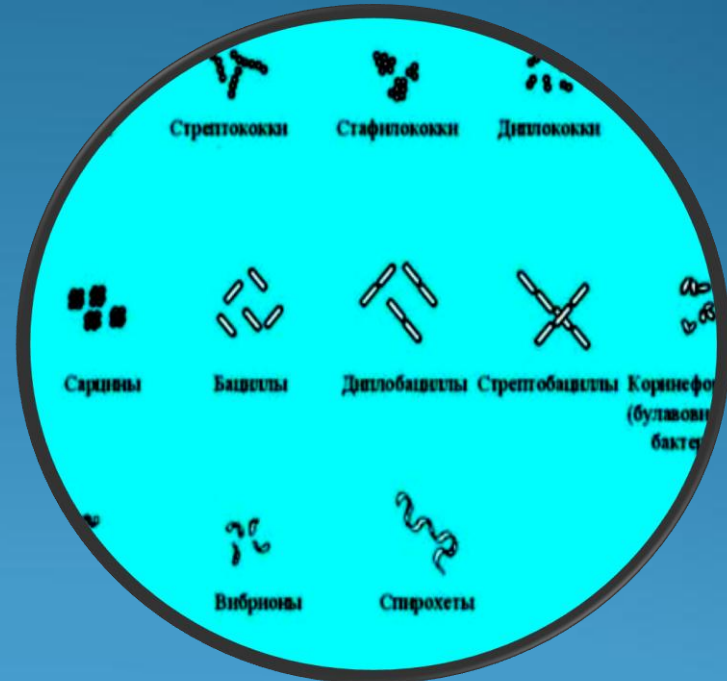
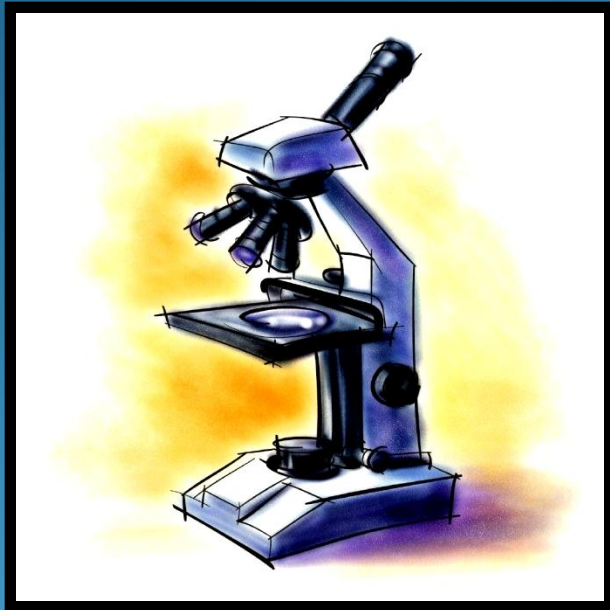


Генетический анализ у прокариот

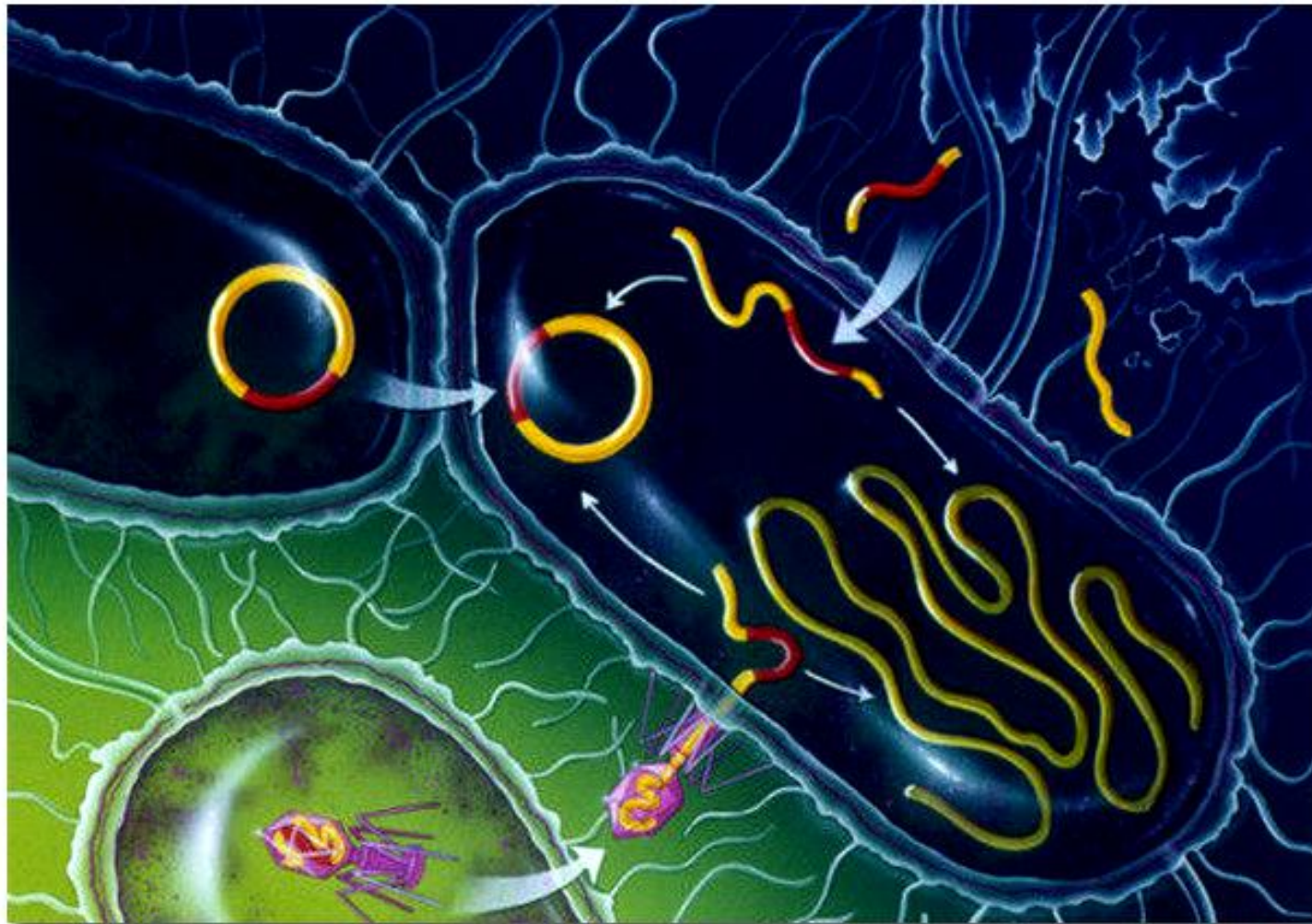


Доцент кафедры МБиГ Новицкая Ирина Вячеславовна

2022 г.

Механизм горизонтального переноса генов - генетические рекомбинации

- Генетические рекомбинации сопровождаются переносом ДНК в одном направлении – от донора к реципиенту, при этом передается не вся молекула ДНК, а лишь небольшой ее участок
- Клетку, в которой произошла рекомбинация, называют рекомбинантом
- У бактерий известны 3 варианта рекомбинаций, отличающиеся способом переноса ДНК:
 - Трансформация,
 - Трансдукция и
 - Конъюгация



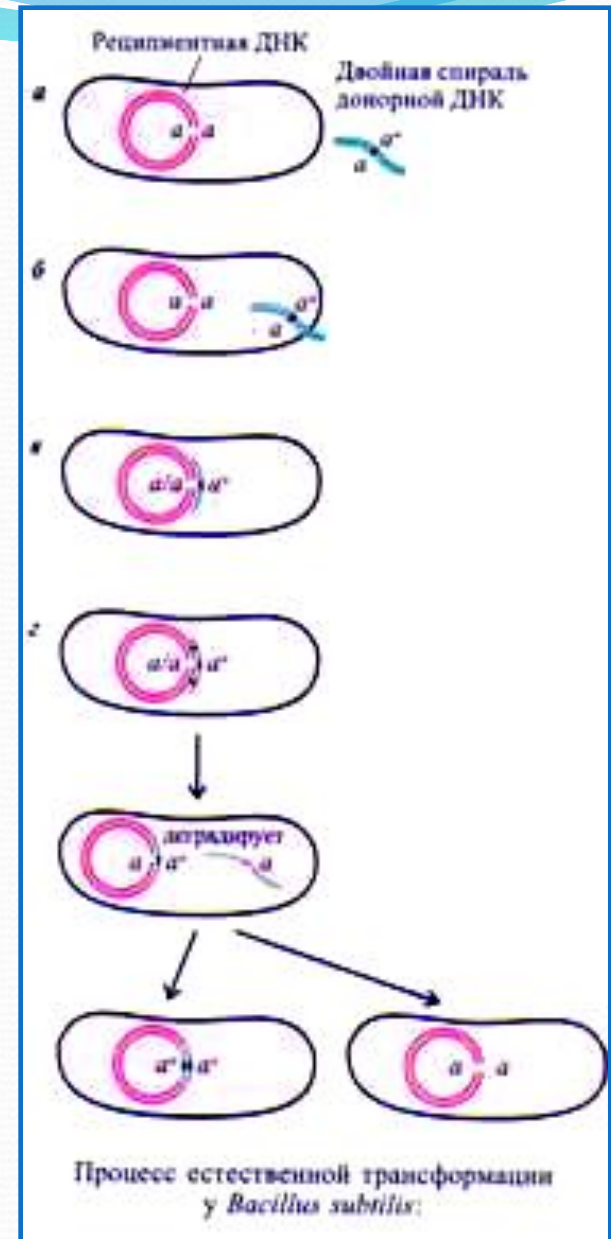
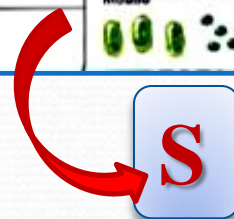
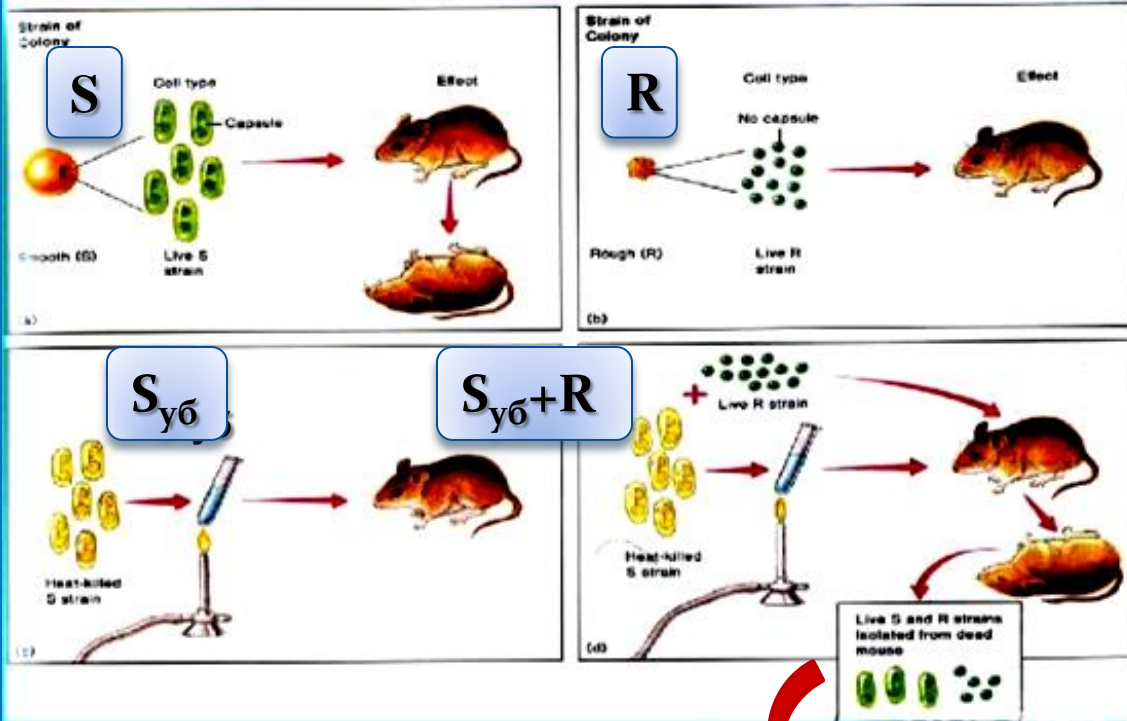
Схема, показывающая возможные способы обмена генами между бактериями: с помощью вирусов, внехромосомных плазмидных ДНК или просто через ДНК от мёртвой клетки (рисунок Bryson Biomedical Illustrations).

