

JULIA GOŁĘBIEWSKA

Pracownia Mikrobiologii Zakładu Roślin Pastewnych IUNG — Poznań

MIKROBIOLOGIA NA USŁUGACH GENETYKI

W latach powojennych, a zwłaszcza w ostatnim dziesięcioleciu, obserwujemy bardzo bujny rozwój genetyki w oparciu o badania biochemiczne. Szczególnym bodźcem dla rozwoju tego kierunku w genetyce stały się badania nad mikroorganizmami, które dały podstawę do ustalenia nowych poglądów na zjawiska zmienności i dziedziczności u organizmów żywych.

Użycie drobnoustrojów jako modeli do badań genetyczno-biochemicznych tłumaczy się różnymi ich właściwościami, z których jako najcenniejsze należy wymienić:

1) szybkość mnożenia się drobnoustrojów, a co za tym idzie szybkość otrzymywania wielu pokoleń;

2) możliwość łatwego operowania dużymi populacjami;

3) możliwość ścisłego określania warunków środowiska hodowlanego.

Prace genetyczne, których przedmiotem badań były bakterie i inne drobnoustroje, przyczyniły się w dużym stopniu do wyjaśnienia dwóch następujących, podstawowych dla genetyki ogólnej problemów: po pierwsze do określenia materialnej, chemicznej struktury jednostek dziedzicznych i po drugie do poznania mechanizmów nabywania i przekazywania zmian dziedzicznych.

Niewątpliwie istnieją różnice w budowie i funkcji genomu u różnych organizmów uwarunkowane swoistością ich budowy i metabolizmu, jednakże istnieje też szereg faktów, świadczących o pewnej wspólnocie procesów dziedziczenia u wszystkich istot należących do świata ożywionego.

Obecnie nie nasuwa już wątpliwości pogląd, oparty na wielu dowodach, że materialnym tworzywem, lokującym jednostki dziedziczenia, jest kwas dezoksyrybonukleinowy (KDN). Istnieje przypuszczenie, że w jądrach komórek bakteryjnych rolę genów pełnią cząsteczki kwasu dezoksyrybonukleinowego. Różnice między poszczególnymi genami polegają prawdopodobnie na różnicy w strukturze łańcuchów KDN, składających się z różnej ilości prostych nukleotydów, różnie uszeregowanych.

Możliwe, że w jądrach komórek roślinnych i zwierzęcych budowa aparatu jądrowego jest bardziej złożona, jednakże podstawową jednostką dziedziczenia w materialnym pojęciu stanowi niewątpliwie również KDN.

Mikrobiologowie we współpracy z biochemikami wiele uwagi poświęcili badaniom nad sposobami odtwarzania się KDN w komórkach potomnych i mechanizmom przekazywania zmian dziedzicznych.

Celem badań biochemicznych jest wyśledzenie, jaką rolę odgrywa łańcuch KDN w komórce macierzystej przy replikacji tego związku w komórkach potomnych. Czy ulega on podziałowi, czy tworzy on matrycę, na której w komórce potomnej odtwarza się struktura chemiczna z materiału nie rodzicielskiego, czy też w całości zostaje przeniesiony do komórki potomnej, która odtwarza drugi podobny łańcuch z własnego materiału. Sprawy te do dziś nie są wystarczająco jasne i są przedmiotem usilnych badań, gdyż wiąże się z tym nadzieję na możliwość ludzkiej ingerencji przy syntezie KDN.

Badania nad mechanizmem przekazywania zmian dziedzicznych u drobnoustrojów idą w dwóch kierunkach. Z jednej strony poszukuje się u bakterii i innych organizmów takich cech morfologicznych, a przede wszystkim fizjologicznych, które mogłyby być dobrymi wskaźnikami mutacji. Z drugiej strony dąży się do dokładniejszego poznania sposobów nabywania i przenoszenia cech dziedzicznych.

