

Mycobacterium — ważny obiekt współczesnych badań genetycznych

Ewa Golańska^{1,2}

Andrzej Sasiak²

Adam Jaworski^{2,3}

Aleksander Chmiel¹

¹Samodzielna Pracownia Biosyntezy Środków Leczniczych
Akademia Medyczna
Łódź

²Zakład Genetyki Drobnoustrojów
Uniwersytet Łódzki
Łódź

³Centrum Mikrobiologii i Wirusologii
Polska Akademia Nauk
Łódź

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się szybki rozwój badań molekularnych drobnoustrojów z rodzaju *Mycobacterium*. Intensyfikacja badań tej grupy bakterii jest związana ze wzrastającą liczbą zachorowań na gruźlicę, wywoływanych nie tylko przez *M. tuberculosis*, ale także przez gatunki uważane niegdyś za niepatogenne dla ludzi, głównie z grupy *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (MAIS complex). Poważny problem stanowią schorzenia spowodowane przez *M. avium* u nosicieli wirusa HIV (1-3); trudności nastęrcza także leczenie chorych zakażonych szczepami opornymi na stosowane powszechnie antybiotyki przeciwgruźlicze (1,2,4). Zagrożenie gruźlicą, pomimo szczepień ochronnych i stosowania antybiotyków, dotyczy nie tylko społeczeństw ubogich, lecz także wysoko rozwiniętych krajów Europy i Stanów Zjednoczonych. Z tych względów na całym świecie prowadzone są badania mające na celu lepsze poznanie czynników chorobotwórczości i mechanizmów lekooporności *Mycobacterium* (3,5,6), skrócenie czasu diagnostyki poprzez wprowadzenie szybkich i czułych metod biologii molekularnej (7-9) oraz ulepszanie leków stosowanych w zwalczaniu zakażeń prątkami (10,11). Próbuje się także wykorzystać adiuwantowe właściwości *M. bovis* BCG i konstruować zrekombinowane poliwalentne szczepionki, w których podlegają ekspresji geny kodujące

antygeny innych drobnoustrojów chorobotwórczych (12-14). Rozważa się również zastosowanie jako żywej szczepionki *M. vaccae* oraz *Mycobacterium w* — szczepu spokrewnionego z *M. fortuitum*, *M. smegmatis* i innymi gatunkami prątków szybko-rosnących (15).

Badania genetyczne prątków kwasoopornych były znacznie opóźnione w porównaniu z badaniami innych grup bakterii. Należy wymienić kilka istotnych przyczyn tego opóźnienia: niemożność uzyskania wzrostu bakterii na sztucznych podłożach (*M. leprae*) (4,16,17), długi czas trwania hodowli i wysokie wymagania odżywcze (inne wolno-rosnące patogeny) (4,18,19), skłonność komórek do agregacji i grudkowaty charakter wzrostu utrudniający preparatykę (4,16), a także złożona struktura ściany komórkowej, bogata w związki lipidowe, stanowiąca barierę dla wprowadzania obcego DNA do komórek prątków (20,21) oraz brak skutecznych markerów selekcyjnych i wektorów zdolnych do replikacji w szczepach *Mycobacterium*. W związku z tym badania genetyczne *Mycobacterium* zostały zapoczątkowane dopiero w latach siedemdziesiątych, a ich intensywny rozwój obejmuje zaledwie ostatnie 10 lat.

2. Początki badań *Mycobacterium* na poziomie molekularnym

Pierwsze badania prątków na poziomie genetycznym dotyczyły określania zawartości guaniny i cytozyny w DNA (G+C%) oraz wielkości genomu tych bakterii. Rodzaj *Mycobacterium* charakteryzuje się wysoką zawartością procentową zasad G+C, która dla większości gatunków wynosi 64-70%. Rozmiar genomu prątków jest stosunkowo duży w porównaniu z innymi *Procarvota* i wynosi $2,8-4,5 \times 10^9$ Da dla szybko-rosnących i $2,-4,2 \times 10^9$ Da dla wolno-rosnących gatunków *Mycobacterium* (wg 22).

Inne wczesne badania, prowadzone w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych, polegały na wykorzystaniu techniki hybrydyzacji pomiędzy DNA genomowymi wolno- i szybko-rosnących szczepów *Mycobacterium* w celu ustalania filogenetycznego pokrewieństwa między poszczególnymi gatunkami (wg 22). Jeszcze innym kierunkiem badań genetycznych *Mycobacterium* była identyfikacja genów kodujących antygeny *M. tuberculosis* i *M. leprae*. Początkowo wykorzystywano jako gospodarza do klonowania tych genów szczepu *E. coli* (23). W ten sposób sklonowano geny kodujące wiele ważnych białek szoku cieplnego, składników osłon komórkowych i zarazem antygenów *M. tuberculosis*, *M. leprae* i *M. bovis* BCG. Zagadnienia te zostały szerzej omówione przez Dziadka i wsp. (24).

Nie wszystkie geny *Mycobacterium* mogą podlegać ekspresji w komórkach *E. coli*, nawet jeśli zostały sklonowane wraz z odpowiednimi promotorami. Synteza niektórych antygenów (np. polisacharydowych czy lipidowych) może wymagać szlaków metabolicznych specyficznych wyłącznie dla prątków kwasoopornych (25). Z tego powodu poszukiwano alternatywnych gospodarzy do klonowania i ekspresji genów *Mycobacterium*.

Stosunkowo dogodnym gospodarzem okazał się promieniowiec *Streptomyces lividans*, gatunek spokrewniony z prątkami kwasoopornymi, o podobnie

wysokiej zawartości w chromosomie zasad G+C (26). Najlepszymi jednak gospodarzami do ekspresji genów *Mycobacterium* i badania roli biologicznej ich białkowych produktów są niechorobotwórcze szczepy *M. bovis* BCG i *M. smegmatis*, lecz wykorzystanie tych bakterii jako biorców DNA przez długi czas było niemożliwe z powodu braku odpowiednich wektorów i sposobów ich wprowadzania do komórek *Mycobacterium*.

3. Wektory stosowane w badaniach *Mycobacterium*

3.1. Wektory — pochodne DNA mykobakteriofagów

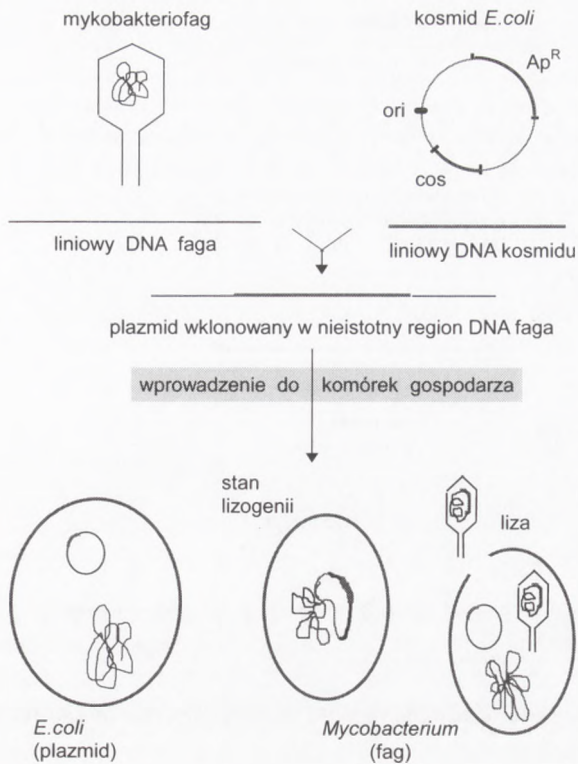
W pierwszych próbach wprowadzania DNA do komórek *Mycobacterium* wykorzystywano DNA mykobakteriofagów. Zastosowanie fagów litycznych, takich jak D29, umożliwiało szybkie sprawdzanie skuteczności transfekcji poprzez obserwację lysinek, pojawiających się w czasie 12-48 godzin (20). Możliwe było także ilościowe określanie wydajności transfekcji — liczby pfu (*plaque forming units*) w przeliczeniu na 1 µg wprowadzonego DNA fagowego (27).

