

Генетика бактерий

Кандидат биологических наук

Юлия Владимировна Закалюкина

Основные понятия и термины

- **Генетика** — наука о закономерностях наследственности и изменчивости организмов. Наследственность и изменчивость являются фундаментальными свойствами всех живых организмов. Они обеспечивают постоянство и многообразие видов и являются основой эволюции живой природы.
- Единицей наследственности является **ген** -- участок ДНК, в котором зашифрована последовательность аминокислот в полипептидной цепочке, контролирующая отдельный признак особи.
- Совокупность генов, сосредоточенных в «хромосоме» бактерий называется **генотип**.
- **Геном** – совокупность наследственного материала определенного вида организмов. У подавляющего числа прокариот геном представлен одиночной хромосомой, которая является кольцевой молекулой ДНК. Помимо хромосомы, в клетках бактерий часто находятся **плазмиды** — также замкнутые в кольцо ДНК, способные к независимой репликации. Хромосомная ДНК и плазмиды вместе называются **репликоны** -- генетические элементы, способные самостоятельно реплицироваться.

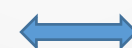
Основные понятия и термины

- У ряда бактерий, относящихся к различным филогенетическим группам, обнаружено линейное строение как хромосомы, так и плазмид. Например, геном спирохеты *Borrelia burgdorferi*, вызывающей болезнь Лайма, состоит из линейной хромосомы и нескольких плазмид, часть из которых имеет также линейное строение.
- Геномы большинства прокариот маленькие и компактные, гены плотно упакованы и между ними находится минимальное количество регуляторной ДНК. Геномы почти всех эубактерий и архей содержат от 10^6 до 10^7 пар нуклеотидов и кодируют 1000-4000 генов. Многие гены у прокариот организованы в совместно транскрибируемые группы — **опероны**.
- Самыми маленькими геномами у прокариот обладают внутриклеточные симбионты и паразиты, такие как *Hodgkinia cicadicola* (144 Кб), *Carsonella ruddii* (180 Кб) или *Mycoplasma genitalium* (580 Кб). Самым большим прокариотическим геномом является геном обитающей в почве бактерии *Sorangium cellulosum*, размер которого составляет около 13 Мб.

Взаимосвязь между генотипом и фенотипом организма

Генотип	Фенотип	
	На среде с лактозой	На среде без лактозы
lac+	лактозоположительный	лактозоотрицательный
lac-	лактозоотрицательный	лактозоотрицательный

 *Генотипическая
изменчивость*

 *Фенотипическая
изменчивость*

Генотип (совокупность всех генов) представляет собой потенциал организма, а фенотип – реализацию генетических возможностей в конкретных условиях среды. Фенотипические изменения не наследуются.

Различные формы одного и того же гена называются аллелями (lac+ и lac-).

Изменение генотипа происходит в процессе мутаций – стойких (спонтанных или индуцированных) изменений генома).

NB! Геном – вся совокупность наследственной информации, а генотип – та ее часть, которая кодирует определенные признаки.

Фенотипическая изменчивость: типы

- длится пока действует фактор,
- может сохраняться и после прекращения действия вызвавшего ее фактора:
 - лабильные модификации (краткосрочные) – сохраняются только в первых генерациях после прекращения действия фактора;
 - стабильные модификации (сохраняются во многих поколениях).

NB! Важно понимать отличие стабильных форм фенотипической изменчивости от генетической. Фенотипические изменения не затрагивают геном, но находятся под его контролем. Генотип определяет и контролирует диапазон фенотипической изменчивости.



Диссоциация колоний *Bacillus anthracis* на разных средах

VS.



E. coli на агаре МакКонки: lac+ и lac- штаммы

Фенотипическая изменчивость: проявления

Временные, генетически не закрепленные изменения – **модификации:**

морфологические – изменение формы клеток, образование L-форм,

культуральные – изменения культуральных свойств (например, диссоциация на R- и S-колонии), образование пигментов в зависимости от состава среды или аэрации,

биохимические – синтез фермента в условиях наличия определенного субстрата (стафилококки только в присутствии пенициллина синтезируют фермент пенициллиназу),

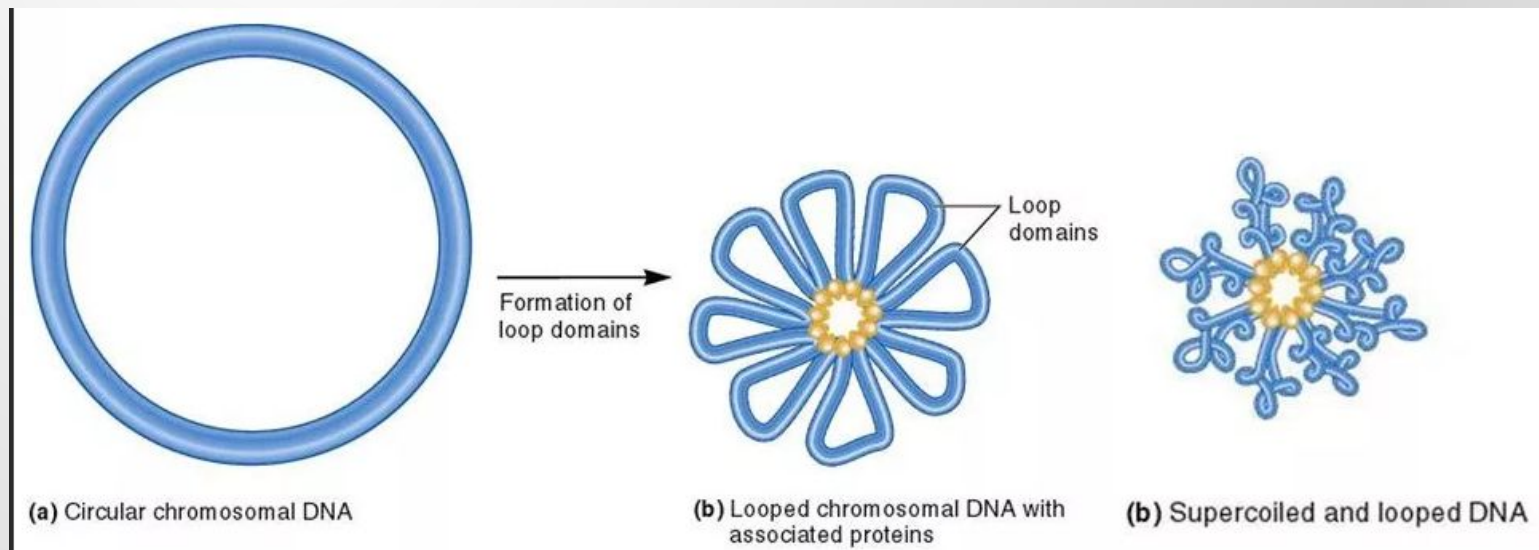
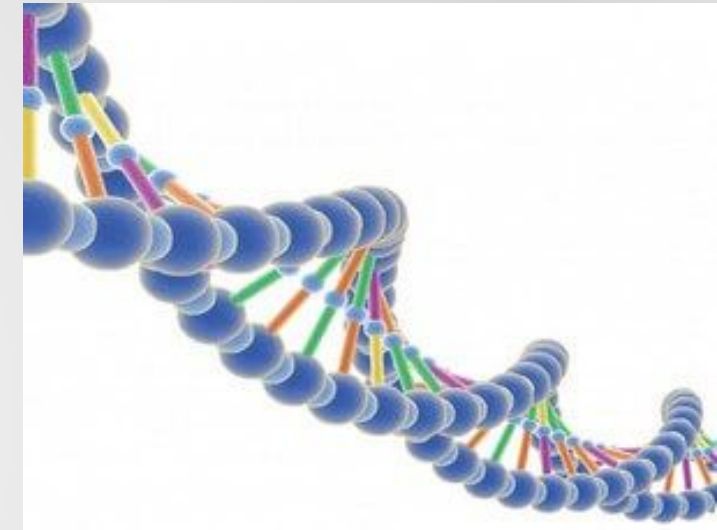
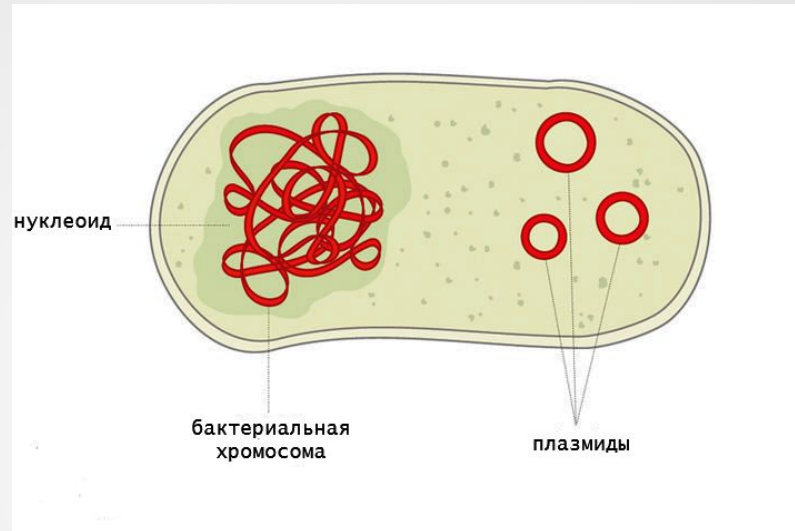
вирулентные – отсутствие факторов вирулентности W и V у *Yersinia pestis* при 28С,

антигенные -- проявляются сменой антигенов микроорганизмов в ходе инфекционного заболевания в результате включения «молчащих» генов (без их перестройки). К модификациям такого рода относятся изменения антигенной структуры гонококка, трепонемы сифилиса, боррелий возвратного тифа, холерного вибриона.