Dzięki tym wysiłkom obecnie nagromadziło się już wiele obserwacji na ten temat, co dało możliwość wyróżnienia pewnych typowych sposobów nabywania i przekazywania zmian dziedzicznych. Wymienić tu należy: 1) mutacje spontaniczne i indukowane; 2) transformację; 3) transdukcję i 4) rekombinację. Jak w każdym schemacie, zwłaszcza w schemacie dotyczącym zjawisk biologicznych, spotykamy się tu z uproszczeniem w przedstawieniu bardzo złożonych i zazębiających się o siebie procesów. Schemat taki ułatwia nam jednak klasyfikację tych zjawisk i pozwala na łatwiejsze ich zrozumienie.

Mutacje spontaniczne i indukowane

Hodowle bakterii stanowią duże populacje. O fenotypie całej hodowli decydują siły dominujące w danym środowisku. W każdej hodowli pojawiają się też mutanty, które, po wyodrębnieniu ich z rodzimej populacji, mogą dać początek nowym populacjom odrębnym od hodowli macierzystej. Mutanty spontaniczne, powstające pod wpływem bliżej nieokreślonych bodźców, spotykamy w hodowlach drobnoustrojów stosunkowo rzadko. Zazwyczaj w hodowlach bakterii w obrębie jednej cechy występują one z częstotliwością 10^{-5} do 10^{-9} . Tak więc na milion dzielących się komórek pojawia się jeden mutant. W populacji drobnoustrojów mutacjom mogą jednak podlegać różne cechy korespondujące z różnymi genami, co zwiększa częstotliwość występowania mutantów. Istnieją różne hipotezy co do powstawania mutantów spontanicznych w hodowlach

drobnoustrojów. Jeszcze do niedawna za główną przyczynę mutacji uważano błędy w reprodukcji materiału genetycznego. Jednakże, jak się okazało, mutacje spontaniczne w określonych warunkach hodowli powstają zawsze w tej samej proporcji, dlatego trudno zjawisko to tłumaczyć jakąś przypadkowością. Przypuszcza się więc, że mutacje mogą zachodzić raczej pod wpływem swoistych wewnątrzkomórkowych czynników mutagennych. Stwierdzono, że mutacje można indukować, to znaczy zwiększać ich częstotliwość. Takimi czynnikami indukującymi mutację, tak zwanymi mutagenami, mogą być promienie jonizujące, np. promienie Roentgena, promienie ultrafioletowe, krańcowe temperatury oraz różne związki chemiczne. Do chemicznych mutagenów zaliczamy nadtlenek wodoru, formaldehyd, fenol, kofeinę, akryflawinę i szereg innych substancji. Warto zwrócić uwagę na to, że np. nadtlenek wodoru i formaldehyd bywają produktami metabolizmu drobnoustrojów, mogą więc być wewnątrzkomórkowymi czynnikami mutagennymi.

Substancje mutagenne wykazują pewną swoistość działania, jednak mutacje spontaniczne i indukowane pozostają procesami bezkierunkowymi i nie jesteśmy w stanie przewidzieć wyniku mutacji i zmienić jej kierunku.

Przy głębszych zmianach w strukturze komórki i jej aparatu genetycznego zmiany mutacyjne są nieodwracalne. Jednakże w wielu wypadkach powrót do form wyjściowych zachodzi dość łatwo. Szybkość takiej rewersji zależy od rodzaju i koncentracji oraz od czasu działania substancji mutagennej. Duży wpływ na możliwość rewersji mają także warunki fizyko-chemiczne środowiska hodowlanego.

Transformacja

Transformacją określamy zjawisko zastąpienia genu w komórce bakteryjnej przez gen homologiczny, pochodzący z zabitej hodowli drugiej rasy bakterii, lub też przez chemicznie wyodrębniony czynnik genetyczny, jakim jest kwas dezoksyrybonukleinowy. Transformacja możliwa jest tylko wtedy, gdy jedna lub więcej cech donatora odpowiada swym charakterem cechom receptora.