Pierwszymi wektorami przeznaczonymi do badań genetycznych *Mycobacterium* były fazmidy — wektory, w których w nieistotny dla funkcji biologicznej region genomu faga wklonowano replikon *E. coli*. Fazmidy są zdolne do autonomicznej replikacji w komórkach *E. coli*, natomiast po wprowadzeniu do komórek *Mycobacterium* powodują lizę lub podlegają integracji do chromosomu, zależnie od rodzaju faga, którego DNA użyto do konstrukcji wektora (rys. 1).

Jacobs i wsp. w roku 1987 skonstruowali wektory fazmidowe (w tym najlepiej scharakteryzowany phAE1) do badań *Mycobacterium*, klonując w DNA faga TM4 kosmid *E. coli* pH79. Wektory te były pierwszym obcym zrekombinowanym DNA, który wprowadzono do komórek *M. smegmatis* i *M. bovis* BCG (27). W tym samym roku Snapper i wsp. opracowali inny fazmid (phAE15), wbudowując DNA kosmidu pH79 w nieistotny region łagodnego mykobakteriofaga L1 (28).

Wektory fazmidowe skonstruowane na podstawie fagów łagodnych posłużyły do wykazania, że gen oporności na kanamycynę (*aph*), kodujący fosfotransferazę aminoglikozydową, może być stosowany jako marker selekcyjny dla szczepów *Mycobacterium*. Fazmid phAE19 (pochodna phAE15) zawierał wklonowany gen oporności na kanamycynę z transpozonu Tn903. Obecność w wektorze genu *aph* umożliwiała selekcję opornych na kanamycynę klonów *M. smegmatis* i *M. bovis* BCG po wprowadzeniu do ich komórek DNA fazmidu (6).

Najlepiej scharakteryzowany ze wszystkich mykobakteriofagów został fag L5, wykryty w szczepach *M. smegmatis*. Jest to fag łagodny, który ma zdolność integracji z chromosomem gospodarza podobnie jak inne tego typu fagi — na drodze rekombinacji miejscowo-specyficznej pomiędzy miejscem *attP* DNA faga i *attB* chromosomu gospodarza. W procesie tym uczestniczy integraza — enzym kodowany przez gen obecny w DNA faga (20). Dokładne poznanie tego mykobakteriofaga pozwoliło na konstrukcję wektorów integra-



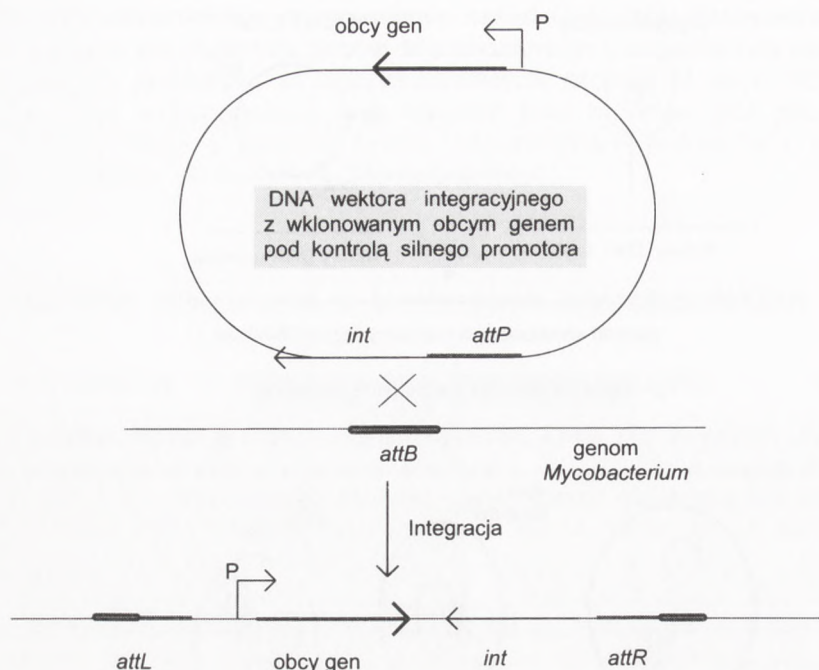
Rys. 1. Schemat konstrukcji i wykorzystania fazmidu (wg 25, zmodyfikowany).

cyjnych, które zawierają gen *aph* jako marker selekcyjny oraz fragment DNA faga L5 z sekwencją *attP* i genem integrazy (17,30). Po transformacji szczepów *M. smegmatis* i *M. bovis* BCG tego typu wektorami pojedyncze kopie wektorów integrują się w obrębie sekwencji *attB* genomu biorcy (rys. 2) (4).

Konstrukcja wektorów fazmidowych stworzyła możliwości ekspresji obcych genów i markerów selekcyjnych w szczepach *Mycobacterium*. Duże nadzieje wiązano z zastosowaniem tych wektorów w identyfikacji determinant genetycznych lekooporności *Mycobacterium*, a także z wprowadzaniem genów kodujących antygeny protekcyjne *M. tuberculosis* i *M. leprae* do szczepów *M. bovis* BCG (28). Najszybszy rozwój badań genetycznych *Mycobacterium* nastąpił jednak dopiero po szerokim zastosowaniu bardziej dogodnych wektorów plazmidowych, które w komórkach gospodarza mogą istnieć w wielu kopiach.

3.2. Plazmidowe wektory autonomiczne

Pierwsze naturalne autonomiczne plazmidy *Mycobacterium* zostały opisane w 1979 r. przez Crawforda i Batesa (30), którzy stwierdzili obecność



Rys. 2. Integracja wektora fazmidowego do genomu *Mycobacterium* na drodze rekombinacji miejscowo-specyficznego (4).

plazmidu u niektórych szczepów *M. avium-intracellulare*. W późniejszych latach DNA plazmidowy wyizolowano także ze szczepów *M. fortuitum* (31,32) i *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* complex (33-35).

Pierwsze plazmidy bifunkcyjne (tj. zdolne do replikacji zarówno w komórkach *E. coli* jak i *Mycobacterium*) zostały skonstruowane przez Snappera i wsp. w 1988 r. poprzez połączenie plazmidu *E. coli* pJ666 i mykobakteryjnego replikonu pAL5000. Uzyskane w ten sposób plazmidy, posiadające 2 odmienne miejsca inicjacji replikacji, wprowadzono metodą elektroporacji do szybko rosnącego szczepu *M. smegmatis* oraz wolnorosnącego *M. bovis* BCG (28).