Бактериальная хромосома -- двухцепочечная кольцевая* молекула ДНК

- содержит до 5 тыс. генов,
- имеет молекулярную массу $1,7 \times 10^9 - 2,8 \times 10^9$ дальтон,
- включает $3 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ пар оснований,
- имеет гаплоидный (одинарный) набор генов,
- расположена в цитоплазме клетки в многократно свернутом и плотно упакованном виде,
- содержит гены, обуславливающие жизненно-важные для бактерий признаки.

* -- типично, но не обязательно



Основные структурные компоненты нуклеиновых кислот (ДНК и РНК): азотистое основание + сахар + фосфат = нуклеотид

Фосфаты

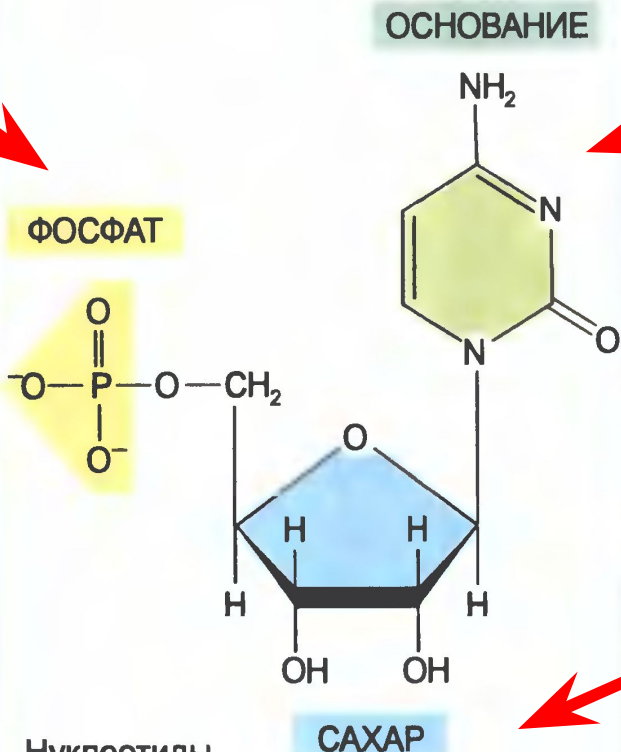
обычно присоединяются к пентозе вместо гидроксильной группы при 5' атоме углерода.

Фосфат придает нуклеотиду отрицательный заряд.

Нуклеотиды соединяются друг с другом в цепочку

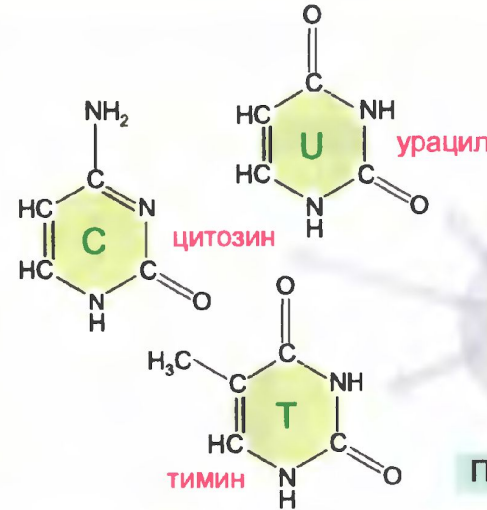
НУКЛЕОТИДЫ

Любой нуклеотид состоит из содержащего азот основания, пятиуглеродного сахара и одной или нескольких фосфатных групп.

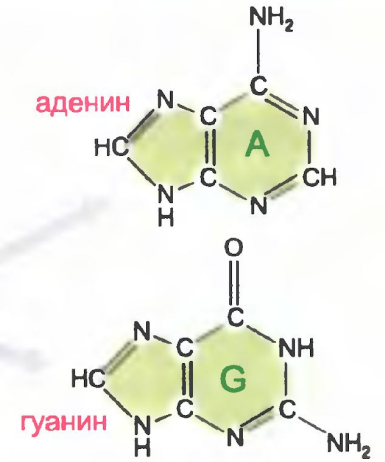


Нуклеотиды являются субъединицами нуклеиновых кислот.

ОСНОВАНИЯ

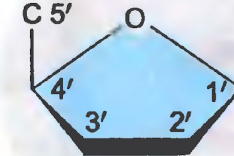


Основания — содержащие азот циклические соединения, представленные пиримидинами или пуринами.

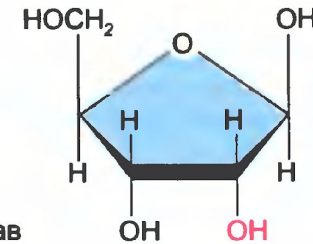


САХАРА

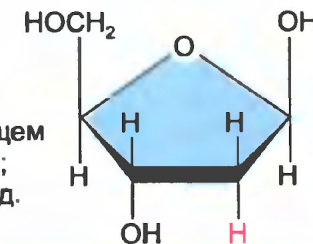
ПЕНТОЗА
пяти-углеродный сахар



два вида входит в состав нуклеиновых кислот



β -D-рибоза — составляющее рибонуклеиновой кислоты



β -D-2-дезоксирибоза — составляющее дезоксирибонуклеиновой кислоты

Каждый пронумерованный атом углерода во входящем в нуклеотид сахаре сопровождается знаком штриха; поэтому их называют «5-штрих атом углерода» и т. д.

Молекула ДНК и ее структурные звенья

Благодаря этой полярности – информация в ДНК всегда «считывается» в определённом направлении.

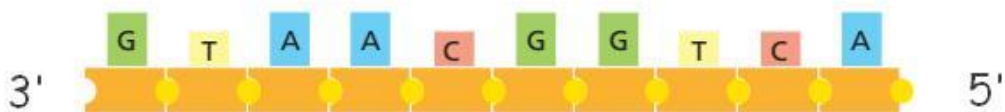
Правило Чаргаффа:
количество аденина равно количеству тимина, а кол-во гуанина – кол-ву цитозина.

Содержание Г+Ц в ДНК бактерий (%) постоянная величина для вида бактерий, используется в таксономии