Klasyczny przykład transformacji stanowią badania Griffitha i McCarty nad transformacją u pneumokokków. Szczepili oni myszki niezjadliwą formą R pneumokokków, a następnie szczepienie uzupełniali zabita hodowlą zjadliwej formy S tych samych bakterii. Myszki poddane takiemu zabiegowi padały, co pozwoliło przypuszczać, że bakterie niezjadliwe uległy transformacji pod wpływem martwych komórek formy S. Wyodrębniając nowy szczep pneumokokków z ciała padłej myszki, stwierdzono, że charakteryzował się on zjadliwością szczepu S i równo-

cześniej niektórymi innymi cechami szczepu R. Doświadczenia tych autorów powtórzone były przez wielu innych badaczy z tym samym wynikiem. Nabycie zjadliwości przez szczep R przypisuje się adsorpcji KDN przez niektóre komórki tego szczepu z zabitej hodowli szczepu S.

W nowszych badaniach stosuje się wyodrębnianie czynnika transformującego w postaci oczyszczonego KDN. Sposób ekstrahowania czynnika transformującego z hodowli bakteryjnych zawdzięczamy badaczom Avery, MacLeod i McCarty. Ich metoda wyodrębniania KDN ogłoszona w 1944 r. z różnymi drobnymi zmianami stosowana jest dotychczas. Obecnie nagromadziło się już bardzo wiele badań nad transformacją. Najczęściej poddaje się transformacji bakterie *Escherichia coli*, *Shigella paradysenteriae*, *Hemophilus influenzae* i *Staphylococcus*. Z punktu widzenia rolniczego interesujące są prace Krasilnikowa z *Rhizobium*. Hodował on *Rhizobium leguminosarum* dla wyki i grochu na przesączu bakterii lucerny i uzyskiwał w ten sposób rasy zakażające lucernę, ale fenotypowo zbliżone do bakterii grochu i wyki.

Badania nad transformacją u *Rhizobium* prowadzi również na Węgrzech Balassa. Z pomocą czystych preparatów KDN, wyekstrahowanych z różnych ras tych bakterii, uzyskiwała ona zmianę wirulencji, efektywności i odporności na streptomycynę u innych ras *Rhizobium*.

Wszystkie badania nad transformacją wskazują na to, że mamy tu do czynienia raczej z przenoszeniem genu niż z indukowaniem mutacji. Obcy KDN staje się czynny genetycznie dopiero po wbudowaniu go w żywą komórkę receptora. Genetyczna konwersja komórki przy transformacji zachodzi w kilku etapach. Pierwszym warunkiem dla pomyślnego przebiegu transformacji jest nabycie kompetencji przez komórkę receptora. Inaczej mówiąc komórka musi przygotować odpowiedni locus na przyjęcie obcego materiału genetycznego. Taką kompetencję komórki bakteryjne w okresie swego rozwoju nabywają i tracą cyklicznie. W obrębie jednej generacji cykl ten powtarza się kilkakrotnie. Później następuje nieodwracalna lub odwracalna reakcja między wprowadzonym KDN i przygotowanym locus w komórce receptora.

Transformacja może spowodować radykalną zmianę cechy już po jednokrotnym potraktowaniu komórek transformowanych ekstraktem KDN pokrewnej masy. Silniejsze działanie ekstraktu obserwuje się jednak po kilkakrotnym powtórzeniu tej reakcji. Np. większy stopień odporności na streptomycynę u bakterii uzyskiwało się przy sukcesywnym, kolejnym traktowaniu komórek wrażliwych ekstraktem KDN rasy odpornej tych bakterii.

Przez transformację uzyskuje się najłatwiej zmiany cech w obrębie jednego gatunku. Znane są już jednak wypadki, w których udało się przeprowadzić transformację między różnymi gatunkami. Shafferowi

(1956) udało się np. otrzymać krzyżówkę *Haemofilus influenzae* × *H. pra-influenzae*. Jednakże częstotliwość występowania form zmienionych przy transformacji dwóch różnych gatunków jest znacznie mniejsza niż przy transformacji dwóch ras bakterii, różniących się między sobą nie-licznymi cechami.

