

Jakub Czarnecki¹, Dariusz Bartosik^{1*}

¹ Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w grudniu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Nazewnictwo replikonów niezbędnych. 3. Koncepcja chromidu. 4. Identyfikacja i klasyfikacja chromidów. 5. Chromidy w genomach bakterii. 6. Ewolucyjne korzyści wynikające z obecności chromidów. 7. Podsumowanie

The concept of chromid and its influence on the classification of bacterial extrachromosomal replicons

Abstract: Extrachromosomal replicons are common components of bacterial genomes. While the genetic information essential for growth and division of bacterial cells is located within the chromosome, the extrachromosomal replicons, usually classified as plasmids, can provide functions which are critical for the survival of a bacterium in a specific environment; however, they are not indispensable for the viability of the host cells. Comparative genomic studies revealed that in many bacterial genomes some chromosomal genes had been transferred into the co-occurring plasmids. This phenomenon has led to the generation of essential extrachromosomal replicons, called chromids, sharing features of both chromosomes and plasmids. The prevalence of chromids in bacteria and their conserved character within certain taxonomic groups suggest an important role for these replicons in the evolution of bacteria.

1. Introduction. 2. Nomenclature of essential replicons. 3. The concept of chromid. 4. Identification and classification of chromids. 5. Chromids in bacterial genomes. 6. Evolutionary significance of chromids. 7. Summary

Słowa kluczowe: chromid, chromosom, genomu bakterii, plazmid
Key words: chromid, chromosome, bacterial genomes, plasmid

1. Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój genomiki, szczególnie zintensyfikowany w ostatnich latach dzięki opracowaniu i upowszechnieniu wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania DNA, przynosi coraz więcej danych na temat struktury genomów bakteryjnych. Okazało się, że genomy bakterii są bardzo zróżnicowane, zarówno pod względem wielkości, organizacji, jak i rodzaju niesionej informacji genetycznej [10]. Wiele z nich ma strukturę wieloreplikonową, bowiem, oprócz chromosomu, zawiera plazmidy, a także niekiedy profagi, które, dzięki obecności typowo plazmidowych systemów replikacyjnych, występują w komórce w formie autonomicznych replikonów (np. P1 i N15).

Plazmidy, w przeciwieństwie do chromosomów, nie są niezbędne dla swoich gospodarzy, nie zawierają bowiem kluczowych dla bakterii genów odpowiedzialnych za podstawowe procesy życiowe (*housekeeping genes*). Odgrywają one jednak ważną rolę w ewolucji bakterii, umożliwiając wprowadzanie do komórek egzogennej DNA w drodze horyzontalnego transferu genów. Replikony te determinują często różnorodne cechy fenotypowe, umożliwiające bakteriom szybką adaptację do zmiennych warunków środowiska oraz zapewniając im przewagę w konkurencji z innymi mikroorganizmami zasiedlającymi tę samą niszę ekologiczną [10].

Bardzo ważne dla zrozumienia struktury genomów bakterii jest właściwe zdefiniowanie chromosomu. To na pozór proste zadanie w praktyce bywa trudne, co wynika z dużej plastyczności genomów i częstej translokacji informacji genetycznej między różnymi, współwystępującymi w komórce replikonami.

Badania nad architekturą genomów zapoczątkowano już w latach 50. XX wieku, niedługo po opisanie struktury podwójnej helisy DNA. Początkowo prowadzono je wyłącznie na modelu Gram-ujemnej pałeczki *Escherichia coli* (typ *Proteobacteria*; klasa *Gammaproteobacteria*). Wykorzystując dostępne wówczas metody ustalono, że podstawowa informacja genetyczna, determinująca funkcje i właściwości komórek tej bakterii, skupiona jest w pojedynczym, kolistym chromosomie [3, 16]. Analogiczne obserwacje poczyniono również dla innych gatunków bakterii reprezentujących różne grupy taksonomiczne (m.in. *Bacillus subtilis*; typ *Firmicutes*). Wydało się wówczas, że obecność pojedynczego chromosomu jest cechą charakterystyczną wszystkich bakterii.

Pogląd ten utrzymywał się dość długo, aż do momentu identyfikacji w genomie *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. (*Alphaproteobacteria*) dwóch replikonów wykazujących właściwości chromosomów [32]. Jeszcze przed zapoczątkowaniem ery genomiki zdano sobie sprawę, że występowanie w komórce kilku niezbędnych replikonów nie jest zjawiskiem unikatowym. W kilku

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541318; e-mail: bartosik@biol.uw.edu.pl

kolejnych analizowanych wówczas szczepach zidentyfikowano dwa (np. w *Leptospira interrogans*, *Brucella* spp., *Pseudoalteromonas haloplanktonis*, *Vibrio* spp.), a nawet trzy tego typu replikony (w *Burkholderia* spp.) [20, 22, 36]. Obecnie wiadomo, że genomy złożone (*composite genomes*), w których geny metabolizmu podstawowego usytuowane są w różnych replikonach, występują w ok. 10% bakterii (których genomy zsekwencjonowano), reprezentujących różne grupy filogenetyczne, często odległe ewolucyjnie [15].

2. Nazewnictwo replikonów niezbędnych

Analizy z zakresu genomiki porównawczej dowodzą, że replikony niezbędne wchodzące w skład poszczególnych genomów złożonych nie są równocenne. Największy w komórce replikon jest konserwowany ewolucyjnie i zawiera większość genów metabolizmu podstawowego. Jego replikacja rozpoczyna się w miejscu *origin*, dzięki działaniu białka inicjatorowego DnaA [15, 21]. Pozostałe replikony niezbędne podlegają szybszym zmianom ewolucyjnym. Cechuje je mniejsze zagęszczenie niezbędnej informacji genetycznej oraz obecność różnorodnych systemów replikacyjnych [6, 29].

