Лекция 6. ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

 Рождением генетики как науки принято считать середину 19в., когда монах Грегор Мендель продемонстрировал в своих опытах с горохом феномен наследственности. Затем лишь в начале ХХв. открытый Менделем феномен наследственности был «открыт» заново, и ученые работали, в основном, с растениями (зерновыми) и плодовыми мушками - дрозофилами. Термин «генетика» был предложен британским биологом William Bateson в 1906 г. Но вскоре генетики стали использовать в своих экспериментах бактерии.

Бактерии имеют значительное преимущество как удобная модель для генетических исследований, благодаря их уникальным свойствам. Их отличает:

1. относительная простота строения генома, позволяющая выявлять мутанты с частотой 10-9 и ниже;
2. гаплоидность, исключающая явление доминантности (нет аллелей);
3. половая дифференциация в виде донорских и реципиентных клеток;
4. наличие обособленных, и интегрированных фрагментов ДНК (плазмид, транспозонов и т.д.);
5. лёгкость культивирования и высокая скорость размножения, дающая возможность получения популяций, содержащих миллиарды микробных тел в короткие сроки. Неудивительно, что мы гораздо больше знаем о генетике бактерий, чем о генетике растений, несмотря на то, что изучением растений генетики занялись намного раньше.

Именно элегантные эксперименты ученых на бактериях и вирусах позволили получить важнейшие данные **о природе генетической информации, генетическом коде и о мутациях**.

А молекулярная генетика — одно из основных направлений молекулярной биологии, изучающей фундаментальные основы жизни — долгое время являлась не чем иным, как генетикой бактерий и бактериофагов.

К 2010 году были составлены карты геномов бактерий – постоянных обитателей организма человека - 3 млн генов включает генофонд аутомикробиоты (всего известны 8 млн генов микробов и 20 млн генов человека). **Наша индивидуальность - совокупность генов человека и генов его микробиоты.**

Изучение генетики бактерий имеет также и несомненный прикладной интерес для медицинской микробиологии, например, в плане установления механизмов передачи патогенных свойств МИО и их устойчивости к лекарственным препаратам и широкого распространения этой устойчивости среди многих видов бактерий.

**Генетика бактерий -** это наука о наследственности и изменчивости микроорганизмов.

**Наследственность -** это сохранение постоянства свойств вида в поколении, т. е. воспроизведение себе подобных благодаря передаче генов от родителей потомкам. **Изменчивость –** появлениеразличия в свойствах между особями одного вида, т.е. изменение характерных для данного организма свойств под действием различных факторов.

У бактерий наследственная информация закодирована в геноме. **Геном** бактерий - совокупность всех **генов** в клетке. **Ген - уникальная** структурная **единица наследственности, носитель и хранитель жизни.** Информация в геноме бактерий закодирована в последовательности нуклеотидов. **Код триплетный**, поскольку **кодон** - функциональная единица, кодирующая синтез 1 аминокислоты,- состоит из трех пар оснований (букв), или нуклеотидов. **1 кодон = 1 аминокислота.**

Ген состоит из кодонов. Расположение кодонов определяет последовательность аминокислот в полипептидной цепи, т.е. первичную структуру соответствующего белка: **1 ген = 1 белок.**

По механизму действия все гены можно подразделить на структурные и функциональные.

Структурные гены (называемые цистроны) кодируют информацию о каком-либо белке. Функциональные (или регуляторные) гены не содержат информации о конкретном признаке, они управляют активностью структурных генов.

**Хромосома состоит из особых структурно-функциональных единиц - оперонов.**

Оперон – это структурно-функциональная единица организации генома клетки. Один оперон кодирует информацию обо всех белках-ферментах, обеспечивающих один процесс (например, гликолиз).

Структуру лактозного оперона кишечной палочки впервые расшифровали Жакоб и Мано в 1961 г.

*Строение оперона*.

R Pr О ген 1 ген 2 ген 3

!\_\_\_\_\_!\_\_\_\_\_\_!\_\_\_\_\_\_!\_\_\_\_\_\_!\_\_\_\_\_\_\_\_!\_\_\_\_\_\_\_\_!