Czynnik transformujący może być przekazywany komórkom receptora w różnych formach. Znane są przypadki transformacji prowadzonej następującymi sposobami:

- 1) hodowla równoczesna (wspólna) dwóch ras bakterii,
- 2) hodowla jednej rasy na filtracie drugiej rasy,
- 3) „ „ „ „ zabitych komórkach drugiej rasy,
- 4) „ „ „ „ autolizacji komórek drugiej rasy,
- 5) „ „ „ „ rozbitych komórkach drugiej rasy.
- 6) „ „ „ „ ekstrakcie KDN przygotowanym z komórek drugiej rasy.

Transdukcja

Transdukcję pierwsi opisali Zinder i Lederberg w 1952 r. Jest to zjawisko polegające na przeniesieniu genetycznego segmentu z jednego organizmu na drugi za pośrednictwem faga. Przy czym fag w niektórych wypadkach sam może stać się materiałem genetycznym. Wiele bakterii żyje z bakteriofagami, tj. wirusami bakteryjnymi, w stosunku symbiotycznym. Takie szczepy bakterii, które mogą być nosicielami fagów, nazywamy szczepami lizogenicznymi, a fagi w tej niezjadliwej formie nazywamy profagami. Profagi bytujące w komórce bakterii mnożą się równocześnie z nią i niczym nie ujawniają swej obecności. Żeby właściwości profaga mogły się uzewnętrznić, musi on przejść w stadium wegetatywne. W tym celu na hodowlę lizogenicznego szczepu bakterii działa się specjalnymi czynnikami pobudzającymi ten proces. Prawie wszystkie znane czynniki mutagenne zdolne są również do pobudzania profagów do przejścia w stadium wegetatywne. W tym stadium fagi mnożą się w komórkach bakteryjnych bardzo szybko, niezależnie od procesów życiowych swego gospodarza. Następnie rozpuszczają błonę komórkową bakterii i wydostają się na zewnątrz. Wówczas fag staje się zdolny do zakażenia wrażliwego szczepu bakterii i przeniesienia niektórych cech szczepu lizogenicznego, z którego się uwolnił. Przy tym stwierdzono, że sam fag może stanowić materiał genetyczny, albo też może on przenosić niektóre segmenty genetyczne charakteryzujące szczep lizogeniczny.

Natura wiązania między profagiem a chromosomem bakteryjnym jest jeszcze mało poznana. Istnieją dwa przypuszczenia. Fag może się doczepić do genomu u bakterii, albo też część genomu bakteryjnego może być

zastąpiona przez faga na zasadzie crossing-over. Nie wszystkie cechy, charakteryzujące dany szczep bakterii, dają się przenosić przez transdukcję. W hodowli bakteryjnej ilość komórek ulegających zmienności pod wpływem transdukcji bywa stosunkowo niewielka. Częstotliwość występowania ich wyraża się przeciętnie liczbą 10^{-5} . Fag niezjadliwy jest przykładem elementu genetycznego, który może być wprowadzony do komórki i może w niej egzystować w dwu różnych postaciach. Może on rozmnażać się jako jednostka niezależna oraz jako jednostka integralnie związana z chromosomem komórki bakteryjnej.

Rekombinacja

Rekombinacją określa się u drobnoustrojów zmienność dziedziczną, która spowodowana zostaje zmianami w układzie genetycznym na zasadzie crossing-over. Możliwość rekombinacji u bakterii stwierdzili w r. 1946 Lederberg i Tatum. Pracowali oni ze szczepem *Escherichia coli* K 12, stwierdzając w hodowlach tej bakterii 3—5% szczepów zdolnych do rekombinacji.