Трансформация

- **Трансформация** - разновидность рекомбинативной изменчивости микроорганизмов, сопровождающаяся переносом ДНК от донора к реципиенту через окружающую среду; т.е.
- Поглощение и встраивание в геном бактериальной клетки интактной ДНК из окружающей среды
- В процессе трансформации ДНК-фрагмент погибшей и разрушенной бактерии встраивается в ДНК реципиента, находящегося в состоянии компетенции
- Впервые продемонстрирована в 1928 г. Ф. Гриффитом
- Описана как у грамположительных, так и грамотрицательных бактерий родов *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Escherichia*, *Pneumococcus*

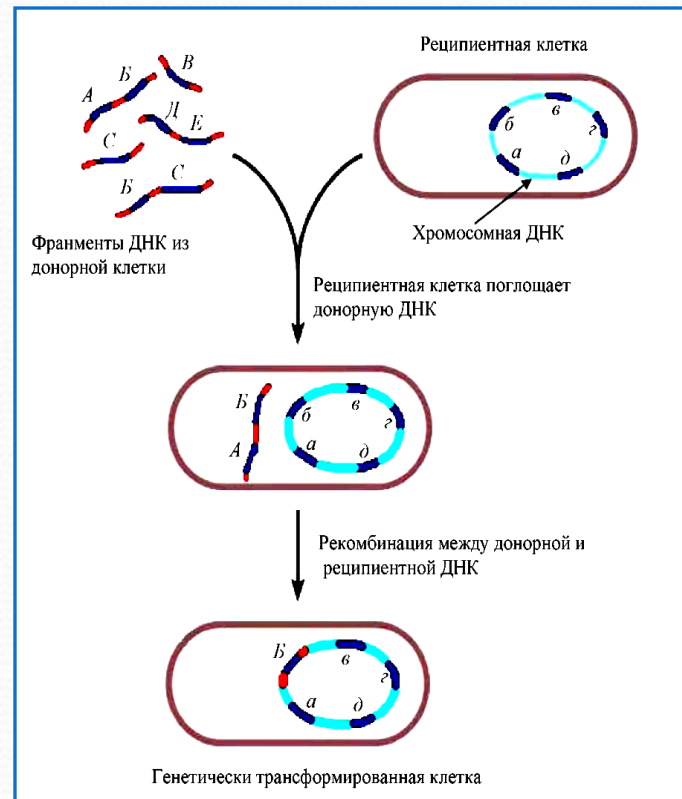
Схема трансформации:

Трансформация (опыты Гриффитса, 1928; Евери Мк Леода и Макарти, 1944)



Для осуществления трансформации требуется:

1. Компетентность клеток – реципиента
2. Размеры донорской ДНК не менее $3 \cdot 10^5$ Да (300 кДа, или 500 п.н.)
3. Интактность двухцепочечной донорской ДНК



1 п.н. = 617 Да

Т.е. Условия трансформации:

1. Наличие относительно **небольшого** (до 20 генов, **$3 \cdot 10^5$**) **интактного** фрагмента
2. **Двухцепочечной ДНК** донорской клетки
(*Одноцепочечные или меньшего размера ДНК быстро разрушаются нуклеазами окружающей среды*)
3. Наличие реципиента, находящегося в состоянии **компетенции** и продуцирующего на поверхность клетки **фактор компетентности**

Компетенцией называют состояние проницаемости бактериальных мембран для ДНК, это сложные изменения в клетке под действием **com-генов**, продуцирующих определенные ДНК-связывающие белки

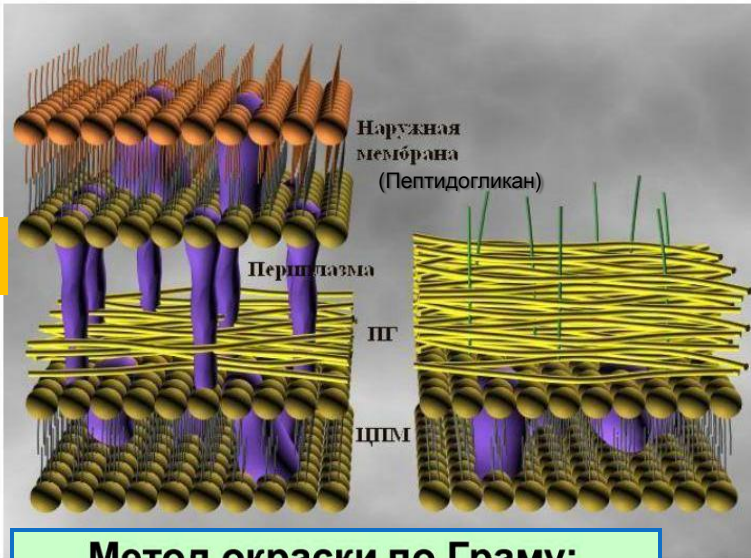
Com – (communicant) - связывающий

Компетентность реципиента
подразумевает:

- **Пористость КС**
- **Впячивания ЦПМ**
- **Экспрессия (выделение) фактора компетентности (рецепторные белки) на поверхности КС**

Грам-отрицательные и грам-положительные бактериальные клетки:

НМ
ППП
ПГ
ЦПМ

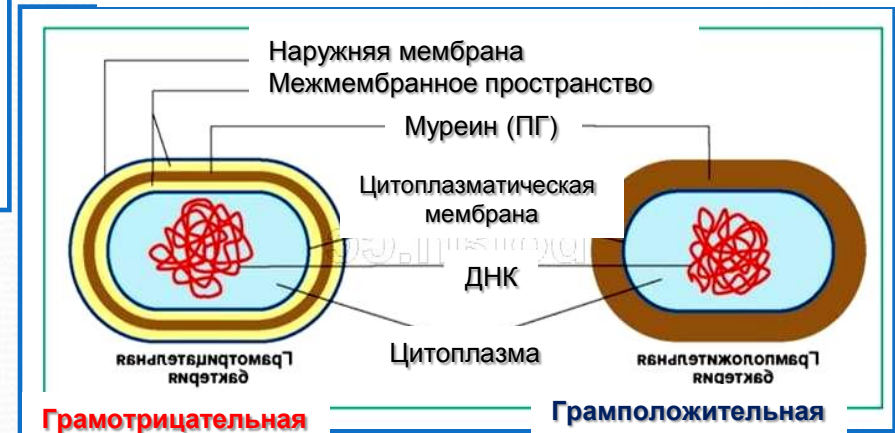
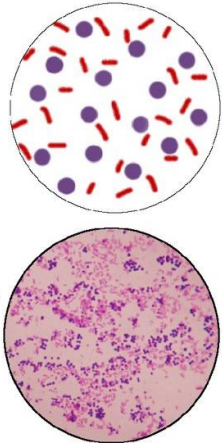


Метод окраски по Граму:

- на фиксированный мазок нанести раствор **генцианвиолета** на 1 - 2 минуты, краситель слить
- нанести **раствор Люголя** на 1 - 2 минуты
- нанести **спирт** на 30 - 60 секунд
- промыть водой
- докрасить раствором **фуксина** в течение 1-2 минут, промыть водой, высушить и микроскопировать

Гр+ бактерии – фиолетовые, Гр- бактерии – красные.

- **Грамположительные** бактерии удерживают генциановый фиолетовый в комплексе с йодом – **фиолетовая окраска** бактерий;
- **Грамотрицательные** бактерии после воздействия спирта утрачивают краситель, обесцвечиваются и при обработке фуксином окрашиваются в **красный цвет**.



Муреин (пептидогликан) КС

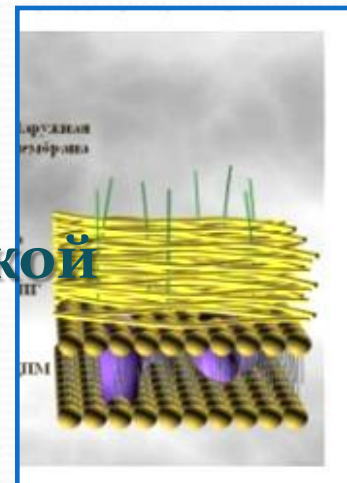
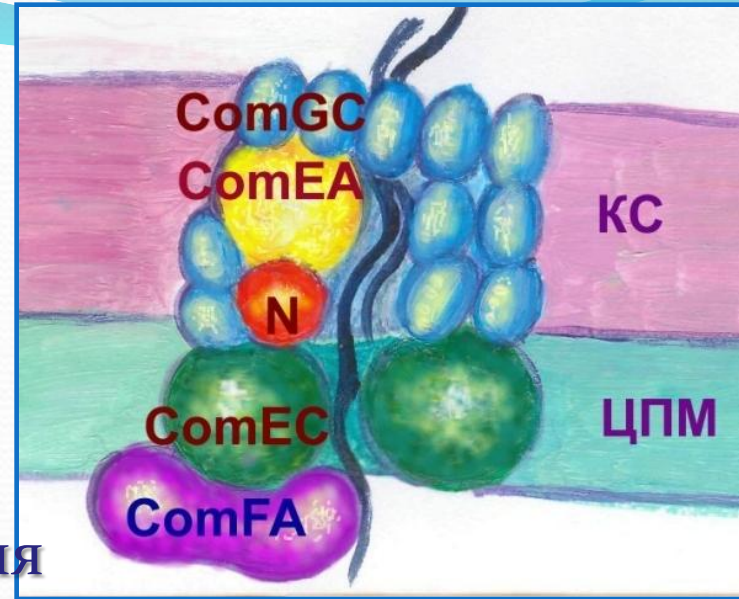
У Грам-отрицательных - микроорганизмов:

- У Грам-клетки формируется канал, пронизывающий наружную мембрану, пептидогликан, периплазматическое пространство и ЦПМ
- ДНК присоединяется к поверхности бактерии и поступает в ее цитоплазму по этому каналу
- В области наружной мембраны канал состоит из белка-пилина PilQ,
- в пептидогликане и периплазматическом пространстве из Pil E и ДНК-связывающего белка Com E, в цитоплазматической мембране - из белка Com A
- Перед поступлением в канал, состоящий из белка ComA, одна из двух нитей ДНК разрушается нуклеазой
- Вторая нить переносится транслоказой в цитоплазму



У грамположительных микроорганизмов:

- Нет наружной мембраны, и потому транспорт происходит только через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану
- В клеточной стенке для прохождения ДНК формируется канал из белка Com GC и ДНК-связывающего протеина Com EA
- Внутри канала, образованного белками Com EC, одна из нитей ДНК на уровне цитоплазматической мембраны разрушается эндонуклеазой N,
- Вторая нить ДНК транслоказой Com FA транспортируется по каналу от белка Com EC в цитоплазму

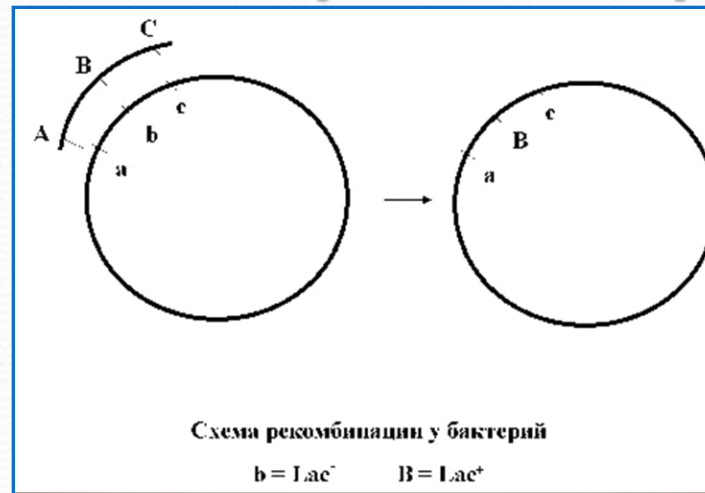


Таким образом,

- Компетенция клетки наступает после того, как аутолизин разрушит КС, обнажит ДНК-связывающий белок Com EA и эндонуклеазу I
- ДНК-связывающий белок адсорбирует фрагмент донорской ДНК (22-45 тыс. п.н.)
- Эндонуклеаза I разрезает ДНК на участки (6 тыс.п.н.)
- В трансмембранном канале одна цепь ДНК деградирует
- Проникнув внутрь клетки, одноцепочечная ДНК связывается с транслоказой Com FA, которая также защищает ее от деградациии
- Транслоказа переносит ДНК внутрь клетки к бактериальной хромосоме
- Комплекс **Rec BCD** и **RecA** осуществляют встраивание ДНК путем гомологичной рекомбинации (кроссинговера)

Между донорской и реципиентной ДНК происходит реципрокный обмен фрагментами (*Гомологичная рекомбинация = Кроссинговер*)

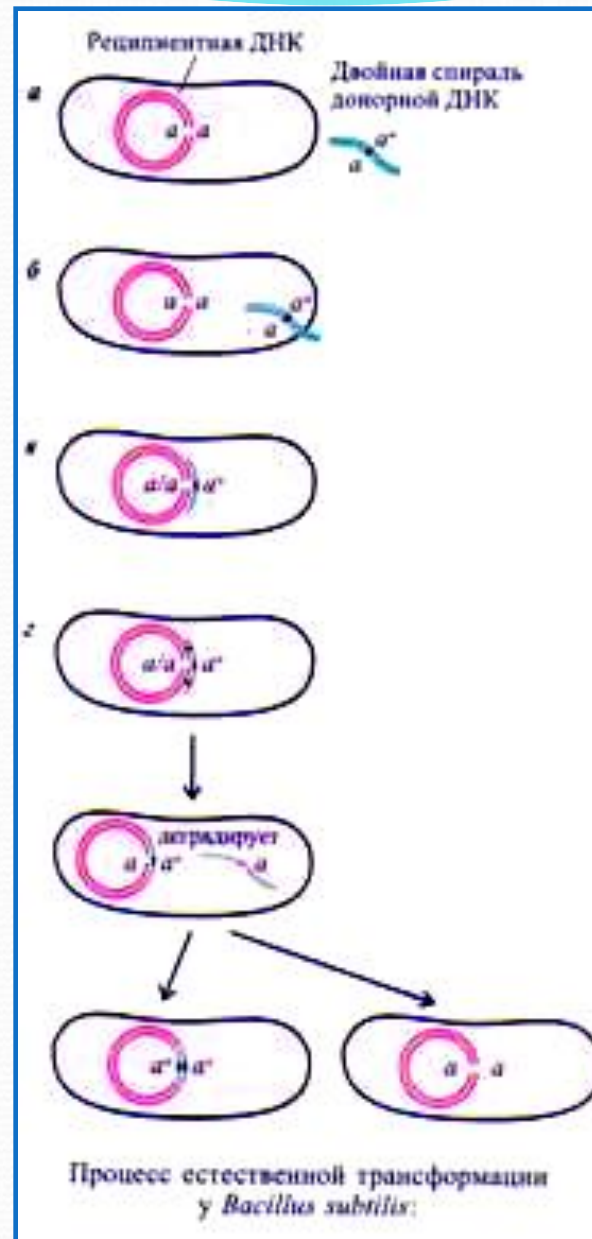
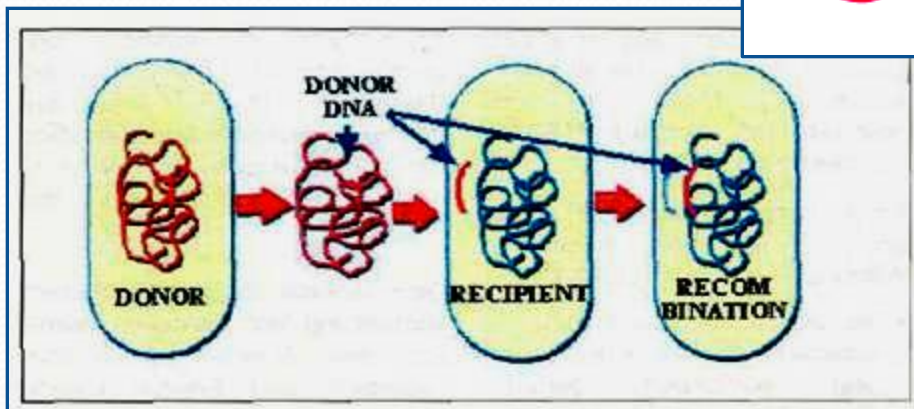
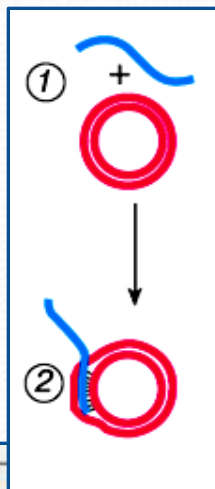
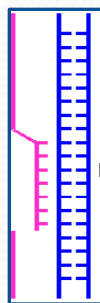
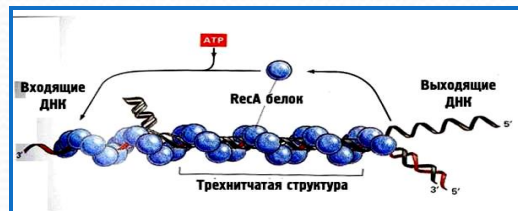
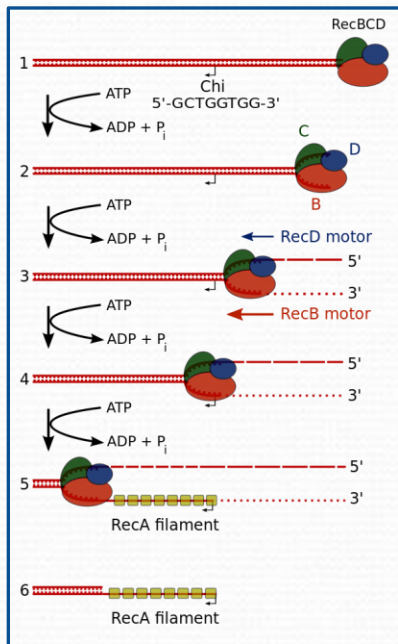
- Рекомбинация требует сходства между генетической информацией донора и реципиента и наличия генов бактериальной рекомбинации- *рес A, B, C, D*



