

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Elena Pirović

**Mehanizmi i značaj horizontalnog prijenosa gena kod mikroorganizama**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Elena Pirović

**Mechanisms and significance of horizontal gene transfer in  
microorganisms**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad izrađen je u sklopu studijskog programa Biologije na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Bosak.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Mehanizmi i značaj horizontalnog prijenosa gena kod mikroorganizama

Elena Pirović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Horizontalnim prijenosom gena prenosi se genska informacija između organizama koji nisu u odnosu roditelj-potomak. Ovakav prijenos gena najzastupljeniji je među mikroorganizmima. Postoje tri glavna mehanizma horizontalnog prijenosa gena između mikroorganizama: konjugacija, transformacija i transdukcija. Konjugacija predstavlja prijenos mobilnih genskih elemenata, najčešće plazmida, preko spolnog pilusa. Bakterije koje sadrže F plazmid nazivaju se  $F^+$  bakterijama te su one donori plazmida, pretvarajući  $F^-$  bakterije u  $F^+$ . F plazmid može se i ugraditi u kromosom domaćina, čime nastaju Hfr sojevi. Transformacija je unos okolišne DNA u domaćina. Bakterije sposobne za primitak okolišne DNA nazivaju se kompetentnim bakterijama. Transdukcija je fazima posredovan horizontalni prijenos gena. Razlikuju se specijalizirana transdukcija, kod koje se prenose samo specifični geni, te generalizirana transdukcija, kod koje je moguće prenijeti bilo koji gen. Horizontalni prijenos gena mikroorganizmima omogućuje brzu prilagodbu na okolišne uvjete te je važan posrednik prokariotske evolucije. Najbolji primjeri za ovo jesu proteorodopsin te rezistencija na antibiotike, oboje važne adaptacije koje su široko rasprostranjene upravo zbog pozitivnog učinka na vijabilnost jedinki koje ih posjeduju.

Ključne riječi: konjugacija, transformacija, transdukcija, proteorodopsin, antibiotici

(20 stranica, 4 slika, 0 tablica, 16 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sunčica Bosak

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

### Mechanisms and significance of horizontal gene transfer in microorganisms

Elena Pirović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Horizontal gene transfer is the movement of genetic information other than by the transmission of DNA from parent to offspring. This type of gene transfer is most prevalent among microorganisms. There are three main mechanisms of horizontal gene transfer between microorganisms: conjugation, transformation and transduction. Conjugation represents the transfer of mobile genetic elements, usually plasmids, through the sex pilus. Bacteria containing the F plasmid are called F<sup>+</sup> bacteria and they are plasmid donors, converting F<sup>-</sup> bacteria into F<sup>+</sup>. The F plasmid can also be incorporated into the host's chromosome, resulting in Hfr strains. Transformation is the introduction of environmental DNA into the host. Bacteria capable of receiving environmental DNA are called competent bacteria. Transduction is phage-mediated horizontal gene transfer. There is a difference between specialized transduction, where only specific genes are transferred, and generalized transduction, where any gene can be transferred. Horizontal gene transfer enables microorganisms to quickly adapt to environmental conditions and is an important mediator of prokaryotic evolution. The best examples of this are proteorhodopsin and antibiotic resistance, both important adaptations that are widespread precisely because of the positive effect on the viability of the individuals that possess them.

Keywords: conjugation, transformation, transduction, proteorhodopsin, antibiotics

(20 pages, 4 figures, 0 tables, 16 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dr. sc. Sunčica Bosak, Assoc. Prof.

# **SADRŽAJ**

<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>MEHANIZMI HORIZONTALNOG PRIJENOSA GENA</b>	<b>2</b>
2.1. KONJUGACIJA	3
2.2. TRANSFORMACIJA	5
2.3. TRANSDUKCIJA	7
2.4. PREPREKE MEHANIZMIMA HORIZONTALNOG PRIJENOSA GENA	10
<b>ZNAČAJ</b>	<b>12</b>
3.1. EVOLUCIJSKI ZNAČAJ	12
3.2. PROTEORODOPSIN	14
3.3. REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE	15
<b>ZAKLJUČAK</b>	<b>17</b>
<b>LITERATURA</b>	<b>18</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>20</b>

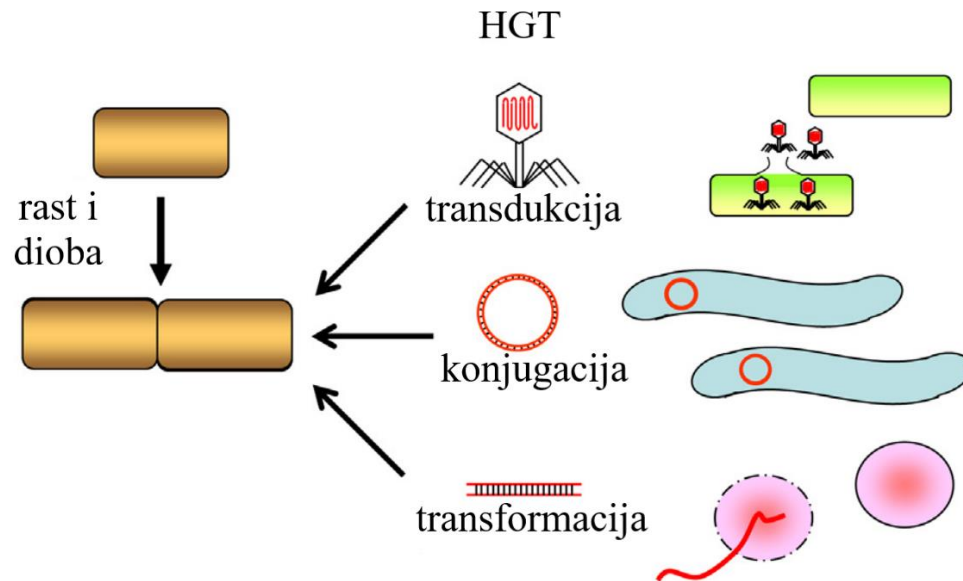
## 1. UVOD

Drvo života kakvo je opisao Charles Darwin bazirano je na adaptivnoj radijaciji, pri čemu je prijenos povoljnih svojstava ograničen na križanje unutar iste vrste. Ovakvo nasljeđivanje genske informacije naziva se vertikalnim prijenosom gena (Blakely 2014). Kad bi prijenos gena doista bio moguć samo unutar iste vrste, genska informacija odražavala bi evolucijske događaje od posljednjeg zajedničkog pretka. Međutim, ovaj pristup otežao je razumijevanje molekularne filogenetike određenih organizama. Naime, kao molekulski marker za rekonstrukciju filogenetskih odnosa između organizama najčešće se koristi sekvenca 16S rRNA, na temelju čije analize su otkrivene razne filogenetske nepodudarnosti, i to prvenstveno kod mikroorganizama (Boto 2010). Prijenos svojstava između mikroorganizama prvi puta je primijećen 1928. godine, kada je Griffith otkrio da se nepoznat “faktor” može prenijeti iz nevirulentnog u virulentni soj vrste *Streptococcus pneumoniae*, proces koji je nazvan transformacijom. 1940-tih godina pokazalo se da je nepoznati “faktor” molekula DNA, što je bio prvi pokazatelj sposobnosti bakterija da prenose genetske informacije neovisno o srodstvenim odnosima, a kasnije je otkriveno da ovaj mehanizam nije ograničen samo na prokariote. Ovakva razmjena genske informacije nazvana je horizontalnim (lateralnim) prijenosom gena (Blakely 2014).