Brak zunifikowanych kryteriów pomocnych w identyfikacji i klasyfikacji replikonów niezbędnych znajduje odzwierciedlenie w niejednorodnym nazewnictwie tych elementów. Replikony takie najczęściej określane są mianem „chromosomów”. Największy tego typu replikon w genomie, ze względu na znaczenie, nazywany jest „chromosomem pierwszorzędowym”, natomiast mniejszy „chromosomem drugorzędowym”. W ten sposób sklasyfikowano niezbędne replikony wielu bakterii, m.in. *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. (chromosom I – 3,2 Mpz, chromosom II – 0,94 Mpz), *Vibrio cholerae* (chromosom I – 3,0 Mpz, chromosom II – 1,0 Mpz) czy *Agrobacterium tumefaciens* C58 (chromosom I – 2,8 Mpz, chromosom II – 2,1 Mpz). Gdy w bakterii występują trzy replikony niezbędne, najmniejszy z nich przyjmuje nazwę „chromosomu trzeciorzędowego” (w przypadku *Burkholderia xenovorans* LB400 jest to replikon o wielkości 1,9 Mpz [4]).

Niektóre replikony niezbędne zaliczono do grupy plazmidów, a więc pozachromosomowych ruchomych elementów genetycznych. Większość z nich, ze względu na znaczne rozmiary, nazywano „megaplazmidami”. Znane są jednak również niewielkie „niezbędne plazmidy”, występujące np. w *Borrelia burgdorferi* B31 (cp26; 26 kpz) oraz w *Buchnera* sp. (pLEU; 9 kpz i pTRP; 7,2 kpz). W pierwszym z wymienionych znajduje się gen resolwazy telomerów (*resT*), białka niezbędnego do rozdziału powstałych po replikacji kopii chromosomów liniowych tej bakterii [2]. Dwa pozostałe niosą jedyne w genomie kopie genów, odpowiednio, *leu-ABCD* – kodujących enzymy zaangażowane w biosyn-

tezę leucyny i *trpEG* warunkujące syntezę tryptofanu [28]. Plazmidy tego typu, zawierające pojedyncze geny metabolizmu podstawowego, są niekiedy nazywane w literaturze „niezbędnymi elementami genetycznymi” (*essential genetic elements*), czyli „niezbędnikami” [10].

Niejednolite nazewnictwo powoduje, że pokrewne replikony niezbędne, występujące w różnych szczepach tego samego gatunku bakterii, są niekiedy zaliczane do odmiennych grup – plazmidów bądź chromosomów. Na przykład replikon niezbędny pSymB (1,7 Mpz) i plazmid pSymA (1,4 Mpz) *Sinorhizobium meliloti* 1021 zdefiniowano w bazie danych GenBank (NCBI) jako megaplazmidy [9], a homologiczne replikony występujące w szczepie *S. meliloti* AK83 nazwano, odpowiednio, chromosomem drugo- i trzeciorzędowym.

Inny przykład stanowią dwa pokrewne replikony występujące w różnych szczepach *Rhodobacter sphaeroides*. Jeden z nich został zdefiniowany jako chromosom drugorzędowy (943 kpz; szczep 2.4.1.), a drugi jako plazmid pRSPA01 (877,9 kpz; szczep ATCC 17029).

Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku trzech pokrewnych replikonów *Agrobacterium tumefaciens*. Dwa z nich (pochodzące ze szczepów C58 i S4) zaliczono do grupy chromosomów drugorzędowych, a trzeci (ze szczepu K84) do plazmidów, mimo iż wszystkie one zawierają potencjalne geny metabolizmu podstawowego. „Chromosomy drugorzędowe” szczepów C58 i S4 zawierają operony rRNA, których obecność, zdaniem niektórych badaczy, powinna stanowić podstawowe kryterium pozwalające na zaliczenie danego replikonu do grupy chromosomów [28]. Należy jednak podkreślić, że pełen zestaw operonów rRNA występuje zwykle w obrębie największego niezbędnego replikonu danego szczepu, tj. chromosomu. Operony usytuowane w mniejszych replikonach stanowią często jedynie dodatkowe kopie, których obecność nie jest niezbędna dla komórki. Potwierdzają to m.in. analizy przeprowadzone z udziałem plazmidu pAMI1 (118 kpz) *Paracoccus aminophilus* JCM 7685, który, mimo iż zawiera geny rRNA, może być z łatwością usunięty z komórek macierzystego szczepu [12].

Podane wyżej przykłady wskazują na potrzebę opracowania nowych, spójnych zasad pozwalających na identyfikację i jednoznaczne zdefiniowanie niezbędnych replikonów bakterii. Powiązanie cech metabolicznych komórek gospodarzy z informacją genetyczną poszczególnych replikonów nie jest jednak łatwe i wymaga przeprowadzenia złożonych i czasochłonnych analiz eksperymentalnych, często o wymiarze „-omicznym”. Nie ulega wątpliwości, że przy lawinowo rosnącej liczbie poznawanych genomów, replikony takie powinny być identyfikowane z wykorzystaniem analiz *in silico*. Pozwoliłoby to na wprowadzenie ich zunifikowanego nazewnictwa już na etapie deponowania sekwencji nukleotydowych genomów w bazach danych.

3. Koncepcja chromidu

Impulsu do szerszej dyskusji na temat struktury bakteryjnych genomów wieloreplikonowych dostarczyły wyniki szeroko zakrojonych analiz z zakresu genomiki porównawczej przeprowadzonych w 2010 roku przez Harrisona i współpracowników z University of York (Wielka Brytania) [15].

Badacze ci przeanalizowali wszystkie dostępne wówczas kompletne sekwencje 897 genomów, zwracając uwagę, że aż w 82 występują duże replikony, które choć zawierają typowo plazmidowe systemy replikacyjne oraz geny adaptacyjne, niosą również informację genetyczną pochodzenia chromosomowego (w tym geny niezbędne do przeprowadzania podstawowych procesów życiowych). Mimo łączących je cech, replikony te zostały sklasyfikowane w bazach danych w obrębie różnych kategorii – jako chromosomy drugorzędowe, megaplazmidy bądź plazmidy.

Nie ulega wątpliwości, że replikony tego typu powstały w wyniku przeniesienia części informacji genetycznej z chromosomów do współwystępujących w komórkach plazmidów. Ze względu na dualistyczne właściwości, zaproponowano zaklasyfikowanie ich do odrębnej, nowoutworzonej grupy replikonów – chromidów (*chromids*) (Rys. 1). Nazwa ta, wywodząca się od słów CHROmosom i plazMID, doskonale odzwierciedla naturę i pochodzenie tych replikonów [15].