Ogromną zaletą plazmidów bifunkcyjnych jest możliwość wykonywania wielu procedur genetycznych (izolacji DNA plazmidowego, klonowania, konstrukcji nowych wektorów) w łatwym do hodowli i preparatyki DNA gospodarzu, jakim jest *E. coli*. Począwszy od roku 1988 powstało wiele tego typu wektorów, w większości opartych na mykobakteryjnym plazmidzie pAL5000 (tab. 1). pAL5000 został dobrze poznany i scharakteryzowany: określono jego sekwencję nukleotydową (52), zidentyfikowano miejsce inicjacji replikacji (53), badano także oddziaływanie białek z sekwencją *ori* plazmidu (54). Jest to replikon *Mycobacterium* obecnie najczęściej wykorzystywany do konstrukcji wektorów przeznaczonych do badań tej grupy bakterii (54).

Oprócz replikonu pAL5000 do konstrukcji wektorów bifunkcyjnych wykorzystywano także plazmid *M. scrofulaceum* pMSC262 (38,39,55), pLR7 z *M. avium* (50), pNG2 z *Corynebacterium* (43) oraz sekwencję *ori* mykobakteriofaga D29 (44).

TABELA 1
WYBRANE WEKTORY PLAZMIDOWE WPROWADZANE DO SZCZEPÓW *Mycobacterium*

Wektor	Typ wektora	Replikon lub system integracji	Marker selekcyjny	Źródło
pYUB12	autonomiczny	pAL5000	Km ^R	(36)
pMD132	autonomiczny	pAL5000	Km ^R , oporność na superinfekcję fagiem L5	(37)
pYT72 i 92	autonomiczny	pMSC262	Km ^R	(38,39)
pJRD215	autonomiczny, kosmid	RSF1010	Km ^R , Sm ^R	(40)
pEP3	autonomiczny	pNG2	Hyg ^R	(41)
MV361	integracyjny, ekspresyjny	attP-int faga L5	Km ^R	(29)
pTSN39	integracyjny	attP-int z pSAM2	Km ^R	(42)
pNIV2173	integracyjny, ekspresyjny	attP-int z FRAT1	Km ^R	(43)
pBL525	autonomiczny	ori faga D29	Km ^R	(44)
wektory serii pUS	integracyjne	IS900	Km ^R	(1,45)
pMY10	autonomiczny, koniugacyjny	pAL5000, ori T	Km ^R	(46)
pDC100	autonomiczny, kosmid	pAL5000	Km ^R	(47)
pJAZ11	autonomiczny, koniugacyjny	pAL5000, Tn611	Km ^R	(19)
pJEM12 i 15	autonomiczne, z genem reporterowym lacZ	pAL5000	Km ^R	(14)
pY6002	integracyjny	rekomb. homologiczna	Km ^R	(48)
pCG79	integracyjny	Tn611	Sm ^R , Sp ^R , Km ^R	(49)
pMB351	autonomiczny	pLR7	Km ^R	(50)
pPE207	autonomiczny, koniugacyjny	pAL5000, oriT z pPM801	Am ^R	(51)

Stwierdzono ponadto, że do komórek *Mycobacterium* można wprowadzić niektóre plazmidy bakterii gramujemnych o szerokim zakresie gospodarzy; przykładem są pIJ666 i pSGM37, które po wprowadzeniu do szczepu *M. smegmatis* podlegają autonomicznej replikacji (56). Również plazmid RSF1010, zdolny do replikacji w różnych rodzajach gospodarzy, może być

przenoszony z *E. coli* do *M. smegmatis* na drodze koniugacji, o ile dawca *E. coli* posiada dodatkowo plazmid koniugacyjny RP4 (57). Hermans i wsp. skonstruowali kosmid pJRD215 — pochodną plazmidu RSF1010, którym transformowano *M. smegmatis* i *M. aurum* (40).

Plazmidy bifunkcyjne zawierające sekwencję *cos* faga λ , np. pYUB18, pMSC1, mogą być wykorzystywane do klonowania i wprowadzania do gospodarzy *Mycobacterium* dużych fragmentów DNA (wg 58).

Pomimo wielu zalet plazmidy autonomiczne są mało przydatne do wprowadzania obcych genów do szczepów *M. bovis* BCG w celu przygotowania zrekombinowanych szczepionek. Do stabilnej replikacji takich wektorów w komórkach biorców wymagana jest stała obecność czynnika selekcyjnego (antybiotyku), co jest warunkiem niemożliwym do spełnienia po wprowadzeniu szczepionki do organizmu (58). Problemów tego typu można uniknąć, wykorzystując wektory plazmidowe podlegające integracji do chromosomu gospodarza.

3.3. Wektory integracyjne

Wbudowanie wektora lub jego fragmentu w chromosom komórki biorcy może zachodzić na drodze integracji miejscowo-specyficznej, rekombinacji homologicznej lub transpozycji. Integracja miejscowo-specyficzna związana jest z wbudowywaniem się w genom gospodarza DNA fagów łagodnych. Zjawisko to wykorzystano do opracowania wektorów zawierających fagową sekwencję *attP* oraz gen integrazy. Wektory tego typu zostały omówione w rozdziale poświęconym mykobakteriofagom i ich pochodnym.

Właściwości podobne do fagów łagodnych wykazuje plazmid pSAM2, zidentyfikowany w szczepach *Streptomyces* sp. Plazmid ten jest zdolny do autonomicznej replikacji lub integracji z genomem gospodarza, która, podobnie jak w przypadku fagów, odbywa się na zasadzie rekombinacji miejscowo-specyficznej w obrębie sekwencji *attB* genomu i *attP* plazmidu, przy udziale integrazy (59). Skonstruowano wektory zawierające replikon *E. coli* pBR322, gen oporności na kanamycynę oraz fragment plazmidu pSAM2 z genem *int* i sekwencją *attP*, które po wprowadzeniu do szczepu *M. smegmatis* stabilnie integrowały z chromosomem biorcy (42).

Mechanizm rekombinacji homologicznej wykorzystali Husson i wsp., transformując szczep *M. smegmatis* plazmidem pY6002. Wektor ten zawiera replikon *E. coli* i pochodzący z *Mycobacterium* gen *pyrF*, który umożliwia rekombinację z homologicznym genem komórki gospodarza i w konsekwencji integrację wektora z chromosomem. Za pomocą integracyjnego plazmidu pY6002 wprowadzono do chromosomu *M. smegmatis* gen kodujący antygen 65kDa *M. leprae* i uzyskano jego ekspresję (48).

Wprowadzanie obcych genów do komórek bakterii jest możliwe także przy udziale transpozonów. U drobnoustrojów rodzaju *Mycobacterium* wykryto szereg ruchomych elementów genetycznych: transpozon Tn610, wyizolowany z *M. fortuitum* oraz sekwencje insercyjne IS900, IS901, IS1141, IS6100, IS986, IS1137, IS1081, IS6120, IS1096 i ISmyco, wykryte u różnych gatunków *Mycobacterium* (wg 60). Niektóre z wymienionych sekwencji insercyjnych zna-

lazły zastosowanie w diagnostyce i badaniach epidemiologicznych *Mycobacterium* (*fingerprinting*). Problemy te zostały omówione w artykule przeglądowym (61). Sekwencje IS900 z *M. paratuberculosis* i IS986 z *M. tuberculosis* complex wykorzystano do konstrukcji wektorów integracyjnych.