Iako je horizontalni prijenos gena prisutan u sve tri domene života, u najvećoj mjeri zastupljen je u prokariota (Boto 2010). Sposobnost horizontalnog prijenosa gena mikroorganizmima omogućuje brzu adaptaciju na uvjete okoliša te popunjavanje raznovrsnih ekoloških niša. Svojstva koja se na taj način prenose značajno utječu na evoluciju mikroorganizama, što je vidljivo na primjeru proteorodopsina - proteina značajnog za metabolizam morskih bakterija (Béja i sur. 2001; Frigaard i sur. 2006), ali i na primjeru povećane rezistencije na antibiotike koja danas predstavlja globalni problem (MacGowan i Macnaughton 2017). Danas su poznati glavni mehanizmi kojima se izmjenjuje genska informacija, a radi se o konjugaciji, transformaciji i transdukciji.

## 2. MEHANIZMI HORIZONTALNOG PRIJENOSA GENA

Postoje tri mehanizma horizontalnog prijenosa gena kod mikroorganizama (**Slika 1**), a to su konjugacija, transformacija i transdukcija, od kojih je konjugacija najrašireniji oblik horizontalnog prijenosa gena te je ujedno i jedini oblik koji uključuje izravni dodir dvaju mikroorganizama (Blakely 2014). Transdukcija podrazumijeva prijenos genske informacije posredstvom faga, a transformacija unos strane DNA iz okoliša u stanicu donora (Blakely 2014).



**Slika 1. Skica mehanizama horizontalnog prijenosa gena kod mikroorganizama.**

Rast i dioba stanica rezultiraju vertikalnim prijenosom gena, dok transdukcija, konjugacija i transformacija sudjeluju u horizontalnom prijenosu gena. Preuzeto i modificirano iz Blakely 2014.

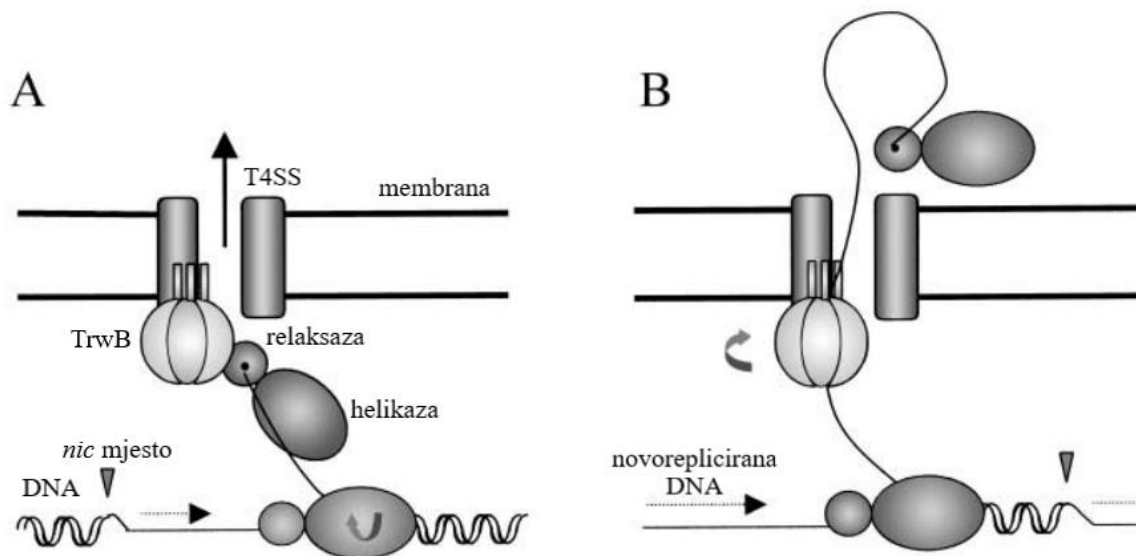


## 2.1. KONJUGACIJA

Konjugacija je prijenos gena između bakterijskih stanica koji uključuje izravni dodir između donora i primatelja (Blakely 2014; Cabezón i sur. 2015; Llosa i sur. 2002). Otkrili su je Lederberg i Tatum 1946. godine u bakteriji *Escherichia coli* tako što su pomiješali dva soja ove bakterije: soj koji nije mogao sintetizirati metionin i biotin te soj koji nije mogao sintetizirati tiamin, leucin i treonin (Blakely 2014). Iz smjese ova dva soja uspjeli su izolirati divlji tip, odnosno bakterije koje mogu preživjeti na minimalnom mediju, upućujući na prijenos gena između dva soja *E. coli*. Daljnjim istraživanjima otkriveno je da konjugacija ovisi o izravnom kontaktu između stanica te o prisutnosti tzv. faktora plodnosti, odnosno F faktora u stanici donoru. F faktor je relativno mala autonomna molekula DNA, tj. samoprenosiv plazmid veličine 100-kb (F plazmid) (Blakely 2014). Mnogi plazmidi prenose gene odgovorne za rezistenciju na antimikrobne spojeve te se takvi plazmidi nazivaju R faktorima (engl. *Resistance factor*, faktor rezistencije) (Blakely 2014).