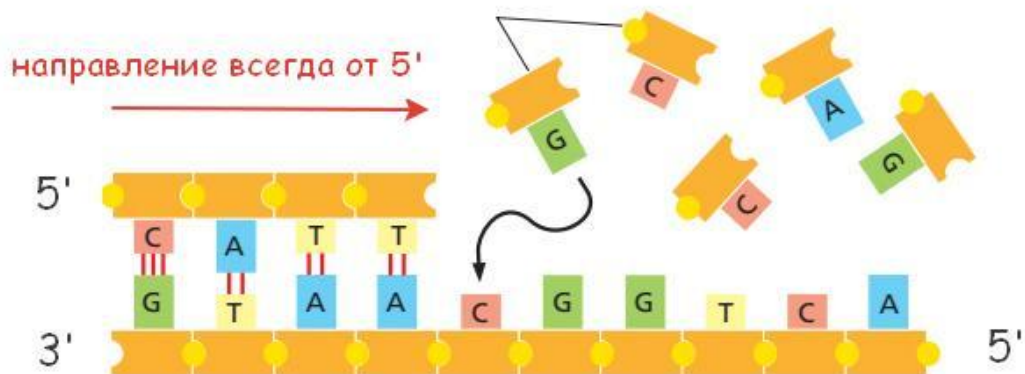
(А) Элементарные звенья ДНК



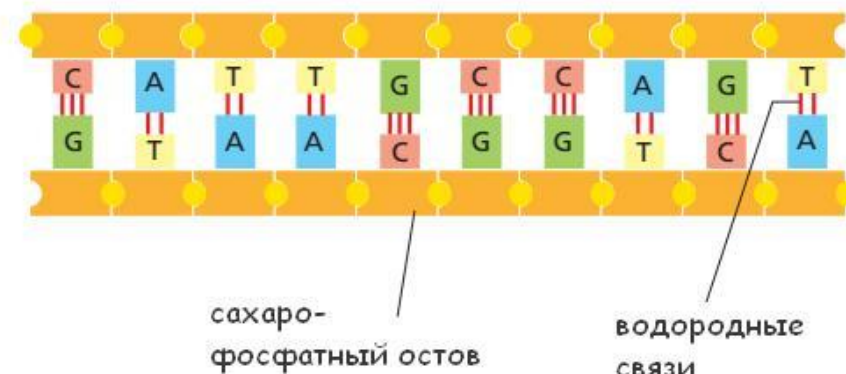
(В) Цепь ДНК



(С) Синтез новой цепи на матрице исходной



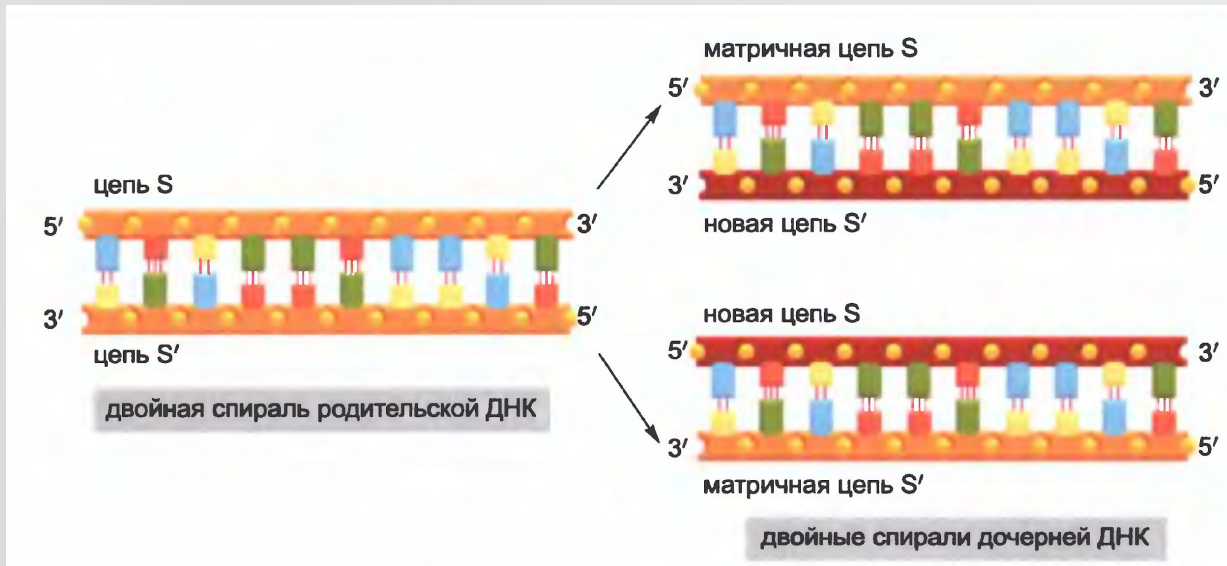
(D) Двухцепочечная ДНК



(E) Двойная спираль

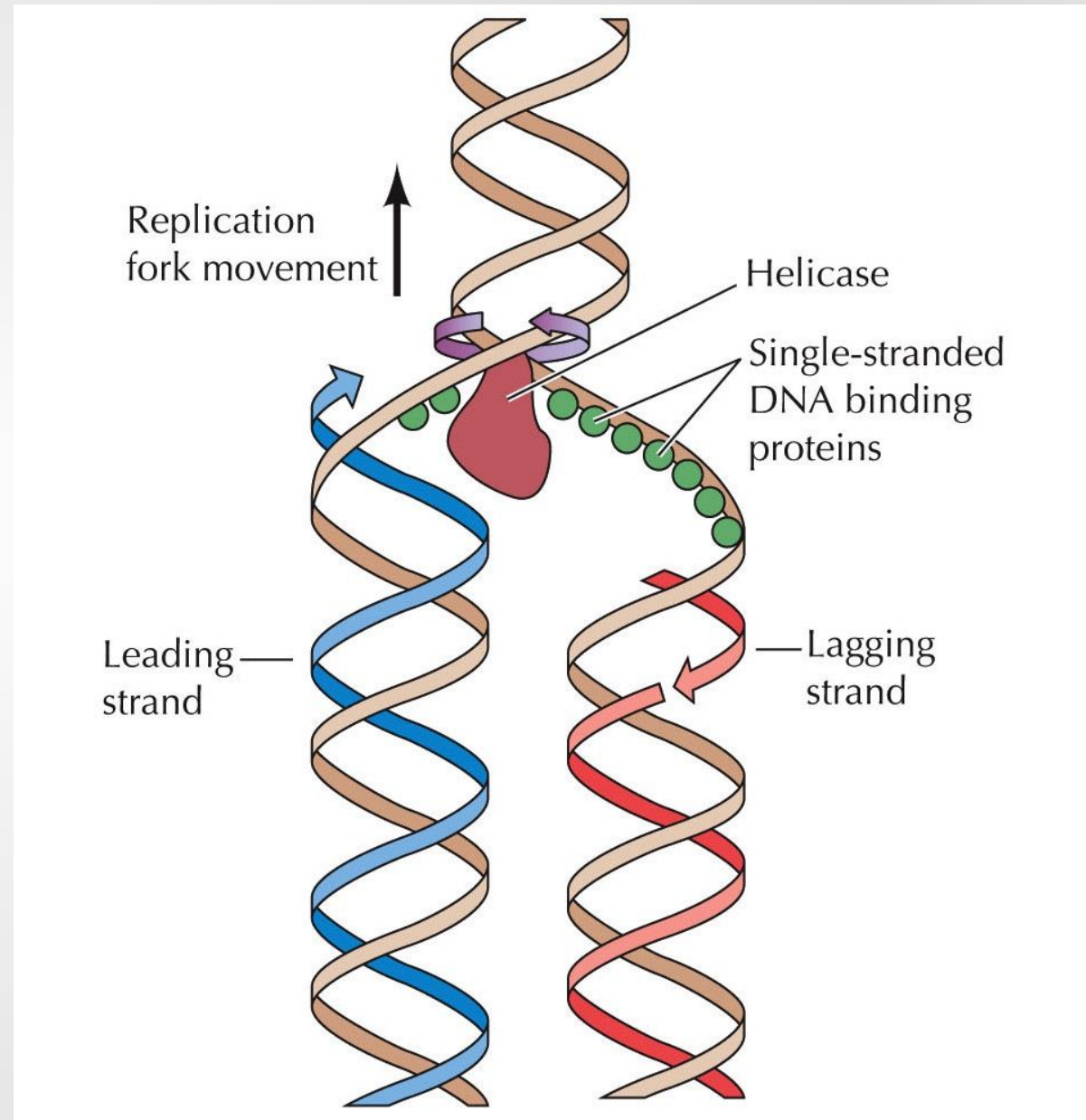


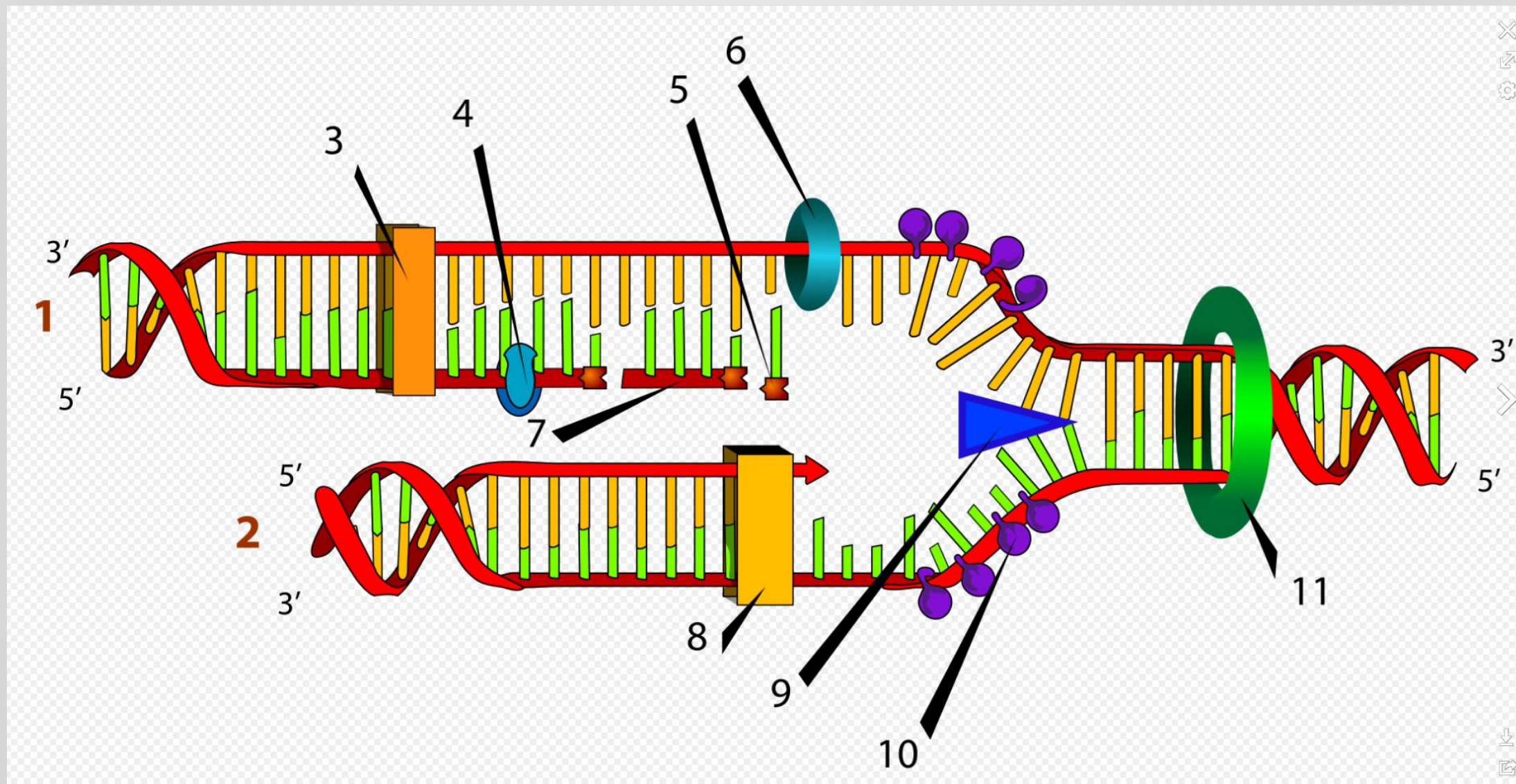
Репликация ДНК – синтез двух дочерних молекул на родительской матрице



С помощью специальных ферментов двойная спираль материнской ДНК расплетается на две нити, на каждой образовавшейся нити достраивается вторая нить, образуя две идентичных дочерних молекулы ДНК, которые затем скручиваются в отдельные спирали.

В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки. Этот процесс обеспечивает точную передачу генетической информации из поколения в поколение.