!функциональные гены! структурные гены !

О – ген-оператор, место прикрепления белка-репрессора, непосредственно включает в работу ген-промотор.

Pr – ген-промотор (активатор), место прикрепления РНК-полимеразы, руководит работой цистронов – структурных генов (ген 1, ген 2 и ген 3).

R – ген-регулятор, регулирует деятельность нескольких генов-операторов и подчиняется внешнему стимулу.

**Геном бактериальной клетки включает нуклеоид (бактериальная хромосома) и уникальные генетические элементы - плазмиды. Хромосома и плазмиды способны к автономному самокопированию - репликации, поэтому их называют репликонами. В составе нуклеоида и плазмид могут находиться подвижные генетические элементы: транспозоны и IS элементы (вставочные, или инсерционные, последовательности).**

**Нуклеоид бактерий** представляет собой 2х цепочечную кольцевую суперспирализованную молекулу ДНК. Бактериальная клетка гаплоидна, а удвоение хромосомы (репликация ДНК) сопровождается делением клетки.

Нуклеоид содержит до 5 миллионов нуклеотидных пар. Он включает в себя от 3 до 5 тыс. генов, кодирующих синтез около 2000 белков. Длина деспирализованной ДНК Escherichia coli составляет 1000 мкм. Гены бактериальной хромосомы содержат информацию о жизненно важных функциях клетки: функции питания, дыхания, роста и размножения.

**Плазмиды** - экстрахромосомный генетический материал (ДНК), т.е. вне хромосомные факторы наследственности. Наличие плазмид - уникальное явление, характерное только для бактерий. По размерам ДНК плазмид бактериальной клетки могут составлять до 5% ДНК нуклеоида. Они несут 40-50 генов (т.е. в 100 раз меньше хромосомы).

**Свойства плазмид**

1.Среда обитания плазмид - только бактерии (среда обитания вирусов, кроме вирусов бактерий – бактериофагов, это растения и животные).

2. Геном представлен короткой двунитевой молекулой ДНК.

3. Плазмиды не содержат жизненно необходимых для бактерий генов. Они сосуществуют с бактериями, наделяя их дополнительными свойствами (селективными преимуществами). Вирусы же, чаще всего, вызывают отрицательный последствия - лизис клеток.

4.Плазмиды представляют собой “голые” геномы, не имеющие никакой оболочки, их репликация не требует синтеза структурных белков и процессов самосборки.

5. Плазмиды могут находиться в 2-х альтернативных состояниях: автономном и интегрированном. В автономном состоянии плазмида представлена кольцевой молекулой ДНК, свободно лежащей в цитоплазме. В автономном состоянии плазмида способна к репликации независимо от хромосомы и с большой скоростью.

В интегрированном состоянии плазмида (эписома) встроена в хромосому бактериальной клетки и реплицируется вместе с ней.

**Классификация плазмид**

По количеству плазмид в клетке выделяют однокопийные и многокопийные (до 200 копий) плазмиды.

По способности присутствовать в одной клетке нескольких видов плазмид они подразделяются на совместимые и несовместимые. Близкородственные плазмиды не способны стабильно сосуществовать, что позволило объединить их по степени родства в Inc- группы (incompatibility- несовместимость).

По способности распространяться в популяции (по вертикали - при клеточном делении, и по горизонтали – между разными особями) выделяют трансмиссивные и нетрансмиссивные плазмиды. Трансмиссивные (или конъюгативные) плазмиды переносятся от бактерии к бактерии внутри вида или между представителями близкородственных видов в процессе конъюгации. Механизм самопереноса контролируют гены tra- оперона. Чаще всего трансмиссивными плазмидами являются F - или R -плазмиды. Подобные плазмиды относительно крупные (25-150 млн Д) и часто выявляются у грамотрицательных палочек. Большие плазмиды обычно присутствуют в количестве 1-2 копий на клетку и их репликация тесно связана с репликацией бактериальной хромосомы.