U konjugaciji F plazmida sudjeluju brojni molekularni mehanizmi (shema na **Slici 2**), posredujući u kontaktu između stanica, obradi te prijenosu DNA, a sve te funkcije kodirane su unutar *tra* regije F plazmida, duge svega 30-kb. Kako bi se konjugacija odvila, potrebno je uspostaviti kontakt između stanice koja sadrži F plazmid (stanice donora, F<sup>+</sup> stanica) te stanice koja ga ne sadrži (stanice primatelja, F<sup>-</sup> stanica) (Blakely 2014). Ovu ulogu preuzima struktura nazvana pilus - polimer proteina pilina dužine do 20 μm (Blakely 2014; Cabezón i sur. 2015). Pilus luči F<sup>+</sup> stanica, a za njegovu formaciju zadužen je sekrecijski sustav tipa IV (engl. *Type IV Secretion System*, T4SS) (Blakely 2014; Cabezón i sur. 2015; Llosa i sur. 2002), koji kodira grupa gena nazvanih genima za formiranje parova za parenje (engl. *mating pair formation*, MPF) (Cabezón i sur. 2015). Plazmidi sadrže svoje MPF gene, što im daje sposobnost autonomnog prijenosa, a naznake MPF gena otkrivene su i kod Cyanobacteria, Firmicutes, Bacteroides, Actinobacteria i Archaea, što upućuje na starost procesa konjugacije (Cabezón i sur. 2015). Nakon uspostave kontakta između stanica, aktivira se relaksosom, odnosno proteinski kompleks kodiran genima unutar plazmida, ali i genoma stanice domaćina (Blakely 2014; Cabezón i sur. 2015). Njegova uloga je vezanje i jednolančano urezivanje specifične sekvence na *nic* mjestu unutar ishodišta replikacije (engl. *origin of replication*, *oriT*), za što je zaslužna TraI podjedinica relaksosoma (Blakely 2014; Cabezón i sur. 2015). TraI se kovalentno veže za 5' kraj DNA, nakon

čega posreduje odmatanje plazmida i prijenos jednolančane DNA (engl. *single-stranded DNA*, ssDNA) u stanicu primatelja kroz kompleks pore (Blakely 2014; Llosa i sur. 2002). Za prijenos DNA kroz poru potrebna je energija hidrolize ATP-a, koju omogućuju spojni proteini (engl. *coupling protein*), potrebni i za stvaranje kontakta između relaksosoma i T4SS kompleksa (Blakely 2014; Llosa i sur. 2002). Ulaskom linearne ssDNA u stanicu primatelja, ona služi kao kalup za sintezu zaostajućeg lanca DNA, čime se plazmid rekonstruira u stanici primatelju, dok se istovremeno kružna DNA u stanici donoru koristi kao kalup za sintezu vodećeg lanca (Blakely 2014). Tako su po završetku ovog procesa obje stanice  $F^+$  stanice.



**Slika 2. Shema mehanizma konjugacije u dva koraka.** A: TrwC (relaksaza + helikaza) kovalentno vezan na izrezani lanac DNA je supstrat za T4SS. B: TrwB unosi lanac DNA u stanicu dok se on istiskuje iz donorskog plazmida. Preuzeto i modificirano iz Llosa i sur. 2002.

Iako većinom autonomne molekule DNA, F plazmidi imaju i sposobnost ugradnje u bakterijski kromosom. To postižu homolognom rekombinacijom na mjestima umetanja (engl. *Insertion Sequence*, IS) koja se nalaze i na plazmidu i nukleosomu (Arber 2014; Blakely 2014). Sojevi s plazmidom ugrađenim u nukleosom nazivaju se Hfr sojevima (engl. *High frequency of recombination*, visoka stopa rekombinacije) te ih karakterizira lako prenošenje genetskih svojstava u druge sojeve (Arber 2014; Blakely 2014). Još jedno njihovo svojstvo je mogućnost formacije F plazmida koji sadrže dijelove kromosomalne DNA, a nastaju homolognom rekombinacijom. Takvi plazmidi se također mogu prenijeti u F- jedinke konjugacijom, pri čemu nastaju tzv. merodiploidi, odnosno sojevi koji sadrže više od jedne kopije kromosoma (Blakely 2014).

Osim plazmidima, konjugacija može biti posredovana i integrativnim konjugacijskim elementima (eng. *Integrative and Conjugative Elements*, ICE), koji predstavljaju mobilne genske elemente čije su karakteristike samoprenosivost, ali i nemogućnost autonomne replikacije (npr. transpozoni). Prije konjugacije, ICE-ovi se moraju izrezati iz kromosoma, nakon čega slijedi prijenos u stanicu primatelja sličan kao i kod konjugacije posredovane plazmidima (Blakely 2014).

