecne w plazmidowym i w chromosomowym DNA. Integracja plazmidu F może następować w wiele miejsc chromosomu, dzięki czemu dysponuje-

my całą pulą stabilnych szczepów Hfr (od ang. high frequency of recombination). Taką nazwę noszą komórki *Escherichia coli* z plazmidem F trwale wbudowanym do chromosomu (Low 1996). Określony szczep Hfr przekazuje geny chromosomowe zawsze w tej samej kolejności poczynając od tego samego punktu początkowego. Natomiast różne szczepy Hfr, punkt początkowy i kierunek przekazywania mają różny, zależny od miejsca i orientacji integracji plazmidu F do chromosomu w czasie ich powstawania. Poszczególne etapy procesu koniugacji w systemie $F^- \times Hfr$ (rozpoznanie biorcy, stabilizacja par koniugacyjnych i rozpoczęcie transferu DNA), są identyczne jak opisane powyżej, jednak w tym przypadku przeniesieniu ulega nie tylko genom plazmidu F (100 kb), ale połączony z nim fizycznie chromosom *Escherichia coli* (4700 kb). Teoretycznie, możliwe jest przeniesienie całego chromosomu dawcy do komórki biorcy (czego wynikiem byłoby wytworzenie w pełni diploidalnej „zygoty”) i potrzeba na to około 100 minut. W praktyce taka sytuacja jest rzadka, zwykle następuje spontaniczne lub sztucznie wywołane przerwanie procesu, a do komórki biorcy dostaje się tylko część chromosomu dawcy, której wielkość zależy od czasu trwania koniugacji. Największe jest prawdopodobieństwo przekazania genów znajdujących się blisko punktu początkowego transferu. Warto wspomnieć, że wykorzystanie odpowiedniego „zestawu” szczepów Hfr oraz zastosowanie techniki tak zwanej przerwanej koniugacji pozwoliło skonstruować szczegółową mapę genetyczną chromosomu *Escherichia coli* na długo przedtem, zanim poznaliśmy jego sekwencję nukleotydową.

Dla naszych rozważań, dotyczących rekombinacji genetycznej, najważniejszym skutkiem omówionego procesu jest, będące rezultatem przekazania do komórki biorcy fragmentu chromosomu, powstanie częściowo diploidalnego układu, który zajście tejże rekombinacji warunkuje.

Plazmid F może powodować także powstanie stanu częściowo diploidalnego (dotyczącego jednak znacznie krótszego fragmentu chromosomowego DNA) według innego niż opisany powyżej mechanizmu (HOLLOWAY i LOW 1966). Otóż integracja plazmidu F do chromosomu nie jest absolutnie nieodwracalna. Jeżeli rzadki przypadek „wycięcia” DNA plazmidu F z chromosomu nastąpi w sposób nieprecyzyjny, może nastąpić trwałe przyłączenie do genomu plazmidowego sąsiadującego z nim w stanie integracji fragmentu chromosomu bakteryjnego. Powstały wtedy plazmid, określany jako F' (F' -prime) zachowuje wszelkie cechy „dzikiego” plazmidu F, w tym zdolność do replikacji w stanie

pozachromosomowym i możliwość koniugacyjnego transferu swego DNA do komórki F⁻. Fragment chromosomu, który stał się integralną częścią cząsteczki plazmidu F, po koniugacyjnym transferze do komórki biorcy posiadającej już taki fragment we własnym chromosomie, powodował będzie powstanie stanu diploidalności tego właśnie regionu chromosomu.

Przedstawiony powyżej koniugacyjny transfer DNA między komórkami *Escherichia coli*, uwarunkowany obecnością plazmidu F odbywa się w podobny sposób u wielu bakterii należących do *Enterobacteriaceae*, a warunkowany jest przez bardzo liczną grupę plazmidów podobnych do plazmidu F (określamy je jako F-like). W innych grupach bakterii gramujemnych występują inne, nie wykazujące homologii z plazmidem F plazmidy koniugacyjne. Mimo istnienia szeregu różnic (np. warunkowanie tworzenia innego typu pilusów — krótkich i sztywnych, odmienne mechanizmy regulacji procesu mobilizacji genów chromosomalnych itp.), ostateczny efekt jest taki sam; wytworzenie stanu częściowej diploidalności genetycznej — warunk niezbędny do podjęcia procesu homologicznej rekombinacji genetycznej. Niektóre plazmidy koniugacyjne (zwane plazmidami o szerokim zakresie gospodarza) mają zdolność pośredniczenia w procesie koniugacji między taksonomicznie odległymi grupami bakterii, nawet między bakteriami gramujemnymi i gramdodatnimi. Opisano nawet koniugacyjny transfer plazmidu bakteryjnego do drożdży.