Нетрансмиссивные плазмиды обычно имеют небольшие размеры и характерны для грамположительных кокков, но встречаются также у некоторых грамотрицательных микроорганизмов (например, у Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae). Мелкие плазмиды могут присутствовать в больших количествах (более 30 на клетку), так как только наличие такого количества обеспечивает их распределение в потомстве во время клеточного деления. При наличии в бактерии одновременно трансмиссивных и нетрансмиссивных плазмид донор может передавать и нетрансмиссивные плазмиды за счет связывания генетического материала последних с факторами, обеспечивающими их перенос в процессе конъюгации.

По свойствам и функциям, которыми они наделяют бактерии, выделяют следующие категории плазмид:

1. F-плазмиды придают бактериальной клетке донорские функции, т.к. они кодируют синтез секс-пилей. Удвоение ДНК таких плазмид в цитоплазме индуцирует репликацию бактериальной хромосомы и деление бактерий, т.е. увеличивает их «плодовитость» (от англ. fertility - плодовитость). Интегрированные F -плазмиды называют Hfr -плазмиды или Hfr -факторы (от англ. high frequency of recombinations - высокая частота рекомбинаций). Hfr -факторы осуществляют перенос части генетической информации данной хромосомы в другую клетку.

2.R - плазмиды (от англ. resistance - устойчивость) - устойчивость к лекарственным препаратам. R -плазмиды содержат гены, детерминирующие синтез ферментов, которые разрушают антибактериальные препараты. В результате бактериальная клетка становится устойчивой к действию целой группы лекарственных веществ. Многие R -плазмиды являются трансмиссивными и, распространяясь в популяции бактерий, переносят резистентность к воздействию антибактериальных препаратов.

3.Col- плазмиды - синтез колицинов (бактериоцинов)- факторов конкуренции близкородственных бактерий (антогонизм). На этом свойстве основано колицинотипирование штаммов.

4.Hly- плазмиды - синтез гемолизинов.

5.Ent- плазмиды - синтез энтеротоксинов.

6.Tox- плазмиды - токсинообразование.

Плазмиды патогенности контролируют вирулентные свойства микроорганизмов, детерминируя синтез факторов патогенности. Так, например, Ent -плазмида определяет синтез энтеротоксина. Развитие инфекционного процесса, вызванного возбудителями чумы, сибирской язвы, кишечного иерсиниоза, клещевого иксодового боррелиоза связано с функционированием плазмид патогенности.

**Биологическая роль плазмид** многообразна, в том числе:

- участие в генетическом обмене между бактериями;

- кодирование синтеза факторов патогенности;

- совершенствование защиты бактерий.

Т.о. бактерии для плазмид - среда обитания, плазмиды для них - переносимые между ними дополнительные геномы с наборами генов, благоприятствующих сохранению бактерий в природе.

Подвижные генетические элементы (мобильные элементы генома, или мигрирующие генетические элементы) не способны самостоятельно реплицироваться, а удваиваются вместе с репликоном, в который они встроены. Они способны перемещаться вдоль хромосомы или между хромосомой и плазмидой с помощью **фермента рекомбинации транспозазы**. К ним относятся:

1.  Вставочные, или инсерционные, последовательности (IS элементы) - это участки ДНК, которые могут целиком перемещаться из одного участка репликона в другой участок либо из хромосомы в плазмиду и обратно. IS элементы содержат только один ген транспозазы, необходимый для перемещения, и ген репрессора. Величина IS- элементов не превышает 1500 пар оснований.

Они не являются жизненно необходимыми, так как не кодируют информацию о синтезе ферментов, участвующих в метаболизме бактериальной клетки.

Они могут инактивировать гены, в которые включились («выключение» гена) или, встраиваясь в хромосому, проявлять эффект промотора, включающего или выключающего транскрипцию соответствующих генов.