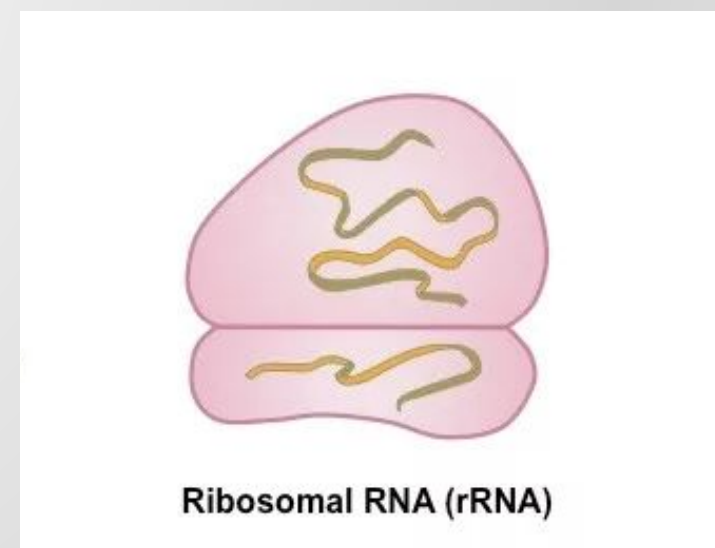
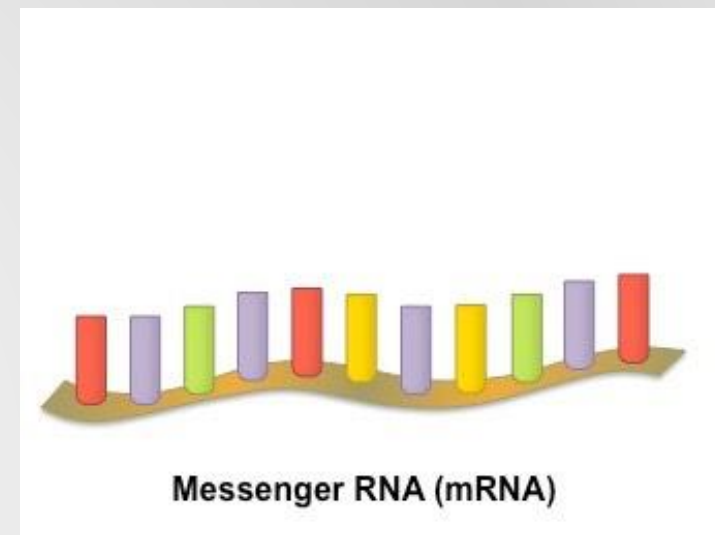




Схематическое изображение процесса репликации, цифрами отмечены: (1) запаздывающая нить, (2) лидирующая нить, (3) ДНК-полимераза (Pol α), (4) ДНК-лигаза, (5) РНК-праймер, (6) праймаза, (7) фрагмент Оказаки, (8) ДНК-полимераза (Pol β), (9) хеликаза, (10) белки, связывающие одноцепочечную ДНК, (11) топоизомераза

Характеристика основных типов РНК в клетке

Типы	Аббревиатура (рус/англ)	Функции
Матричная (информационная) РНК	мРНК, иРНК mRNA	Переносит информацию о строении белка от ДНК к рибосомам
Транспортная РНК	тРНК tRNA	Доставляют аминокислоты к рибосомам
Рибосомальная РНК	рРНК rRNA	Входит в рибосомы, образует активный центр, где синтезируются полипептидные цепи



Как реализуется информация, «записанная» в ДНК

I этап – транскрипция

«переписывание информации» с матрицы ДНК на информационную (или матричную) РНК

II этап – трансляция

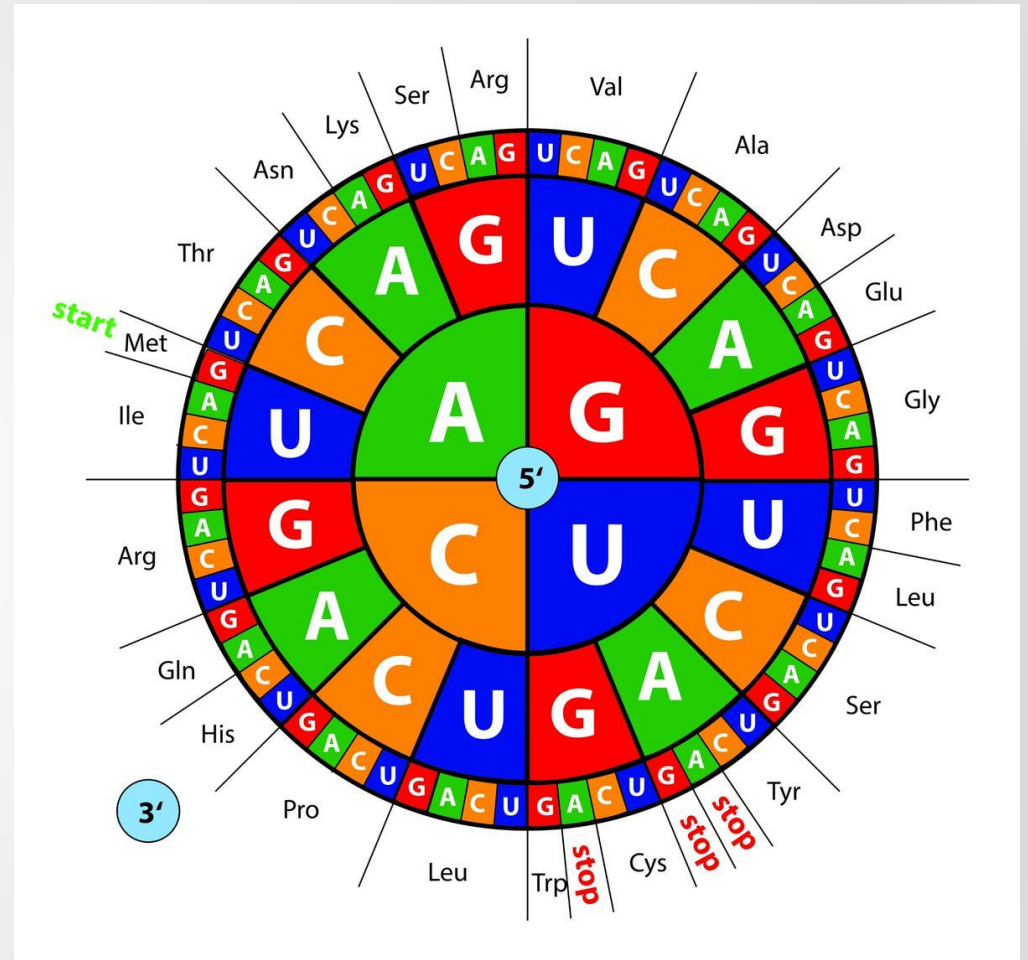
«перевод информации» с матричной РНК в рибосомах в последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Белок – это отдельный полипептидный комплекс нескольких полипептидов, выполняющий биологическую функцию

- Полипептид - понятие химическое.
- Белок - понятие биологическое.

III этап – биогенез белков

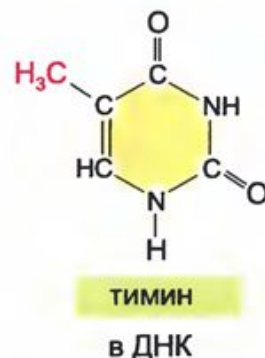
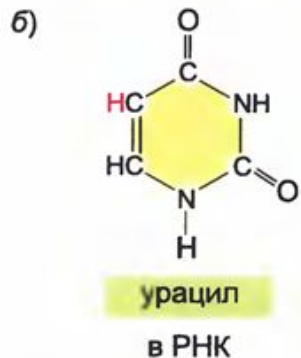
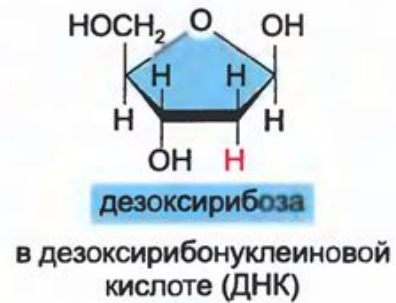
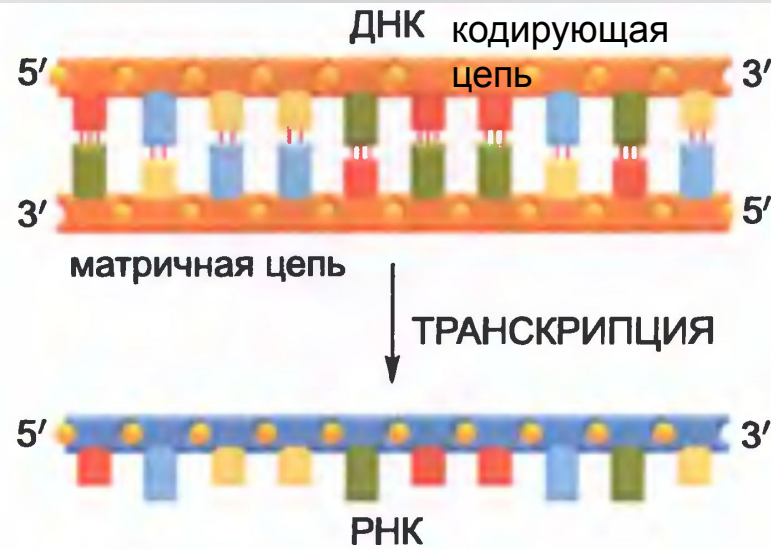
пространственная сборка, химическая или структурная модификация, транспорт белков

в биосинтезе белка у прокариот участвует > 300 макромолекул (до 35% сухого веса клетки *E.coli*)



Из 4х азотистых оснований -- 64 кодона:
61 – кодируют аминокислоты и 3 стоп-кодона

Транскрипция



– синтез на одной из цепей ДНК – комплиментарной ей одноцепочечной молекулы РНК. Процесс транскрипции (букв. переписывания, переложения – англ.) осуществляет фермент РНК-полимераза.