Proces koniugacyjnego transferu DNA spotykamy też w kilku grupach bakterii gramdodatnich. Koniugacja jest tu także zależna od obecności plazmidów koniugacyjnych (wyjątkiem są nieliczne systemy warunkowane obecnością transpozonów koniugacyjnych). Cechą systemu koniugacyjnego bakterii gramdodatnich jest brak tak typowych dla bakterii gramujemnych elementów aparatu koniugacyjnego jakim są pilusy płciowe. U *Enterococcus faecalis* i innych paciorkowców, wytworzenie kontaktu między partnerami zależy od produkowania przez komórki żeńskie specyficznych, kodowanych przez geny chromosomowe substancji, tak zwanych feromonów płciowych (CLEWELL 1993). Feromony płciowe wydzielane są do środowiska i oddziałują na komórki potencjalnych (posiadających odpowiedni koniugacyjny plazmid) dawców, indukując u nich syntezę specyficznych substancji na powierzchni komórki (AS aggregation substance) umożliwiających tworzenie agregatów koniugacyjnych. Przekazywanie materiału genetycznego następuje w kierunku od zaindukowanego do indukującego partnera. Istnieje wysoka specyficzność oddzia-

ływania między konkretnym typem feromonu płciowego a odpowiednim plazmidem; jeden bezplazmidowy szczep może produkować wiele różnych feromonów, lecz agregaty koniugacyjne wytworzy tylko ze szczepem niosącym określony „pasujący” do któregoś z feromonów plazmid (np. plazmid pAD1 odpowiada tylko na sygnał w postaci feromonu cAD1, a plazmid pAM322 na feromon cAM322). Systemy koniugacyjne bakterii gramdodatnich są znacznie mniej dokładnie poznane na poziomie molekularnym niż funkcjonujące u bakterii gramujemnych, rozwijanie tego tematu nie jest w tym miejscu celowe. Wspomniano o tym jedynie dla wskazania, że proces koniugacji — najbliższy powszechnie występującym u *Eukaryota* procesom płciowym, nie jest wśród bakterii zjawiskiem tak unikatowym, jak się powszechnie wydaje.

Przenoszenie DNA między bakteriami drogą transdukcji i transformacji

Transfer materiału genetycznego między komórkami bakteryjnymi nie ogranicza się jedynie do koniugacji (procesu, którego określenie mianem paraseksualnego nie budzi zastrzeżeń). Ważnymi drogami wprowadzania do komórki bakteryjnej egzogennej DNA (chromosomowego lub plazmidowego) są transdukcja i transformacja. Ponieważ mimo braku bezpośredniej analogii do procesu płciowego „organizmów wyższych” (czyż jednak transformacja bakteryjna nie jest w pewnym sensie odpowiednikiem sztucznego zapłodnienia?) obydwie te procesy prowadzą do utworzenia częściowo diploidalnej struktury warunkującej zajście rekombinacji genetycznej, krótkie ich omówienie w tym miejscu uważam za celowe.

W przypadku transdukcji ogólnej i specyficznej przeniesienie materiału genetycznego z jednej komórki bakteryjnej do drugiej następuje przy udziale bakteriofaga (MASTERS 1996, WEISBERG 1996). W transdukcji ogólnej każdy gen o chromosomowej lokalizacji może być z niską, lecz teoretycznie zbliżoną częstością przeniesiony z komórki dawcy do biorcy. Podczas transdukcji specyficznej, pewne geny są przenoszone z wysoką częstością, a inne wcale. Wynika to z różnego, w obu przypadkach, mechanizmu tworzenia tak zwanych cząstek transdukujących.

Fagi zdolne do transdukcji ogólnej (np. P1 lub P22) tworzą cząstki transdukujące w czasie cyklu litycznego. Po zainfekowaniu komórki przeprowadzają one replikację własnego genomu oraz syntezę kapsydów (płaszczki) białkowych, natomiast chromosom gospodarza ulega stopniowej degradacji. Może się jednak zdarzyć, że w czasie pakowania genomów fagowych do