Z badań Harrisona i wsp. [15] wynika, że chromidy to duże replikony, zwykle drugie pod względem wielkości w komórce. Sekwencje nukleotydowe chromidów i chromosomów wykazują wiele cech wspólnych, np. mają zbliżoną zawartość par G+C i podobne wykorzystanie kodonów w sekwencjach kodujących (*codon usage*), co wskazuje na długotrwałą koewolucję obu typów replikonów.

Zaobserwowano, że chromidy są replikonami bardziej konserwowanymi niż plazmidy. Homologiczne chromidy występują niejednokrotnie u wszystkich przedstawicieli danego rodzaju taksonomicznego, co odróżnia je od plazmidów, których duże zróżnicowanie widoczne jest w szczepach należących do tego samego gatunku [15]. Wiele chromidów zawiera informację genetyczną, która jest charakterystyczna dla danego rodzaju [15, 24] i umożliwia bakteriom zajęcie właściwej im niszy ekologicznej. Chromidy występujące w różnych rodzajach bakterii mają odmienne typy systemów replikacyjnych, co sugeruje, że replikony te powstały kilkukrotnie w toku ewolucji, zaś ich prekursorami były plazmidy charakterystyczne dla poszczególnych rodzajów taksonomicznych gospodarzy.

Ze względu na polifiletyczne pochodzenie, chromidy nie zawierają konserwowanego zestawu genów, który mogłyby stanowić marker pomocny w ich identyfikacji. Harrison i wsp. [24] zaproponowali trzy kry-

teria definiujące te replikony, które łącznie pomagają odróżnić je od plazmidów i chromosomów. Są to: (i) obecność plazmidowych systemów replikacyjnych, (ii) skład nukleotydowy sekwencji zbliżony do chromosomu i (iii) występowanie genów rdzenia genomu, konserwowanych w chromosomach pokrewnych bakterii. Ostatnie z wymienionych kryteriów wskazuje na niezbędność chromidów – ich usunięcie z komórki powinno wywoływać efekt letalny. Niektóre chromidy niosą tylko pojedyncze geny niezbędne (na przykład w pSymB *Sinorhizobium meliloti* – dwa geny [9]), natomiast inne zawierają duże segmenty DNA pochodzenia chromosomowego, o wielkości nawet kilkudziesięciu tysięcy par zasad (np. tzw. chromosom 2 *Paracoccus denitrificans* PD 1222).

Należy podkreślić, że przyjęcie koncepcji chromidu zasadniczo zmienia sposób postrzegania przez nas struktury genomów bakteryjnych. W jej świetle, mikroorganizmy te mają tylko jeden chromosom z silnie konserwowanym systemem replikacyjnym typu *dnaA* [21]. Natomiast replikony definiowane jako chromidy, ze względu na ich „plazmidowe korzenie”, powinny być zaliczane wraz z plazmidami do grupy elementów pozachromosomowych (Rys. 1).

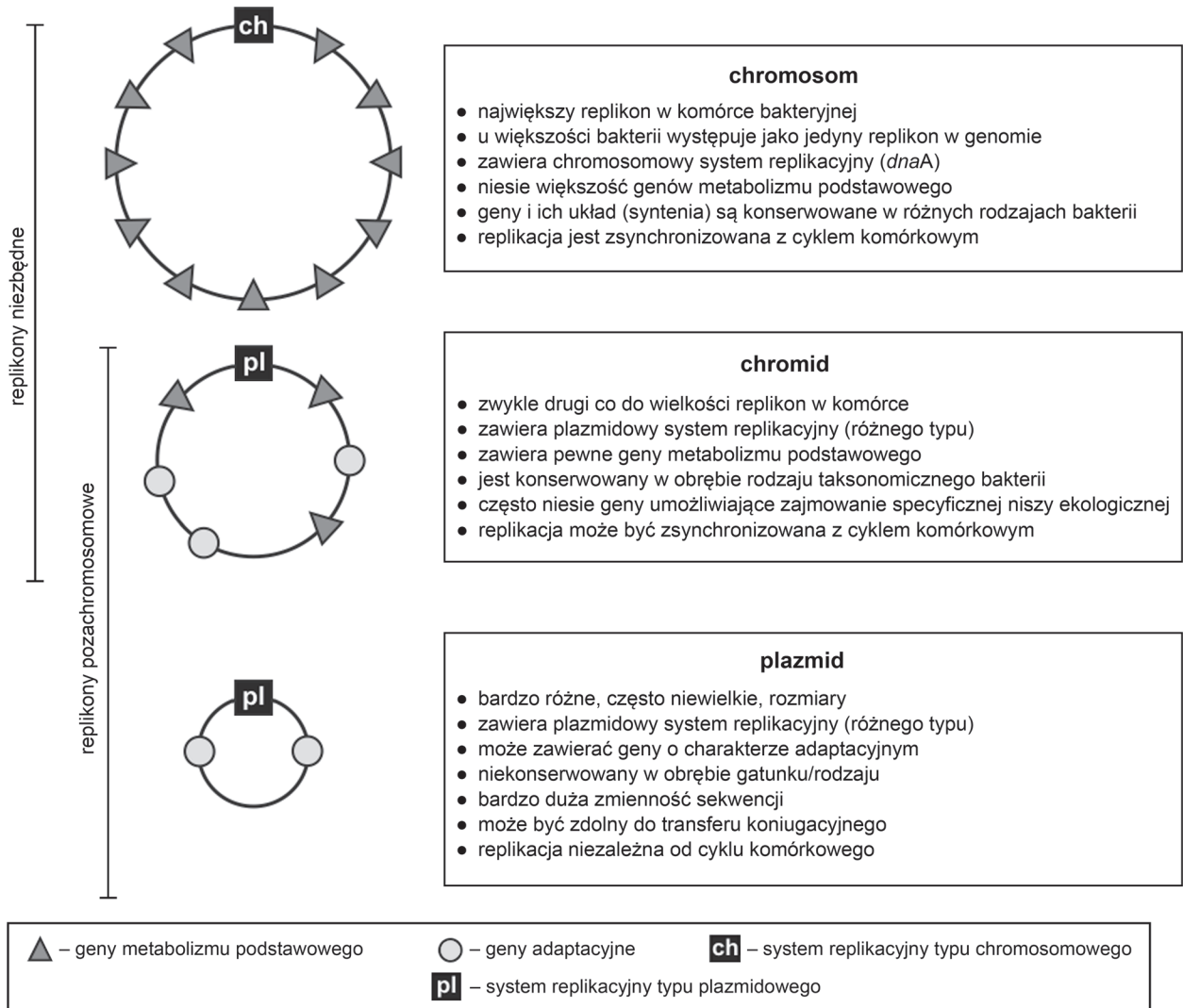
4. Identyfikacja i klasyfikacja chromidów

Propozycja nowej klasyfikacji replikonów bakteryjnych została zaakceptowana przez wiele zespołów, prowadzących badania z zakresu genomiki. W kolejnych poznawanych genomach złożonych wyróżniane są nowe chromidy, jednak ich identyfikacja często bywa problematyczna.