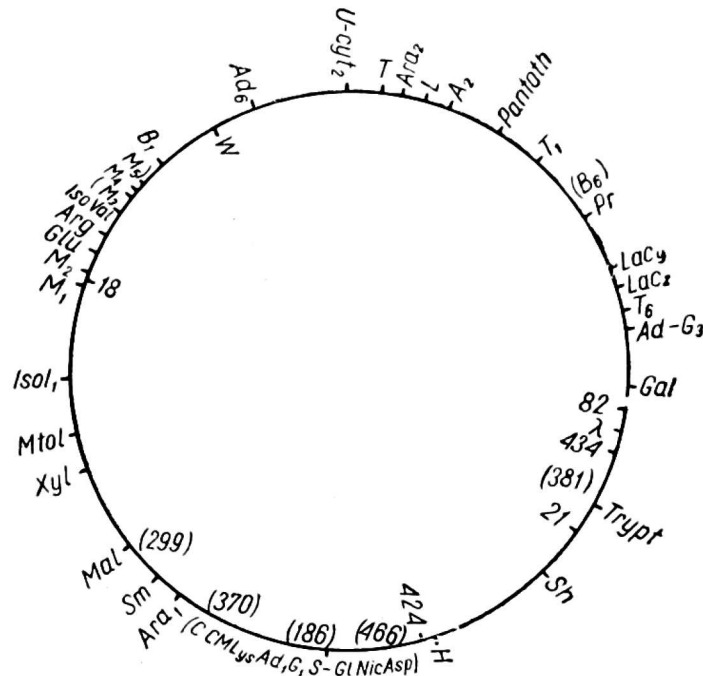
Dalsze badania nad rekombinacją u *E. coli* K 12 pozwoliły na sporządzenie mapy chromosomowej tej bakterii. Swoje mapy chromosomowe mają obecnie także niektóre grzyby, np. *Neurospora crassa* i *Aspergillus niger*.

U *E. coli* mapa chromosomowa oparta została głównie na zdolności syntetyzowania przez tę bakterię różnych związków z grupy aminokwasów, cukrów, witamin itp. Mapa chromosomowa u *E. coli* przedstawia się w kształcie pierścienia, na którym w określonych miejscach lokują się geny kontrolujące syntezę poszczególnych związków (rys. 1).

Wymiana poszczególnych genów na takiej nici chromosomowej nie może być przypadkowa. Obowiązuje pewna kolejność. Okazało się, że wśród hodowli *E. coli* K 12 można wyróżnić szczepy żeńskie i szczepy męskie. Dotychczas jedynym miarodajnym sposobem oznaczenia czy szczep jest męski, czy żeński, jest próba ich skrzyżowania, gdyż krzyżują się tylko szczepy męskie z żeńskimi. Nie można skrzyżować ze sobą dwóch szczepów żeńskich. Poszukuje się także innych wskaźników określających płeć, badając stosunek poszczególnych szczepów do różnych barwników, ich właściwości elektroforetyczne, właściwości immunologiczne itp.

Badania Lederberga z 1957 r. wykazały, że przy koniugacji między dwoma komórkami powstaje most, przez który przenoszony jest materiał genetyczny z męskiej komórki do żeńskiej. Most ten, niewidoczny w zwykłym mikroskopie ze względu na swą małą wielkość, udało się zobaczyć w mikroskopie elektronowym. Rekombinanty można znaleźć tylko przy

segregacji szczepu żeńskiego, przy czym ze względu na nieregularność procesu rekombinacji taka segregacja stanowi trudne zadanie.



Rys. 1. Diagram przedstawiający mapę chromosomową *E. coli* K 12. Na rysunku uwidoczniło kolejność cech, a nie rzeczywiste odległości między nimi. Symbole odpowiadają syntezie uracylu (U), cytozyny (Cyt), treoniny (T), leucyny (L), pantotenianu (Pantoth), witaminy B6, proliny (Pr), adeniny (Ad), guaniny (G), tryptofanu (Tr), „shikimic acid” (Sh), histydyny (H), asparaginianu (Asp), amidu kwasu nikotynowego (Nic), seryny (S), glicyny (Gl), lizyny (Lys), cysteiny (C), metioniny (M), izoleucyny (Iso), glutaminianu (Glu), argininy (Arg), waliny (Val), witaminy B1, fermentacji arabinozy (Ara), laktozy (Lac), galaktozy (Gal), maltozy (Mal), ksylozy (Xyl), mannitolu (Mtol), wrażliwości na faga T1 i T6, na azydek sodu na streptomycynę (Sm), lokalizacji indukującego się profaga 82, 2434, 381, 21, 424, 466, nieindukującego się profaga 186, 370, 299, 18, W. Symbole w nawiasach odpowiadają wskaźnikom, których kolejność usytuowania nie jest dokładnie określona (według Jacoba i Wollmana, 8)