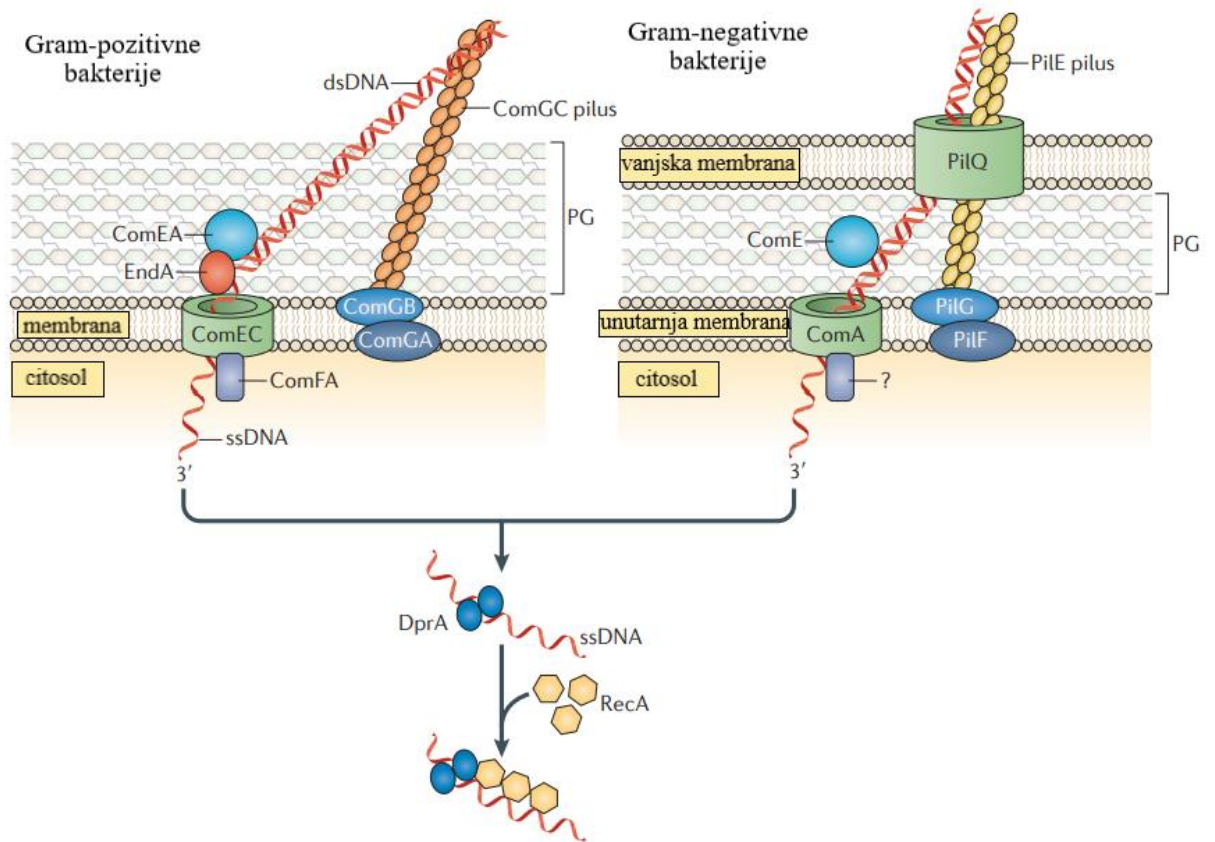
## 2.2. TRANSFORMACIJA

Transformacija podrazumijeva paraseksualan proces koji uključuje egzogenu DNA i stanicu primatelja (Johnston i sur., 2014), a otkrivena je u vrsti *Streptococcus pneumoniae* 1928. (Blakely 2014). Bakterije koje su sposobne proći proces transformacije pokazuju posebno fiziološko stanje nazvano kompetencijom, koje je inducirano heptadekapeptidnim feromonima (Sun 2018). Kompetentne bakterije sposobne su u sebe unijeti egzogenu DNA mehanizmom koji je dobro konzerviran u Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, ali i arheja (Sun 2018). Za razliku od konjugacije i transdukcije, transformacija je u potpunosti vođena stanicom primateljem te su svi potrebni proteini kodirani u genomu stanice primatelja (Johnston i sur. 2014). Ti proteini visoko su konzervirani čak i kod daleko srodnih bakterija, s izuzetkom vrste *Helicobacter pylori*, koja za transformaciju koristi sustav sličan konjugaciji (Sun 2018). Većina kompetentnih bakterija ne eksprimira gene uključene u transformaciju konstantno, već su za indukciju transformacije potrebni specifični uvjeti koji uvelike variraju između vrsta (Johnston i sur. 2014; Sun 2018).

Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije posjeduju vrlo slične sustave unosa DNA u stanicu, s izuzetkom transporta DNA kroz vanjsku membranu kod Gram-negativnih bakterija (Johnston i sur. 2014; Sun 2018). Iako Gram-pozitivne bakterije nemaju vanjsku membranu, imaju peptidoglikanski omotač, koji je potrebno oslabjeti prije unosa DNA u stanicu (Sun 2018). Kod Gram-negativnih bakterija kroz vanjsku membranu prolazi dvolančana DNA (engl. *Double-stranded DNA*, dsDNA), dok kroz unutarnju prolazi ssDNA, isto kao i kod Gram-pozitivnih bakterija (Sun 2018).

Unos DNA u stanicu počinje vezanjem dsDNA za površinu bakterijske stanice pomoću proteinskog kompleksa koji podsjeća na pilus tipa IV (Blakely 2014). Potom endonukleaza reže dsDNA u svrhu dobivanja manjih fragmenata. DNA zatim dolazi u kontakt s dsDNA receptorskim

proteinom (ComEA), nakon čega se jedan lanac razgrađuje endonukleazom EndA. Drugi lanac je u 3'-5' smjeru translociran u citoplazmu membranskim proteinom ComEC. Po ulasku ssDNA u citoplazmu, na nju se vežu proteini koji vežu jednolančanu DNA (engl. *Single strand binding protein*, SsbB) kako bi se spriječila razgradnja nukleazama. Ako ssDNA unesena u stanicu ima regije homologne nukleosomu, ona se homolognom rekombinacijom može ugraditi u genom stanice primatelja, no u tu svrhu potreban je protein DrpA koji interagira sa SsbB kompleksom, omogućujući vezanje proteina RecA na ssDNA. RecA potom traži regije homologije između ssDNA i dvolančane bakterijske DNA, nakon čega posreduje razmjenu DNA (Blakely 2014). Shema transformacije prikazana je na **Slici 3**.



**Slika 3. Shema mehanizma transformacije kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.** Sustav za unos DNA općenito se sastoji od transformacijskog pilusa, sastavljenog od ComGC podjedinica u Gram-pozitivnih bakterija, DNA receptora ComEA i transmembranske pore ComEC (Johnston i sur. 2014). Kod Gram-pozitivnih bakterija, kao što je *Streptococcus pneumoniae*, nukleaza EndA prima DNA od DNA receptora ComEA i razgrađuje jedan lanac DNA, dok neidentificirane nukleaze stvaraju ssDNA (Johnston i sur. 2014). Kod Gram-negativnih bakterija, kao što je *Neisseria gonorrhoeae*, PilQ sekrecijski kanal omogućuje pilusu da prijeđe vanjsku membranu, dok se dsDNA prenosi preko vanjske membrane kroz PilQ (Johnston i sur. 2014). I kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija za unos DNA potrebni su dodatni proteini (primjerice ComGA, ComGB) (Johnston i sur. 2014). Po ulasku ssDNA, ona se veže za DprA, koji pokreće RecA. RecA promovira traženje homologije, nakon čega slijedi homologna rekombinacija (Johnston i sur. 2014). Preuzeto i modificirano iz Johnston i sur. 2014.