2. Транспозоны (Tn- элементы) включают до 25 тысяч пар нуклеотидов, содержат фрагмент ДНК, несущий структурные гены и два Is- элемента. Каждый транспозон содержит гены, привносящие важные для бактерии характеристики, как и плазмиды (множественная устойчивость к антибиотикам, токсинообразование и т.д.). Транспозоны также способны к перемещению, могут встраиваться и перемещаться среди ДНК хромосом, плазмид, умеренных фагов, не требуя гомологичных участков ДНК, т.е. обладают потенциальной способностью распространяться среди различных видов бактерий.

**Понятие о генотипе и фенотипе**.

Как и у других организмов, совокупность генов бактериальной клетки — геном — определяет её свойства и признаки (**генотип**). **Генотип** - потенциальная способность организма к фенотипическому проявлению определенных свойств и признаков, закодированных в геноме. Термин «генотип» в отношении бактерий - эквивалентен понятию «геном».

**Фенотип** бактериальной клетки — проявление генотипа в конкретных условиях обитания, т.е. результат взаимодействий между бактерией и окружающей средой — также контролируется геномом (так как сами признаки закодированы в бактериальных генах).

В основе изменчивости лежит 1 из 2-х механизмов:

1. либо изменение самого генотипа в результате мутации генов или их рекомбинации,
2. либо изменение реакции генотипа на факторы окружающей среды.

В связи *с этим изменчивость подразделяют на 2 вида: наследственную (генотипическую) и ненаследственную (фенотипическую)*.

1. Фенотипическая изменчивость (или модификационная) - изменение проявления определенных свойств организма под влиянием факторов внешней среды (а также под влиянием внутриклеточных факторов) без изменения генотипа. При устранении фактора, вызвавшего модификацию, данные изменения исчезают.
2. Генотипическая изменчивость - изменение свойств в результате изменения ДНК (генетического аппарата).

Примеры проявления фенотипической изменчивости

1. Изменение морфологических признаков
2. Изменение культуральных свойств
3. Изменение биохимической активности

Пример: образование нестабильных L-форм бактерий под действием антибиотиков.

Другой пример: образование красного пигмента у бактерий вида Serratia marcescens происходит при выращивании культуры при комнатной температуре на свету и не происходит при выращивании той же культуры в термостате.

**Генотипическая изменчивость**:

Сопровождается изменением ДНК и стойко передается по наследству.

Генотипическая изменчивость может быть **мутационной и комбинативной**.

Мутационная изменчивость возникает в результате мутации (от mutatio — изменение) - химического изменения в структуре ДНК в пределах одного или нескольких генов. Основу мутации составляют качественные или количественные изменения последовательности нуклеотидов в ДНК, которые могут возникать при жизнедеятельности бактерий под влиянием эндогенных факторов (в их основе лежат ошибки копирования наследственной информации, возникающие при репликации) или при действии химических и физических мутагенов.

Фенотипическим проявлением мутации могут быть: изменение морфологии бактериальной клетки, возникновение потребности в факторах роста (например, в аминокислотах, витаминах), т.е. ауксотрофность; появление устойчивости к антибиотикам; изменение чувствительности к температуре; снижение вирулентности (аттенуация).

Различают следующие виды мутаций:

* Точечные и хромосомные,
* Прямые (приводящие к потере функции) и обратные (восстанавливающие генотип и фенотип),
* Полезные, нейтральные, вредные (летальные, полулетальные),
* Спонтанные и индуцированные.

Спонтанные мутации появляются самопроизвольно в результате ошибок копирования наследственной информации при репликации ДНК.

Спонтанные мутации у бактерий носят ненаправленный характер.

Индуцированные мутации появляются под влиянием внешних факторов – мутагенов. Мутагены бывают физическими (УФ-лучи, гамма-радиация), химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, азотистая кислота, другие соединения) и биологическими (транспозоны).

Теоретически, мутации, вызванные радиацией, химическими веществами или другими факторами, могли бы привести к вымиранию бактериальной популяции, однако в любой живой клетке существуют биохимические механизмы, способные полностью или частично восстанавливать исходную структуру ДНК. Совокупность ферментов, катализирующих реакции коррекции повреждений ДНК, составляют системы репарации.