kapsydu zostanie „przez pomyłkę” zapakowany fragment chromosomowego DNA gospodarza, jeżeli jego wielkość jest zbliżona do wielkości cząsteczki DNA faga. Po zlizowaniu komórki i uwolnieniu plonu fagowego, wśród wielu namnożonych cząstek fagowych znajduje się więc niewielka frakcja cząstek transdukujących, czyli kapsydów fagowych zawierających wyłącznie DNA bakteryjny. Cząstki transdukujące mogą zainfekować kolejną komórkę i wprowadzić do niej DNA ze swojego kapsydu. W wyniku takiej infekcji komórka nie może wydać potomstwa fagowego, uzyskuje natomiast „drugi egzemplarz” genów wprowadzonych za pośrednictwem faga, homologiczny do odpowiedniego odcinka własnego chromosomu. Mamy więc sytuację powstania stanu częściowej diploidalności, który jest analogiczny do sytuacji po transferze koniugacyjnym (choć homologia dotyczy z reguły znacznie krótszego fragmentu DNA) i może teraz wejść w ciąg zdarzeń rekombinacyjnych, które będą opisane oddzielnie.

Transdukcję specyficzną przeprowadzają niektóre fagi łagodne, zdolne do integracji z genomem swego gospodarza podczas ustanawiania stanu lizogenii. Przy następującym spontanicznym lub indukowanym przechodzeniu ze stanu lizogenii w cykl lityczny następuje „wycinanie” się genomu fagowego z chromosomu. Przy nieprecyzyjnym wycięciu, do genomu fagowego przyłączony może być fragment chromosomu przylegający do miejsca integracji DNA fagowego i łącznie z nim podlega dalszym etapom cyklu rozwojowego. Ponieważ poszczególne fagi łagodne mają zwykle ściśle zdefiniowane miejsce integracji z chromosomem, tak więc geny, które za ich pośrednictwem mogą być przenoszone do kolejnej komórki, są to geny sąsiadujące z miejscem integracji. Tworzenie cząsteczek przeprowadzających transdukcję specyficzną bardzo przypomina opisane powyżej tworzenie plazmidów typu F-prime.

Proces, w którym wolny DNA uwolniony z komórki jednej bakterii jest wprowadzany do innej komórki, nazywamy transformacją bakteryjną (HANAHAN i Bloom 1996). Zaobserwowanie transformacji u pneumokoków (Griffith, rok 1928), a następnie wyjaśnienie jej istoty — czyli udowodnienie (Avery, McCarthy i MacLeod, rok 1944), że to wprowadzenie DNA jest przyczyną zmiany właściwości biorcy, było fundamentalnym odkryciem dla nowoczesnej genetyki, które dokumentowało bezpośrednio i niepodważalnie rolę DNA jako nośnika informacji genetycznej.

Transformujący DNA może być wprowadzany do komórki w postaci fragmentów DNA chromosomowego lub kompletnej cząsteczki plazmidu. Jeżeli jest to liniowy fragment chromo-

somu, trwałe utrzymanie w komórce biorcy „zapisanej” w nim informacji genetycznej możliwe jest tylko jako rezultat rekombinacji z homologicznym odcinkiem DNA chromosomu biorcy. Z reguły osłony komórkowe nie pozwalają na niekontrolowane, bierne wnikanie egzogenego DNA. Niektóre bakterie stan tak zwanej kompetencji (zdolności do pobierania DNA) zyskują naturalnie, w pewnym stadium swego cyklu komórkowego, jednak u większości bakterii zdolnych do transformacji stan kompetencji indukujemy sztucznie, poprzez zwiększenie przepuszczalności ich osłon komórkowych w wyniku działania odpowiednimi czynnikami chemicznymi lub fizycznymi. Nie jest moim zamiarem dokładne omawianie poszczególnych etapów procesu transportu DNA przez osłony komórkowe podczas transformacji u bakterii. Należy jednak podkreślić, że zaadsorbowany na powierzchni komórki dwuniciowy fragment DNA chromosomowego jest w większości systemów, podczas transportu przez osłony, przekształcany w formę jednoniciową i taka właśnie forma DNA będzie uczestniczyła w rekombinacji genetycznej. W przypadku transformacji liniowym DNA, wielkość wprowadzanego odcinka nie przekracza zwykle 10–15 kb, to jest fragmentu niosącego około 10 genów.

MOLEKULARNY MECHANIZM REKOMBINACJI HOMOLOGICZNEJ U *ESCHERICHIA COLI*

W opisanych powyżej procesach, haploidalna komórka bakterii osiąga stan częściowej diploidalności, który sprawia, że spełniony jest podstawowy warunek zajścia rekombinacji homologicznej. W wyniku rekombinacji, w ciągu precyzyjnie kontrolowanych zdarzeń (nazywanych szlakami rekombinacyjnymi), informacja genetyczna zawarta na wprowadzonym z innej, lecz pokrewnej, komórki fragmencie DNA, zostaje na trwałe włączona do chromosomu komórki biorcy, której kolejne podziały dadzą początek klonowi tzw. rekombinantów genetycznych. Drugi element uczestniczący w rekombinacji, fragment DNA dawcy, nie będący samodzielnym replikonem, ulegnie destrukcji.