England i wsp. skonstruowali wektory pUS701 i pUS702, zawierające sztuczny transpozon, składający się z genu *aph* z Tn903, otoczonego przez dwie kopie sekwencji IS900, który umieszczono w plazmidzie *E. coli* pUC18. Plazmidy pUS701 i pUS702 posiadają zdolność autonomicznej replikacji jedynie w szczepach *E. coli*, natomiast po wprowadzeniu do komórek *Mycobacterium* wektory te (lub przynajmniej zawarty w nich transpozon) ulegają integracji z chromosomem (1). Te same sekwencje insercyjne oraz IS986 posłużyły do opracowania całej rodziny plazmidów pUS. Poszczególne wektory różnią się między sobą liczbą i orientacją sekwencji insercyjnych, co ma znaczenie dla częstości transpozycji. Jeden z wektorów tej rodziny (pUS909) zawiera ponadto gen kodujący antygen 18kDa *M. leprae*. Klonując obce geny poniżej jego sekwencji promotorowej można uzyskiwać białka fuzyjne w gospodarzu *Mycobacterium*. W ten sposób wprowadzono do komórek *M. smegmatis* gen *gag27* wirusa SIV (45).

Stwierdzono, że wektory pUS mogą być integrowane w genom komórki gospodarza w liczbie kopii od 1 do 5 (45), łączą zatem zalety wynikające ze stabilnej integracji obcego DNA z chromosomem z możliwością wprowadzania do komórki więcej niż jednej kopii klonowanego genu.

4. Ekspresja obcych genów w komórkach *Mycobacterium*

Wprowadzane do szczepów *Mycobacterium* geny mogą podlegać wydajnej ekspresji jeśli posiadają odpowiednie promotory, rozpoznawane przez systemy enzymatyczne komórek biorcy. Pierwszymi obcymi genami, których ekspresję uzyskano w gospodarzu *Mycobacterium*, były: *aph* (Km^R) z transpozonu Tn903 (28) oraz gen *hsp60* *M. leprae* (wg 62). Oba geny wprowadzono do komórek *Mycobacterium* z własnymi promotorami.

Do konstrukcji wektorów ekspresyjnych przeznaczonych do klonowania obcych genów wykorzystywano promotory mykobakteryjnych genów kodujących białka szoku cieplnego: *hsp60* i *hsp70* z *M. bovis* BCG (63,64), promotor genu kodującego antygen 64kDa z *M. bovis* BCG (43), antygen *M. kansasii*, antygen 19kDa i 38kDa *M. tuberculosis*, ORF2 z IS900 *M. paratuberculosis* oraz *groES/groEL1* ze *Streptomyces albus* (wg 62). Wykorzystywano w tym celu także promotor operonu *lac* *E. coli* i ramki odczytu pochodzące z różnych mykobakteriofagów (wg 62).

Prowadzone były ponadto badania mające na celu identyfikację i dokładniejsze poznanie mykobakteryjnych sekwencji odpowiedzialnych za inicjację transkrypcji i translacji. W eksperymentach tych wykorzystywano wektory zawierające geny reporterowe, których ekspresja w komórkach gospodarza jest łatwa do wykrycia i można ją oceniać ilościowo. Opisano zastosowanie do tego celu kilku różnych genów reporterowych, takich jak pozbawiony

promotora gen *lacZ* z *E. coli* (21,65,66), gen *fflux*, kodujący lucyferazę świetlika (67), gen kodujący zielony barwnik fluorescencyjny (*gfp*) z meduzy *Aequorea victoria* (68,69) oraz pozbawiony promotora gen acetylotransferazy chloramfenikolowej (*cat*) (70). Dzięki wykorzystaniu wektorów zawierających geny reporterowe możliwe było klonowanie sekwencji promotorowych pochodzących z *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. leprae*, *M. smegmatis* i mykobakteriofagów (21,65,66,70). W ostatnich latach przybywa informacji dotyczących promotorów *Mycobacterium*, ich sekwencji nukleotydowych oraz różnic i podobieństw w porównaniu z sekwencjami regulatorowymi innych drobnoustrojów, jednak wiedza na temat regulacji ekspresji genów u *Mycobacterium* wciąż jest stosunkowo uboga (71-74).

Dodatkowy problem w uzyskiwaniu w komórkach *Mycobacterium* ekspresji obcych genów, oprócz dostarczenia odpowiedniego promotora, może stanowić wysoka zawartość G+C, charakterystyczna dla genomu *Mycobacterium*. Wiąże się z nią odmienny niż u innych bakterii *codon usage*: przewaga kodonów zawierających G lub C w trzeciej pozycji (75). Zjawisko to może ograniczać wydajność translacji genów pochodzących z drobnoustrojów innych niż *Mycobacterium* (62).

W większości przypadków obce geny mogą podlegać ekspresji w *Mycobacterium* po dokonaniu ich fuzji z fragmentem końca 5' mykobakteryjnego genu z silnym promotorem (wg 62). Przykładem może być uzyskanie ekspresji w *M. bovis* BCG i *M. smegmatis* genu reporterowego alkalicznej fosfatazy (*phoA*) z *E. coli*, sklonowanego pod kontrolą promotora i sekwencji kodującej peptyd sygnałowy antygeny 85A *M. tuberculosis*. W analogiczny sposób otrzymano antygen *Schistosoma mansoni* — transferazę S-glutationu w szczepie *M. bovis* BCG. Oba heterologiczne białka były produkowane i wydzielane poza komórkę gospodarza dzięki fuzji z peptydem sygnałowym *Mycobacterium* (74). W gospodarzu *M. bovis* BCG sklonowano ponadto różnorodne geny kodujące antygeny pasożytów, patogennych bakterii i wirusów, w tym kilka antygenów wirusa HIV (12,13, wg 62,76).

5. Markery selekcyjne w badaniach genetycznych prątków

Dobry wektor przeznaczony do klonowania genów, oprócz miejsca inicjacji replikacji lub systemu integracji z chromosomem gospodarza i silnego promotora, musi zawierać także marker, umożliwiający selekcję zrekombinowanych klonów. Najczęściej stosowanymi w genetyce bakterii markerami selekcyjnymi są geny warunkujące oporność na antybiotyki. Ze względu na szeroką lekooporność prątków możliwości tego rodzaju selekcji są ograniczone. Najczęściej stosowanym w badaniach *Mycobacterium* markerem selekcyjnym jest gen *aph*, pochodzący z transpozonu Tn5 lub Tn903, który warunkuje oporność na kanamycynę. Z danych literaturowych wynika, że jest to dogodny marker, gdyż gen *aph* podlega ekspresji w komórkach *Mycobacterium* pod kontrolą własnego promotora, zaś kanamycyna jest antybiotykiem stosunkowo stabilnym i dodana do podłoża nie ulega inaktywacji przez czas

wystarczający do hodowli prątków wolnorosnących (16). Gen oporności na kanamycynę, jak się okazało, był jednak nieskutecznym markerem selekcyjnym dla *M. vaccae* i *Mycobacterium w* (77).