Najbardziej dyskusyjne jest kryterium „niezbędności” chromidów. Niektóre geny uważane za niezbędne u jednych bakterii, u innych mogą pełnić mniej istotne funkcje, i odwrotnie, geny uważane za nieistotne u jednych gospodarzy mogą odgrywać kluczową rolę w procesach metabolicznych innych gatunków [17]. Co więcej, niektóre bakterie niosą unikatowe geny niezbędne, np. wspomniany gen resolwazy telomerów w *Borrelia* spp. [2], które można zidentyfikować i zdefiniować wyłącznie w toku analiz eksperymentalnych.

Niektóre replikony pozachromosomowe mogą nie spełniać kryterium „niezbędności”, chociaż występują w nich homologi genów kluczowych dla bakterii. Może to wynikać np. z obecności w komórce kilku kopii takich genów, usytuowanych w różnych replikonach. Nie ulega zatem wątpliwości, że analizy ładunku genetycznego chromidów nie powinny być prowadzone w oderwaniu od kompletnych sekwencji genomów szczepów gospodarzy.

Dyskusyjne wydaje się również samo pojęcie „niezbędności” genów. Próba identyfikacji *in silico* informacji



Rys. 1. Charakterystyka głównych typów replikonów występujących w genomach bakterii

genetycznej niezbędnej dla komórki nie znajduje często poparcia w wynikach analiz eksperymentalnych. Niektórych genów nie można zmutować w określonych warunkach laboratoryjnych (wydają się więc niezbędne) jednak z łatwością udaje się je usunąć z komórek po zmianie warunków hodowli [8]. Szczepy pozbawione tych genów bywają jednak upośledzone pod względem niektórych cech metabolicznych, co zmniejsza ich szanse w konkurencji z innymi organizmami, a tym samym uniemożliwia im przetrwanie w naturalnym środowisku.

Ze względu na przedstawione wyżej wątpliwości, niektórzy badacze stosują bardziej liberalną definicję chromidów, proponując, aby o przynależności do tej grupy replikonów decydowały tylko dwa kryteria, tj. obecność plazmidowych systemów replikacyjnych oraz zbliżony do chromosomu skład nukleotydowy sekwencji [24]. Na tej podstawie typowane są replikony o długiej historii ewolucyjnej w danej bakterii, na co wskazuje „dopasowanie” ich sekwencji do genomów gospodarzy.

Zrezygnowanie z kryterium „niezbędności” pozwala na zaliczenie do grupy chromidów znacznie większej liczby replikonów pozachromosomowych. Na przykład w genomach kilku szczepów bakterii morskich z kladu *Roseobacter* (*Alphaproteobacteria*), mianem chromidów określono: (i) dwa z pięciu replikonów pozachromosomowych *Dinoroseobacter shibae* DSM16493 [24], (ii) wszystkie trzy replikony pozachromosomowe *Pheobacter inhibens* DSM17395 [24] oraz (iii) osiem z jedenastu replikonów pozachromosomowych *Marinovum algicola* D898 [14].

Niektóre z wyróżnionych w ten sposób chromidów można usunąć z komórek bakterii. Powiodło się to m.in. w przypadku chromidów *P. inhibens* DSM17395 (262 kbp) i *D. shibae* DSM16493 (72 kbp), których utrata nie spowodowała widocznych zmian w tempie wzrostu bakterii w warunkach laboratoryjnych. Replikony te są jednak ewolucyjnie zachowane w obu gatunkach i występują w szczepach izolowanych nawet z odległych regionów geograficznych. Determinują one cechy, które

są ważne (być może „niezbędne”) do przeżycia gospodarzy w środowisku naturalnym, takie jak produkcja antybiotyków [24] czy adaptacja do warunków głodu i stresu oksydacyjnego [30].

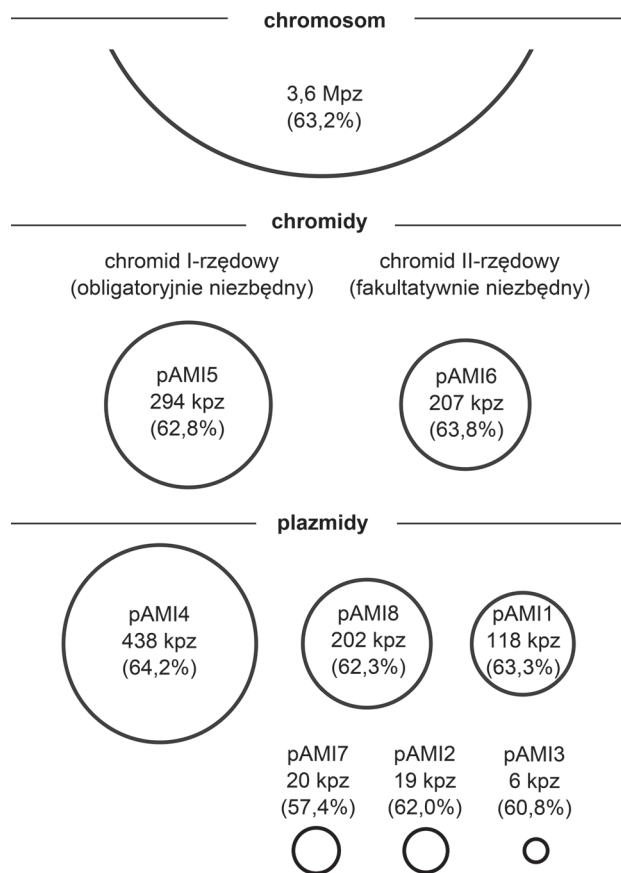
Obserwacje te skłoniły badaczy do wyróżnienia dwóch grup chromidów, tj. chromidów *sensu stricto* i *sensu lato* [24], nazwanych również alternatywnie, odpowiednio, chromidami pierwszo- i drugorzędownymi [12]. Pierwsze są obligatoryjnie niezbędne swoim gospodarzom, bowiem zawierają przynajmniej jeden kluczowy gen, występujący w jednej kopii w genomie, niezbędny do przeprowadzania podstawowych procesów życiowych. Drugie są fakultatywnie niezbędne, mogą więc być usunięte z komórki w warunkach laboratoryjnych, lecz prawdopodobnie odgrywają istotną rolę, gdy bakteria występuje w środowisku naturalnym [24].