W rekombinacji homologicznej biorą udział bardzo liczne układy enzymatyczne przeprowadzające wymianę odcinków między cząsteczkami DNA. Modelem, który posłużył do badań molekularnych mechanizmów rekombinacji homologicznej stał się system pokoniugacyjnej rekombinacji w „dzikim” szczepie *Escherichia coli* z użyciem dawcy typu Hfr. Główny szlak pokoniugacyjnej rekombinacji u *Escherichia coli* nazwano szlakiem RecBCD, ponieważ unikatowym jego elementem jest specyficzny, trój-

składnikowy kompleks enzymatyczny — białko RecBCD (uprzednio nazywane Egzonukleazą V). Niezastąpioną rolę w tym szlaku odgrywa także białko RecA, lecz jego rola w metabolizmie DNA jest znacznie szersza, nie stanowi więc ono wyróżnika dla szlaku RecBCD.

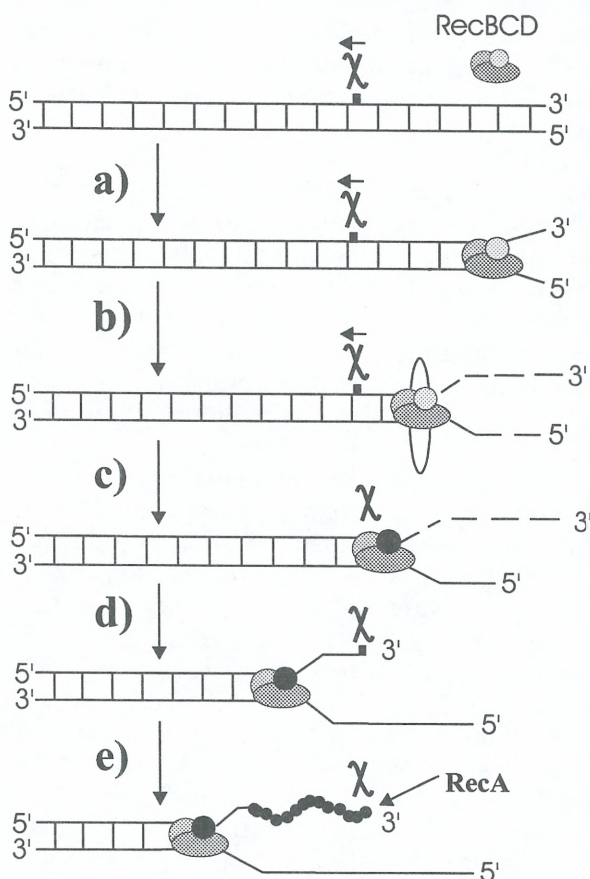
W ciągu ostatniego dziesięciolecia pojawiło się wiele obszernych prac przeglądowych na temat homologicznej rekombinacji u bakterii, przedstawiających także genetyczną i biochemiczną charakterystykę białek RecBCD i RecA (SMITH 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, TAYLOR 1988, WEST 1992, WŁODARCZYK 1992; KOWALCZYKOWSKI i współaut. 1994), do których odsyłam zainteresowanych.

Poniżej, w sposób celowo uproszczony, przedstawie opartą na najnowszych źródłach sekwencję zdarzeń prowadzącą do utworzenia zrekombinowanego chromosomu w komórce biorcy mającej w pełni aktywny rekombinacyjny aparat enzymatyczny, a także alternatywne sposoby uzyskania produktu w niektórych mutantach.

Substratami pokoniugacyjnej (także potransdukcyjnej) rekombinacji jest kompletny chromosom biorcy oraz liniowy, dwuniciowy fragment DNA dawcy. Pierwszym etapem szlaku rekombinacyjnego w „dzikim” szczepie *Escherichia coli* jest przekształcenie dwuniciowego DNA dawcy w formę posiadającą na końcu cząsteczki jednoniciowe regiony (ssDNA tails), które w następnym etapie, po związaniu się z białkiem RecA będą zdolne do wejścia w kluczowy etap procesu — inwazję dwuniciowego DNA dawcy. Sposób, w jaki białko RecBCD przeprowadza ten etap procesu, był w ostatnich latach najintensywniej badanym elementem szlaku RecBCD (KOWALCZYKOWSKI i współaut. 1994, EGGLESTON i WEST 1996, FARAH i SMITH 1997). Wyniki tych badań podsumowuje schemat przedstawiony na rycinie 3.