Alternatywnym wobec genu *aph* markerem jest gen oporności na higromycynę. Wektorami niosącymi ten marker selekcyjny skutecznie transformowano *M. vaccae*, *Mycobacterium w*, a także *M. smegmatis* i *M. bovis* BCG (tab. 2).

TABELA 2

GENY OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI JAKO MARKERY SELEKCYJNE STOSOWANE W BADANIACH GENETYCZNYCH
Mycobacterium (wg 2)

Marker	Biorca	Źródło literaturowe
Km ^R	<i>M. aurum</i>	(40,47)
	<i>M. avium</i>	(50)
	<i>M. bovis</i> BCG	(3,14,18,45,50,55,65,78)
	<i>M. tuberculosis</i>	(47,50)
	<i>M. flavescens</i>	(47)
	<i>M. fortuitum</i>	(55)
	<i>M. parafortuitum</i>	(wg 2)
	<i>M. phlei</i>	(55)
	<i>M. smegmatis</i>	(3,14,18,28,42,44,45,46,47,49,57,65,79)
	<i>M. vaccae</i>	(45)
Hyg ^R	<i>M. avium</i>	(79)
	<i>M. bovis</i> BCG	(55,80)
	<i>M. smegmatis</i>	(55,77,80)
	<i>M. vaccae</i>	(77,80)
	<i>Mycobacterium w</i>	(77)
Sm ^R	<i>M. aurum</i>	(40)
	<i>M. parafortuitum</i>	(wg 2)
	<i>M. smegmatis</i>	(14,40,49,57)
Cm ^R	<i>M. bovis</i> BCG	(55)
Tc ^R	<i>M. smegmatis</i>	(58)
Gm ^R	<i>M. smegmatis</i>	(57,81)
	<i>M. bovis</i> BCG	(81)
Am ^R	<i>M. smegmatis</i>	
	<i>M. bovis</i> BCG	(51)
	<i>M. tuberculosis</i>	
Sul ^R	<i>M. smegmatis</i>	(57)

Oznaczenia markerów oporności:

Km^R — kanamycyna; Hyg^R — higromycyna; Sm^R — streptomycyna; Cm^R — chloramfenikol; Tc^R — tetracyklina; Gm^R — gentamycyna; Am^R — apramycyna; Sul^R — sulfonamidy.

Selekcja transformantów na podłożu z dodatkiem tetracykliny jest możliwa w przypadku *M. smegmatis* (58), antybiotyk ten jest jednak zbyt mało stabilny, aby mógł być stosowany w hodowlach gatunków wolnorosnących. Z kolei chloramfenikol nie może być wykorzystywany w badaniach genetycznych *Mycobacterium* jako jedyny czynnik selekcyjny ze względu na dużą częstość pojawiania się spontanicznych mutantów opornych na ten antybiotyk (36). Gen warunkujący oporność na chloramfenikol stosowano natomiast w połączeniu z innym markerem — genem *aph* (55).

Rekombinanty *Mycobacterium* selekcjonowano także na podłożach zawierających sulfonamidy, gentamycynę (57,81), streptomycynę (40) i apramycynę (51) (tab. 2).

Wprowadzanie genów oporności na antybiotyki do szczepów chorobotwórczych lub wykorzystywanych jako żywe szczepionki wiąże się z ryzykiem rozprzestrzeniania się lekooporności, także na inne patogenne bakterie. Tego sposobu selekcji nie można zatem wykorzystać w opracowywaniu zrekombinowanych szczepionek. Dlatego poszukuje się innych markerów selekcyjnych, nie niosących ze sobą zagrożenia biologicznego.

Alternatywnym markerem może być na przykład gen *gp71*, pochodzący z faga L5, który nadaje szczepowi gospodarza oporność na superinfekcję fagiem L5 i D29. Gen ten wykorzystano do konstrukcji plazmidów: autonomicznego i integracyjnego, którymi transformowano *M. smegmatis* i *M. bovis* BCG (37).

Opisano także wykorzystanie jako markera selekcyjnego genu *mer* z *Pseudomonas aeruginosa*, warunkującego oporność na rtęć. Wektorami niosącymi ten gen transformowano *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG i *M. tuberculosis*, otrzymując klony o wysokiej oporności na sole rtęci (82).

6. Metody wprowadzania obcego DNA do komórek *Mycobacterium*

Pierwsze doniesienia na temat wprowadzania obcego DNA do szczepów *Mycobacterium* pochodziły z lat siedemdziesiątych i dotyczyły transformacji prątków chromosomalnymi genami lekooporności oraz komplementacji mutantów auksotroficznych. Wydajność transformacji była jednak bardzo niska, a nie dysponowano jeszcze wówczas wektorami zdolnymi do autonomicznej replikacji w szczepach *Mycobacterium*, które pozwoliłyby na dopracowanie warunków bardziej wydajnej transformacji (wg 58).

We wczesnych pracach z wykorzystaniem fagów i wektorów fazmidowych stosowano metodę transfekcji, tj. wprowadzania do komórek DNA fagowego. Wydajność transfekcji ze względu na złożoną strukturę ściany komórkowej *Mycobacterium* była początkowo niska — wynosiła poniżej 100 pfu (*plaque forming units*) w przeliczeniu na 1 μg DNA. Dzięki zastosowaniu sferoplastów *Mycobacterium* i glikolu polietylenowego, który stymuluje transfer DNA do komórki, możliwe było zwiększenie wydajności do ponad 10^4 pfu na 1 μg

DNA fagowego (27). Wadą tej metody była trudność i czasochłonność procesu otrzymywania sferoplastów i ich regeneracji.

Do wprowadzania obcego DNA do komórek *Mycobacterium* wykorzystywano także proces koniugacji. Koniugacja pomiędzy bakteriami gramujemnymi a prątkami kwasoopornymi została udokumentowana po raz pierwszy w 1990 r. przez Lazraqa i wsp. (46). Skonstruowali oni bifunkcyjny plazmid pMY10 i opisali jego koniugacyjny transfer ze szczepu *E. coli* do *M. smegmatis*. Wektor ten, oprócz miejsc inicjacji replikacji funkcjonujących w *E. coli* i *Mycobacterium* oraz markera selekcyjnego (genu *aph*), zawierał także fragment operonu *tra*, odpowiedzialnego za proces koniugacji — sekwencję *oriT*. W jej obrębie następuje przecięcie nici DNA i zapoczątkowanie transferu plazmidu z komórki dawcy do komórki biorcy. Aby zaszła koniugacja szczep dawcy musi jednak posiadać cały operon *tra*, który kontroluje przebieg tego procesu. Przenoszenie plazmidu pMY10 i innych wektorów zawierających sekwencję *oriT* do komórek *Mycobacterium* było możliwe dzięki zastosowaniu jako dawcy szczepu *E. coli* niosącego oprócz wektora także dodatkowy, „mobilizujący” koniugacyjny plazmid z pełnym operonem *tra* (46,51).

Opisane metody wprowadzania obcego DNA do biorców *Mycobacterium* były jednak skomplikowane i ograniczone do niewielkiej liczby szczepów. Prawdziwy postęp w technikach inżynierii genetycznej *Mycobacterium* przyniosło dopiero zastosowanie do celów wprowadzania do komórek DNA metody elektroporacji.