В естественных условиях трансформация обычно приводит к усилению вирулентности

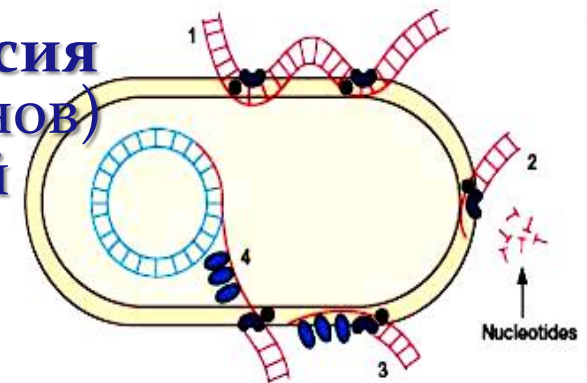
- В редких случаях возможна рекомбинация между **отдаленными видами**

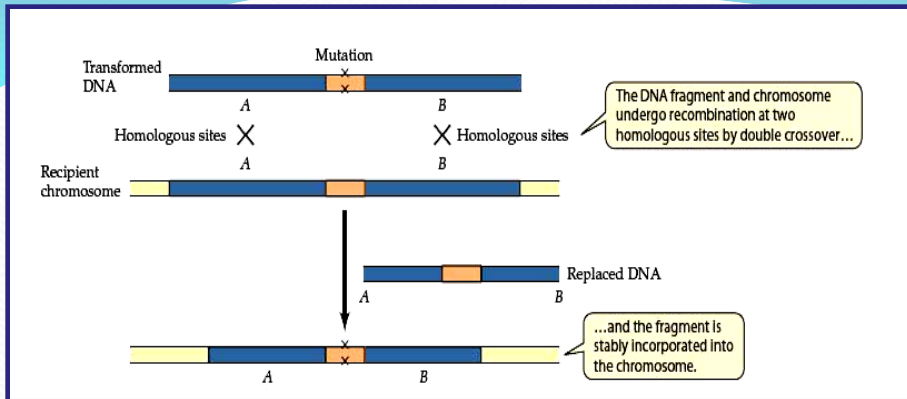
Гомологичная рекомбинация при трансформации:



Т. обр., Стадии трансформации:

- 1) **обратимое присоединение** молекул двухцепочечной ДНК к рецепторным сайтам на поверхности клетки реципиента (на этой стадии ДНК донора чувствительна к разрушению ДНК-азой);
- 2) Превращение двухцепочечной ДНК донора в **одноцепочечные фрагменты** под действием клеточных эндонуклеаз внутри каналов клеточной стенки;
- 3) **Интеграция** (за счет ковалентного присоединения) одноцепочечной ДНК донора в КС бактерии, затем в хромосому
- 4) **Рекомбинация и Необратимое поглощение** ДНК донора (с этого времени процессу трансформации нельзя помешать обработкой ДНК-азой);
- 5) сегрегация и фенотипическая экспрессия интегрированного гена донора (или генов) в рекомбинантой трансформированной клетке





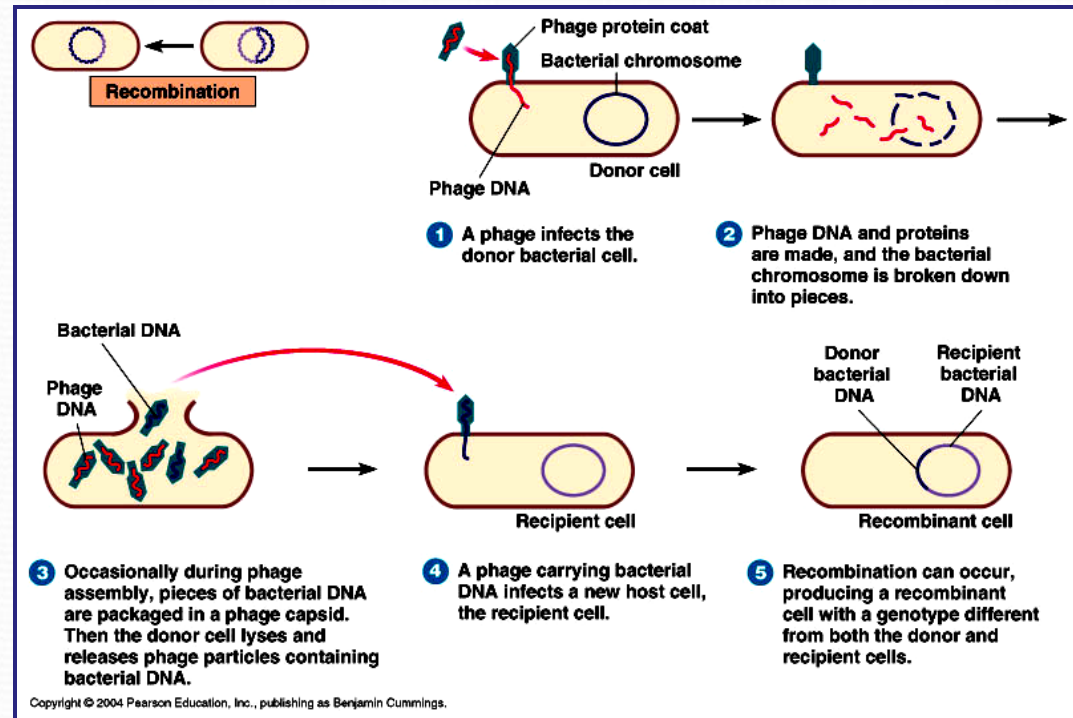
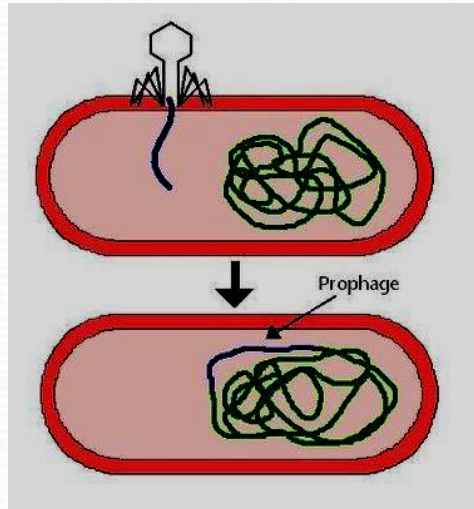
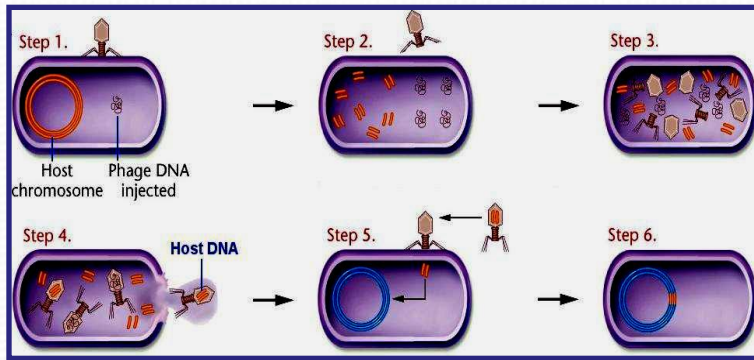
Обычно в рекомбинации участвует ДНК донора длиной около **200 тыс.** нуклеотидов, или **1/200** всей бактериальной хромосомы

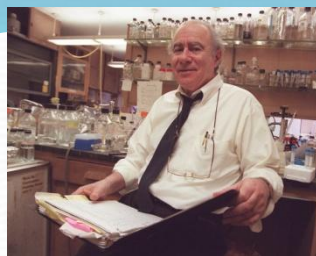
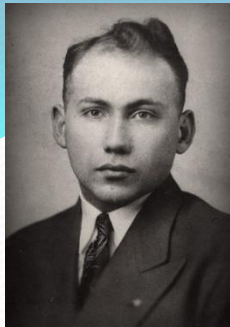
Частота трансформации зависит от:

- свойств данного препарата ДНК,
- ее концентрации,
- состояния клетки-реципиента,
- вида бактерий

Штаммы пневмококков трансформируются с частотой 10^{-2} — 10^{-3} на клетку реципиента
 У гемофильных бактерий частота трансформации варьирует от 10^{-3} до 10^{-7}

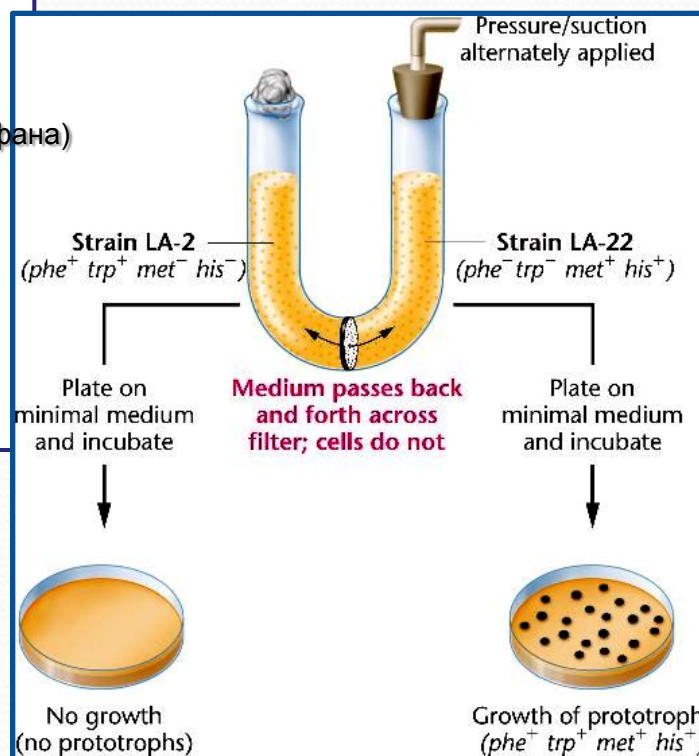
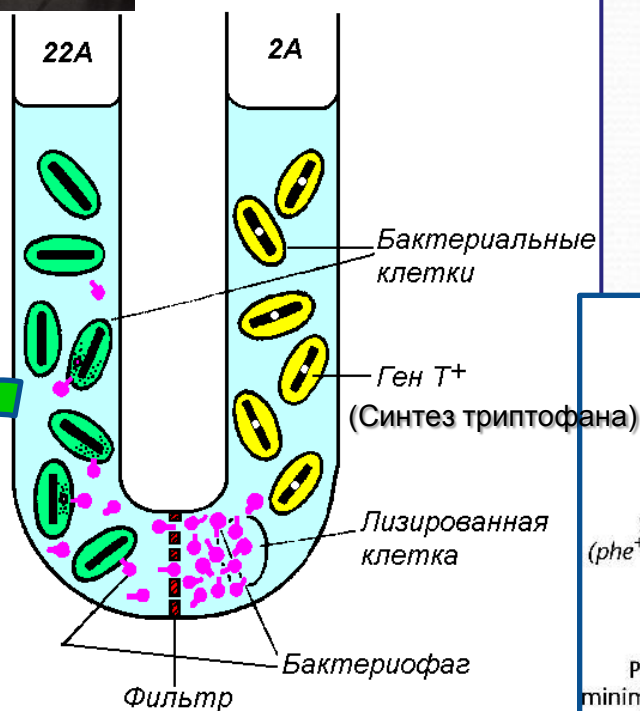
Трансдукция - это рекомбинативный перенос генетической информации у микроорганизмов от донора к реципиенту с помощью бактериофага



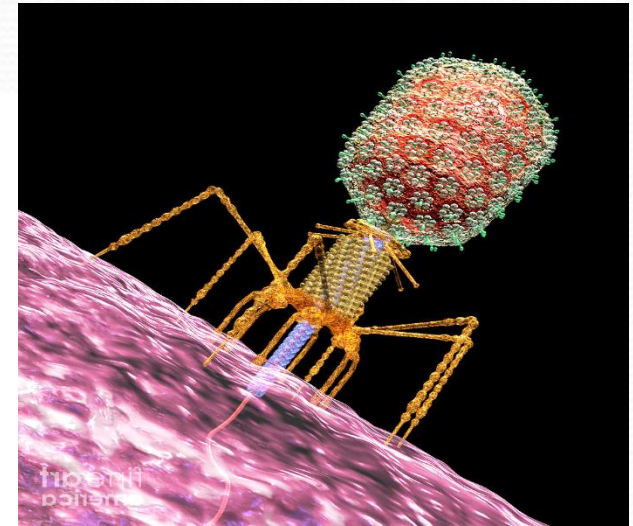
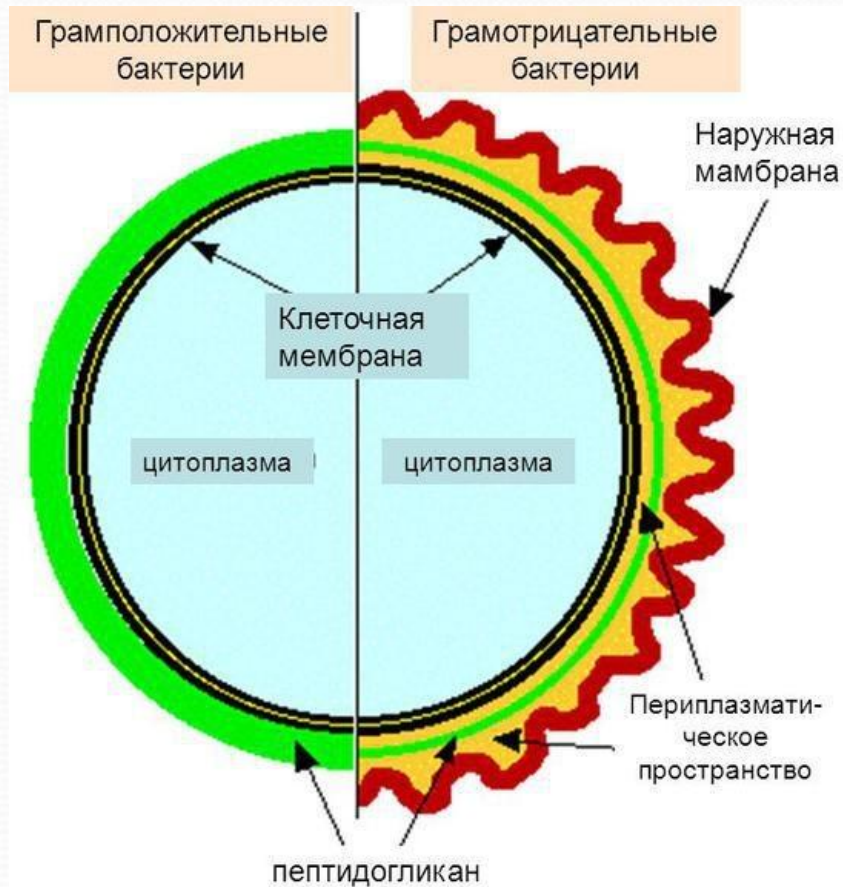