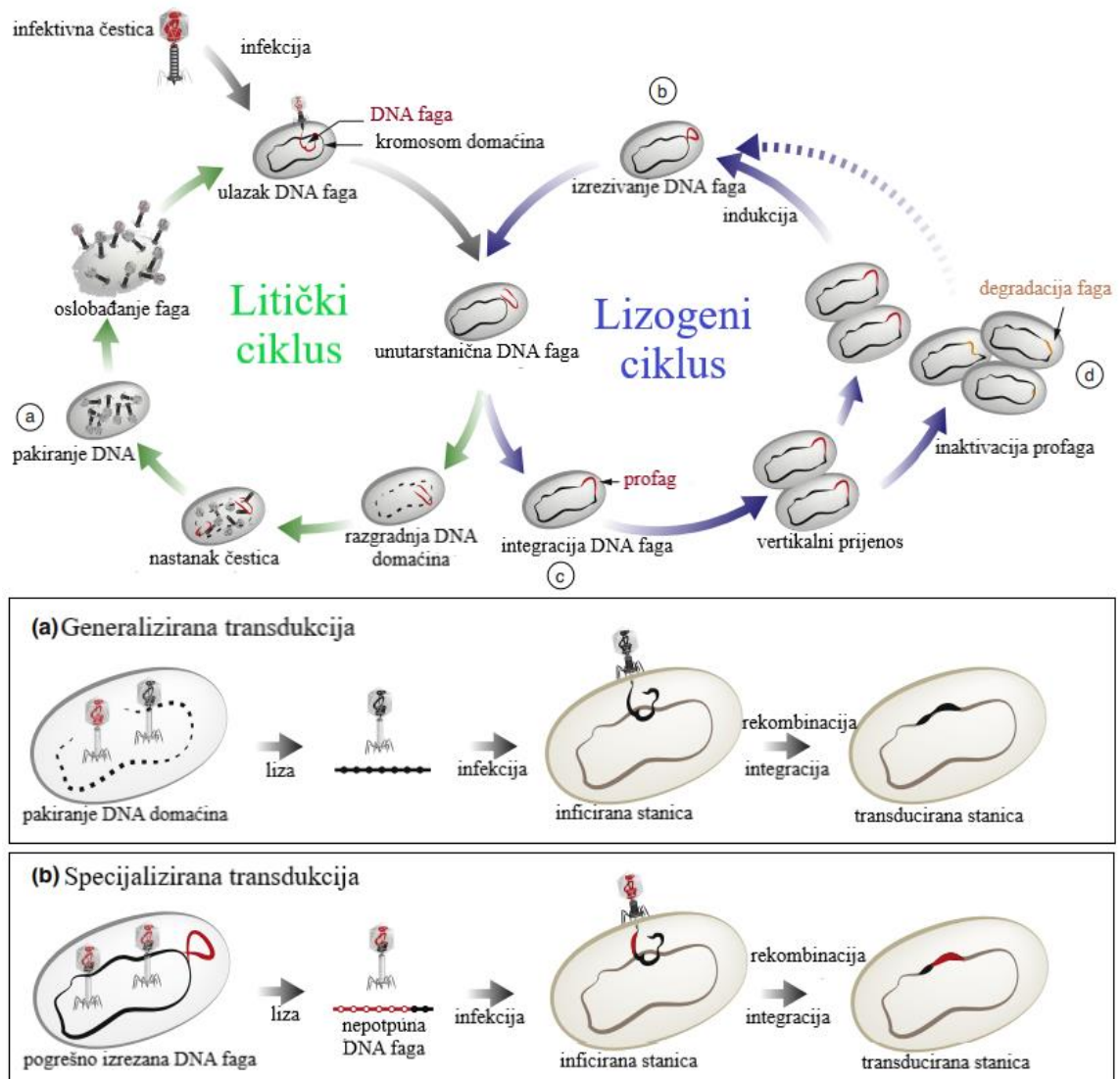
### 2.3. TRANSDUKCIJA

Transdukcija ili fagom posredovan horizontalni prijenos gena je proces u kojem se genom prenosi iz jedne bakterije u drugu preko bakteriofaga kao vektora. Proces je prvi puta primijećen u vrsti *Salmonella enterica* kad su Zinder i Lederberg opazili da se genetska svojstva mogu prenositi između dva soja bakterija čak i kada se između njih nalazi filter nepropusan za bakterije (Blakely 2014). U ovom slučaju vektor je bio bakteriofag P22, a odgovoran je za tzv. generaliziranu transdukciju, u kojoj je moguća razmjena gotovo bilo koje genetske osobine (Arber 2014; Blakely 2014). Za razliku od P22, neki fagovi mogu prenositi samo ograničenu količinu specifičnih genskih markera te se taj proces naziva specijaliziranom transdukcijom (Arber 2014; Blakely 2014), a događa se tako što fag u svoj genom inkorporira dio genoma domaćina, nakon čega greškom izreže te gene te ih prenese u drugog domaćina (Touchon, Moura de Sousa i Rocha 2017).

Generalizirana transdukcija (**Slika 4**) najbolje je istražena kod faga P1 koji napada *E. coli*, a moguća je zbog mehanizma sastavljanja fagova. Naime, tijekom životnog ciklusa faga P1, genom faga kopira se mehanizmom “kotrljajućeg kruga” (engl. *Rolling circle mechanism*) zbog kojeg nastaju DNA konkatemi, koji služe kao izvor DNA za nastajuće fagove (Blakely 2014). To se postiže cijepanjem posebne sekvence DNA faga (engl. *pac site*, *pac* mjesto) pomoću proteina koji kodira fag te umetanjem kraja DNA u glavu faga. Budući da u genomu bakterije postoje mjesta slična *pac* mjestima, ona ponekad budu krivo prepoznata od strane proteina za cijepanje DNA te genom domaćina bude umetnut u glavu faga. Fagovi koji sadrže DNA domaćina nazivaju se transdukcijским česticama (Blakely 2014). Takve čestice mogu se prihvatiti za novog domaćina te prenijeti genom prijašnjeg u novog domaćina, rezultirajući horizontalnim prijenosom gena. Takva strana DNA bit će ili razgrađena endonukleazama, ili ugrađena u genom domaćina homolognom rekombinacijom (Blakely 2014).

Za razliku od generalizirane transdukcije, specijalizirana transdukcija (**Slika 4**) zaslužna je za prijenos točno definiranih regija kromosomalne DNA. Ovaj proces najbolje je proučen na fagu  $\lambda$  koji inficira *E. coli*, a koji može proći kroz litički ili lizogeni životni ciklus (Blakely 2014). Tijekom lizogene faze, genom faga ugradi se u genom *E. coli* rekombinacijom između *attP* sekvence na fagu i *attB* sekvence na kromosomu, nakon čega se može replicirati zajedno s

kromosomom domaćina (Blakely 2014). Taj proces naziva se lizogenom konverzijom te može rezultirati ekspresijom gena profaga, što mijenja fenotip domaćina (Touchon, Moura de Sousa i Rocha 2017). Indukcijom litičke faze, DNA faga rekombinacijom se izrezuje iz kromosoma i stvara nove infektivne čestice. Budući da kod rekombinacije može doći do greške, ponekad se uz genom faga izreže i dio genoma domaćina, stvarajući hibridnu molekulu koja se pakira u glavu faga, koji potom može napadati druge bakterije i na taj način prenositi strani genetski materijal (Blakely 2014).



**Slika 4. Shema transdukcije.** Infekcija umjerenim fagom može dovesti do litičkog (zeleno) ili lizogenog (plavo) ciklusa. (a) Generalizirana transdukcija: prijenos cijelog genoma domaćina. (b) Specijalizirana transdukcija: prijenos specifičnog dijela genoma domaćina.

Preuzeto i modificirano iz Touchon, Moura de Sousa i Rocha 2017

## 2.4. PREPREKE MEHANIZMIMA HORIZONTALNOG PRIJENOSA GENA

Strana DNA u stanici domaćinu ne mora uvijek preživjeti i tako ostaviti stanicu domaćina s novim svojstvima. Naime, kako bi strana DNA preživjela, ona se mora homolognom rekombinacijom ugraditi u DNA domaćina. Za takvo što potrebna je dovoljna homologija sa kromosomom domaćina, koja obično iznosi 50-100 pb (Blakely 2014; Thomas i Nielsen 2005). Čim je veća homologija, tim je veća šansa homologne rekombinacije, a strana DNA s nedovoljnom homologijom neće se uspjeti zadržati u stanici (Blakely 2014). Međutim, iako srodniji organizmi imaju veću vjerojatnost uspješne razmjene gena, to nije uvijek slučaj. Primjerice, poznato je da bakterije i arheje često međusobno sudjeluju u horizontalnom prijenosu gena (Boto 2010).