Последовательность событий транскрипции:

- инициация – связывание РНК-полимеразы с ДНК, расплетание цепи в нужном участке;
- элонгация - синтез матричной РНК на матричной цепи ДНК согласно принципу комплиментарности;
- терминация – отсоединения РНК-полимеразы.

Особенности:

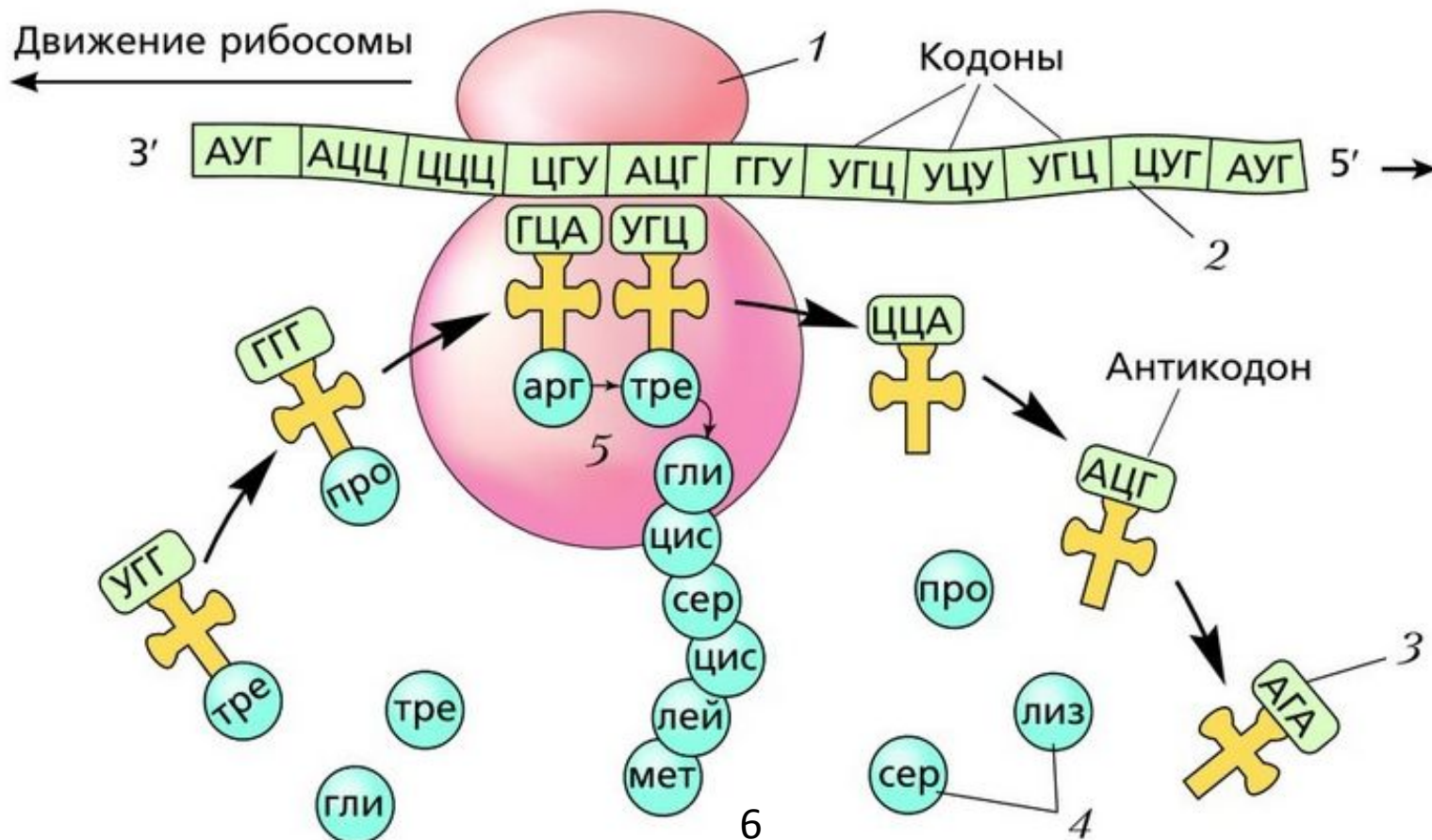
- РНК-транскрипт имеет ту же последовательность, что и участок кодирующей (смысловой) цепи ДНК,
- в РНК тимин заменяется на урацил.

Существует множество ингибиторов транскрипции, большинство из них – антибиотики, например:

рифамицин (и его производное рифампицин) это ингибиторы инициации, актиномицин Д прочно связывается с ДНК и препятствует транскрипции.

Трансляция

Биосинтез белка



1 – малая субъединица рибосомы,
2 – триплет или кодон,
3 – тРНК,
4 – аминокислоты,
5 – большая субъединица рибосомы,
6 – растущая полипептидная цепь

Также разделяют на:
инициацию — узнавание рибосомой стартового кодона и начало синтеза,
элонгацию — собственно синтез белка,
терминацию — узнавание терминирующего кодона (стоп-кодона) и отделение продукта.

Филогенетическая систематика

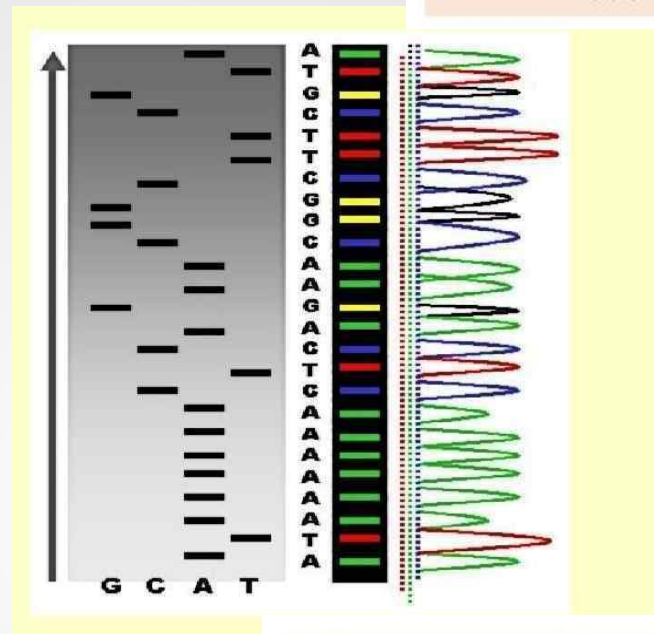
Основу филогенетической систематики -- области знаний, которая выявляет эволюционные связи между организмами для построения естественной классификации), в настоящее время, составляет **геносистематика**. Она основывается на изучении и сравнительном анализе геномов организмов.

Изучение последовательности нуклеотидов в различных фрагментах или целом геном осуществляется с помощью секвенирования.

Для того, чтобы установить «буквенную» последовательность генов – интересующий фрагмент ДНК заданной длины нужно «размножить» в достаточном количестве, чтобы сделать возможной его детекцию.

Именно для многократного «копирования» и служит метод ПЦР

Метод Сэнгера — метод определения последовательности нуклеотидов ДНК, также известен как **метод обрыва цепи**. Впервые метод использован в 1977 году автор удостоен Нобелевской премии по химии в 1980 году.

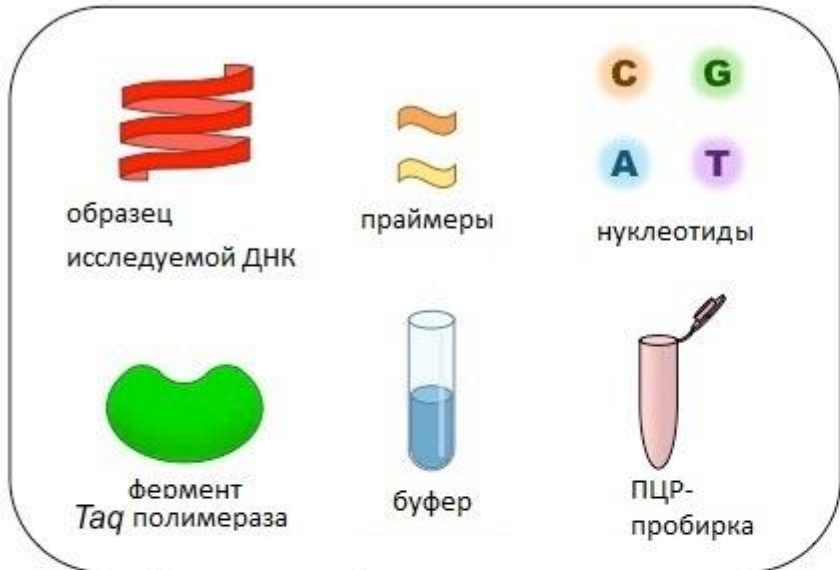


Реакцию с одной и той же матрицей проводят в четырёх разных пробирках, каждая из которых содержит:

- Праймер
- ДНК;
- радиоактивно меченный нуклеотид
- смесь трёх нуклеотидов в оптимальных концентрациях
- четвёртый нуклеотид в более низкой концентрации и производное четвёртого нуклеотида (после их включения синтез обрывается).