Składające się z trzech podjednostek, białko RecBCD wykazuje kilka aktywności enzymatycznych: aktywność helikazy (zdolność do rozwijania helisy DNA), egzonukleazy i endonukleazy, a także aktywność ATPazy zależnej od DNA. Te wielorakie aktywności utrudniały określenie i zrozumienie roli tego kompleksu enzymatycznego w rekombinacji. Po udowodnieniu roli specjalnych, ośmionukleotydowych sekwencji χ (Chi; 5'-GCTGGTGG-3'), występujących w DNA chromosomowym co około 5 kb, w modulowaniu aktywności nukleolitycznej białka RecBCD, zdefiniowano jego rolę we wczesnym etapie rekombinacji. Białko RecBCD wiąże się z wolnym końcem dwuniciowego DNA i zaczyna jego rozwijanie przesuwając się wzdłuż cząsteczki. Jednocześnie z rozwijaniem helisy wpro-

wadza endonukleolityczne nacięcia obu nici powodując ich degradację. Gdy przesuwający się kompleks enzymatyczny napotka na sekwencję χ (od jej końca 3') następuje przejściowe zahamowanie rozwijania helisy, wprowadzenie nacięcia w pobliżu sekwencji χ , a także modyfikacja aktywności nukleazowej. Modyfikacja ta jest wynikiem inaktywacji, a może nawet utraty podjednostki RecD enzymu. Zmodyfikowany kompleks (RecBC) podejmuje rozwijanie helisy DNA bez jednoczesnej degradacji nukleolitycznej, dzięki czemu powstają długie jednoniciowe obszary na końcach rozwijanej cząsteczki (tzw. jednoniciowe „ogony”, ang. tails). 3'-jednoniciowy DNA jest substratem rozpoznawanym i pokrywany przez białko RecA. Tak przygotowany DNA dawcy „atakuje” teraz dwuniciową czą-



Ryc. 3. Model ilustrujący rolę kompleksu enzymatycznego RecBCD w przygotowaniu dwuniciowego DNA dawcy do inwazji DNA biorcy w procesie rekombinacji homologicznej.

a) Białko RecBCD wiąże się z wolnym końcem dwuniciowego DNA i zaczyna jego rozwijanie. b) Kontynuowane jest rozwijanie helisy, któremu towarzyszy niejednakowa nukleolityczna degradacja obu nici. c) Po napotkaniu sekwencji χ następuje zahamowanie aktywności nukleolitycznej białka RecBCD w wyniku inaktywacji podjednostki RecD (zaciemniona). d i e) Rozwijanie jest kontynuowane, a z uwalnianą nicią 3' wiąże się specyficznie białko RecA, czyniąc ją gotową do inwazji DNA biorcy.

steczkę DNA biorcy. Następuje jej częściowe rozplatanie i „wędrówka” pokrytej białkiem RecA nici DNA dawcy w poszukiwaniu sekwencji komplementarnej. Po jej napotkaniu tworzy się przejściowy produkt wymiany między rekombinującymi homologicznymi regionami DNA w postaci tak zwanej struktury Hollidaya (przecięcie i krzyżowo połączone nici DNA rekombinujących cząsteczek). Kolejny etap procesu to przesuwanie się miejsca skrzyżowania nici (ang. „branch migration”), dzięki czemu powstaje odcinek mieszańcowego DNA o długości nawet kilku tysięcy par nukleotydów. Do niedawna sądzono, że przesunięcie skrzyżowania nici jest także prowadzone przez białko RecA. Ostatnio zidentyfikowano inne białka mające właściwość specyficznego wiązania się z miejscem skrzyżowania nici (białka RuvA i RuvB oraz RecG) i udokumentowano ich rolę w „branch migration”, a dla kompleksu RuvAB przedstawiono nawet model działania na poziomie molekularnym.

Powstanie zrekombinowanych cząsteczek DNA wymaga rozdzielenia (przecięcia) struktur Hollidaya. Niedawno wykazano, że przecięcie to dokonywane jest przez białko RuvC, a sposób oraz miejsce (sekwencja) przecięcia też są ściśle określone. Istnieje prawdopodobnie alternatywny mechanizm rozdzielania struktur Hollidaya, ponieważ w mutantach *ruvC* nie obserwuje się znacznego obniżenia poziomu rekombinacji.