Комбинативная изменчивость

**Генетическая рекомбинация** – это взаимодействие между двумя геномами, которое приводит к образованию рекомбинаций ДНК и формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих «родителей».

При комбинативной изменчивости не затрагивается химическая структура гена, но изменяется комбинация генов внутри хромосомы.

**Особенности рекомбинаций у бактерий определяются отсутствием истинного полового процесса и мейоза у прокариот и гаплоидным набором генов.**

В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые этот материал воспринимают. В клетку-реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, т.е. один или несколько генов. Образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента с включением фрагментов хромосомы донора.

Передача генетического материала между бактериями осуществляется 3-мя механизмами: **трансформацией, трансдукцией и конъюгацией.**

 Трансформация (от transformatio — преобразование) - перенос изолированной ДНК в реципиентную клетку, которая способна поглотить эту ДНК. Была открыта в 1922-28 гг. Фредериком Гриффитом на примере пневмококка. Он говорил, что введение капсульных пневмококков вызывает гибель лабораторных животных, введение бескапсульных гибели не вызывало. В то же время введение безкапсульных клеток вместе с убитыми капсульными приводило к гибели животного. Из организма павших мышей высевались капсульные пневмококки. Гриффит сделал заключение о том, что под влияние какого-то фактора в организме бескапсульные клетки превращаются в капсульные. В 1944 году механизм этого явления был установлен учеными Эвери, Макклауд, Маккарди. На основании добавления к убитым вирулентным пневмококкам различные энзимов: протеазы, РНК-азы, ДНК-азы они установили, что только присутствие ДНК-азы препятствовало трансформации. А это означает, что трансформация вызвана именно ДНК убитых нагреванием клеток.

 В процессе трансформации выделяют 2 стадии – **1) проникновение** ДНК внутрь клетки реципиента; **2) встраивание** ДНК в гомологичный участок ДНК реципиента. Для трансформации можно использовать как хромосомную, так и плазмидную ДНК.

При трансформации не происходит непосредственного контакта между донором и реципиентом; в трансформации не участвует переносчик-бактериофаг. В настоящее время трансформация является основным методом генной инженерии, используемым при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.

Трансдукция – это перенос генов с помощью переносчика – бактериофага. Бактериофаги, размножаясь в клетке-доноре, захватывают часть ДНК донора и передают клетке реципиенту. Была описана Джошуа.

В соответствии с существованием фагов вирулентных и умеренных существуют и различные типы трансдукции: неспецифическая (общая), специфическая и абортивная.

*Общая (неспецифическая) трансдукция* - перенос бактериофагом фрагмента любой части бактериальной хромосомы. В клетке, инфицированной вирулентным бактериофагом, в ходе сборки дочерней популяции в головки некоторых фагов может проникнуть фрагмент бактериальной ДНК или плазмиды либо вместе с фаговой ДНК, либо вместо нее. Этот процесс происходит вследствие того, что **бактериальная ДНК фрагментируется после фаговой инфекции** и кусочек бактериальной ДНК того же размера, что и фаговая ДНК, проникает в вирусную частицу с частотой приблизительно 1 на 1000 фаговых частиц. При такой форме трансдукции в клетки-реципиенты могут быть внесены практически любые гены. Феномен неспецифической трансдукции может быть использован для картирования бактериальной хромосомы.

*Специфическая трансдукция* наблюдается в том случае, когда фаговая ДНК **интегрирует** в бактерию с образованием профага. При исключении ДНК фага из бактериальной хромосомы в результате случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы. Так как большинство умеренных фагов интегрируют в бактериальную ДНК в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК донора. Специфическая трансдукция может служить механизмом переноса вирулентных генов среди бактерий при условии, что эти гены локализованы в непосредственной близости от мест интеграции профага.

*Абортивная трансдукция.* При абортивной трансдукции внесенный фрагмент ДНК донора не встраивается в хромосому реципиента, а остается в цитоплазме и там самостоятельно функционирует. Впоследствии он передается одной из дочерних клеток (т.е. наследуется однолинейно) и затем теряется в потомстве.