Porównując rekombinację z transdukcją, szczep męski można nazwać donatorem, a szczep żeński receptorem. Istotną różnicę rekombinacji i transdukcji stanowi to, że komórka męska przy rekombinacji nie zostaje zniszczona, podczas gdy przy przenoszeniu materiału genetycznego przez faga komórka donatora ulega rozpadowi. Przy transdukcji do komórki receptora przechodzi tylko drobna część genomu ojcowskiego (około 1%). Przy rekombinacji natomiast cały genom może być przeniesiony z komórki męskiej do żeńskiej.

Proces zapłodnienia u komórek bakteryjnych może być sztucznie przerywany, tak że tylko część materiału genetycznego zostaje w tym wypadku przeniesiona do komórki żeńskiej. Istnieje korelacja między czasem przejścia określonej porcji materiału genetycznego z komórki męskiej do żeńskiej, a częstotliwością przemian danego wskaźnika, oczywiście tylko przy

krzyżowaniu nie przerywanym. Ułatwia to tworzenie map chromosomowych.

Wszystkie przedstawione tu sposoby nabywania i przenoszenia cech przez drobnoustroje dotychczas tylko w bardzo ograniczonej mierze pozwalają nam na regulowanie cech dziedzicznych i ich segregację. Rewolucję w tych zjawiskach może dopiero spowodować możliwość otrzymywania syntetycznych kwasów nukleinowych, analogicznych do tych, które determinują występowanie określonych cech dziedzicznych. Nadzieje na taki sukces stają się coraz bardziej realne. Właśnie w 1959 r. nagrodę Nobla otrzymali dwaj biochemicy amerykańscy: prof. Severo Ochoa i prof. Artur Kornberg, którym udało się z pomocą enzymów bakteryjnych spowodować powiązanie prostych nukleotydów w polinukleotydy, formalnie niczym nie różniące się od kwasów nukleinowych, znajdujących w komórkach żywych organizmów. W doświadczeniach tych uczonych dla zapoczątkowania procesów syntezy konieczny był jednak udział choć drobnych ilości gotowego KRN lub KDN. Trudnym zadaniem stojącym przed biochemikami jest także rozszyfrowanie budowy łańcuchów KDN, stanowiących tworzywo poszczególnych genów. Ogromny rozwój biochemii w oparciu o bardzo przydatny do doświadczeń genetycznych materiał bakteryjny stwarza jednak podstawy do przypuszczenia, że może te zdawałoby się nieprawdopodobne marzenia staną się rzeczywistością.

LITERATURA

1. Adaptation in Micro-organisms. III Symp. of the Society for General Microbiology. Cambridge 1953.
2. Bacterial Anatomy. VI Symp. of the Society for General Microbiology. Cambridge 1956.
3. Braun W.: Bacterial Genetics, Philadelphia 1957.
4. Kunicki-Goldfinger Wł.: Zmienność u bakterii. Acta Microbiol. Polon., 1954, 3, 3:199.
5. Papers in Microbial Genetics. Selected by J. Lederberg. Wisconsin 1952.
6. Ravin A. W.: Bacterial Genetics. Annual Review of Microbiology, 1958, 12:309.
7. Ravin A. W.: The Origin of Bacterial Species. Genetic Recombination and Factors Limiting it Between Bacterial Populations. Bacteriological Reviews 1960, 24, 2:201.
8. Recent Progress in Microbiology. Recombination Mechanisms in Bacteria I Symp. at the VII International Congress for Microbiology. Stockholm 1958.
9. Skarżyński B.: Synteza kwasów nukleinowych. Wszechświat 1960, 8:201.