Перенос участков бактериальной хромосомы фагами был открыт в 1951-1952 г.г. Д.Ледербергом и М.Зиндером у *Salmonella typhimurium*, впоследствии трансдукция описана у многих родов бактерий:

Salmonella,
Escherichia,
Shigella,
Bacillus,
Pseudomonas,
Vibrio,
Streptococcus,
Staphylococcus,
Corynebacterium

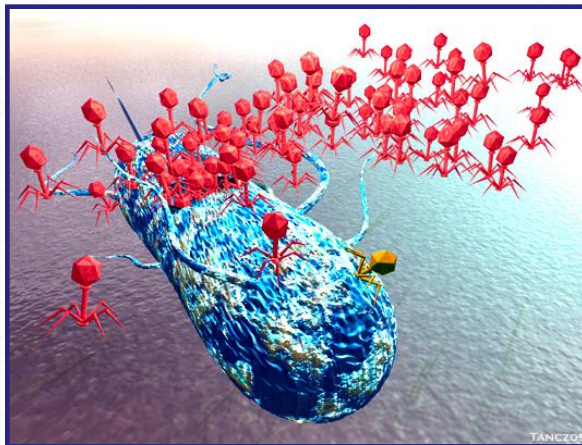
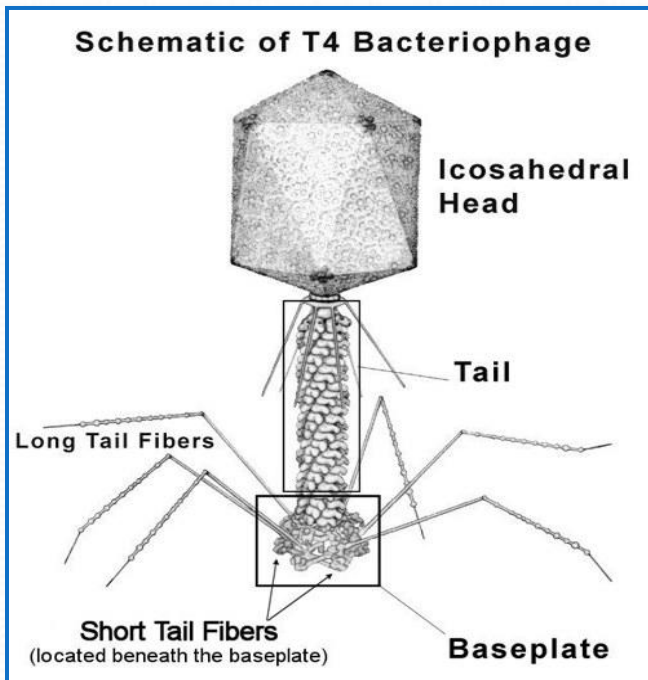
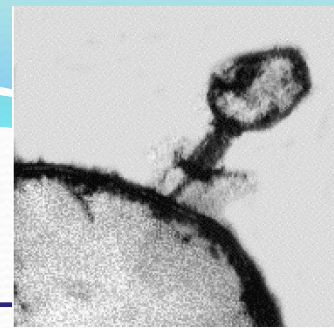


Трансдукция – основной путь обмена генетической информацией у Грам+ бактерий



Различия в строении клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий

Фаги – вирусы бактерий



Капсидная оболочка бактериофага защищает его от действия нуклеаз, поэтому **трандукция, в отличие от трансформации, не чувствительна к нуклеазам**

Длина фага от конца хвостового отростка до вершины головки составляет около 200 нм, ширина головки — около 50 — 60 нм

ДНК фагов может быть одноцепочечной:

- линейной (парвовирус)
- кольцевой (фаги фХ174, fd)

двухцепочечной:

- линейной (фаг Т 7),
- с одноцепочечными разрывами (фаг Т5),
- с замкнутыми концами (вирус оспы)

ковалентно-замкнутой

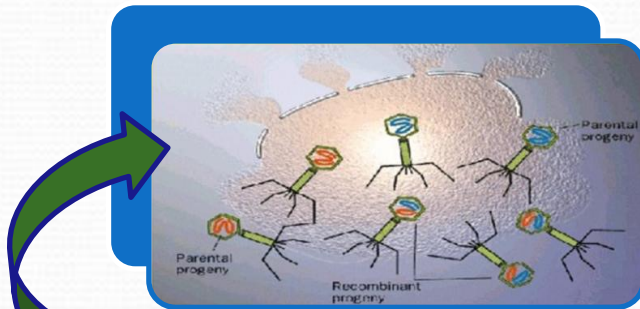
- кольцевой сверхспирализованной (паповавирус)

• **Может быть РНК**

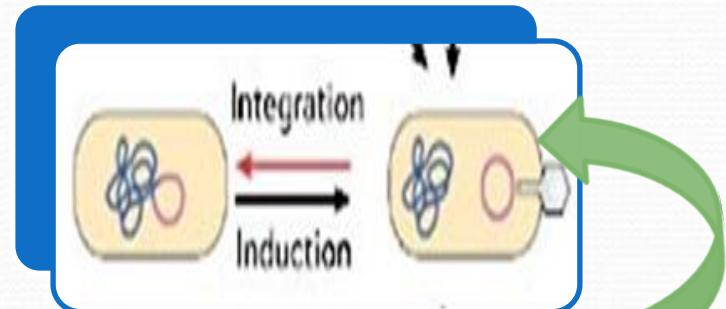
Фаги

Вирулентные

Умеренные



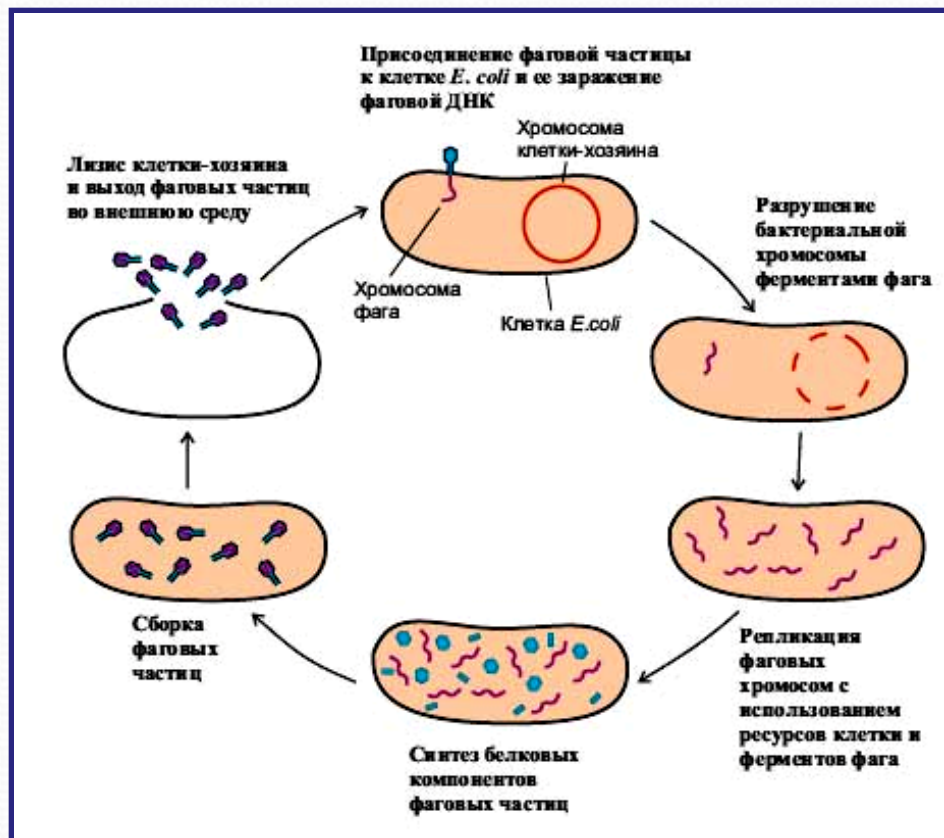
Бактерия гибнет



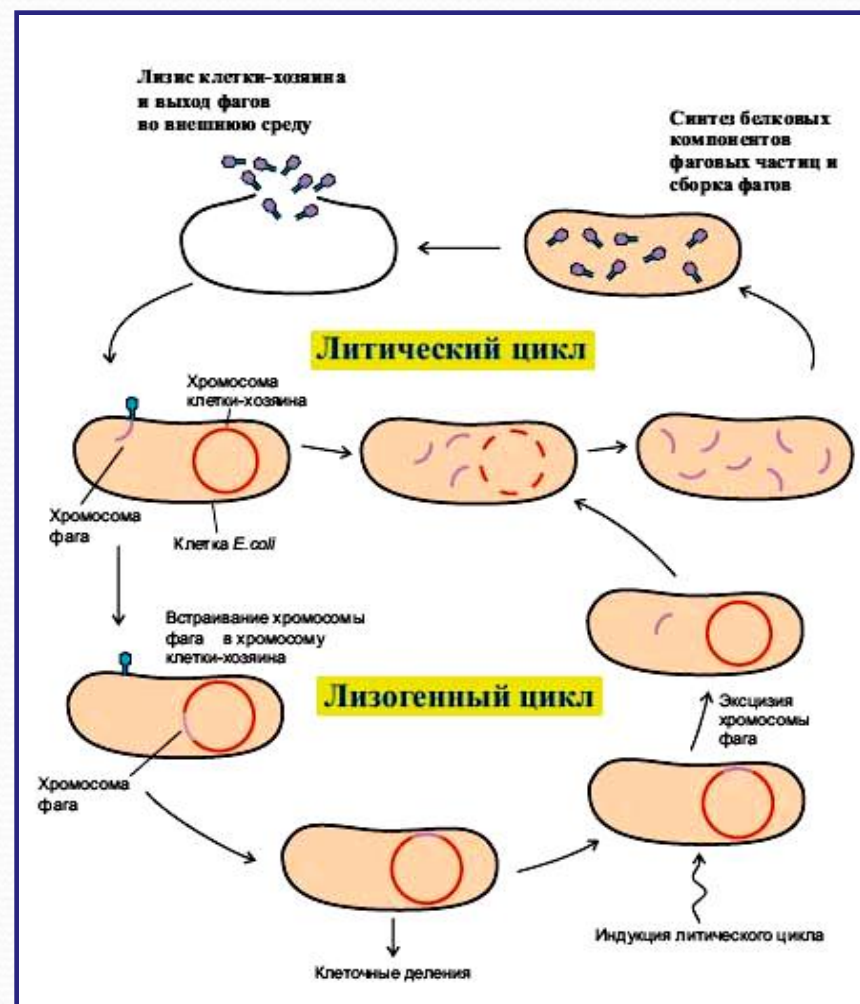
Бактерия живет

Фаг в составе бактериальной хромосомы называют профагом

Жизненный цикл вирулентных и умеренных фагов:



Жизненный цикл вирулентных фагов иначе называется литическим

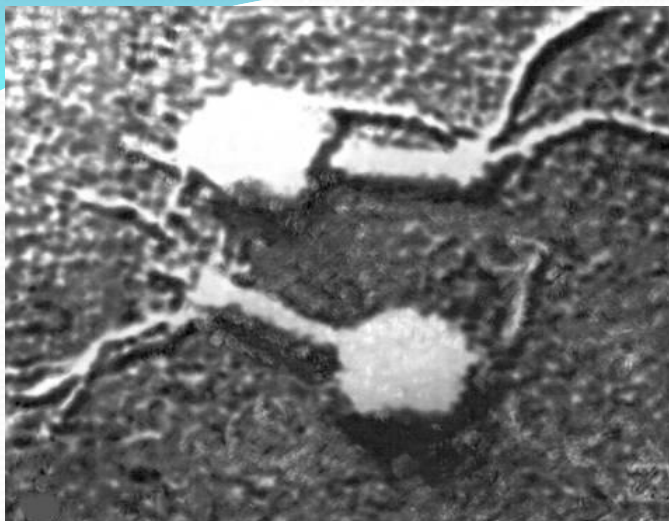


Пример умеренных фагов — фаги λ и $\phi 80$ *E. coli*

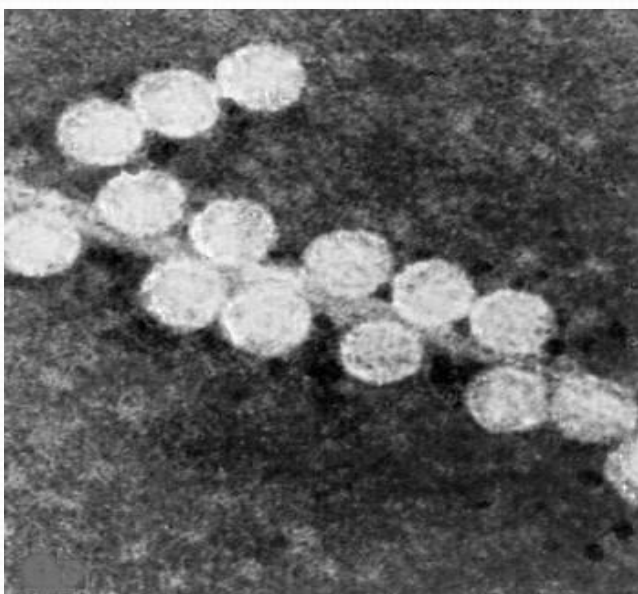
Свойства некоторых бактериофагов

Фаги	Родственные фаги	Бактерия – хозяин
Вирулентные		
T4	T2, T6	<i>E. coli</i>
T1		<i>E. coli</i>
T5	BF23	<i>E. coli</i>
T7	T3, φ11	<i>E. coli</i>
SPO1	SP8	<i>B. subtilis</i>
Умеренные		
λ	φ80, 21, 434	<i>E. coli</i>
P22		<i>Salmonella sp.</i>
P2		<i>E. coli</i>
N15		<i>E. coli</i>
Mu	PBS 2, 3 NT	<i>B. subtilis</i>