Według opisanego mechanizmu powstają rekombinanty genetyczne po koniugacyjnym i transdukcyjnym transferze DNA chromosomowego do komórki biorcy, w której aktywne są wszystkie wymienione powyżej białka enzymatyczne. Analiza genetyczna szeregu mutantów w genach kodujących enzymy szlaku RecBCD pozwoliła ustalić istnienie w pewnych przypadkach szlaków „zastępczych”. Ich mechanizmy nie są tak szczegółowo poznane jak szlaku RecBCD, i nie będą tu omawiane. Warto jednak zaznaczyć, że w szlakach tych (np. RecF i RecE) uruchamiane są zastępcze drogi przygotowywania dwuniciowego substratu do oddziaływania z białkiem RecA w wyniku mutacji supresorowych *sbcA*, *sbcBC*. Natomiast białko RecA jest w tych szlakach bezwzględnie potrzebne, i pełni funkcję analogiczną jak w szlaku RecBCD. Potwierdza to całkowite zahamowanie rekombinacji homologicznej w mutantach *recA*.

Rekombinacja następująca po transformacji komórki *Escherichia coli* liniowymi fragmentami chromosomowego DNA przebiega według szlaku RecF, o czym świadczy możliwość otrzymania transformantów jedynie przy zastosowa-

niu jako biorcy mutantu *recBCD sbcBC* (z nieaktywnym szlakiem RecBCD). Jest to zrozumiałe, jeżeli uwzględnimy, że w procesie transformacji fragment DNA wprowadzony do komórki jest jednoniciowy i w przypadku obecności białka RecBCD ulega szybkiej nukleolitycznej degradacji. W najnowszej literaturze mało uwagi poświęca się opisowi szczegółów molekularnych mechanizmów potransformacyjnej rekombinacji chromosomowego DNA. Ten sposób wprowadzania chromosomowego DNA do komórki nie ma większego zastosowania praktycznego, nie jest też jak się sądzi powszechny w naturze. Z kolei, będące w centrum zainteresowania zagadnienia związane z transformacją plazmidową, powszechnie obecnie używaną techniką w tak zwanej inżynierii genetycznej, leżą poza zakresem tego opracowania, ponieważ wprowadzany plazmid, jako samodzielny replikon, nie wymaga rekombinacji z chromosomem do trwałego utrzymania się w komórce. Świadczy o tym chociażby fakt powszechnego zalecania stosowania mutantów *recA*, jako biorców dla zrekombinowanych wektorów do klonowania. Zrekombinowany wektor jest wtedy „stabilny”; to znaczy nawet gdy niesie wklonowany fragment chromosomowego DNA nie podlega rekombinacji homologicznej z chromosomem gospodarza.

Przy omawianiu rekombinacji homologicznej, nie można pominąć jej udziału w naprawie uszkodzonego DNA chromosomowego. Szczególnie ważne jest to w przypadku dwuniciowych pęknięć DNA, które w nieobecności białka RecA i RecBCD są dla komórki letalne, gdyż zatrzymują replikację chromosomu. W komórce szybko rosnącej, z reguły występują zwielokrotnione widełki replikacyjne, a chromosomowy DNA jest częściowo, a nawet w pełni powielony. Pomiedzy odcinkami homologicznymi częściowo zreplikowanych chromosomów może wtedy nastąpić rekombinacja prowadząca do wymiany „uszkodzonego” allelu genu na prawidłowy, jest to „naprawa przez rekombinację”. Pozwala ona komórce przeżyć, a także jest elementem stanowiącym o zachowaniu identyczności genetycznej kolejnych generacji (o czym wspomniano definiując biologiczną rolę rekombinacji genetycznej).

Większość badań dotyczących mechanizmów rekombinacji przeprowadzono na modelu *Escherichia coli*, należy jednak przypuszczać, że analogiczne mechanizmy są szeroko rozpowszechnione wśród prokariotów. Analogiczne do RecA oraz RecBCD białko zidentyfikowano u wielu innych bakterii (TAYLOR 1988). Co ciekawe, także u różnych organizmów eukariotycz-

nych stwierdzono obecność białek wykazujących znaczące podobieństwo sekwencji aminokwasowej do białka RecA *Escherichia coli*. Zidentyfikowano, też eukariotyczne homologi białek rekombinacyjnych RecQ i RuvC. Podobieństwa te mogą wskazywać na uniwersalność mechanizmów rekombinacyjnych u wszystkich organizmów żywych (KOWALCZYKOWSKI i EGGLESTON 1994, EGGLESTON i WEST 1996).