Elektroporacja jest zjawiskiem polegającym na okresowej destabilizacji błony komórek poddanych krótkotrwałemu działaniu prądu elektrycznego o wysokim napięciu. Przyłożone z zewnątrz pole elektryczne indukuje potencjał membranowy komórki, gdy potencjał ten osiągnie wartość krytyczną (od 0,2 do 1,5 V) w błonie komórkowej tworzą się pory i zwiększa się jej przepuszczalność zarówno dla cząsteczek przenikających ze środowiska, jak i dla związków wypływających z komórki na zewnątrz (83,84). W metodzie tej stosuje się prąd stały o wysokim napięciu (w przypadku komórek bakteryjnych jest to 5-20 kV na 1cm odległości między elektrodami) w postaci impulsu na tyle krótkotrwałego (od 100 μ s do kilku ms), aby nie doprowadzić do zniszczenia komórek (wg 83).

Wiedza dotycząca mechanizmu i przebiegu elektroporacji pochodzi głównie z badań na modelowych błonach lipidowych i erytrocytach. Można przypuszczać, że podobnie jak w komórkach *Eucaryota* również w błonie bakterii pod wpływem szoku elektrycznego tworzą się pory, jednak nie jest znany wpływ pola elektrycznego na ścianę komórkową bakterii. Pomimo nieznamości dokładnego mechanizmu elektroporacji metoda ta jest wykorzystywana do wprowadzania obcego DNA do komórek drobnoustrojów, szczególnie gatunków, których klasyczna transformacja jest niemożliwa lub wymaga stosowania pracochłonnych metod; przykładami są niektóre gatunki bakterii gramodatnich czy prątki kwasooporne. Opracowanie tej metody umożliwiło zwiększenie liczby transformowanych szczepów *Mycobacterium*, podniosło wydajność transformacji i w rezultacie ogromnie ułatwiło badania tej grupy bakterii.

7. Badania molekularne szczepów *Mycobacterium* zdolnych do biotransformacji steroli

Zainteresowanie drobnoustrojami z rodzaju *Mycobacterium* wiąże się nie tylko z zagrożeniami wynikającymi z chorobotwórczości tych drobnoustrojów i leczeniem powodowanych przez nie zakażeń. Niektóre szybko rosnące szczepy *Mycobacterium* dzięki posiadanym właściwościom enzymatycznym znajdują zastosowanie w biotechnologii. Opisano i opatentowano szereg mutantów *M. fortuitum*, *M. parafortuitum*, *M. phlei* i *M. vaccae*, które zostały przystosowane do celów przemysłowych (85, wg 86,87). Szczepy te posiadają zdolność do biotransformacji tanich steroli, takich jak cholesterol czy sitosterol, z wytworzeniem pochodnych pozbawionych alkilowego łańcucha bocznego, które są związkami pośrednimi w produkcji cennych środków farmakologicznych (85,88). Szczególnie przydatny z punktu widzenia biotechnologii jest gatunek *M. vaccae*, ponieważ w jego obrębie nie wykryto szczepów chorobotwórczych (87).

Biotransformacja steroli została stosunkowo dobrze poznana na poziomie poszczególnych reakcji biochemicznych (86), znacznie mniejsza jest natomiast wiedza na temat podstaw genetycznych tego procesu.

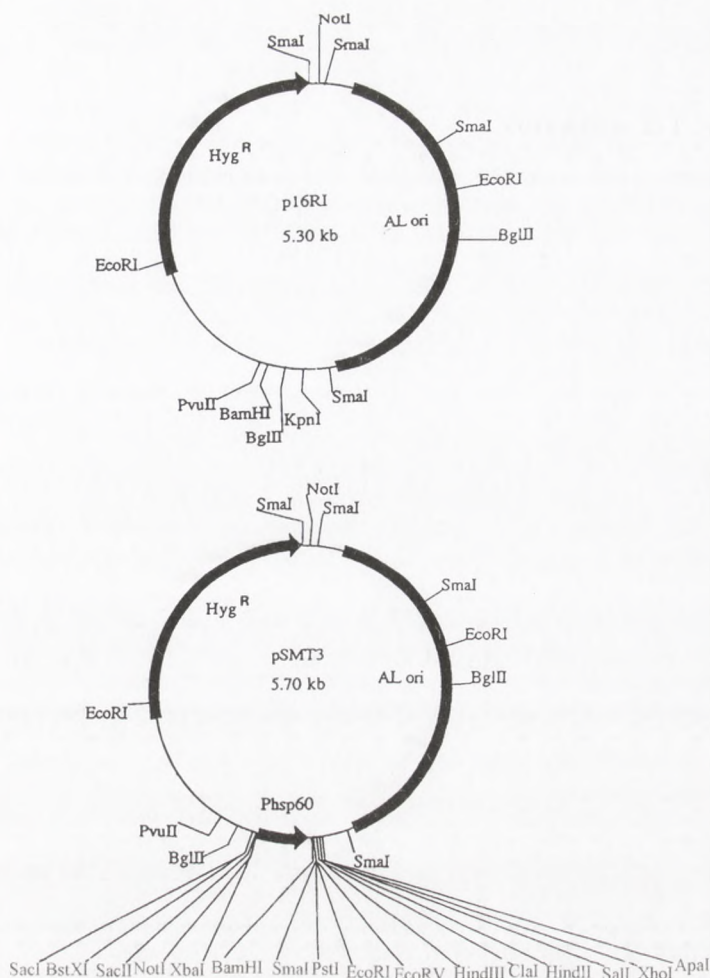
Hesselink i wsp. (88) podjęli próbę identyfikacji genów *Mycobacterium* odpowiedzialnych za biotransformację steroli. Skonstruowali oni bank genów przemysłowego szczepu *M. vaccae* NRRL B3683 w wektorze kosmidowym pLAFRI. Po przeniesieniu zrekombinowanych plazmidów ze szczepu *E. coli* do *Pseudomonas testosteroni* autorzy ci wyselekcjonowali klony, które nabyły zdolności wykorzystywania związków steroidowych jako jedyne źródła węgla. Nie zidentyfikowano jednak konkretnych genów *Mycobacterium* odpowiedzialnych za tę zmianę właściwości metabolicznych szczepu gospodarza (88).

Wilmańska i wsp., wykorzystując metodę *Western blot*, zidentyfikowali białko oksydazy cholesterolowej u szczepów *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei* i *M. vaccae*, jednak w DNA chromosomalnym wyizolowanym z tych drobnoustrojów nie stwierdzono obecności sekwencji homologicznej ze znanym genem oksydazy cholesterolowej ze *Streptomyces* sp. (89).

Wciąż brak jest informacji na temat lokalizacji i sekwencji genów *Mycobacterium*, kodujących poszczególne enzymy szlaku degradacji steroli.

W Zakładzie Genetyki Drobnoustrojów UŁ oraz Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi od kilku lat prowadzone są badania szybko rosnących szczepów *Mycobacterium* zdolnych do degradacji związków steroidowych. Badania te były utrudnione ze względu na brak odpowiedniego modelowego systemu wektora i biorcy, który umożliwiłby wprowadzanie i stabilną replikację DNA plazmidowego w komórkach szczepów biotechnologicznych. Dopiero zastosowanie wektorów bifunkcyjnych zawierających gen oporności na higromycynę jako marker selekcyjny pozwoliło na uzyskiwanie pozytywnych powtarzalnych wyników transformacji.