Za horizontalni prijenos gena koji nemaju ortologa u bakterijskom kromosomu vrlo je bitna sposobnost plazmida za replikaciju kako bi se izbjegla potreba za ugradnjom u bakterijski kromosom (Thomas i Nielsen 2005). Primijećeno je da plazmidi sa većim rasponom domaćina imaju uspješnije mehanizme replikacije, a jako važnom pokazala se sposobnost replikacije zaostajućeg lanca, kao i helikaza domaćina koja stupa u kontakt sa Rep proteinom takvih plazmida (Thomas i Nielsen 2005). Primjerice, dobro istraženi plazmidi širokog raspona domaćina, IncP i IncQ, kodiraju za samo tri replikacijska proteina, od kojih niti jedan nije zadužen za replikaciju zaostajućeg lanca (Thomas i Nielsen 2005). Replikacija ovih plazmida zahtijeva upotrebu DNA-polimeraze III, SsbB proteina te proteina sličnih histonima, od kojih svi imaju nisku specifičnost na DNA (Thomas i Nielsen 2005). Međutim, odsutnost gena za sintezu zaostajućeg lanca dovodi do nakupljanja međuprodukata replikacije ssDNA, postavljajući tako ograničenje na količinu DNA koju plazmidi mogu steći i horizontalno prenijeti (Thomas i Nielsen 2005).

Nadalje, bakterije su razvile restriksijsko modifikacijski sustav koji omogućava prepoznavanje strane DNA te njeno cijepanje restriksijskim endonukleazama (Arber 2014; Thomas i Nielsen 2005). Ovaj mehanizam dobra je zaštita protiv bakteriofaga, čija DNA može izbjeći restriksijsko modifikacijski sustav s vrlo malom vjerojatnošću (Arber 2014). Kako restriksijske endonukleaze ne bi razgradile bakterijski kromosom, dolazi do metilacije, odnosno dodavanja metilne skupine na adenin i citozin u sekvenci za prepoznavanje. Situacija je drugačija kod malih plazmida i pojedinačnih gena jer za njih postoji značajna vjerojatnost da ne sadrže neke od rjeđih restriksijskih sekvenci, izbjegavajući na taj način učinak enzimskog cijepanja (Thomas i Nielsen 2005). Unatoč tome, sa sigurnošću je utvrđeno da je učestalost transkonjuganata manja



ako domaćin ima dobro razvijen restriksijsko-modifikacijski sustav (Thomas i Nielsen 2005). Također je utvrđeno da i mnogi plazmidi sadrže gene koji kodiraju za restriksijsko-modifikacijski sustav, predstavljajući na taj način opasnost za DNA domaćina ako ona nije metilirana (Thomas i Nielsen 2005).

Osim toga, poznate su i brojne druge prepreke, specifične za mehanizam prijenosa gena. Primjerice, transformacija je uvjetovana okolišnim uvjetima jer oni kontroliraju stabilnost DNA, a samim time i vjerojatnost da će doći do transformacije (Thomas i Nielsen 2005). Za transdukciju je bitan raspon domaćina bakteriofaga (Arber 2014), kao i efikasnost bakterijskog mehanizma obrane (Touchon, Moura de Sousa i Rocha 2017), dok je za konjugaciju bitna kompatibilnost površina bakterija kako bi došlo do uspješne formacije konjugacijskog para (Arber 2014).

### 3. ZNAČAJ

#### 3.1. EVOLUCIJSKI ZNAČAJ

Gen dobiven horizontalnim prijenosom gena mora zadovoljiti određene uvjete kako bi dulje vremena preživio u domaćinu. Dugo se smatralo da zadobiven gen mora predstavljati selektivnu prednost ili prema sebi ili domaćinu, pa su se istraživanja bazirala na takvim genima. Međutim, novijim istraživanjima otkriveno je da geni koji su preneseni između srodnih organizama često imaju (gotovo) neutralan učinak na domaćina (Soucy, Huang i Gogarten 2015). Iako geni s neutralnim učinkom sami po sebi ne predstavljaju selektivnu prednost, stjecanje neutralnih gena može pružiti nove kombinacije genetskog materijala na koje selekcija može djelovati. Ipak, najznačajniji geni stečeni horizontalno jesu oni koji predstavljaju evolucijsku prednost, odnosno adaptaciju na ekološke uvjete (Soucy, Huang i Gogarten 2015). Takvi geni obično su smješteni na tzv. "sebičnim" genskim elementima, kao što su plazmidi i integrativni konjugativni elementi (ICE), na kojima se nalaze geni za rezistenciju na antibiotike. Na složenim sebičnim genskim elementima također se nalaze i geni za rezistenciju na toksine, razni metabolički geni i faktori virulencije. Svojstva pohranjena u ovim genskim elementima mogu služiti kao rezervoar gena u nepovoljnim uvjetima (Soucy, Huang i Gogarten 2015).

Horizontalni prijenos gena posrednik je i aditivnog prijenosa gena, odnosno ugradnje novog genskog materijala u genom (Soucy, Huang i Gogarten 2015; Thomas i Nielsen 2005). Integracija u genom odvija se procesom nehomologne ili homologne rekombinacije. Aditivni transfer gena između srodnih gena koji imaju ortolog u genomu domaćina obično rezultira dvama istim kopijama gena u genomu domaćina, što je slično duplikaciji gena (Soucy, Huang i Gogarten 2015). Tako je više od 1000 gena prepoznato kao geni koji su potekli iz bakterija kod Haloarchaea, uključujući gene za asimilaciju ugljika, komplekse respiratornog lanca, membranskih transportera i kofaktora u biosintezama. Ovi geni omogućili su precima Haloarchaea prilagodbu na aerobni način života (Soucy, Huang i Gogarten 2015).

Horizontalni prijenos gena ima utjecaj i na evoluciju holobionta, odnosno domaćina i njemu pridruženu mikrobiotu. Dobar primjer ove tvrdnje jesu bakterije u crijevima Japanaca, koje mogu razgraditi polisaharide iz morskih trava prisutnih u prehrani Japanaca, omogućavajući im iskorištavanje ugljikohidrata iz algi kao izvor nutrijenata (Hehemann i sur. 2010). Gene za

razgradnju polisaharida iz algi bakterije su dobile upravo horizontalnim prijenosom ovih gena iz parazita morskih algi. Ipak, ovo se ne bi trebalo protumačiti kao selekciju koja djeluje na holobiont, već kao evoluciju crijevnih bakterija radi popunjavanja ekološke niše (Soucy, Huang i Gogarten 2015).