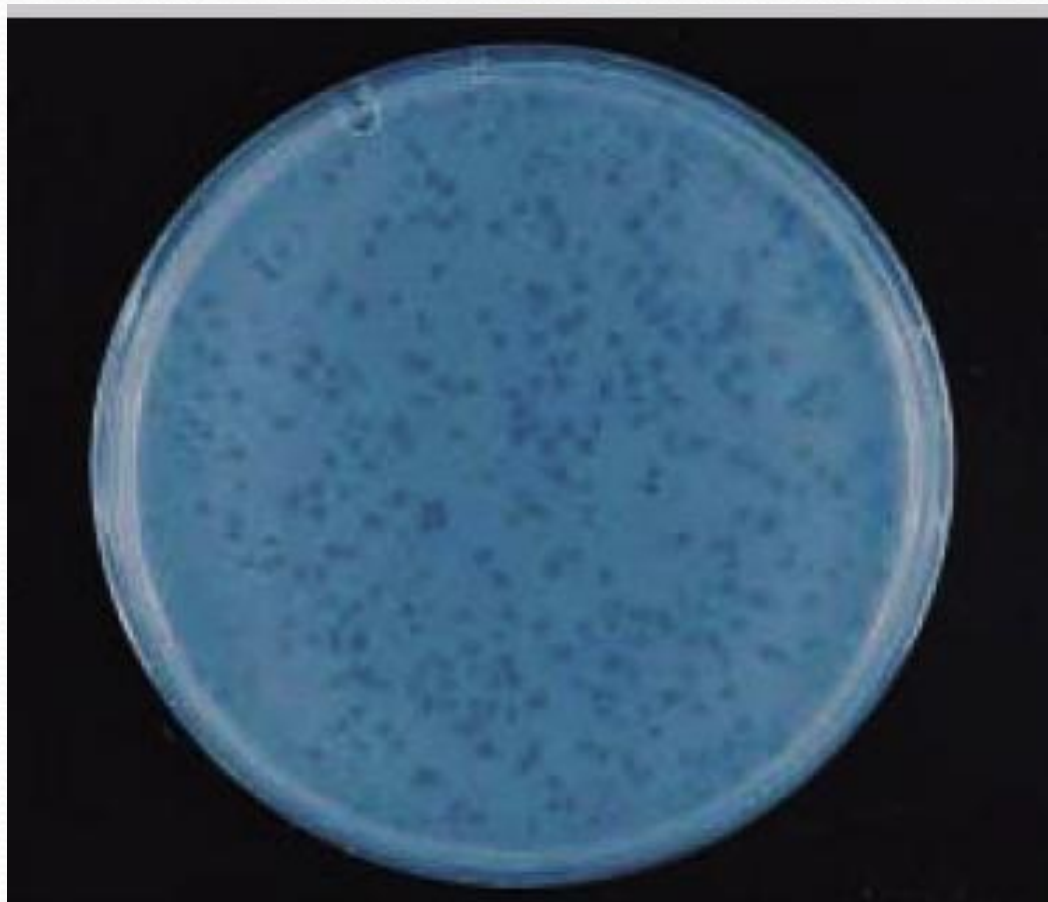




Фар T2

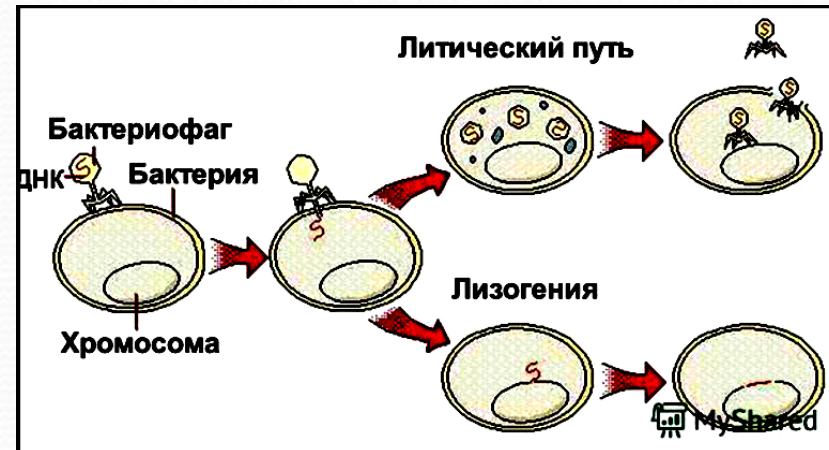


Фар MS2

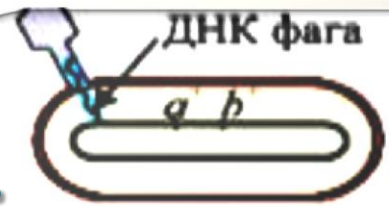
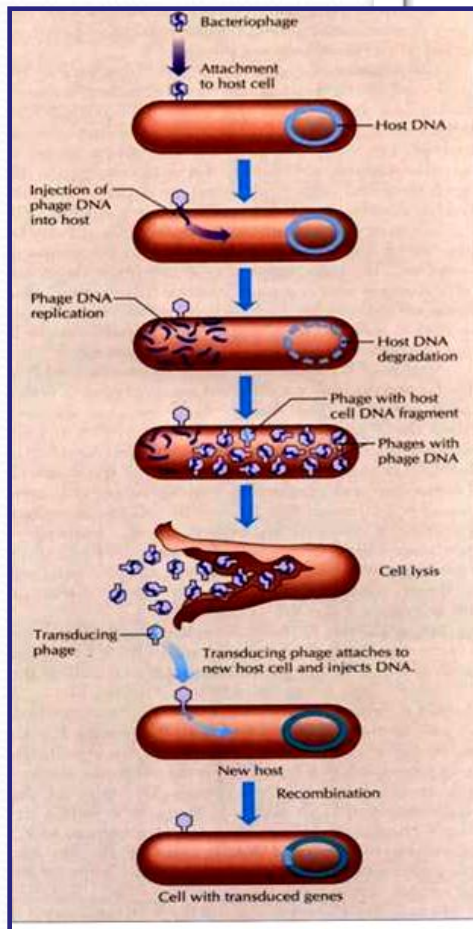


**Фаровые бляшки на
бактериальном газоне**

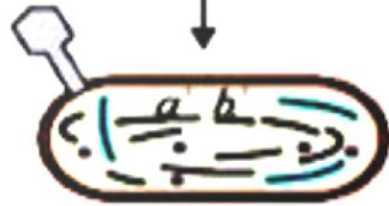
- Бактерии, в хромосому которых встроен профаг, называют **лизогенными**. Характерное свойство лизогенных бактерий — иммунитет к литической инфекции, осуществляемой тем же или близкородственным фагом
- В хромосоме бактерий могут быть **специальные сайты**, в которые встраивается профаг. Таким сайтом для фага λ *E. coli* служит сайт *att* (от англ. *attachment* — прикрепление), находящийся вблизи галактозного оперона
- В ряде случаев возникает **фаговая (или лизогенная) конверсия** - приобретение лизогенной бактерией **новых признаков** под влиянием носительства фага
- Объем трансдуцирующего фрагмента ДНК соответствует размеру ДНК фага (в среднем 10^2 тыс. п.н., до 100 генов)



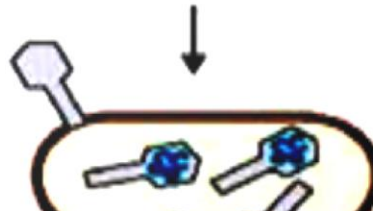
Этапы трансдукции:



Фаг инфицирует донорную бактериальную клетку

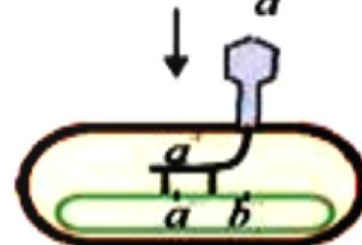


Донорная ДНК фрагментируется, фаговая ДНК реплицируется и синтезируются фаговые белки

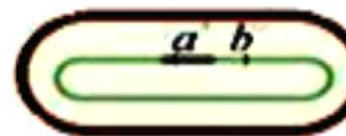


Фрагменты донорной бактериальной ДНК упаковываются в фаговый капсид

Литический цикл



Трансдуцирующая частица инфицирует реципиентную бактериальную клетку, происходит гомологичная рекомбинация между донорной и реципиентной ДНК



Рекомбинантная бактериальная клетка

Лизогенный цикл

Трансдукция

Общая (Неспецифическая)

Бактериофаг может встраиваться в любом месте генома бактерии и потому способен переносить любой фрагмент ДНК хозяина

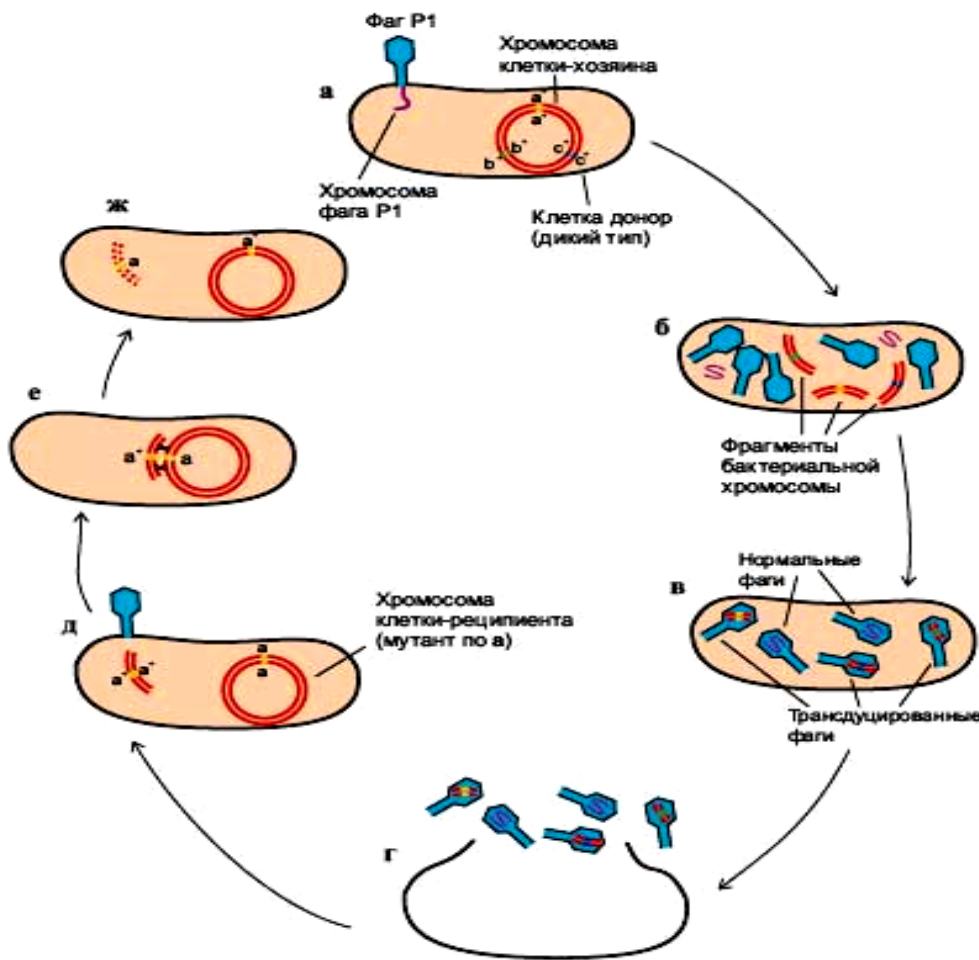
Сайт- специфическая (ограниченная)

Бактериофаг встраивается в строго определенные места генома бактерии, а потому переносит лишь строго определенные фрагменты ДНК

Абортивная

Фрагмент ДНК фага-донора не включается в хромосому клетки-реципиента, а остается в ее цитоплазме и в таком виде способен поддерживаться и проявляться фенотипически

Общая трансдукция (фаги P1 и P22):



Длина трансдуцирующей бактериальной ДНК: $1/50$ — $1/100$ от всей хромосомы

Частота образования трансдуктантов: 10^{-5} — 10^{-7}

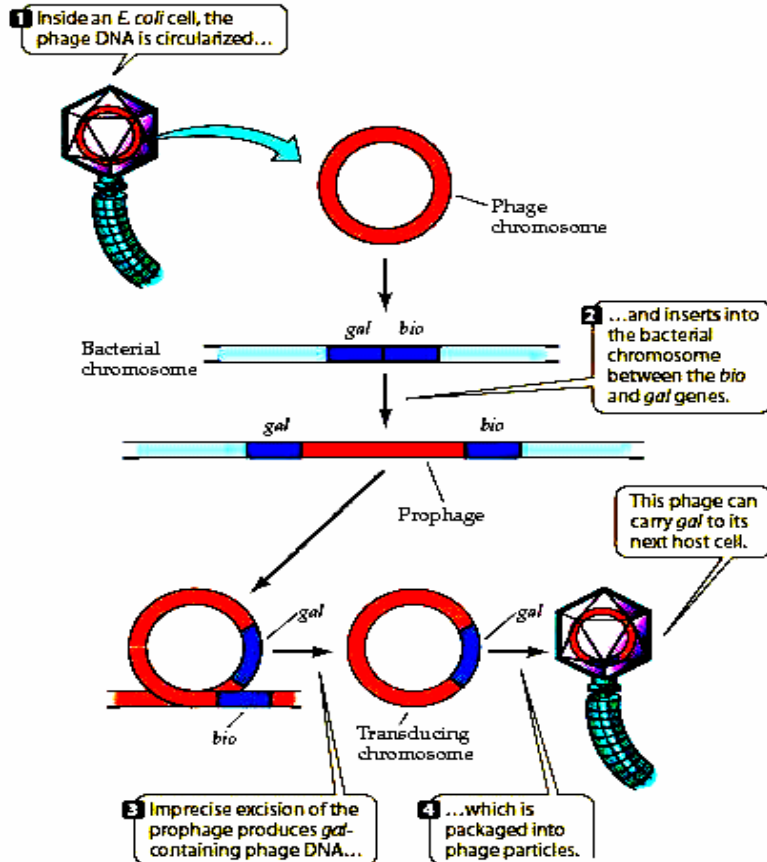
Специфическая трансдукция:

В отличие от общей трансдукции,

- **Специфическая трансдукция** – это перенос фрагментов хромосомы донора в хромосому реципиента по **определённым сайтам**

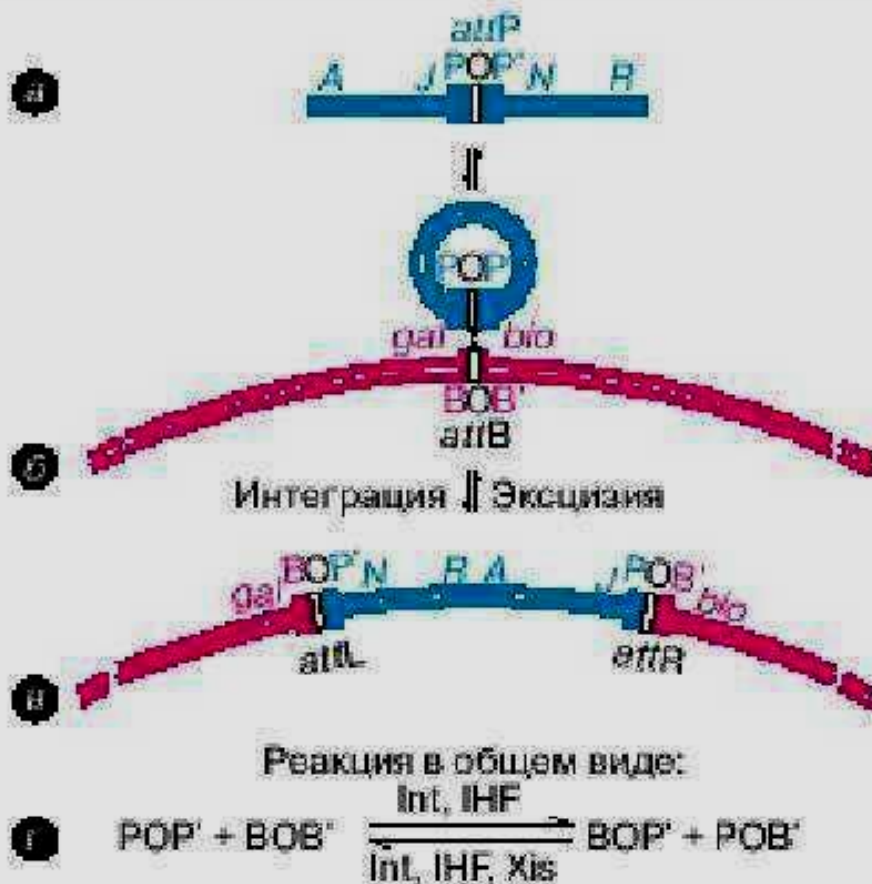
- Ее осуществляют фаговые частицы, полученные при **выходе профага из хромосомы лизогенной бактерии**

- Обеспечивают **Интегроны** - генетические элементы, содержащие промотор и ген рекомбиназы - *int*, которая обеспечивает встраивание в сайт *att I* бактериальной хромосомы



Частота образования специализированных трансдуцирующих фагов $\sim 10^{-6}$

Схема сайт-специфической рекомбинации бактериофага лямбда



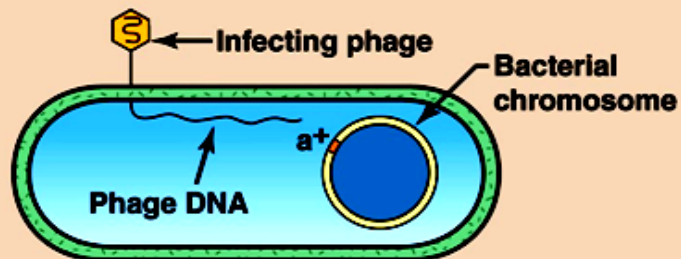
А) линейная (вирионная) ДНК фага

Б) ДНК фага после инфекции в *E. coli* замыкается в кольцо, и находящийся в ней сайт attP вступает в рекомбинацию с сайтом attB в хромосоме бактерии

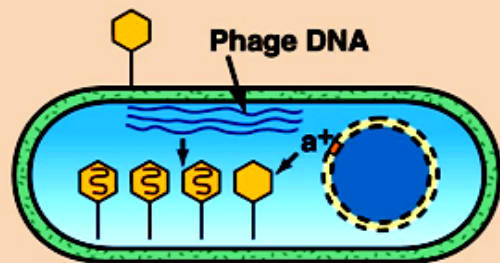
В) продукт рекомбинации - профаг в составе хромосомы бактерии

Г) запись процесса рекомбинации в общем виде

A Generalized Transduction



Phage replication and fragmentation of bacterial DNA ($a^+ = \text{any bacterial gene}$)

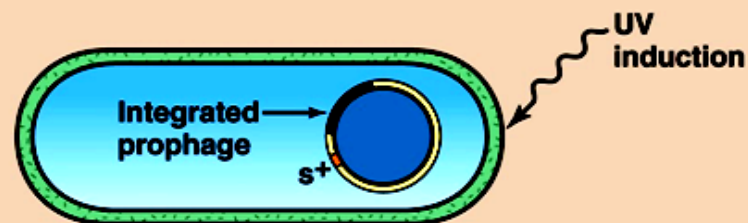


Lysis

These are normal, non-transducing phage.

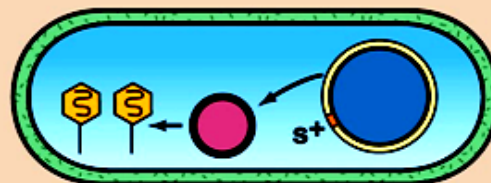
This rare phage, which has accidentally packaged the a^+ gene, can transduce an a^- cell to a^+ .

B Specialized Transduction



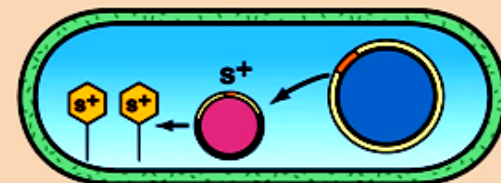
Normal excision of prophage

Rare abnormal excision of prophage picks up the adjacent s^+ gene ($s^+ = \text{special bacterial gene}$)



Lysis

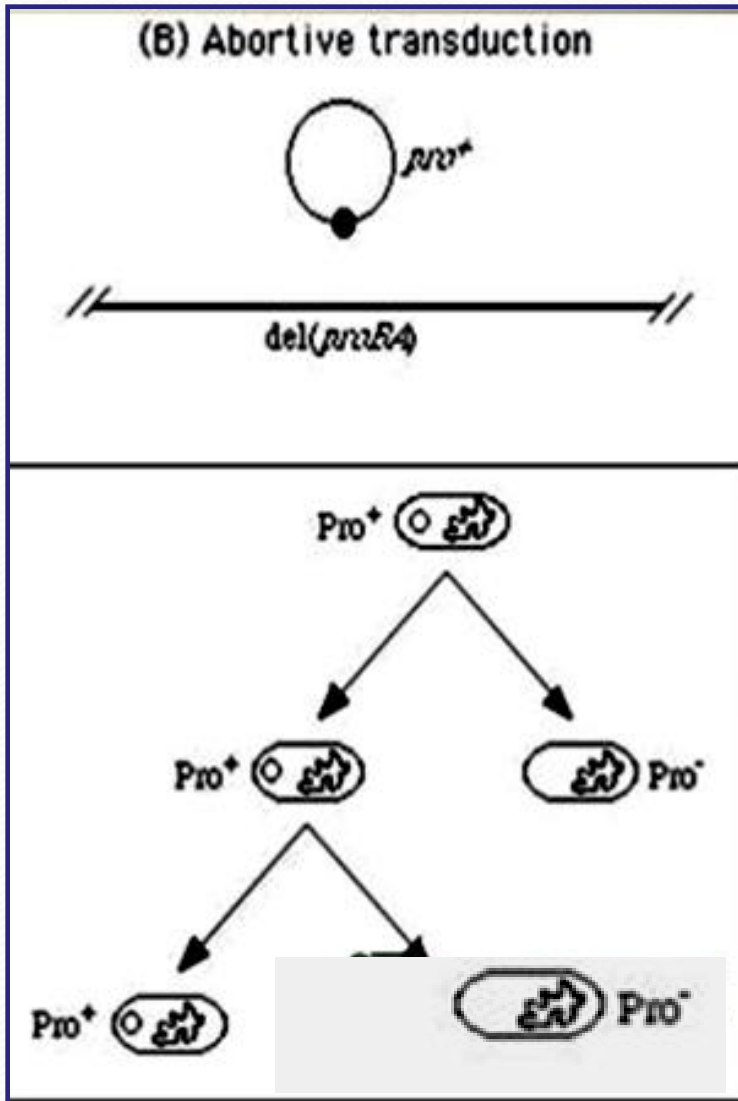
These are normal, nontransducing phage.



Lysis

These phage, which carry the s^+ gene, can transduce an s^- cell to s^+ .

Абортивная трансдукция:



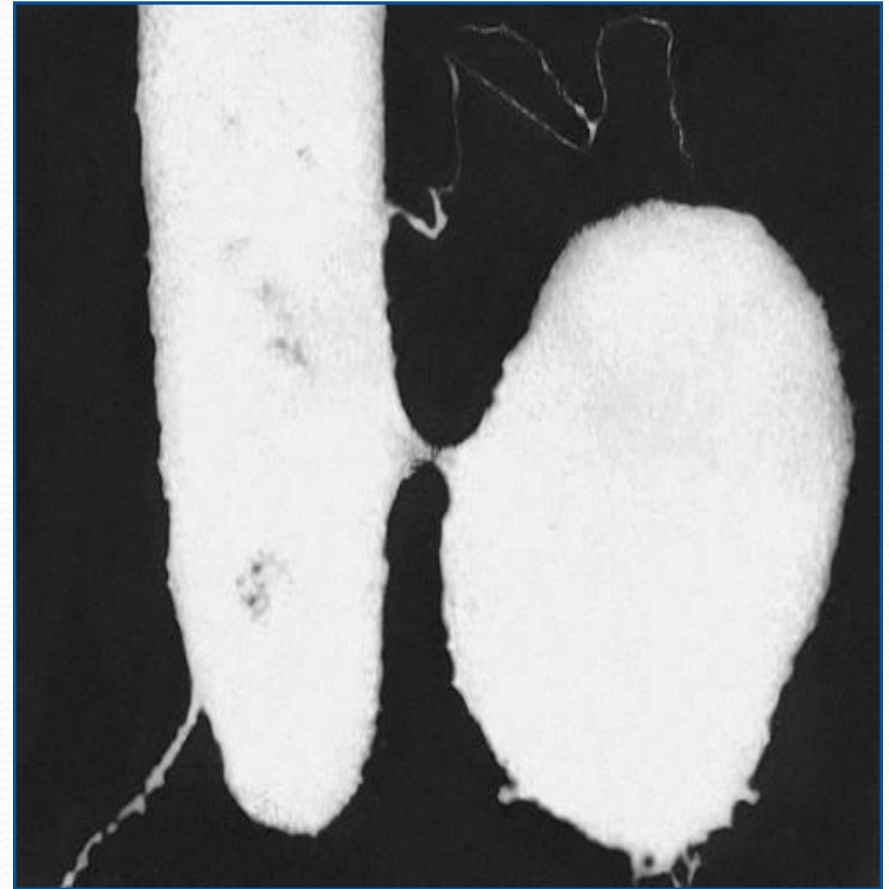
Участок бактериальной хромосомы донора, перенесенный бактериофагом, **не вступает в рекомбинацию с хромосомой реципиента, а остается вне хромосомы**

Происходит транскрипция перенесенной ДНК (синтезируется соответствующий генный продукт), **но не ее репликация**

В процессе деления клетки донорский фрагмент переходит только в одну из дочерних клеток и **со временем утрачивается**

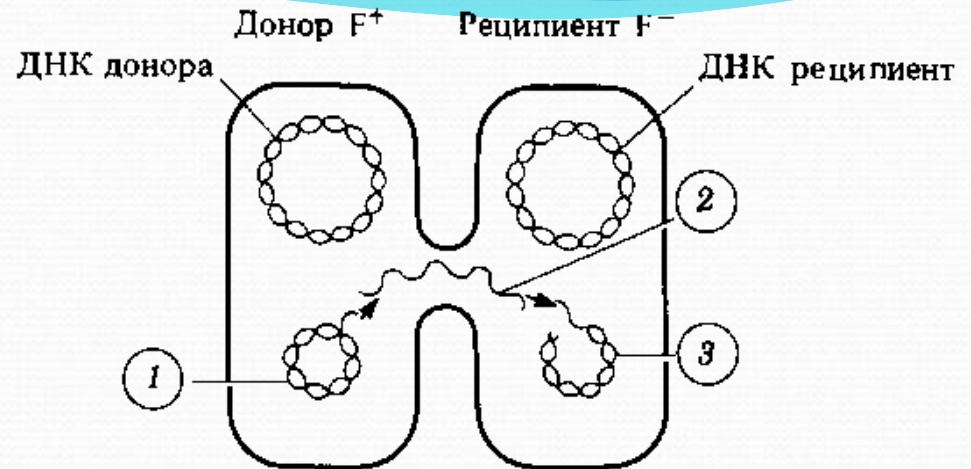
Конъюгация —

перенос генетического материала у бактерий из клеток донора в клетки реципиента при их непосредственном контакте



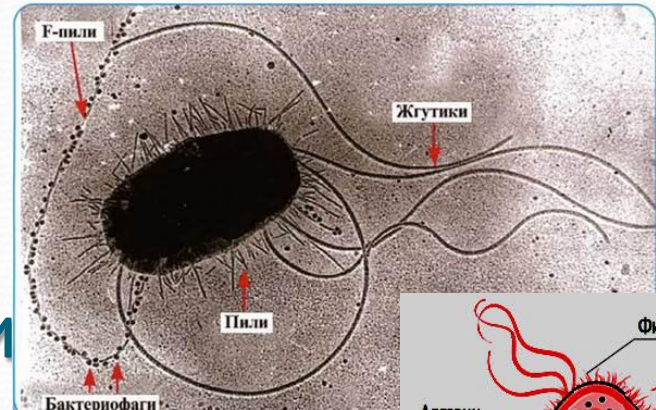
Условия конъюгации:

- **Непосредственный контакт** клеток
- **Конъюгационный мостик**
- **Конъюгативная плазмида**



- *Конъюгация открыта в 1946 г. Ледербергом и Татумом*
- *Частота в естественных условиях $1:10^6$ (10^{-6})*

Конъюгация – основной способ передачи факторов вирулентности микробов, а также свойств множественной антибиотикорезистентности