Конъюгацией называется передача генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент путем непосредственного контакта между клетками. В 1946 г. Дж. Ледерберг и Э. Тейтем описали феномен конъюгации — передачи генетического материала из клетки в клетку при непосредственном контакте бактерий. Исследования проводились на штамме Е. coli К12. Перенос генетического материала происходил только в одном направлении; одна клетка являлась донором, другая — реципиентом.

Необходимым условием для конъюгации является наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды (с F-фактором). Трансмиссивные плазмиды кодируют половые пили (F-пили), образующие конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой одна нить плазмидной ДНК передается из клетки-донора в клетку-реципиент. Затем каждая нить достраивается комплементарной нитью, получается двунитевая ДНК в каждой из клеток. В результате такого переноса клетка-реципиент получает донорские свойства (F+).

Клетки-доноры, обладающие F-фактором, обозначаются как F(+)-клетки, а клетки-реципиенты, не имеющие F -фактора – F(-) -клетки. Если F -фактор встраивается в хромосому клетки-донора и начинает функционировать в виде единого с хромосомой трансмиссивного репликона, то хромосома донора приобретает способность передаваться в клетку-реципиент. Донорские клетки, имеющие встроенный в хромосому F -фактор, называются Hfr –клетками (High frequency of chromosomal recombinants). Хромосомная ДНК реплицируется, одна цепь копии хромосомы переносится в реципиентную F (-) -клетку, тогда как другая остается в Hfr (+) -клетке, т.е. донор сохраняет свое генетическое постоянство.

Передача генетического материала при конъюгации начинается с расщепления ДНК в районе локализации F-фактора. Одна нить донорской ДНК передается через конъюгационный мостик в клетку-реципиент. Процесс сопровождается достраиванием комплементарной нити до образования двунитевой структуры. Переданная в реципиентную клетку и достроенная до двунитевой структуры, нить ДНК рекомбинирует с гомологичным участком реципиентной ДНК с образованием стабильной генетической структуры.

Биологическая значимость конъюгации хорошо видна на примере распространения резистентности бактерий к антибиотикам. Устойчивость к антибиотикам бактерия может получить в результате мутации, что происходит 1 раз на каждые 106  клеточных делений. Однако, однажды изменившись, генетическая информация может быстро распространяться среди сходных бактерий посредством конъюгации, поскольку каждая третья из близкородственных бактерий способна именно к этому типу генетического переноса.

Методы рекомбинации широко используются в генной инженерии, например, при конструировании генетически измененных или генетически модифицированных организмов. С этой целью используют рекомбинантную ДНК.

Успехи современной генетики микроорганизмов позволили объяснить ряд явлений и процессов, важных для практики. Выяснены механизмы формирования лекарственной устойчивости бактерий и намечены пути для ее устранения. Получены мутанты — активные продуценты антибиотиков, витаминов и аминокислот, важных для медицинской и хозяйственной практики.

В практике наследственно закреплённые изменения (мутации) применяются для получения вакцинных авирулентных штаммов бактерий. Л. Пастер впервые доказал возможность получения слабовирулентных (аттенуированных) штаммов бактерий в результате направленного искуственного ослабления их вирулентности. Им были получены сибиреязвенные вакцинные штаммы в результате длительного культивирования возбудителя при температуре 42,5оС. Г. Жерар и Ж. Робик получили вакцинный штамм возбудителя чумы (ЕV) в результате серийных пассажей исходной культуры при пониженной температуре (+15 - +20оС) в течение 5 лет. А. Кальмет и С. Жерен получили вакцинный штамм бычьего туберкулёза (БЦЖ) под влиянием длительного культивирования (13 лет) исходной культуры на питательной среде с добавлением бычьей желчи.

Науке сегодня известно менее 1% всех существующих на планете видов прокариот. Эти неизвестные прокариоты являются громадным резервом генетического материала и генетической информации в природе, которые ожидают еще своего применения.