Najbardziej wiarygodnych informacji na temat roli i znaczenia replikonów pozachromosomowych przyniosła analiza eksperymentalne, umożliwiające określenie ich rzeczywistej funkcji. Z tego powodu, w badaniach nad genomami bakterii z rodzaju *Paracoccus* (*Alphaproteobacteria*), prowadzonych z udziałem autorów tej pracy, dwa wymienione wcześniej kryteria bioinformatyczne stosowano jedynie do wstępnego typowania chromidów, a nie przy ostatecznej klasyfikacji [12].

Analizy *in silico* sekwencji genomu *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 wskazywały, że aż sześć z ośmiu replikonów pozachromosomowych tego szczepu powinno być zaliczonych do grupy chromidów. Jednak analiza funkcji poszczególnych replikonów wykazała, że tylko dwa z nich odgrywają ważną rolę, warunkując przeżycie lub wpływając na tempo wzrostu komórek gospodarza w różnych testowanych warunkach. Na tej podstawie wyróżniono chromid pierwszo- (pAMI5) i drugorzędowy (pAMI6) [11, 12] (Rys. 2). Nie oznacza to, że informacja genetyczna zawarta w obrębie pozostałych replikonów nie odgrywa istotnej roli w warunkach naturalnych. Kodowane przez nie właściwości odpowiadają jednak bardziej cechom plazmidów, których geny adaptacyjne są istotne jedynie w szczególnych warunkach bytowania.

Analogiczne badania przeprowadzone z udziałem bakterii z rodzaju *Rhizobium* również wskazują na istnienie dwóch grup chromidów. W *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii TA1 występują cztery pozachromosomowe replikony, zarówno nieusuwalne, jak i takie, których utrata prowadzi do znacznego upośledzenia wzrostu komórek gospodarza. Wszystkie one spełniają więc kryteria chromidów (pierwszo- lub drugorzędowych), niosąc jednocześnie geny adaptacyjne, odpowiedzialne za nawiązanie stosunków symbiotycznych z roślinami [31].

Inny ciekawy przykład stanowią dwa replikony pozachromosomowe (p42e i p42f) *Rhizobium etli* CFN42. Występują w nich liczne typowe dla chromosomów



Rys. 2. Replikony wchodzące w skład genomu *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 (*Alphaproteobacteria*) [12]

W nawiasach podano procentową zawartość par GC w sekwencjach nukleotydowych poszczególnych replikonów

geny, m.in. *cobFGHIJKLM* odpowiedzialne za syntezę kobalaminy, *panBC* zaangażowane w syntezę kwasu pantotenowego, *nadABC* odpowiedzialne za syntezę NAD czy *minCDE* zaangażowane w podziały komórkowe. Chociaż nie są to geny „niezbędne” (można je zmutować w warunkach laboratoryjnych; [19, 34]), badacze uważają, że szczepy ich pozbawione nie byłyby w stanie przetrwać w środowisku naturalnym. Oba replikony należy więc uznać za chromidy drugorzędowe. Na ich przynależność do grupy chromidów wskazywały także wcześniejsze przewidywania Harrisona i wsp. [15].

5. Chromidy w genomach bakterii

Chromidy są składową genomów wielu bakterii reprezentujących różne grupy taksonomiczne [15]. Analizy danych dostępnych w 2014 roku w bazie GenBank (NCBI) wskazują, że replikony te są szczególnie powszechne w *Proteobacteria* [25]. Zidentyfikowano je w licznych gatunkach z 19 rodzajów (spośród 231) zaliczanych do klas: (i) *Alpha-* (*Agrobacterium* spp., *Asticcacaulis* spp., *Brucella* spp., *Ochrobactrum* spp.,

Paracoccus spp., *Rhizobium* spp., *Rhodobacter* spp., *Sinorhizobium* spp., *Sphingobium* spp.), (ii) Beta- (*Burkholderia* spp., *Cupriavidus* spp., *Ralstonia* spp., *Variovorax* spp.) i (iii) *Gammaproteobacteria* (*Aliivibrio* spp., *Listonella* spp., *Photobacterium* spp., *Pseudoalteromonas* spp., *Vibrio* spp.) [25].

Dla porównania, w typie *Firmicutes*, liczącym 90 rodzajów, zidentyfikowano jedynie dwa szczepy niosące chromidy (*Butyrivibrio proteoclasticus* B316, *Clostridium difficile* BI1). Obecność tego typu replikonów stwierdzono także w bakteriach z typów: (i) *Actinobacteria* (*Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43 111), (ii) *Bacteroidetes* (*Prevotella* spp.), (iii) *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. 90, *Cyanothece* sp. ATCC 51142), (iv) „*Deinococcus-Thermus*” (*Deinococcus radiodurans* R1) i (v) *Spirochaetes* (*Leptospira* spp.) [25].

Większość wyróżnionych dotąd chromidów poddano jedynie pobieżnym analizom sekwencji nukleotydowych. Bardziej szczegółowe badania, mające na celu poznanie podstaw funkcjonowania genomów złożonych, prowadzono głównie z wykorzystaniem kilku modelowych mikroorganizmów. Bakterie te wybrano ze względu na interesujące badaczy właściwości szczepów gospodarzy bądź unikatową strukturę ich genomów.

Są to m.in.: (i) *Vibrio cholerae* – czynnik etiologiczny cholery [26, 33, 35], (ii) *Agrobacterium tumefaciens* – fitopatogen, zawierający w genomie dwa chromidy, w tym jeden o strukturze liniowej [29], (iii) *Sinorhizobium meliloti* – bakteria brodawkowa [9] oraz (iv) szczepy *Burkholderia* spp., w których współwystępują dwa chromidy [4, 23].