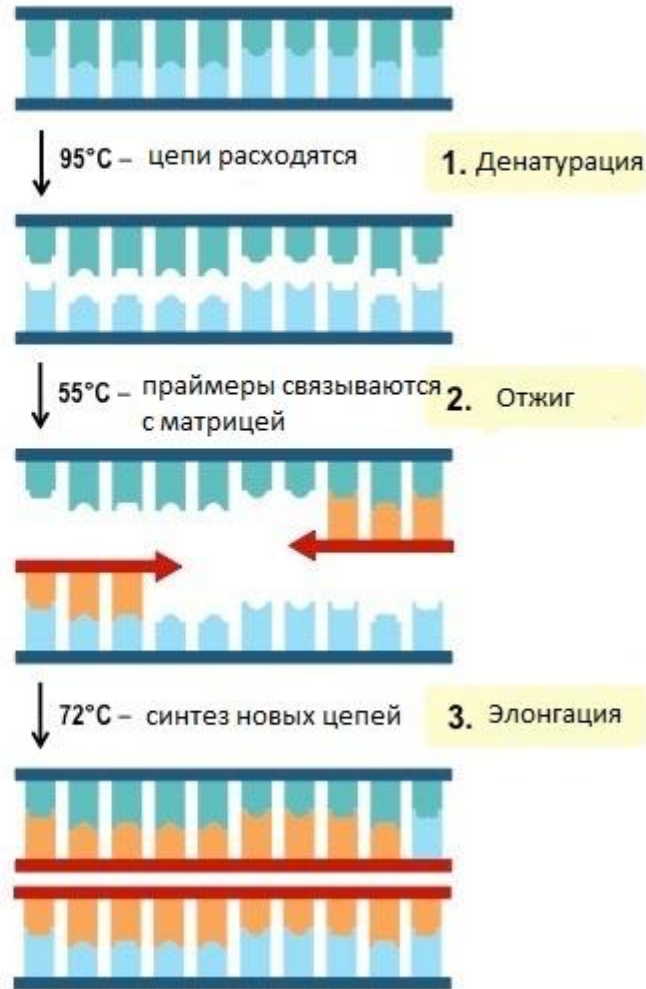
Прежде чем анализировать нуклеотидные последовательности – их необходимо многократно копировать (амплифицировать), чтобы накопить достаточное количество ДНК для детектирования (из одной ДНК за 30-40 циклов ПЦР можно получить до 10^8 ампликонов).

Компоненты для ПЦР-реакции



Амплификатор - прибор, который может быстро изменять или поддерживать температуру в заданном режиме с высокой точностью

Полимеразно-цепная реакция (1 шаг)



1. Денатурация ДНК - расплетение двойной спирали. Протекает при 93-95°C в течение 30-40 сек.

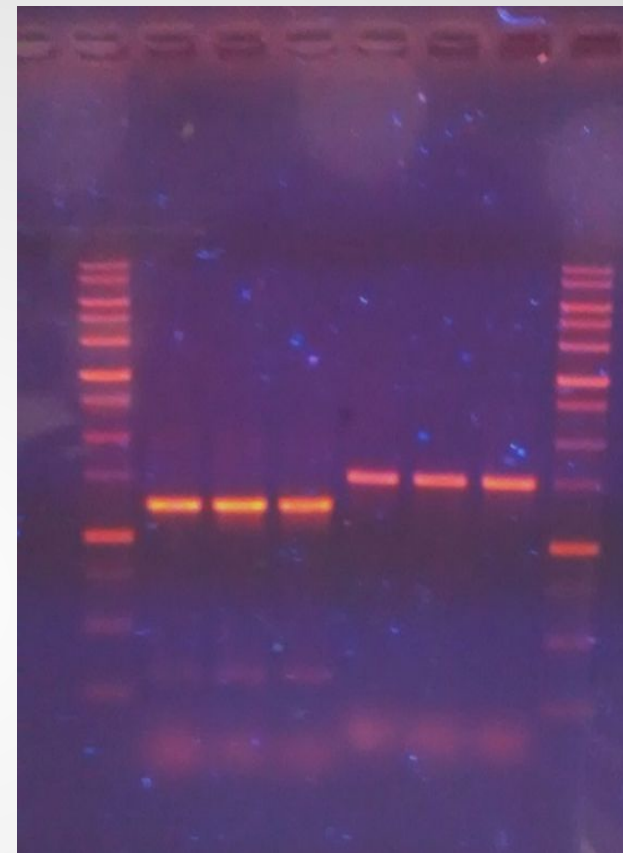
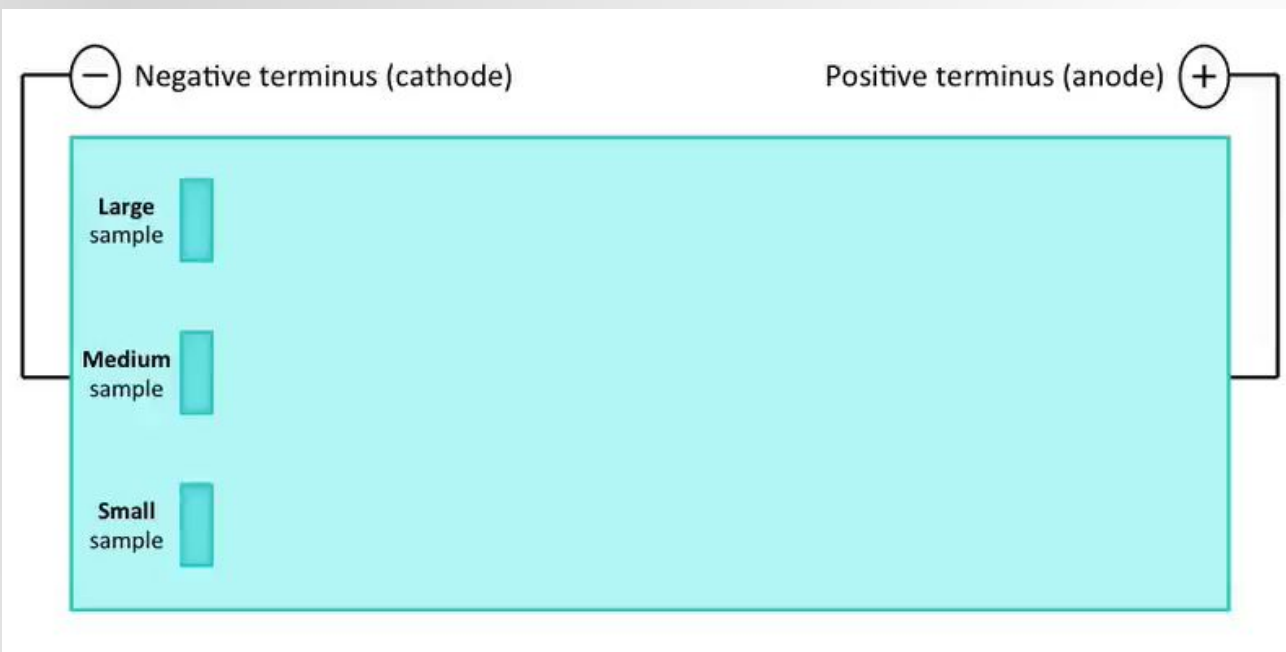
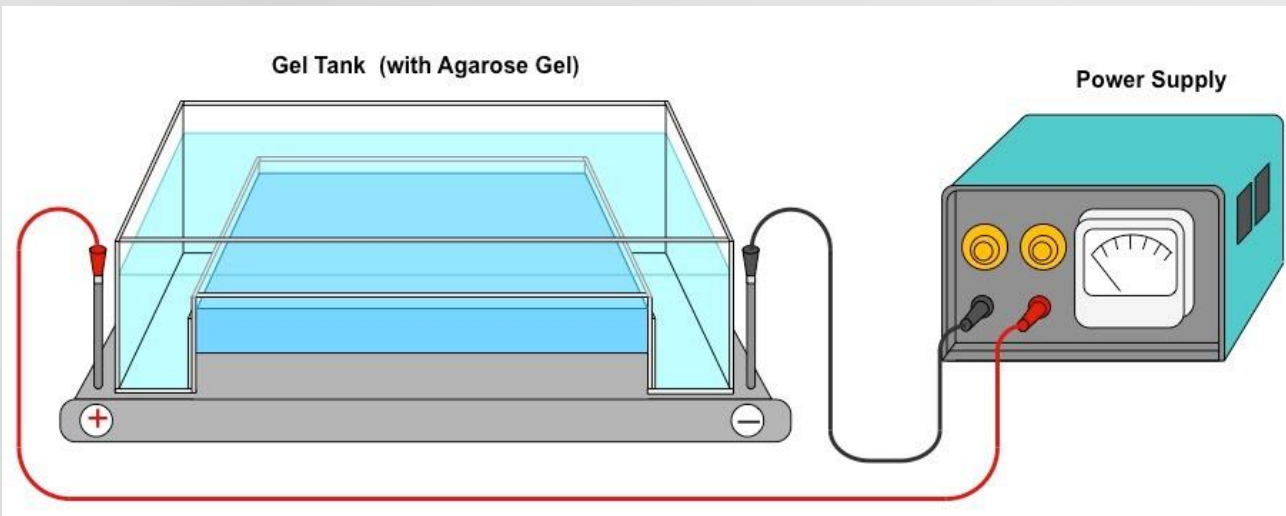
2. Ожиг - присоединение праймеров. Происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для разных праймеров – своя температура отжига (50-65°C).

3. Элонгация - достраивание цепей ДНК. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров.

Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) и проходит при температуре 70-72°C. Время протекания синтеза 20-40 сек.

Вновь синтезированная ДНК – является матрицей для второго и последующего

Электрофорез в агарозном геле: детекция и разделение смеси продуктов амплификации



Сравнение с полосками известной длины (так называемыми ладдерами) позволяет оценить длину полученных фрагментов. Также можно вырезать интересующую полоску геля и выделить из нее интересующую ДНК.