Osim što horizontalni prijenos gena ima značajan doprinos u evoluciji prokariota, poznato je da su geni preneseni iz prokariota u mikroeukariote također značajno utjecali na prilagodbu mikroeukariota uvjetima ekološke niše. Prvi primjer je kod dugoživaca (Tardigrada), mikroskopskih eukariotskih organizama, također zvanih vodenim medvjedima. Naime, 2015. godine provedena je analiza genoma ove životinje, koja je dovela do spoznaje da oko 17.5% sveukupnog genoma dugoživaca predstavlja gene dobivene od bakterija, biljaka, gljiva i arheja (Emamalipour i sur. 2020). Dugoživci su poznati po svojoj sposobnosti preživljavanja ekstremnih uvjeta, a stjecanje stranih gena im je zasigurno olakšalo prilagodbu na brojne, čak i ekstremne životne uvjete (Emamalipour i sur. 2020). Još jedan zanimljiv primjer je anaerobni eukariotski mikroorganizam *Monocercomonoides* sp., analizom čijeg genoma je otkriveno da ne sadrži mitohondrije (Emamalipour i sur. 2020). Daljnjom analizom otkriveno je da *Monocercomonoides* sp. sadrži Fe-S klastere, stečene horizontalnim prijenosom mitohondrijskog željezo-sumpor klaster sustava od drugih bakterija (Emamalipour i sur. 2020). Dobar primjer adaptacije na uvjete mikrookoliša predstavljaju i Bdelloidea, mikroskopski eukarioti sposobni za aseksualnu reprodukciju, značajku dobivenu horizontalnim prijenosom gena (Emamalipour i sur. 2020; Boto 2010). Ovi mikroorganizmi također su sposobni za preživljavanje u ekstremnim ekološkim uvjetima, kao što su ekstremne suše koje uzrokuju razgradnju dsDNA, omogućujući ubacivanje prokariotskih gena u genom po ponovnom izlaganju vodi (Emamalipour i sur. 2020).

### 3.2. PROTEORODOPSIN

Proteini kovalentno vezani za retinal koji apsorbiraju svjetlost nalaze se u sve tri domene živog svijeta (De la Torre i sur. 2003). Kod viših Metazoa, rodopsini se nalaze u fotoreceptorskim stanicama mrežnice i služe za detekciju i prepoznavanje fotona različitih valnih duljina (De la Torre i sur. 2003). Za bakterijske rodopsine mislilo se da se nalaze isključivo u halofilnim arhejama (De la Torre i sur. 2003). Jedan takav protein je bakteriorodopsin - membranski protein koji koristi retinal kao kromofor za pokretanje svjetlošću regulirane protonske pumpe, a otkriven je u halofilnoj arheji *Halobacterium salinarum* (Béja i sur. 2001). Pri apsorpciji svjetla, bakteriorodopsin prolazi kroz niz konformacijskih promjena koje su odgovorne za transport protona preko membrane, rezultirajući u elektrokemijskom membranskom potencijalu koji je odgovoran za sintezu ATP-a pomoću H<sup>+</sup>ATP-aze (Béja i sur. 2001). Iako se prije smatralo da ovakav sustav postoji samo kod arheja, sličan sustav pumpanja protona posredovan rodopsinom otkriven je kod nekultiviranih morskih bakterija iz "SAR86" filogenetske grupe (Béja i sur. 2001; Frigaard i sur. 2006). Béja i sur. (2001) testirali su formiraju li molekule nalik rodopsinu fotoaktivne proteine, analizirajući uzorke bakterijskog planktona iz površinskog sloja vode u zaljevu Monterey Bay. Otkrili su da fotokemijske reakcije u membranama bakterioplanktona proizvode intermedijer s crvenim pomakom spektralno sličan rekombinantno eksprimiranom proteorodopsinu u *E. coli*, čime su dokazali postojanje transportera sličnih proteorodopsinu u površinskim vodama. Također su dokazali visoku koncentraciju proteorodopsina u membranama SAR86 filogenetske skupine, ukazujući na značajnu ulogu proteorodopsina u fiziologiji ovog bakterioplanktona. Iako bakterije koje posjeduju proteorodopsin ne provode fotosintezu u užem smislu, korištenje proteorodopsina za svjetlom vođenog kemiosmotskog potencijala daje im značajnu konkurencijsku prednost (Frigaard i sur. 2006). Otkriće visoke sličnosti mehanizama kontrole valne duljine u bakterijskom i arhealnom rodopsinu (Béja i sur. 2001) upućuje na mogućnost horizontalnog prijenosa gena između bakterija i arheja koje posjeduju rodopsin. O raširenosti proteorodopsina u oceanima govori i činjenica da je proteorodopsin otkriven na Antarktiku dobiven od bakterije visoko srodne SAR86 skupini u Monterey Bayu koja sadrži proteorodopsin (Béja i sur. 2001). Zasad su proteorodopsini otkriveni samo kod morskih proteobakterija kao što je *Pelagibacter ubique* (Frigaard i sur. 2006).

Mikrobni sustavi bazirani na rodopsinu relativno su jednostavni te ih kodira mali broj gena, imaju sposobnost funkcije u membranama raznovrsnih mikrobnih skupina te snažan doprinos

staničnom metabolizmu, što upućuje na visoku stopu genske mobilnosti (Frigaard i sur. 2006). Budući da se ovi geni lako prenose horizontalno te predstavljaju adaptivnu prednost, našli su se u genomima svih triju životnih domena, što ih čini kozmopolitskim genima (Frigaard i sur. 2006).

### 3.3. REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE

Rezistencija na antibiotike problem je s kojim se suočava cijela populacija, a radi se o prisutnosti genetski uvjetovanog mehanizma rezistencije koji patogenu omogućuje preživljavanje tretmana antibioticima (MacGowan i Macnaughton 2017). Antibiotička rezistencija može biti naslijeđena ili stečena. U kontekstu stečene rezistencije, bitan je horizontalan prijenos gena kojima se ona širi preko plasmida i transpozona. Postoje četiri glavna mehanizma preko kojih bakterije preživljavaju tretiranje antibioticima, a to su izmjena ciljane supstance lijeka, inaktivacija enzima, pojačano izbacivanje lijeka iz stanice te smanjena permeabilnost na lijek (MacGowan i Macnaughton 2017).

Beta laktami i karbapenemi su antibiotici širokog spektra, čije djelovanje je značajno smanjeno zbog porasta bakterija s razvijenim mehanizama rezistencije na ove antibiotike. Hidrolizom  $\beta$ -laktamskog prstena  $\beta$ -laktamazama, enzimima koje posjeduju bakterije iz porodice Enterobacteriaceae, stvara se rezistencija na penicilin i cefalosporine, posebice kod *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* (MacGowan i Macnaughton 2017). U EU se rezistencija ove dvije vrste na cefalosporine povećala za više od 50% u razdoblju od 2012. do 2015. (MacGowan i Macnaughton 2017). Broj mikroorganizama koji posjeduju karbapenemaze također se povećava, a trenutno su Enterobacteriaceae s ovim enzimima prisutni globalno, uključujući u dijelovima južne Europe, ali i zemalja u razvoju (MacGowan i Macnaughton 2017). Još veći problem predstavlja činjenica da karbapenemaze često dolaze u paru s drugim mehanizmima rezistencije, na taj način znatno otežavajući liječenje (MacGowan i Macnaughton 2017).