6. Ewolucyjne korzyści wynikające z obecności chromidów

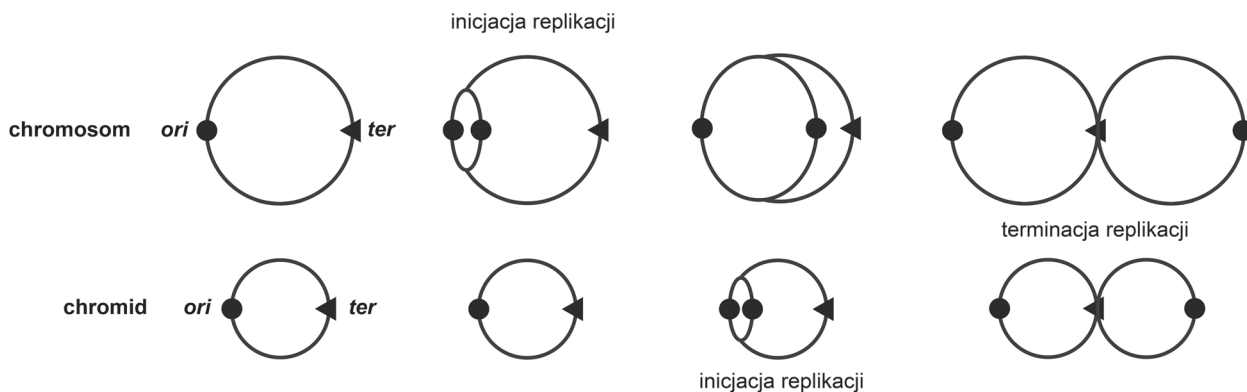
Chromidy powstawały przypadkowo w wyniku losowych zdarzeń rekombinacyjnych, które doprowadziły do międzyreplikonowej translokacji informacji gene-

tycznej. Dopasowanie sekwencji chromidów do genomu danego gospodarza sugeruje, że do zdarzeń tych doszło dość dawno z ewolucyjnego punktu widzenia. Ze względu na obecność pokrewnych chromidów w różnych gatunkach jednego rodzaju taksonomicznego, wydaje się prawdopodobne, że wiele tego typu replikonów powstało w szczepach, które były protoplastami wyróżnianych współcześnie rodzajów taksonomicznych.

Na długotrwałą koewolucję chromidów i chromosomów wskazują również wyniki badań prowadzonych na modelu *V. cholerae*. W bakterii tej, replikony obu typów podlegają wspólnej globalnej regulacji, na co wskazuje synchronizacja ich replikacji (na etapie terminacji) w cyklu komórkowym [26] (Rys. 3). Odróżnia to chromid *V. cholerae* od plazmidów, które powielają swoje genomy niezależnie od replikacji chromosomu. Być może synchronizacja replikacji niezbędnych replikonów jest cechą charakterystyczną wszystkich genomów złożonych; potwierdzenie tej tezy wymaga jednak eksperymentalnej weryfikacji.

Chromidy powstały niezależnie w różnych grupach taksonomicznych bakterii. Nie zostały one wyeliminowane w toku ewolucji, co sugeruje, że rozdział niezbędnej informacji genetycznej między kilka replikonów może być korzystny dla bakterii. Utrzymywanie dodatkowych dużych replikonów oraz powiązanie ich podstawowych funkcji z cyklem komórkowym i globalnym systemem regulacji ekspresji genów wymaga znacznych „kosztów ewolucyjnych”, których wydatkowanie powinno być odpowiednio kompensowane [25].

Jedna z hipotez zakłada, że genomy złożone zapewniają komórce możliwość utrzymywania większej ilości informacji genetycznej. W istocie, genomy takie ($5,73 \text{ Mbp} \pm 1,66 \text{ Mbp}$) są zwykle większe od genomów o strukturze jednoreplikonowej, zawierających jedynie chromosom ($3,38 \text{ Mbp} \pm 1,81 \text{ Mbp}$) [15]. Powstawanie genomów złożonych nie jest jednak warunkiem koniecznym do rozbudowy genomu. Bardzo dużą ilość informacji genetycznej jest w stanie utrzymać również



Rys. 3. Synchronizacja terminacji replikacji chromosomu i chromidu
ori – origin, miejsce inicjacji replikacji, ter – terminus, miejsce zakończenia rundy replikacyjnej.

pojedynczy replikon, czego przykładem są m.in. chromosomy *Sorangium cellulosum* (*Deltaproteobacteria*) i *Ktedonobacter racemifer* (*Chloroflexi*), o wielkości przekraczającej 13 Mbp [5, 27].

Należy zauważyć, że replikacja genomów złożonych zostaje zainicjowana w kilku miejscach *origin*, usytuowanych w różnych replikonach. Może to skrócić czas powielania całego genomu i doprowadzić do wzrostu tempa podziałów komórkowych. Znane są przykłady blisko spokrewnionych bakterii (mających genomy o podobnej wielkości, lecz różnej strukturze), które charakteryzuje odmienna dynamika wzrostu. Widoczne jest to m.in. w bakteriach brodawkowych (*Alphaproteobacteria*), do których zalicza się zarówno szybko rosnące bakterie o genomach wieloreplikonowych (rodzaje *Rhizobium* i *Sinorhizobium*), jak i wolno rosnące szczepy mające genomy jednoreplikonowe (rodzaje *Mesorhizobium* i *Bradyrhizobium*) [15].

Analogiczne różnice zaobserwowano także u dwóch stosunkowo blisko spokrewnionych gatunków – *V. cholerae* i *E. coli*. Porównując tempo ich wzrostu w warunkach laboratoryjnych stwierdzono, że czas generacji *V. cholerae* (genom złożony) jest o połowę krótszy niż *E. coli* (genom jednoreplikonowy odpowiadający wielkością genomowi *V. cholerae*); czasy te wynoszą, odpowiednio, 15 i 30 min [13].

Przytoczone wyżej przykłady sugerują ścisłą korelację między strukturą genomu a tempem podziałów komórkowych. Podjęte próby eksperymentalnej weryfikacji tych zależności, przeprowadzone na modelu *V. cholerae*, nie pozwoliły jednak na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Zgodnie z oczekiwaniami, zmodyfikowany szczep, w którym połączono chromosom i chromid w jeden replikon, rósł nieco wolniej niż szczep dziki. Jednak spowolnione tempo wzrostu obserwowano również w przypadku szczepu, którego chromid powiększono, wprowadzając do niego dodatkowy segment chromosomowego DNA (podobnej wielkości chromid i chromosom) [33].