Poza omówionym powyżej typem rekombinacji genetycznej, warunkowanej homologią oddziałujących cząsteczek DNA i z reguły zależnej od białka RecA, określanym jako rekombinacja homologiczna, u bakterii występuje rekombinacja tak zwana nieuprawniona. Nie wymaga ona rozległej homologii DNA i jest niezależna od białka RecA. Ten typ rekombinacji to na przykład rekombinacja „specyficzna wobec miejsca” (NASH 1996), której przykładem jest

integracja genomu bakteriofaga λ do chromosomu *Escherichia coli* w czasie przechodzenia w stadium profaga, oraz przemieszczanie w obrębie cząsteczki DNA (chromosomu, plazmidu), lub między cząsteczkami tak zwanych ruchomych elementów genetycznych (nazywanych potocznie skaczącymi genami) — sekwencji insercyjnych (IS) i transpozonów (Tn), (CRAIG 1996). Ten rodzaj rekombinacji, dość powszechny u bakterii, jest istotnym źródłem zmienności, powoduje bowiem szereg rearanżacji w materiale genetycznym (insercje, delecje, duplikacje, inwersje itp.). Nie wykazuje jednak analogii do zdarzeń następujących podczas procesów płciowych organizmów wyższych i w związku z tym szczegółowe omawianie jego mechanizmów uznano za wykraczające poza ramy tematu.

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej wybrane zagadnienia dotyczące rekombinacji genetycznej u bakterii, ograniczono do tych aspektów, które bezpośrednio wiążą się z nadrzędnym hasłem całego cyklu — biologią rozrodu, a właściwie rozrodu płciowego, a więc tego typu, który w swej klasycznej dla tak zwanych „organizmów wyższych” formie, u bakterii w zasadzie nie istnieje. Jak widać jednak, bakterie nie są pozbawione umiejętności przeprowadzania rearanżacji swego materiału genetycznego poprzez kombinowanie informacji zawartej w oddzielnych cząsteczkach DNA. Enzymatyczne wyposażenie komórki bakteryjnej, szczególnie dokładnie poznane u *Escherichia coli*, pozwala na przeprowadzanie bardzo różnorodnych typów rekombinacji. Ponieważ jednak, jak się wydaje, rekombinacja jako źródło różnorodności genetycznej, a więc „siła napędowa ewolucji”, u bakterii ma mniejsze znaczenie niż u organizmów eukario-

tycznych, ewolucja mechanizmów rekombinacyjnych może mieć związek raczej z koniecznością sprostania potrzebom naprawy niebezpiecznych dla komórki uszkodzeń DNA niż jako źródło różnorodności genetycznej. Fakt, że determinanty genetyczne szlaków rekombinacyjnych (odmiennie np. od genów odpowiedzialnych za strukturę i funkcjonowanie aparatu koniugacyjnego) zlokalizowane są zawsze w chromosomach bakteryjnych popiera ten właśnie kierunek rozumowania. Dzięki chromosomalowej lokalizacji determinant genetycznych enzymy szlaków rekombinacyjnych mogą „stać na straży” integralności genetycznej, także tych komórek, w których źródłem zwielokrotnienia genów jest jedynie ich powielenie w cyklu replikacyjnym, nie dysponujących natomiast mechanizmami pozwalającymi na osiąganie stanu diploidalności fragmentów swego genomu poprzez przyjmowanie DNA spoza komórki.

EXCHANGE OF GENETIC MATERIAL AND RECOMBINATION IN BACTERIA

Summary

Basic genetic information in the bacterial cell is contained in one circular chromosome organised in a compact structure called the nucleoid. Occasionally bacteria contain additional smaller extrachromosomal genetic elements, called plasmids. Although bacterial cells are in general haploids, the transient genetic diploidy required for the process of homologous recombination may occur in the cell under several circumstances. The cell may become partially diploid due to introduction of DNA from one other cell by means of conjugation, transduction or transformation which are in a sense equivalents of eukariotic sexual processes.

In this review, I describe mechanisms by which the state of partial diploidy can be acquired. Special emphasis is given to F-mediated bacterial conjugation in *Escherichia*

coli. In the second part, the process of homologous genetic recombination which is important for the generation of genetic diversity as well as for maintenance of genomic integrity is described. In recent years, the combination of genetic, molecular and biochemical analyses has provided new data allowing better understanding of the mechanism of homologous recombination at the molecular level. Mutational analysis has defined more than 25 genes involved in the process. I focus on the molecular mechanism of the RecBCD protein activity at the stage of donor duplex DNA unwinding which is required for its interaction with RecA protein and initiation of recombination. The role of the newly discovered RuvA, RuvB and RuvC proteins in the process of the branch migration of recombination inter-

mediates and Holliday's structures resolution is also described. It is pointed out that there is some evidence con-

cerning the possible universality of the elements of the recombination enzymatic apparatus in all living organisms.