Metodą elektroporacji wprowadzono 2 plazmidy bifunkcyjne — p16R1 i pSMT3 (rys. 3), do mutantu przemysłowego *M. vaccae* B3805, co stanowiło



Rys. 3. Mapy bifunkcyjnych wektorów zawierających gen oporności na higromycynę (Hyg^R) (77).

pierwszą udaną próbę transformacji tego szczepu obcym DNA. Wprowadzony DNA plazmidowy był replikowany i stabilnie utrzymywał się w komórkach gospodarza.

Plazmid pSMT3 jest wektorem ekspresyjnym, zawierającym silny promotor, który umożliwia klonowanie genów i uzyskiwanie ich ekspresji w gospodarzu *Mycobacterium*. Wektor ten, wraz z biotechnologicznym szczepem *M. vaccae* B3805 jako biorcą, stanowi dogodny model do badania genetycznego uwarunkowania szlaku degradacji steroli. Pogłębienie wiedzy na temat molekularnego podłoża tego procesu mogłoby umożliwić doskonalenie szczepów przemysłowych oraz zwiększanie wydajności biotransformacji.

Literatura

1. England P. M., Wall S., McFadden J. J., (1991), *Mol. Microbiol.*, 5, 2047-2052.
2. Parish T., Stoker N. G., (1995), *Methods Mol. Biol.*, 47, 237-252.
3. Ranes M. G., Rauzier J., Lagranderie M., Gheorghiu M., Gicquel B., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 2793-2797.
4. Hatfull G. F., (1994), *ASM News*, 60, 255-260.
5. Banerjee A., Dubnau E., Quemard A., Balasubramanian V., Wilson T., Collins D., de Lisle G., Jacobs W. R. Jr., (1994), *Science*, 163, 227.
6. Finken M., Kirschner P., Meier A., Wrede A., Bottger E. C., (1993), *Mol. Microbiol.*, 9, 1239-1246.
7. van der Vliet G. M., Schukkink R. A., van Gemen B., Schepers P., Klatser P. R., (1993), *J. Gen. Microbiol.*, 139, 2423-2429.
8. Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Bottger E. C., Bodmer T., (1993), *J. Clin. Microbiol.*, 31, 175-178.
9. Imboden P., Cole S., Bodmer T., Telenti A., (1993), *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*, Eds. Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C., White T. J., ASM, Washington, DC.
10. Rastogi N., Goh K. S., (1990), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34, 2061-2064.
11. Nikaido H., Jarlier V., (1991), *Res. Microbiol.*, 142, 437-443.
12. Honda M., Matsuo K., Nakasone T., Okamoto Y., Yoshizaki H., Kitamura K., Sugiura W., Watanabe K., Fukushima Y., Haga S., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10693-10697.
13. Hanson M. S., Lapevich C. V., Haun S. L., (1995), *Ann. NY Acad. Sci.*, 754, 214-221.
14. Timm J., Lim E. M., Gicquel B., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 6749-6753.
15. Reddi P. P., Amin A. G., Khandekkar P. S., Talwar G. P., (1994), *Int. J. Lepr. Mycob. Dis.*, 62, 229-236.
16. Jacobs W. R. Jr., Kalpana G. V., Cirillo J. D., Pascopella L., Snapper S. B., Udani R. A., Jones W., Barletta R. G., Bloom B. R., (1991), *Met. Enzymol.*, 204, 537-555.
17. Lee M. H., Pascopella L., Jacobs W. R. Jr., Hatfull G. F., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3111-3115.
18. Kalpana G. V., Bloom B. R., Jacobs W. R. Jr., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5433-5437.
19. Gavigan J-A., Guilhot C., Gicquel B., Martin C., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 127, 35-39.
20. Hatfull G. F., Jacobs W. R. Jr., (1994), in: *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, Ed. B. R. Bloom, ASM, Washington, DC, 165-184.
21. Barletta R. G., Snapper B., Cirillo J. D., Connell N. D., Kim D. D., Jacobs W. R., Bloom B. R., (1990), *Res. Microbiol.*, 141, 931-939.
22. Clark-Curtiss J. E., (1990), *Genome structure of Mycobacteria*, in: *Molecular biology of the Mycobacteria*, Ed. J. J. McFadden, Surrey University Press, 77-96.
23. Young D. B., Kaufmann S. H. E., Hermans P. W. M., Thole J. E. R., (1992), *Mol. Microbiol.*, 6, 133-145.
24. Dziadek J., Rumijowska A., Jaworski A., (1992), *Post. Mikrobiol.*, 31, 137-161.
25. Snapper S. B., Bloom B. R., Jacobs W. R. Jr., (1990), in: *Molecular biology of the Mycobacteria*, Ed. J. J. McFadden, Surrey University Press, 199-218.
26. Kieser T., Moss M. T., Dale J. W., Hopwood D. A., (1986), *J. Bacteriol.*, 168, 72-80.
27. Jacobs W. R. Jr., Tuckman M., Bloom B. R., (1987), *Nature*, 327, 532-534.
28. Snapper S. B., Lugosi L., Jekkel A., Melton R. E., Kieser T., Bloom B. R., Jacobs W. R. Jr., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6987-6991.
29. Stover C. K., de la Cruz V. F., Fuerst T. R., Burlein J. E., Benson L. A., Bennett L. T., Bansal G. P., Young J. F., Lee M. H., Hatfull G. F., Snapper S. B., Barletta R. G., Jacobs W. R. Jr., Bloom B. R., (1991), *Nature*, 351, 456-460.
30. Crawford J. T., Bates J. H., (1979), *Infect. Immun.*, 24, 979-981.
31. Hull S. I., Wallace R. J., Bolbey D. G., Price K. E., Goodhines R. A., Swenson J. M., Silcox V. A., (1984), *Am. Rev. Resp. Dis.*, 129, 614-618.