Interpretując wyniki tego typu analiz, należy mieć świadomość, że rozległe zmiany w architekturze genomu mogą zaburzyć funkcjonowanie wielu genów, w tym genów niezbędnych do przeprowadzania podstawowych procesów życiowych. Badając spontaniczną translokację segmentu chromosomowego DNA w genomie *Burkholderia cepacia* [23], zaobserwowano, że transfer informacji genetycznej z chromosomu do chromidu może spowodować zmianę poziomu ekspresji przeniesionych genów.

Inne badania potwierdziły, że poziom transkryptów genów chromidowych jest niższy niż genów chromosomowych [35]. Przyczyną tego jest mniejsza liczba kopii genów chromidowych w genomie (*gene dosage*), co wynika ze wspomnianej wcześniej synchronizacji terminacji replikacji chromidu i chromosomu (Rys. 3).

Ponieważ chromidy są mniejsze od chromosomów, ich replikacja rozpoczyna się później, dlatego geny znajdujące się w ich obrębie mają przez dłuższy czas cyklu komórkowego mniejszą liczbę kopii niż geny znajdujące się w chromosomie, zwłaszcza w pobliżu *origin* replikacji (*oriC*) [23].

Translokacja informacji genetycznej do chromidów może stanowić więc dodatkowy czynnik pozwalający na optymalizację poziomu ekspresji wielu genów. Geny rzadziej transkrybowane w mniejszym stopniu podlegają działaniu oczyszczającego doboru selekcyjnego (*purifying selection*), który eliminuje z populacji bakterii ich zmutowane warianty. W rezultacie informacja genetyczna chromidów może ulegać szybszym zmianom ewolucyjnym [7].

Należy także podkreślić, że genomy chromidów, dzięki niewielkiemu zagęszczeniu genów niezbędnych do przeprowadzania podstawowych procesów życiowych, są bardziej plastyczne niż chromosomy. Świadczy o tym m.in. nagromadzenie w nich dużej ilości egzogennej informacji genetycznej, w tym genów adaptacyjnych, których obecność umożliwia bakteriom zajmowanie określonych niszy ekologicznych. Obecność tego typu informacji genetycznej w niezbędnych replikonach jest zapewne korzystna dla bakterii, może bowiem prowadzić do powstania wysoce wyspecjalizowanych szczepów, znacznie lepiej dostosowanych do specyficznych warunków danego środowiska.

Nie ulega wątpliwości, że chromidy wywierają istotny wpływ na funkcjonowanie i ewolucję genomów bakteryjnych. Mozaikowa struktura chromidów oraz występowanie w nich różnych kombinacji genów chromosomowych i plazmidowych powodują, że replikony te są często postrzegane jako swoiste „poligony doświadczalne”, w których „testowane” są różne układy genetyczne, mogące stanowić nowe, korzystne warianty ewolucyjne [1].

7. Podsumowanie

Bakteryjne replikony pozachromosomowe postrzegano dotąd jedynie przez pryzmat plazmidów, uważając, że stanowią one wyłącznie źródło dodatkowej informacji genetycznej, która nie jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek bakteryjnych. Liczne replikony wymykają się jednak definicji plazmidu, bowiem – podobnie jak chromosomy – determinują podstawowe procesy życiowe bakterii. Wskazuje to na potrzebę zmiany definicji plazmidu bądź wprowadzenia nowej klasyfikacji replikonów pozachromosomowych.

Koncepcja chromidu, zaproponowana przez Harrisona i współpracowników [15] przynosi rozwiązanie tego problemu. Utworzenie nowej klasy replikonów

pozwała na włączenie do niej licznych elementów o dualistycznych właściwościach, których tożsamość budziła wcześniej wątpliwości.

Należy podkreślić, że nie jest to jedynie propozycja zmiany nomenklatury, ale również zasadnicza zmiana obrazu struktury wielu genomów bakteryjnych. Powraca koncepcja pojedynczego chromosomu i dodatkowych replikonów pozachromosomowych, cechujących się dużą różnorodnością, które dopiero po szczegółowych analizach *in silico* i *in vivo* powinny być zaliczone do grupy chromidów lub plazmidów (Rys. 1).

Postawienie ostrej granicy między plazmidami a chromidami często bywa jednak trudne, a niekiedy wręcz niemożliwe. Istnieją liczne replikony o właściwościach pośrednich, których wkład do ogólnego metabolizmu komórki jest trudny do oszacowania. Dodatkowe problemy wynikają z trudności jednoznacznie zdefiniowania niezbędnej informacji genetycznej, której obecność stanowi podstawę wyróżnienia chromidów pierwszorzędowych [8]. Duże nadzieje należy wiązać z możliwością zastosowania w badaniach wysokoprępowych technik mutagenyzy transpozonowej (Tn-Seq), które, poprzez analizę nawet setek tysięcy mutantów, umożliwiają wskazanie genów, których mutacja jest w danych warunkach letalna dla komórki [1, 18].

Podziękowania

Praca ta powstała w trakcie realizacji projektu badawczego, mającego na celu analizę struktury i funkcji chromidów bakterii z rodzaju *Paracoccus* (*Alphaproteobacteria*). Projekt ten jest finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji nr DEC-2013/09/B/NZ1/00133.