U novije vrijeme sve češći su multirezistentni organizmi za koje ne postoji efikasan način liječenja (MacGowan i Macnaughton 2017). Najveći problem predstavljaju tzv. ESKAPE patogeni: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp., koji su posebno važni zbog nozokomijalnih infekcija (MacGowan i Macnaughton 2017). Možda najpoznatiji od ovih patogena

jest *S. aureus* rezistentan na meticilin (MRSA). Ova bakterija ustvari predstavlja jednu od rijetkih pozitivnih priča o kontroli multirezistentnih patogena zbog značajnog smanjenja zaraze MRSA-om u Ujedinjenom Kraljevstvu od 2000. do 2012. godine (MacGowan i Macnaughton 2017). Međutim, u nekim europskim državama MRSA i dalje ima značajan utjecaj na bolničke infekcije, povećavajući uporabu vankomicina, što rezultira u pojavljivanju *S. aureus* rezistentnog na vankomicin (VRSA) (MacGowan i Macnaughton 2017). Ovakve sojeve posebno je teško kontrolirati.

Pretpostavlja se da u Europi godišnje 25000 ljudi umre zbog infekcija uzrokovanih ESKAPE patogenima (MacGowan i Macnaughton 2017). Budući da i dalje ne postoje idealne alternative antibioticima, a broj rezistentnih sojeva raste, u uporabu se vraćaju stariji antibiotici koji su se prestali koristiti zbog štetnih utjecaja na zdravlje. Kako bi se problem multirezistentnih bakterija doveo pod kontrolu, potrebno je povećati svijest javnosti prema ovom problemu te smanjiti korištenje antibiotika. Potrebno je i smanjiti širenje rezistentnih sojeva u zdravstvu pravilnom higijenom, izolacijom i redovitim testiranjem na bolesti (MacGowan i Macnaughton 2017).

#### 4. ZAKLJUČAK

Iako se Darwinovo stablo života čini kao logičan prikaz evolucije, analizom bakterijskih genoma pokazalo se da je ono loš prikaz evolucije prokariota. Horizontalni prijenos gena predstavlja jednu od vodećih sila prokariotske evolucije, omogućavajući im dijeljenje adaptivnih svojstava neovisno o srodstvenim odnosima, što rezultira širokom rasprostranjenosti gena koji kodiraju za svojstva povoljna svojim nosiocima. Jedno od takvih svojstava predstavlja proteorodopsin, koji je široko rasprostranjen u oceanskim bakterijama, a pruža im mogućnost iskorištavanja svjetlosne energije za stvaranje ATP-a. Horizontalni prijenos gena djeluje poput dvosjeklog mača: s jedne strane izvor je raznolikosti u prirodi, a s druge strane djeluje nepovoljno na preživljavanje ljudi zbog učinaka kao što je rezistencija na antibiotike, koja je danas globalno raširena. U svrhu rješavanja ovog problema potrebno je dublje razumijevanje mehanizama koji stoje iza horizontalnog prijenosa gena: konjugacije, transformacije i transdukcije, s naglaskom na konjugaciju koja je prvenstveno odgovorna za prijenos gena za rezistenciju na antibiotike. Naime, umjesto fokusa na razvoj novih antibiotika, pažnju bi trebalo posvetiti na horizontalni prijenos gena kao glavnu metu, primjerice upotrebom CRISPR-Cas9 sustava. Disrupcijom mehanizama prijenosa gena mogla bi se smanjiti raširenost rezistencije, što će zauzvrat smanjiti i potrebu razvijanja novih antibiotika. Osim toga, razumijevanje horizontalnog prijenosa gena doprinijelo bi i genetičkom inženjerstvu, u kojem se već i danas široko primjenjuju bakterijski mehanizmi prijenosa gena.

## LITERATURA

1. Arber W. Horizontal gene transfer among bacteria and its role in biological evolution. *Life*. 2014;4(2):217-224. doi:10.3390/life4020217
2. Béja O, Spudich EN, Spudich JL, Leclerc M, DeLong EF. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*. 2001;411(6839):786-789. doi:10.1038/35081051
3. Blakely GW. *Mechanisms of Horizontal Gene Transfer and DNA Recombination*. Elsevier Ltd; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00015-9
4. Boto L. Horizontal gene transfer in evolution: Facts and challenges. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2010;277(1683):819-827. doi:10.1098/rspb.2009.1679
5. Cabezón E, Ripoll-Rozada J, Peña A, de la Cruz F, Arechaga I. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(1):81-95. doi:10.1111/1574-6976.12085
6. Emamalipour M, Seidi K, Zununi Vahed S, et al. Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(May). doi:10.3389/fcell.2020.00229
7. Frigaard NU, Martinez A, Mincer TJ, DeLong EF. Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic Bacteria and Archaea. *Nature*. 2006;439(7078):847-850. doi:10.1038/nature04435
8. Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*. 2010 Apr 8;464(7290):908-12. doi: 10.1038/nature08937. PMID: 20376150.
9. Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(3):181-196. doi:10.1038/nrmicro3199
10. De la Torre JR, Christianson LM, Béjà O, et al. Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12830-12835. doi:10.1073/pnas.2133554100
11. Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M, De la Cruz F. Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol*. 2002;45(1):1-8. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x



12. MacGowan A, Macnaughton E. Antibiotic resistance. *Med (United Kingdom)*. 2017;45(10):622-628. doi:10.1016/j.mpmed.2017.07.006
13. Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nat Rev Genet*. 2015;16(8):472-482. doi:10.1038/nrg3962
14. Sun D. Pull in and push out: Mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Front Microbiol*. 2018;9(SEP):1-8. doi:10.3389/fmicb.2018.02154
15. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(9):711-721. doi:10.1038/nrmicro1234
16. Touchon M, Moura de Sousa JA, Rocha EP. Embracing the enemy: The diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. *Curr Opin Microbiol*. 2017;38:66-73. doi:10.1016/j.mib.2017.04.010

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 7.6.2000. godine u Varaždinu. Završila sam Osnovnu školu "Gustav Krklec" u Maruševcu 2015. godine. 2019. godine maturirala sam u varaždinskoj Prvoj gimnaziji te iste godine upisala Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tokom studija odradila sam laboratorijsku stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za kemijsku biologiju Zavoda za molekularnu biologiju pod vodstvom dr.sc. Snježane Mihaljević. Kroz 4 tjedna sudjelovala sam i u bihevioralnom dijelu projekta BOLDeR (Dopaminska regulacija kompetitivnog ponašanja guštera *Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis*) pod vodstvom doc. dr. sc. Sofie Blažević. 8 mjeseci provela sam u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta provodeći pokuse u sklopu projekta "Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša" (InteractOomyc) voditeljice izv. prof. dr. sc. Ane Bielen.