Бромистый этидий образует с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения, которые под действием УФ-облучения способны флуоресцировать: после окрашивания гелевой пластинки можно наблюдать оранжево-красные светящиеся полосы.

Генотипическая изменчивость

Мутации – изменения в геноме – появления генетической изменчивости.

- по происхождению:

спонтанные (естественные)

индуцированные (экспериментальные).

- по широте охвата:

геномные – изменяется количество хромосом,

хромосомные – нарушается строение хромосом (делеции, инверсии, дубликации),

генные – нарушаются последовательности пуриновых и пиримидиновых оснований в ДНК в пределах одного гена, если речь о замене одной нуклеотида – это точечные мутации.

- По направлению:

прямые – из дикого типа в мутантный,

обратные – из мутантного типа обратно в дикий (на два порядка реже возникают):

истинные обратные – восстанавливается и фенотип, и генотип дикого типа,

супрессорные обратные – восстанавливается только фенотип.

Мутагенные факторы

Физические – различные виды излучений (ионизирующее излучение, УФ-излучение и даже ИК-излучение);

Химические

- некоторые алкалоиды: колхицин — один из самых распространённых в селекции мутагенов, винкамин, подофиллотоксин;
- окислители и восстановители (нитраты, азотистая кислота и её соли — нитриты, активные формы кислорода);
- алкилирующие агенты (например, иодацетамид, эпоксибензантрацен);
- нитропроизводные мочевины: нитрозометилмочевина, нитрозоэтилмочевина, нитрозодиметилмочевина — часто применяются в сельском хозяйстве;
- этиленимин, этилметансульфонат, диметилсульфат, 1,4-бисдиазоацетилбутан (известный как ДАБ);
- некоторые пестициды (пестициды группы альдрин, гексахлоран);
- некоторые пищевые добавки (например, ароматические углеводороды (бензол и т.п.), цикламаты);
- продукты переработки нефти;
- органические растворители;
- лекарственные препараты (например, цитостатики, препараты ртути, иммунодепрессанты).

Биологические:

- специфические последовательности ДНК — транспозоны;
- некоторые вирусы (вирус кори, краснухи, гриппа);
- продукты обмена веществ (продукты окисления липидов);
- антигены некоторых микроорганизмов.

Генетические рекомбинации у прокариот

- «перетасовка генов», когда в хромосому одной бактерии (реципиента) встраивается фрагмент ДНК другой бактерии (донора);
- возникают новые последовательности в результате перестроений (разрывов, вставок, соединений) исходной молекулы ДНК;
- происходят вследствие процессов **трансформации, конъюгации, трансдукции**;
- бывают законные и незаконные:

<u>Законная</u>	<u>Незаконная</u>
<ul style="list-style-type: none">• Требуется наличие протяженных комплементарных участков ДНК в рекомбинируемых молекулах• Происходит только между близкородственными видами	<ul style="list-style-type: none">• Не требует наличия протяженных комплементарных участков ДНК• Происходит при участии Is-элементов, обеспечивающих быстрое встраивание в хромосому

Трансформация

-- ДНК из разрушенной бактериальной клетки попадает в неповрежденную бактерию-реципиент. Для эукариотических клеток – это явление трансфекции.

К трансформации способны многие бактерии, например, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Bacillus*, актиномицеты, цианобактерии и другие бактерии. Так, антигенная вариация, наблюдаемая у возбудителя гонореи *Neisseria gonorrhoeae*, обеспечивается за счёт трансформации, при которой клетки передают друг другу гены различных вариантов пилей, за счёт которых прикрепляются к клеткам организма-хозяина.

В нормальном состоянии проникновению крупных молекул ДНК внутрь бактериальных клеток мешают плотные покровы, поэтому, чтобы быть способной к трансформации, клетка должна войти в так называемое состояние компетентности. В естественных условиях компетентность приобретает часть культуры в логарифмической фазе роста под действием некоторых белков (факторов компетентности).

Развитие компетентности в лог-фазе обусловлено нехваткой питательных веществ и накоплением значительного количества факторов компетентности. Трансформацию могут провоцировать бактериофаги, вызывающие выход ДНК из погибающих клеток, а также повреждения бактериальной ДНК. Приобретение компетентности — чрезвычайно сложный физиологический процесс, у *Bacillus subtilis* он требует экспрессии около 40 генов.

Сначала компетентные клетки связывают ДНК своей поверхностью с помощью особых рецепторов, причём линейными фрагментами клетка трансформируется гораздо легче, чем кольцевыми. ДНК расщепляется нуклеазами до фрагментов с массой до 4—5 миллионов Да, причём в клетку поступает лишь одна из двух цепей фрагментов. Некоторые бактерии, такие как пневмококки и *Bacillus subtilis*, могут поглощать ДНК из разнообразных источников, а другие, такие как *Haemophilus*, могут поглощать только ДНК клеток своего вида. Фрагменты, имеющие массу менее 500 кДа, в клетку не попадают.

После попадания в клетку одноцепочечный фрагмент встраивается в геномную ДНК клетки-реципиента. Трансформация длится от 10 до 30 минут и у разных бактерий происходит с частотой около 1 %.

Трансдукция

- перенос ДНК в клетку-реципиент с помощью бактериофага или вируса;
- специфическая (перенос определенных генов, расположенных вблизи встраивания фага) или неспецифическая (случайный захват бактериальных генов);
- лизогения – носительство бактерией профага (фага, встроенного в геном);
- лизогенная конверсия – приобретение новых свойств благодаря интеграции умеренного фага в хромосому бактерии.

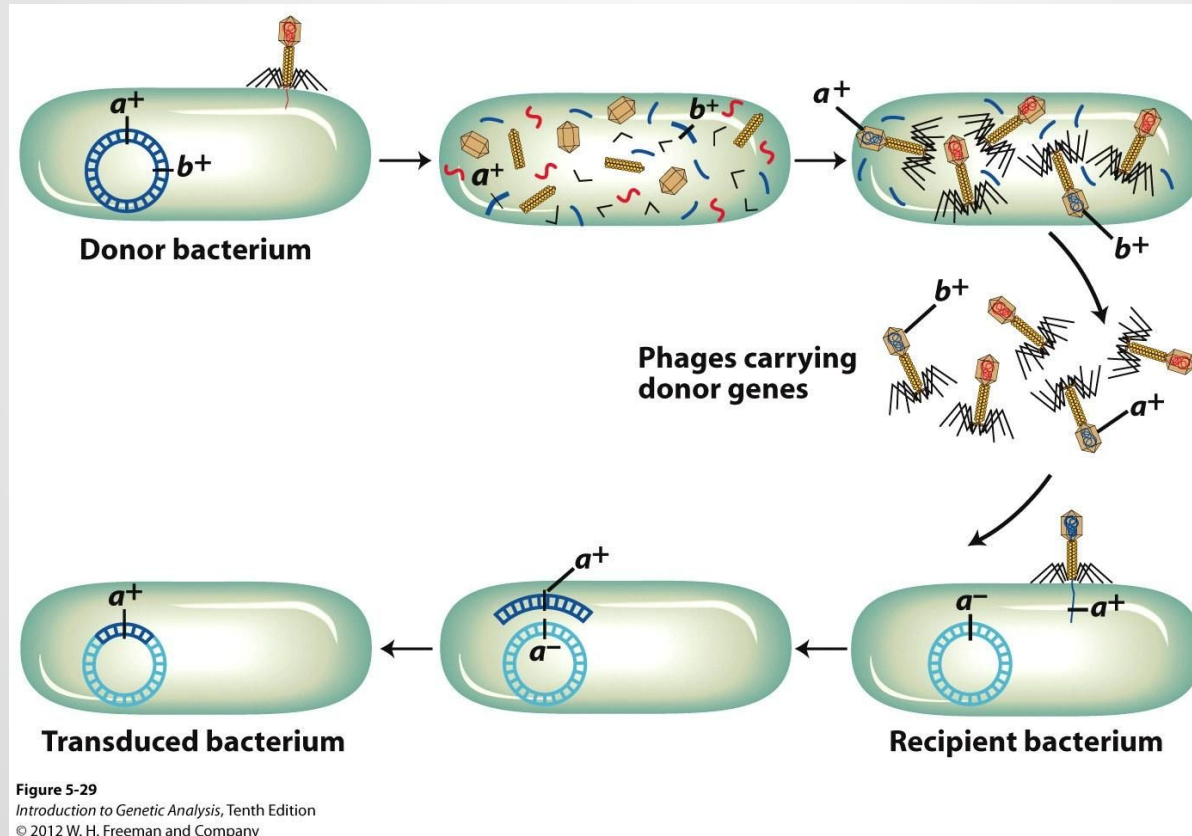
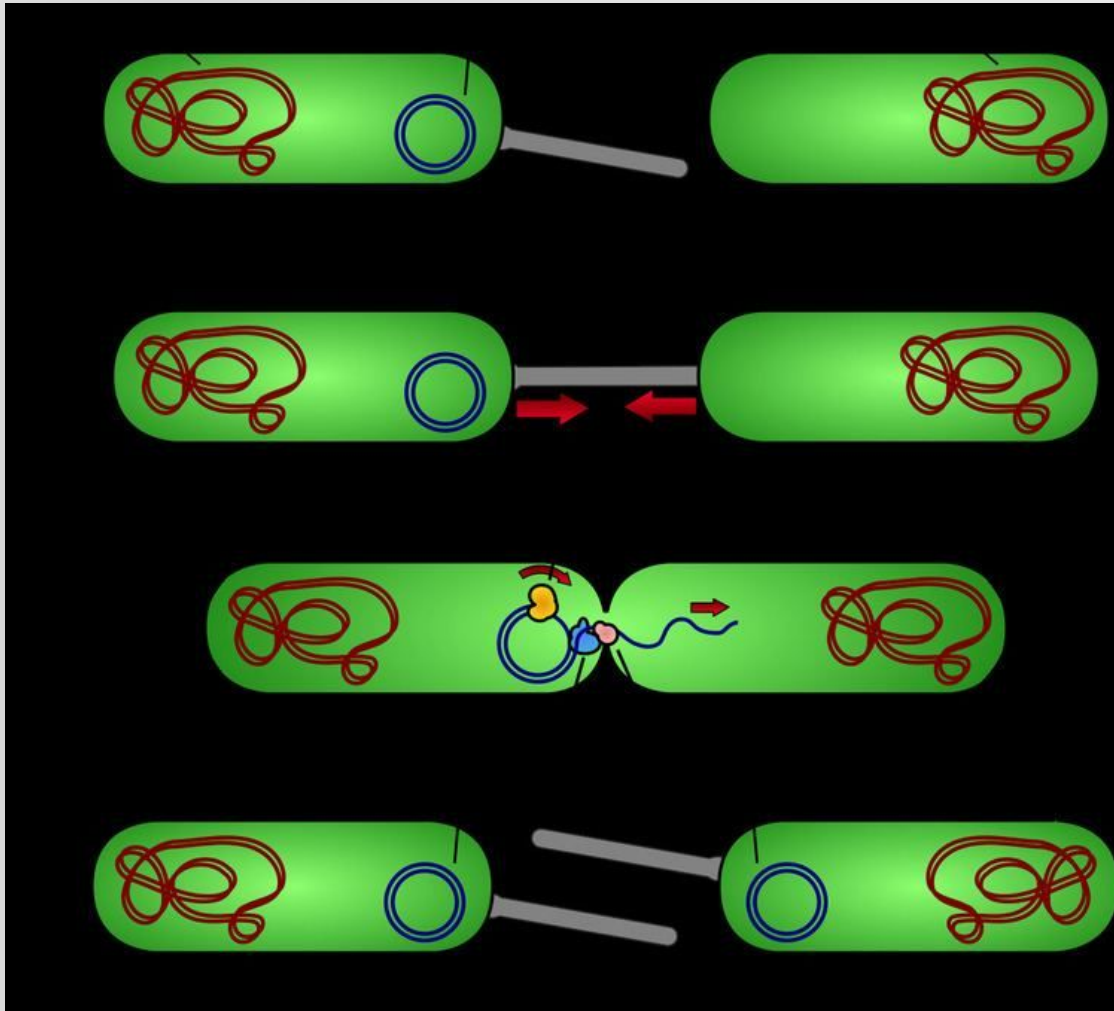