Piśmiennictwo

- Barquist L., Boinett C.J., Cain A.K.: Approaches to querying bacterial genomes with transposon-insertion sequencing. *RNA Biol.* **10**, 1161–1169 (2013)
- Byram R., Stewart P.E., Rosa P.: The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **186**, 3561–3569 (2004)
- Cairns J.: The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J. Mol. Biol.* **6**, 208–213 (1963)
- Chain P.S., Denev V.J., Konstantinidis K.T., Vergez L.M., Agullo L., Reyes V.L., Hauser L., Cordova M., Gomez L., Gonzalez M. *et al.*: *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15280–15287 (2006)
- Chang Y.J., Land M., Hauser L., Chertkov O., Del Rio T.G., Nolan M., Copeland A., Tice H., Cheng J.F., Lucas S. *et al.*: Non-contiguous finished genome sequence and contextual data of the filamentous soil bacterium *Ktedonobacter racemifer* type strain (SOSP1-21). *Stand. Genomic Sci.* **5**, 97–111 (2011)
- Choudhary M., Zanhua X., Fu Y.X., Kaplan S.: Genome analyses of three strains of *Rhodobacter sphaeroides*: evidence of rapid evolution of chromosome II. *J. Bacteriol.* **189**, 1914–1921 (2007)
- Cooper V.S., Vohr S.H., Wrocklage S.C., Hatcher P.J.: Why genes evolve faster on secondary chromosomes in bacteria. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1000732 (2010)
- D'Elia M.A., Pereira M.P., Brown E.D.: Are essential genes really essential? *Trends Microbiol.* **17**, 433–438 (2009)
- diCenzo G., Milunovic B., Cheng J., Finan T.M.: The tRNAarg gene and engA are essential genes on the 1.7-Mb pSymb megaplasmid of *Sinorhizobium meliloti* and were translocated together from the chromosome in an ancestral strain. *J. Bacteriol.* **195**, 202–212 (2013)
- Dziewit L., Bartosik D.: Genomy prokaryotyczne w świetle analiz genomowych. *Post. Mikrobiol.* **50**, 87–96 (2011)
- Dziewit L., Czarnecki J., Prochwicz E., Wibberg D., Schluter A., Puhler A., Bartosik D.: Genome-guided insight into the methylo-trophy of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686. *Front. Microbiol.* **6**, 852 (2015)
- Dziewit L., Czarnecki J., Wibberg D., Radlinska M., Mrozek P., Szymczak M., Schluter A., Puhler A., Bartosik D.: Architecture and functions of a multipartite genome of the methylo-trophic bacterium *Paracoccus aminophilus* JCM 7686, containing primary and secondary chromids. *BMC Genomics*, **15**, 124 (2014)
- Egan E.S., Fogel M.A., Waldor M.K.: Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol. Microbiol.* **56**, 1129–1138 (2005)
- Frank O., Goker M., Pradella S., Petersen J.: Ocean's Twelve: flagellar and biofilm chromids in the multipartite genome of *Marinovum algicola* DG898 exemplify functional compartmentalization. *Environ. Microbiol.* **17**, 4019–4034 (2015)
- Harrison P.W., Lower R.P., Kim N.K., Young J.P.: Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* **18**, 141–148 (2010)
- Jacob F., Brenner S.: On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon. *CR Hebd. Seances Acad. Sci.* **256**, 298–300 (1963)
- Juhas M., Reuss D.R., Zhu B., Commichau F.M.: *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* essential genes and minimal cell factories after one decade of genome engineering. *Microbiology*, **160**, 2341–2351 (2014)
- Kwon Y.M., Ricke S.C., Mandal R.K.: Transposon sequencing: methods and expanding applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2015)
- Landeta C., Davalos A., Cevallos M.A., Geiger O., Brom S., Romero D.: Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia. *J. Bacteriol.* **193**, 1317–1326 (2011)
- Lanoil B.D., Ciuffetti L.M., Giovannoni S.J.: The marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* has a complex genome structure composed of two separate genetic units. *Genome Res.* **6**, 1160–1169 (1996)
- Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwinska J., Zawilak A., Dudek M.R., Cebrat S.: Where does bacterial replication start? Rules for predicting the *oriC* region. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3781–3791 (2004)
- Michaux S., Paillisson J., Carles-Nurit M.J., Bourg G., Allardet-Servent A., Ramuz M.: Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. Bacteriol.* **175**, 701–705 (1993)
- Morrow J.D., Cooper V.S.: Evolutionary effects of translocations in bacterial genomes. *Genome Biol. Evol.* **4**, 1256–1262 (2012)
- Petersen J., Frank O., Goker M., Pradella S.: Extrachromosomal, extraordinary and essential – the plasmids of the *Roseobacter* clade. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 2805–2815 (2013)
- Poirion O.: Discrimination analytique des génomes bactériens. Rozprawa doktorska. Ecole Centrale de Lyon (2015)

26. Rasmussen T, Jensen R.B, Skovgaard O.: The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. *EMBO J.* **26**, 3124–3131 (2007)
27. Schneiker S., Perlova O., Kaiser O., Gerth K., Alici A., Altmeyer M.O., Bartels D., Bekel T., Beyer S., Bode E. *et al.*: Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1281–1289 (2007)
28. Shigenobu S., Watanabe H., Hattori M., Sakaki Y., Ishikawa H.: Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature*, **407**, 81–86 (2000)
29. Slater S.C., Goldman B.S., Goodner B., Setubal J.C., Farrand S.K., Nester E.W., Burr T.J., Banta L., Dickerman A.W., Paulsen I. *et al.*: Genome sequences of three agrobacterium biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J. Bacteriol.* **191**, 2501–2511 (2009)
30. Soora M., Tomasch J., Wang H., Michael V., Petersen J., Engelen B., Wagner-Dobler I., Cypionka H.: Oxidative stress and starvation in *Dinoroseobacter shibae*: the role of extrachromosomal elements. *Front. Microbiol.* **6**, 233 (2015)
31. Stasiak G., Mazur A., Wielbo J., Marczak M., Zebracki K., Koper P., Skorupska A.: Functional relationships between plasmids and their significance for metabolism and symbiotic performance of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *J. Appl. Genet.* **55**, 515–527 (2014)
32. Suwanto A., Kaplan S.: Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.* **171**, 5850–5859 (1989)
33. Val M.E., Skovgaard O., Ducos-Galand M., Bland M.J., Mazel D.: Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues. *PLoS Genet.* **8**, e1002472 (2012)
34. Villasenor T., Brom S., Davalos A., Lozano L., Romero D., Los Santos A.G.: Housekeeping genes essential for pantothenate biosynthesis are plasmid-encoded in *Rhizobium etli* and *Rhizobium leguminosarum*. *BMC Microbiol.* **11**, 66 (2011)
35. Xu Q., Dziejman M., Mekalanos J.J.: Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1286–1291 (2003)
36. Zuerner R.L., Herrmann J.L., Saint Girons I.: Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. *J. Bacteriol.* **175**, 5445–5451 (1993)