LITERATURA

- CLEWELL D. B., 1993. *Sex pheromones and the plasmid encoded mating response in Enterococcus faecalis*. [W:] *Bacterial Conjugation*. CLEWELL D. B. (red.), Plenum Press, New York and London, str. 349-367.
- CRAIG N. L., 1996. *Transposition*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., str. 2339-2362.
- EGGLESTON A. K., WEST S. T., 1996. *Exchanging partners: recombination in E. coli*. Trends in Genetics 12, 20-26.
- FARAH J. A., SMITH G. R., 1997. *The RecBCD enzyme initiation complex for DNA unwinding: enzyme positioning and DNA opening*. J. Mol. Biol. 272, 699-715.
- FIRTH N., IPPEN-IHLER K., SKURRAY R. A., 1996. *Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., str. 2377-2395.
- HANAHAN D., BLOOM F. R., 1996. *Mechanism of DNA transformation*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., 2449-2459.
- HOLLOWAY B., LOW K. B., 1996. *F-prime and R-prime factors*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., str. 2413-2420.
- IPPEN-IHLER K., SKURRAY R. A., 1993. *Genetic organization of transfer-related determinants on the sex factor F and related plasmids*. [W:] *Bacterial Conjugation*. CLEWELL D. B. (red.), Plenum Press, New York and London, str. 23-52.
- KOWALCZYKOWSKI S. C., DIXON D. A., EGGLESTON A. K., LAUDER S. D., REHRAUER W. M., 1994. *Biochemistry of homologous recombination in Escherichia coli*. Microbiol. Rev., 58, 401-465.
- KOWALCZYKOWSKI S. D., EGGLESTON A. K., 1994. *Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins*. Ann. Rev. Biochem. 63; 991-1043.
- LANKA E., WILKINS B. M., 1995. *DNA processing reactions in bacterial conjugation*. Annu. Rev. Biochem. 64, 141-169.
- LLOYD R. G., LOW K. B., 1996. *Homologous recombination*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., str. 2236-2255.
- LOW K. B., 1996. *Hfr strains of Escherichia coli K-12*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., str. 2402-2405.
- MASTERS M., 1996. *Generalized transduction*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., str. 2421-2441.
- NASH H. A., 1996. *Site-specific recombination: integration, excision, resolution, and inversion of defined DNA segment*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., str. 2363-2376.
- PETTIJOHN D. E., 1996. *The nucleoid*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., str. 158-166.
- SMITH G. R., 1987. *Mechanism and control of homologous recombination in Escherichia coli*. Annu. Rev. Genet. 21, 179-201.
- SMITH G. R., 1988. *Homologous recombination in prokaryotes*. Microbiol. Rev. 52, 1-28.
- SMITH G. R., 1989. *Homologous recombination in E. coli: multiple pathways for multiple reasons*. Cell 58, 807-809.
- SMITH G. R., 1990. *RecBCD enzyme*. [W:] *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Vol. 4. ECKSTEIN F., LILLEY D. M. J. (red.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, str. 78-98.
- SMITH G. R., 1991. *Conjugational recombination in E. coli: myths and mechanisms*. Cell, 64:19-27.
- TAYLOR A. F., 1988. *RecBCD enzyme of Escherichia coli*. [W:] *Genetic Recombination*. KUCHERLAPATI R., SMITH G. R. (red.), ASM Press, Washington, D. C., str. 231-263.
- WEISBERG R. A., 1996. *Specialized transduction*. [W:] *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. NEIDHARDT F. C. (red.) ASM Press, Washington, D. C., str. 2442-2448.
- WEST S. C., 1992. *Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination*. Annu. Rev. Biochem. 61, 603-640.
- WILLETS N., 1993. *Bacterial conjugation. A historical perspective*. [W:] *Bacterial Conjugation*. CLEWELL D. B. (red.) Plenum Press, New York and London, str. 1-22.
- WŁODARCZYK M., 1992. *RecBCD protein as a representative of Escherichia coli DNA helicases*. Acta Microbiol. Polon. 41, 127-136.

Podziękowanie.

Uprzejmie dziękuję magistrowi Dariuszowi Bartosikowi za przygotowanie rysunków.