Figure 5-29
Introduction to Genetic Analysis, Tenth Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Конъюгация – генетический обмен у бактерий



1. Клетка-донор выпускает половой пиль.
2. Пиль прикрепляется к клетке-реципиенту, соединяя две клетки.
3. В мобильной плазмиде происходит односторонний разрыв, и одна цепь ДНК переходит в клетку-реципиент.
4. Обе клетки достраивают вторую цепь ДНК плазмиды, восстанавливая двуцепочечную кольцевую плазмиду, и образуют половые пили. Теперь обе клетки являются полноценными донорами.

Белок пилей кодируется геном, который несет сама F-плазмида, и имеет гомологию с некоторыми капсидными белками фагов. Плазмиды могут являться потомками некоторых вирусов, приспособившихся к персистированию в клетках хозяев.

Внехромосомные факторы наследственности

Автономные
(репликоны)

Плазмиды

небольшие молекулы ДНК, физически обособленные от хромосом и способные к автономной репликации, главным образом, у бактерий и архей.

Неавтономны
е

Транспозоны

это мобильные участки ДНК организмов, способные к передвижению (транспозиции) и размножению в пределах генома, т.н. «прыгающие гены»

IS -последовательности

от англ. *insertion sequences* - это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного места в другое

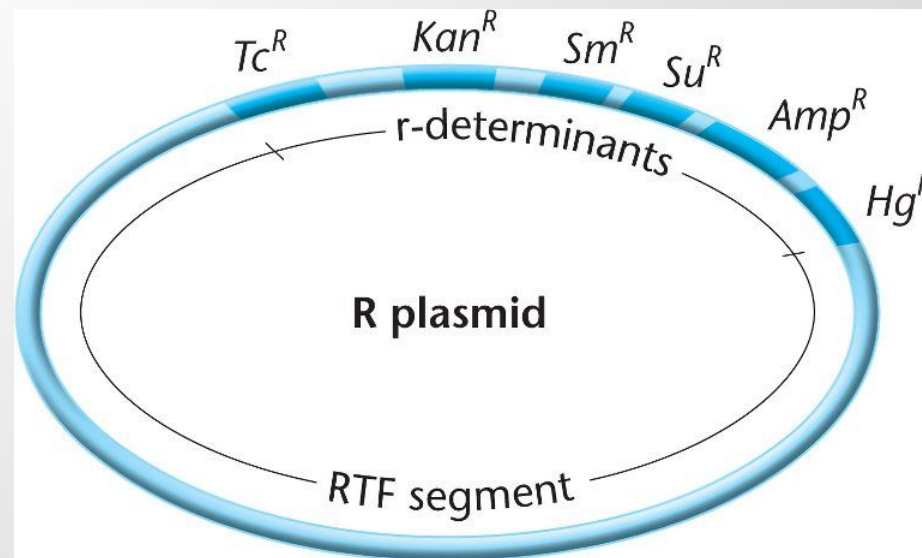
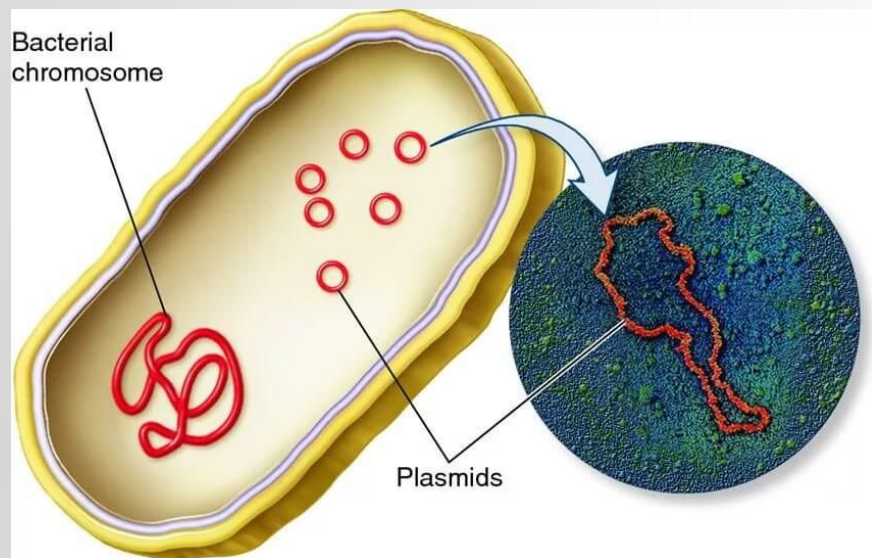
Умеренные
фаги

встраиваются в хромосому бактерий в определенном участке, при делении клетки реплицируются вместе с ней и переходят в дочерние клетки

Плазмиды – небольшие двухцепочечные молекулы ДНК, масса которых на два порядка меньше массы хромосомы. Несут 40-50 генов. Необязательные компоненты клеток, но могут кодировать новые признаки, которые обеспечат выживание клона бактерий в изменившихся условиях среды.

Конъюгативные – передаются с помощью конъюгации,
неконъюгативные – способны самостоятельно проникать в клетку.

В цитоплазме бактерий плазмиды способны к самостоятельной репликации, также могут интегрировать в бактериальную хромосому, обмениваться генетическим материалом друг с другом и с ДНК клетки-хозяина.



Классификация плазмид

Типы плазмиды	Какие гены несут	Примеры
F-плазмиды	гены половых пилей, которые обеспечивают возможность конъюгации	
Col-плазмиды	гены синтеза бактериоцинов (белков, задерживающих рост близкородственных бактерий)	<i>E.coli</i> продуцирует колицины, <i>Y.pestis</i> -- пестицины, <i>S.aureus</i> -- стафилоцины
R-плазмиды	гены устойчивости к антибиотикам, например, гены ферментов, разрушающих антибиотики	Бета-лактамазные плазмиды <i>Staphylococcus aureus</i>
Плазмиды биodeградации	гены ферментов для утилизации органических соединений, которые бактерии используют в качестве источника углерода и энергии	Как правило, ферменты одного метаболического пути. Распространены у псевдомонад: утилизация салициловой кислоты, октана, камфоры
Криптические плазмиды	не проявляются фенотипически	

Мигрирующие генетические элементы

Mu- бактериофаг способен интегрировать в любой участок бактериальной ДНК, обуславливая мутагенный эффект. Его включение вызывает изменение в последовательности оснований бактериального гена. В результате кодируемый геном продукт не синтезируется. Появляются ауксотрофные и другие мутанты.

Is - элементы и транспозоны при включении в ДНК вызывают изменение последовательности азотистых оснований по обе стороны от включенного элемента. В результате индуцируются генные мутации. При этом может наблюдаться подавление функции не только гена, в который включен транспозируемый элемент, но и прилегающих к нему соседних генов.

Важной особенностью транспозируемых элементов является то, что они, будучи включенными в ДНК, могут вызывать наряду с генными мутациями еще и сложные перестройки хромосомы бактерий, т.е. хромосомные мутации: инверсии, делеции и дубликации.