32. Labidi A., Dauguet C., Goh K. S., David H. L., (1984), *Curr. Microbiol.*, 11, 235-240.
33. Crawford J. T., Cave M. D., Bates J. H., (1981), *Rev. Infect. Dis.*, 3, 949-952.
34. Mizuguchi Y., Funukaga M., Taniguchi H., (1981), *J. Bacteriol.*, 146, 656-659.
35. Scott-Meissner P., Falkinham J. O. III, (1986), *J. Infect. Dis.*, 153, 325-331.
36. Snapper S. B., Melton R. E., Mustafa S., Kieser T., Jacobs W. R. Jr., (1990), *Mol. Microbiol.*, 4, 1911-1919.
37. Donnelly-Wu M. K., Jacobs W. R. Jr., Hatfull G. F., (1993), *Mol. Microbiol.*, 7, 407-417.
38. Mizuguchi Y., Taniguchi H., Udou T., Qin M.H., Goto Y., Tokunaga T., (1991), *Kekkaku*, 66, 607-613.
39. Goto Y., Taniguchi H., Udou T., Mizuguchi Y., Tokunaga T., (1991), *FEMS Microbiol Lett.*, 67, 277-282.
40. Hermans J., Martin C., Huijberts G. N., Goosen T., de Bont J. A., (1991), *Mol. Microbiol.*, 5, 1561-1566.
41. Radford A. J., Hodgson A. L., (1991), *Plasmid*, 25, 149-153.
42. Martin C., Mazodier P., Mediola M. V., Gicquel B., Smokvina T., Thompson C. J., Davies J., (1991), *Mol. Microbiol.*, 5, 2499-2502.
43. Haeseleer F., Pollet J. F., Haumont M., Bollen A., Jacobs P., (1993), *Mol. Biochem. Parazitol.*, 57, 117-126.
44. David M., Lubinsky-Mink S., Ben-Zvi A., Ulitzur S., Kuhn J., Suissa M., (1992), *Plasmid*, 28, 267-271.
45. Dellagostin O. A., Wall S., Norman E., O'Shaughnessy T., Dale J. W., McFadden J. J., (1993), *Mol. Microbiol.*, 10, 983-993.
46. Lazraq R., Clavel-Sérès S., David H. L., Roulland-Dussoix D., (1990), *FEMS Microbiol. Lett.*, 69, 135-138.
47. Lazraq R., Clavel-Sérès S., David H. L., (1991), *Curr. Microbiol.*, 22, 9-13.
48. Husson R. N., James B. E., Young R. A., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 519-524.
49. Guilhot C., Otal I., van Rompaey I., Martin C., Gicquel B., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 535-539.
50. Beggs M. L., Crawford J. T., Eisenach K. D., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 4836-4840.
51. Paget E., Davies J., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 6357-6360.
52. Rauzier J., Moniz-Pereira J., Gicquel-Sanzey B., (1988), *Gene*, 71, 315-321.
53. Stolt P., Stoker N. G., (1996), *Microbiol.*, 142, 2795-2802.
54. Stolt P., Stoker N. G., (1996), 178, 6693-6700.
55. Qin M., Taniguchi H., Mizuguchi Y., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 419-425.
56. Zainuddin Z. F., Kunze Z. M., Dale J. W., (1989), *Mol. Microbiol.*, 3, 29-34.
57. Gormley E. P., Davies J., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 6705-6708.
58. Hatfull G. F., (1993), *Trends in Microbiol.*, 1, 310-314.
59. Boccard F., Smokvina T., Pernodet J-L., Freidman A., Guerinéau M., (1989), *Plasmid*, 21, 59-70.
60. McAdam R. A., Guilhot C., Gicquel B., (1994), in: *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, Ed. B. R. Bloom, ASM, Washington, DC, 199-216.
61. Sajduda A., Brzostek A., Dziadek J., (1995), *Post. Mikrobiol.*, 34, 3-21.
62. Burlein J. E., Stover C. K., Offutt S., Hanson M. S., (1994), in: *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, Ed. B. R. Bloom, ASM, Washington, DC, 239-252.
63. Kong D., Kunimoto D., (1995), *Infect. Immun.*, 63, 799-803.
64. Aldovani A., Young R., (1991), *Nature*, 351, 479-482.
65. Dellagostin O. A., Esposito G., Eales L., Dale J. W., McFadden J.-J., (1995), *Microbiol.*, 141, 1785-1792.
66. Barletta R. G., Kim D. D., Snapper S. B., Bloom B. R., Jacobs W. R. Jr., (1992), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 23-30.
67. Jacobs W. R. Jr., Barletta R. G., Udani R., Chan J. Kalkut G., Sosne G., Kieser T., Sarkis G. J., Hatfull G. F., Bloom B. R., (1993), *Science*, 260, 819-822.
68. Kremer L., Baulard A., Estaquier J., Poulain-Godefroy O., Loch C., (1995), *Mol. Microbiol.*, 17, 913-922.
69. Dhandayuthapani S., Via L. E., Thomas C. A., Horowitz P. M., Deretic D., Deretic V., (1995), *Mol. Microbiol.*, 17, 901-912.

70. Das Gupta S. K., Bashyam M. D., Tyagi A. K., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 5186-5192.
71. Gonzales-y-Merchand J. A., Colston M. J., Cox R. A., (1996), *Microbiology*, 142, 667-674.
72. Kenney T. J., Churchward G., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 3564-3571.
73. Bashyan M. D., Kaushal D., Dasgupta S. K., Tyagi A. L., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 4847-4853.
74. Kremer L., Baulard A., Estaquier J., Content J., Capron A., Loch C., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 642-653.
75. Andersson S. G. E., Sharp P. M., (1996), *Microbiology*, 142, 915-925.
76. Stover C. K., de la Cruz V. F., Fuerst T. R., Burlein J. E., Benson L. A., Bennett L. T., Bansal G. P., Young J. F., Lee M. H., Hatfull G. F., Snapper S. B., Barletta R. G., Jacobs W. R. Jr, Bloom B. R., (1991), *Nature*, 351, 456-460.
77. Garbe T. E., Barathi J., Barnini S., Zhang Y., Abou-Zeid C., Tang D., Mukherjee R., Young D. B., (1994), *Microbiology*, 140, 133-138.
78. Matsumoto S., Tamaki M., Yukitake H., Matsuo T., Naito M., Teraoka H., Yamada T., (1996), *FEMS Microbiol Lett.*, 135, 237-243.
79. Hinshelwood S., Stoker N. G., (1992), *Gene*, 110, 115-118.
80. Howard N. S., Gomez J. E., Ko C., Bishai W. R., (1995), *Gene*, 166, 181-182.
81. Pelicic V., Reytrat J-M., Gicquel B., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 1197-1199.
82. Baulard A., Escuyer V., Haddad N., Kremer L., Loch C., Berche P., (1995), *Microbiology*, 141, 1045-1050.
83. Chang. D. C., Saunders J. A., Chassy B. M., Sowers A. E., (1992), in: *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Eds. D. C. Chang, B. M. Chassy, J. A. Saunders, A. E. Sowers, Academic Press, Inc.
84. Chernomordik L. V., (1992), in: *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Eds. D. C. Chang, B. M. Chassy, J. A. Saunders, A. E. Sowers, Academic Press, Inc.
85. Sedlaczek L., (1988), *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 7, 187-235.
86. Szentirmai A., (1990), *J. Ind. Microbiol.*, 6, 101-115.
87. Seidel L., Horhold C., (1992), *J. Basic Microbiol.*, 32, 49-55.
88. Hesselink P. G. M., (1988), Ph.D. Thesis, University of Groningen, Holandia.
89. Wilmańska D., Dziadek J., Sajduda A., Milczarek K., Jaworski A., Murooka Y., (1995), *J. Ferm. Bioeng.*, 79, 119-124.

Mycobacteria in current genetic research

Summary

The article reviews the development of molecular investigations of the genus *Mycobacterium*. Achievements and difficulties of the genetics of mycobacteria are presented. Vectors and selectable markers commonly used in genetic manipulations and methods of introduction of foreign DNA into mycobacteria are described. The stress is laid not only on the research of the virulent mycobacteria, but also on molecular investigations of the non-pathogenic strains used in steroid drugs industry.

Key words:

mycobacteria, vectors, selectable markers, steroids.

Adres do korespondencji:

Ewa Golańska, Samodzielna Pracownia Biosyntezy Środków Leczniczych, Akademia Medyczna, ul. Muszyńskiego 1, 90-145 Łódź.