- Для грамотрицательных микроорганизмов **конъюгация - основной механизм горизонтальной передачи генов**, так как
- **Пили и жгутики** – характерные морфологические признаки Грам- микробов
- У грамположительных микроорганизмов клетки-доноры продуцируют адгезивный материал, который способствует агрегации с реципиентом и передаче генетического материала

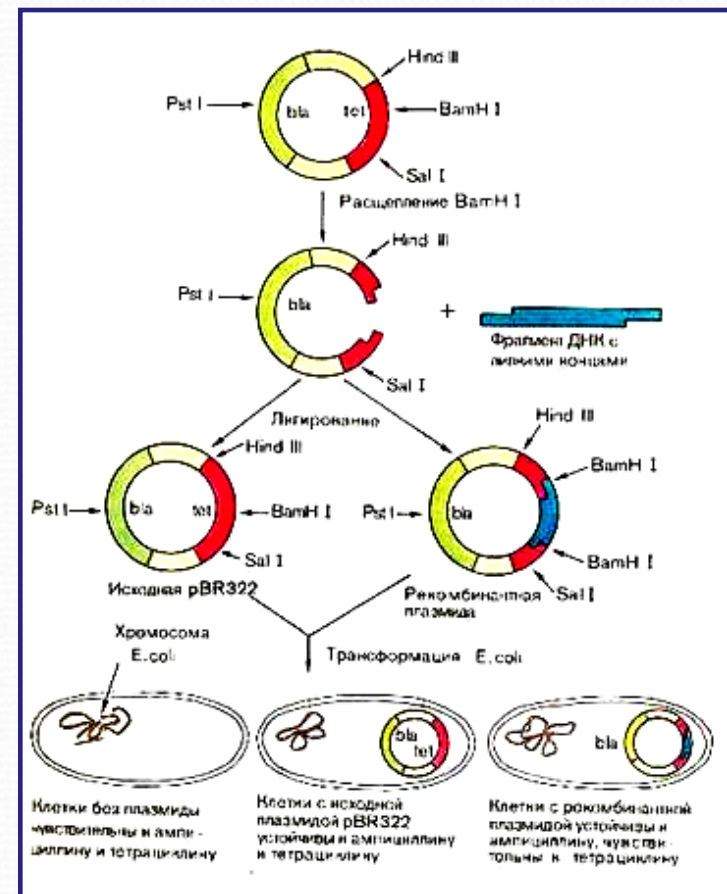
Плазмиды:



- Внехромосомные факторы наследственности, представляющие собой небольшие кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, находящиеся в цитоплазме и способные к автономной репликации
- В плазмидах закодированы информация, необходимая для их репликации, а также признаки, обеспечивающие бактериям преимущества в различных условиях обитания и в стрессовых ситуациях
- Плазмиды могут интегрировать в бактериальную хромосому, тогда их называют эписомами

Плазмиды:

- обеспечивают перенос генов, их используют в качестве векторов в генной инженерии



Плазмиды классифицируют в зависимости от:

- **Размера:** большие, средние, малые (космиды)
- **Способности к репликации в клетке:** совместимые и несовместимые.
- **Способности вызывать конъюгацию бактерий:**
- **1) конъюгативные**, которые имеют относительно большие размеры и содержат информацию, необходимую для автономной репликации и переноса ДНК реципиенту;
- **2) неконъюгативные**, которые не способны запускать конъюгацию; они могут передаваться реципиенту при наличии в клетке конъюгативных плазмид

По фенотипическому эффекту

Плазмиды бывают:

- **Фертильности – F-плазмиды** (донорные функции)
- **Бактериоциногении – Col-плазмиды** (ColE1, ColE2). Кодировать продукцию бактериоцинов (колицинов)-веществ, обладающих бактерицидным действием в отношении других микроорганизмов
- **Резистентности – R-плазмиды**. Обуславливают устойчивость к антибиотикам, солям тяжелых металлов, УФ излучению (плазмиды R100, RP 4). Как правило, являются конъюгативными
- **Вирулентности** (плазмиды LT2, K88). Кодировать продукцию энтеротоксинов, фимбрий, ферментов
- **Биодеградации** — D-плазмиды. Обеспечивают расщепление сложных субстратов (углеводородов нефти и т.д.) и другие...

Виды плазмид

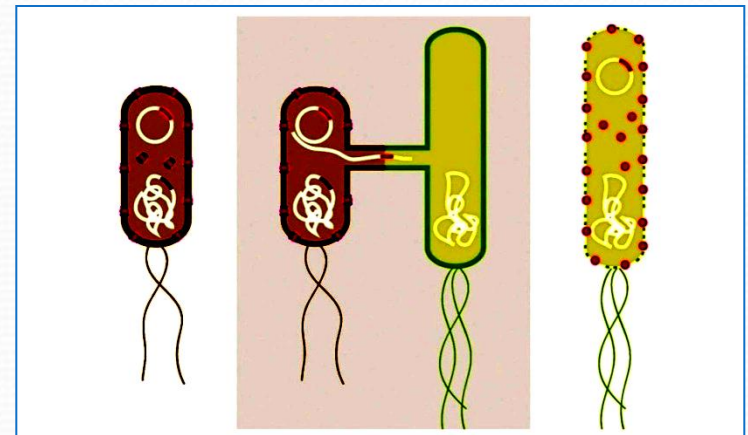
- R-плазмиды
- F-плазмиды и Hfr-фактор
- Col- плазмиды
- Tox- плазмиды
- Ent – плазмиды
- Hly– плазмиды
- Ure- плазмиды

F - (от *Fertility* - плодovitость)

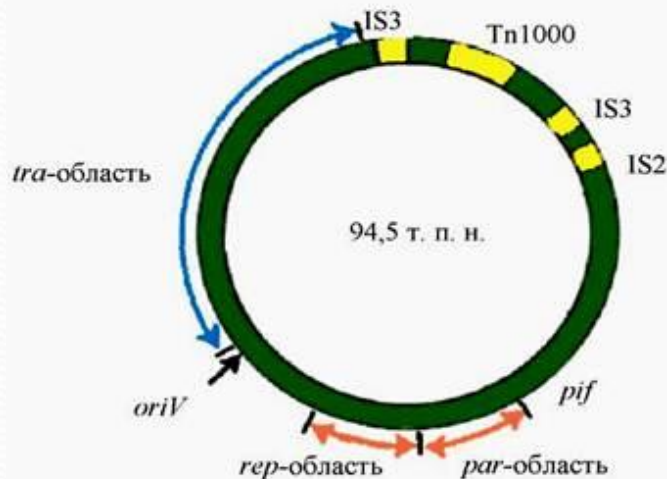
Hfr – (от *High Frequency of Recombination*
– высокая частота рекомбинации)

Половой фактор – F-плазмида:

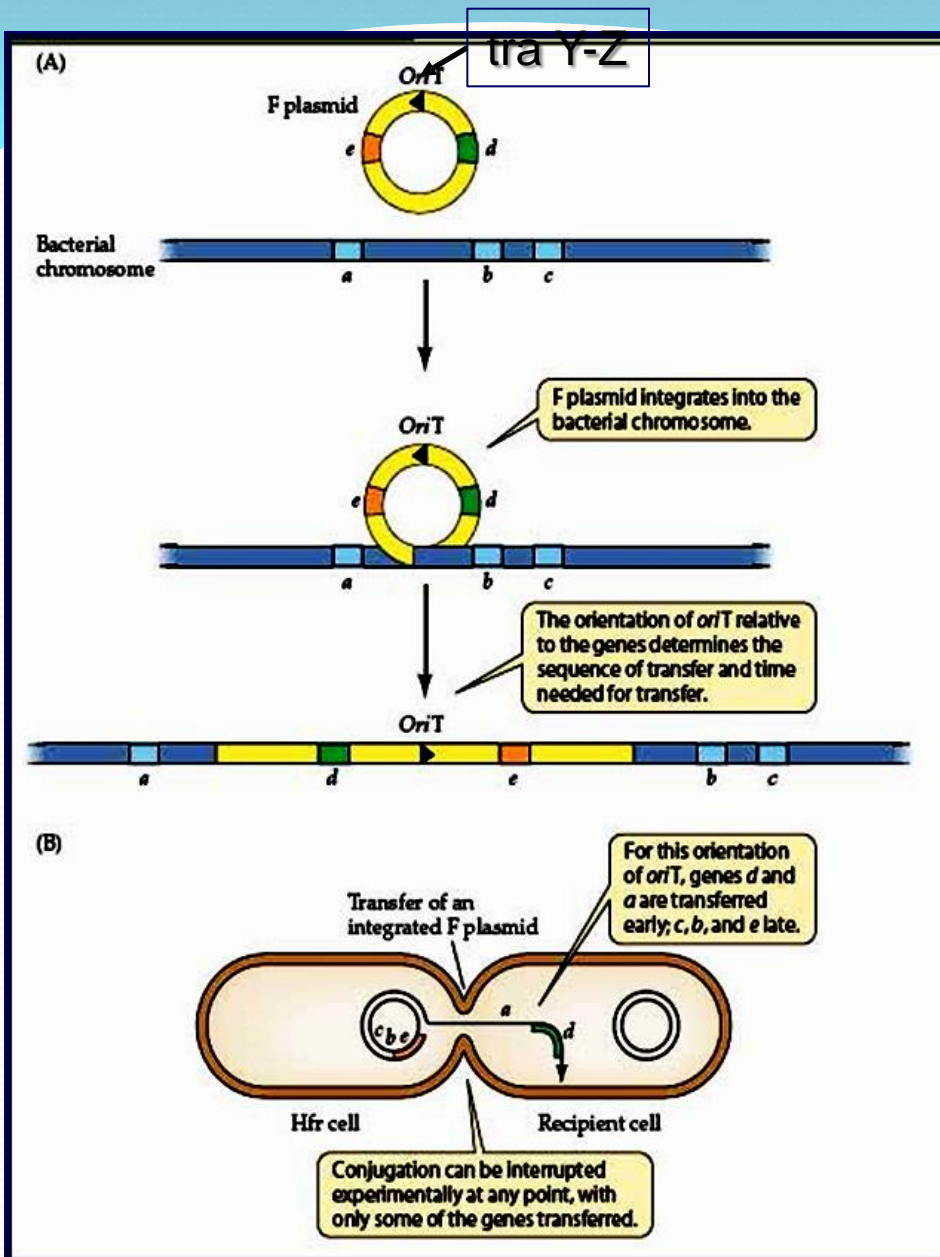
- Первый половой фактор — плазмиду F (от англ. *fertility* — плодовитость) обнаружил **У. Хейс** (1952)
- Штаммы бактерий дифференцированы по половому признаку:
 - - **F+** переносят ДНК - **донорные или мужские**
 - - **F-** воспринимают ДНК, передающуюся от донора - **реципиентные или женские**



F-плазмида :

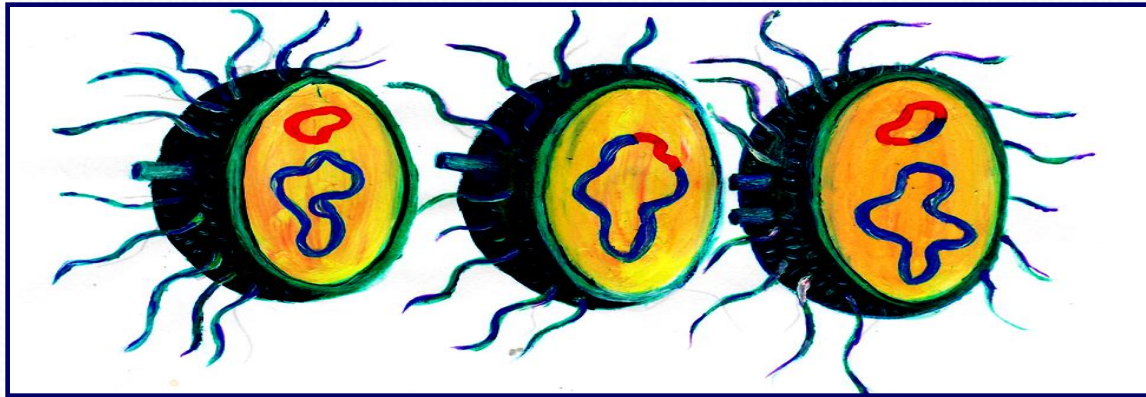


- Реплицируется автономно (независимо от хромосомной ДНК)
- Кольцевая двухцепочечная молекула ДНК с массой **45×10^6 Да**
- Содержит около **25 генов**, которые детерминируют:
 - 1) процесс независимого от генома удвоения (репликации);
 - 2) особые структуры клеточной поверхности - половые пили, или F-пили, которые служат для взаимного узнавания при контакте донора и реципиента и образуют конъюгационный мостик
- Содержит **tra-оперон**



- В плазмиде F идентифицировано и картированы гены, контролирующие различные этапы конъюгации
- Большая часть этих генов образует единый **оперон *tra Y—Z*** (от англ. *transfer* — перенос) длиной около **30000 п. н.**
- Начало конъюгационного переноса связано с разрезанием одной из нитей ДНК плазмиды F в локусе ***ori T***, расположенном **перед генами *tra*-оперона** и ориентированном таким образом, что ***tra*-область переносится в реципиентную клетку последней**

Состояние F-фактора (F-плазмиды):



1. Автономное F

F-фактор находится в цитоплазме в свободном состоянии, не интегрирован в бактериальную хромосому и не несет в своем составе хромосомные гены

2. Интегрированное, или

Hfr. F-фактор интегрирован в бактериальную хромосому, и в таком состоянии носит название эписомы. Донорские клетки с интегрированным F-фактором обеспечивают высокую частоту переноса хромосомной ДНК и получили название клеток *Hfr* (*High frequency of recombinants*)

Автономное F2 □

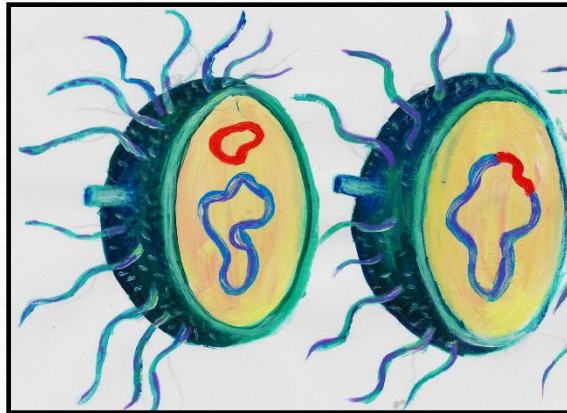
Интегрированная F-плазмида может покинуть бактериальную хромосому, захватывая близлежащие гены, таким образом превращаясь в F

Таким образом,

F-фактор может находиться в мужской клетке в двух альтернативных состояниях:

- в автономном, когда он реплицируется независимо от хромосомы;
- в интегрированном, когда он ковалентно присоединён к хромосомной ДНК и реплицируется в ее составе, подобно профагу, наряду с другими хромосомными генами (у *Hfr* штаммов)

F+



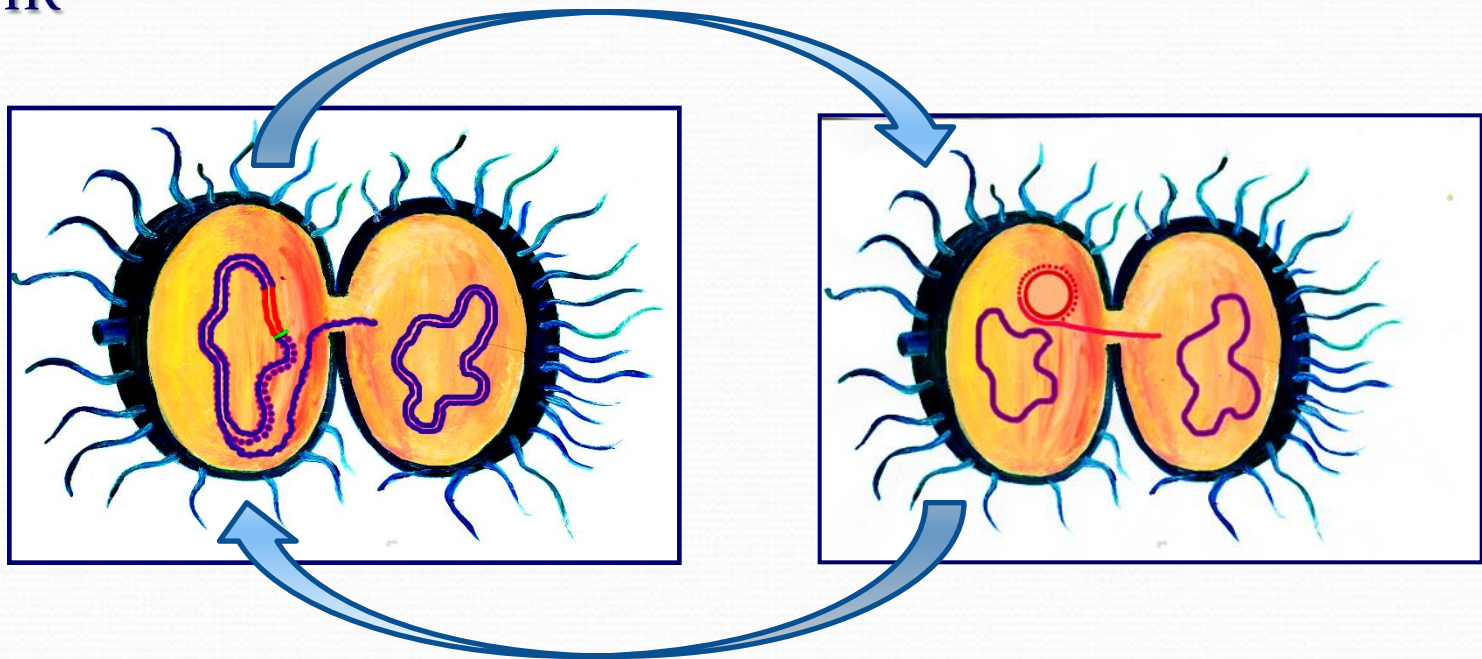
Hfr F+

Донор и реципиент при конъюгации:

- 1. **Донор (F^+)**. Донор отличается присутствием полового фактора F , представляющего собой плазмиду, в которой закодированы гены, обеспечивающие ее репликацию, образование пилей, формирование конъюгационного мостика и, наконец, сам перенос
- 2. **Реципиент (F^-)**. Не имеет плазмиды F
 - **Исход конъюгации и частота передачи хромосомных признаков зависят от физиологического состояния F -фактора**

Интеграция фактора F в бактериальную хромосому обратима:

- При правильном «вырезании» (эксцизии, выключении) фактора F из бактериальной хромосомы разрыв происходит исключительно по его краям, в редких случаях выключение происходит с захватом соседних участков бактериальной ДНК

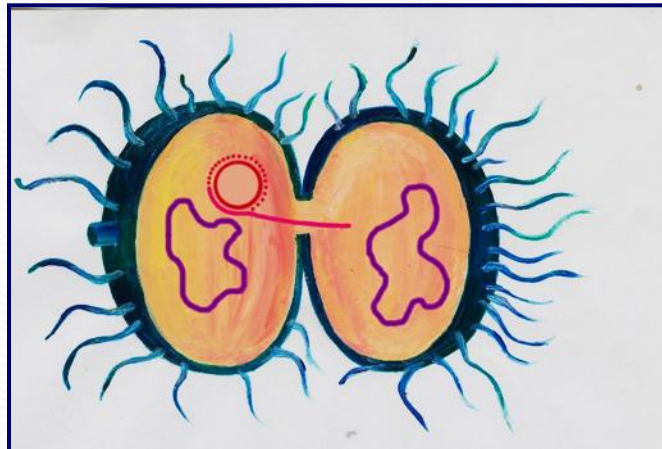


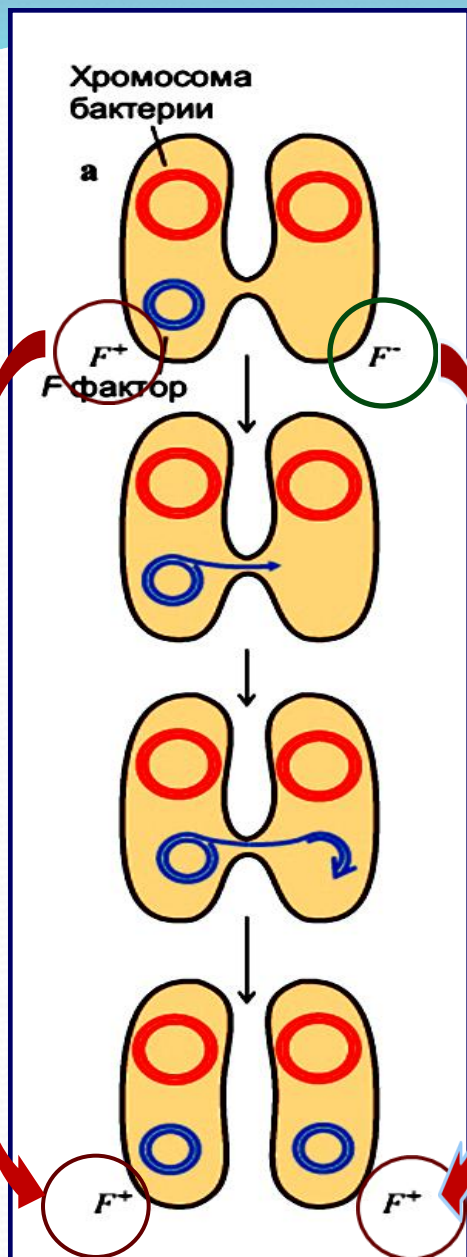
Механизм конъюгации:

- Столкновение донора и реципиента, формирование пары
- Образование конъюгационного мостика, защищающего передаваемую ДНК от действия нуклеаз окружающей среды
- Прикрепление секс-пилей донора к поверхности реципиента, при этом контакт клеток происходит очень короткое время

Перенос плазмиды F при автономном состоянии F-фактора:

- От донора к реципиенту передается только плаزمида F с частотой, близкой к 100%.
- Реципиент превращается в потенциального донора
- Донор сохраняет фактор F
- Хромосомные признаки не передаются



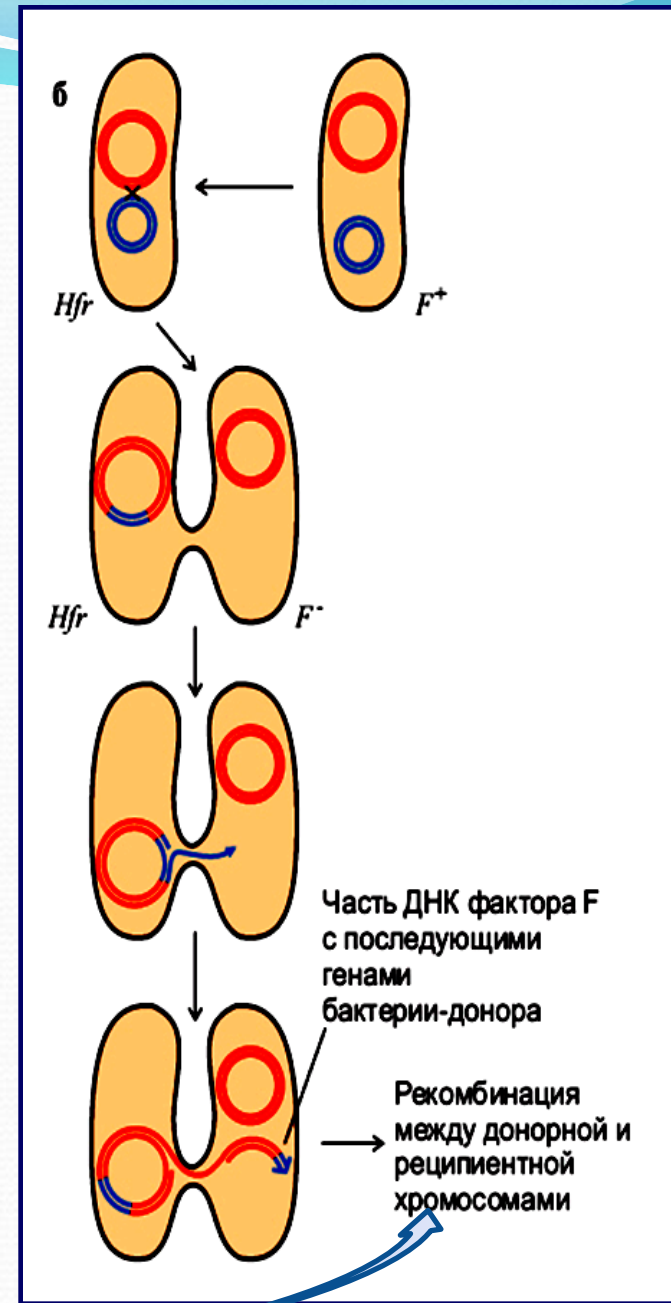


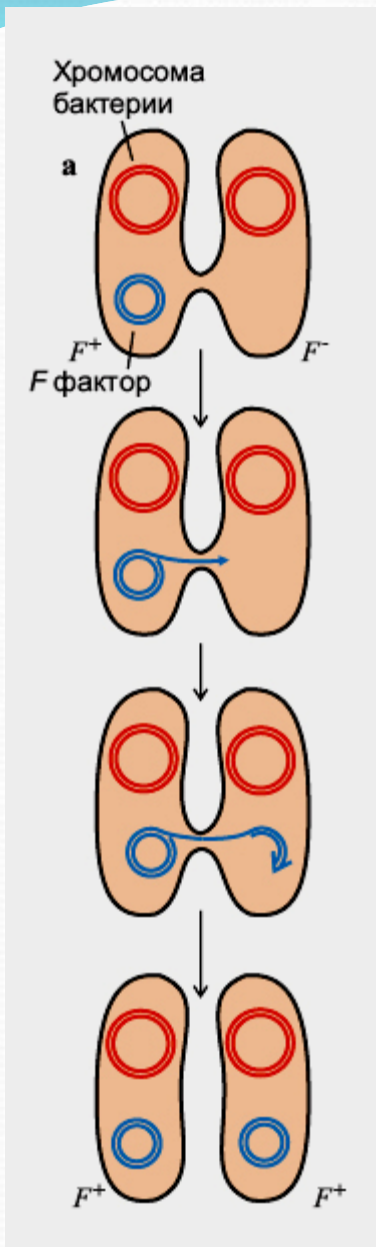
Скрещивание F^+ x F^- :

- Перенос ДНК происходит после разрыва в определенном месте одной из цепей F-плазмиды
- Разорванная цепь движется по конъюгационному мостику
- В цитоплазме реципиента перенесенная цепь ДНК достраивается второй
- Концы замыкаются
- Клетка F^- становится F^+

Скрещивание Hfr x F-:

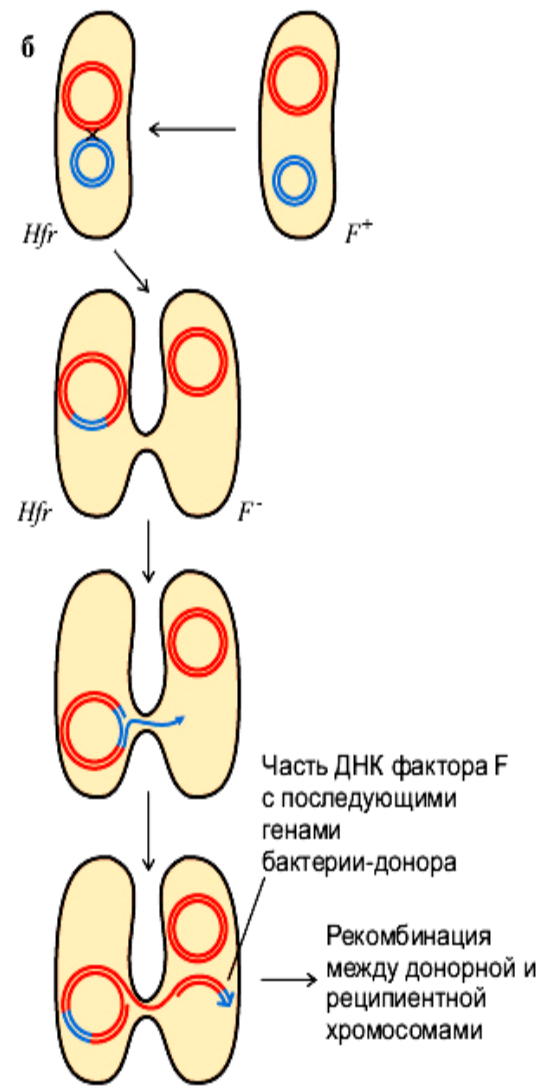
- Перенос бактериальной ДНК за счет Hfr фактора происходит, если F-фактор интегрирован в бактериальную хромосому
- В результате такой конъюгации реципиент остается F-, донор остается Hfr, а перенос полной хромосомной ДНК донора или ее фрагмента происходит с высокой частотой
- Так как перенос всей хромосомы *E. coli* продолжается при 37°C около 100 мин, а время контакта клеток ограничено, то к реципиенту в большинстве случаев переходит не вся донорская ДНК, при этом Hfr фактор не попадает реципиенту (переносится последним), хотя другие гены могут быть перенесены





Скрещивание F^+ x F^-

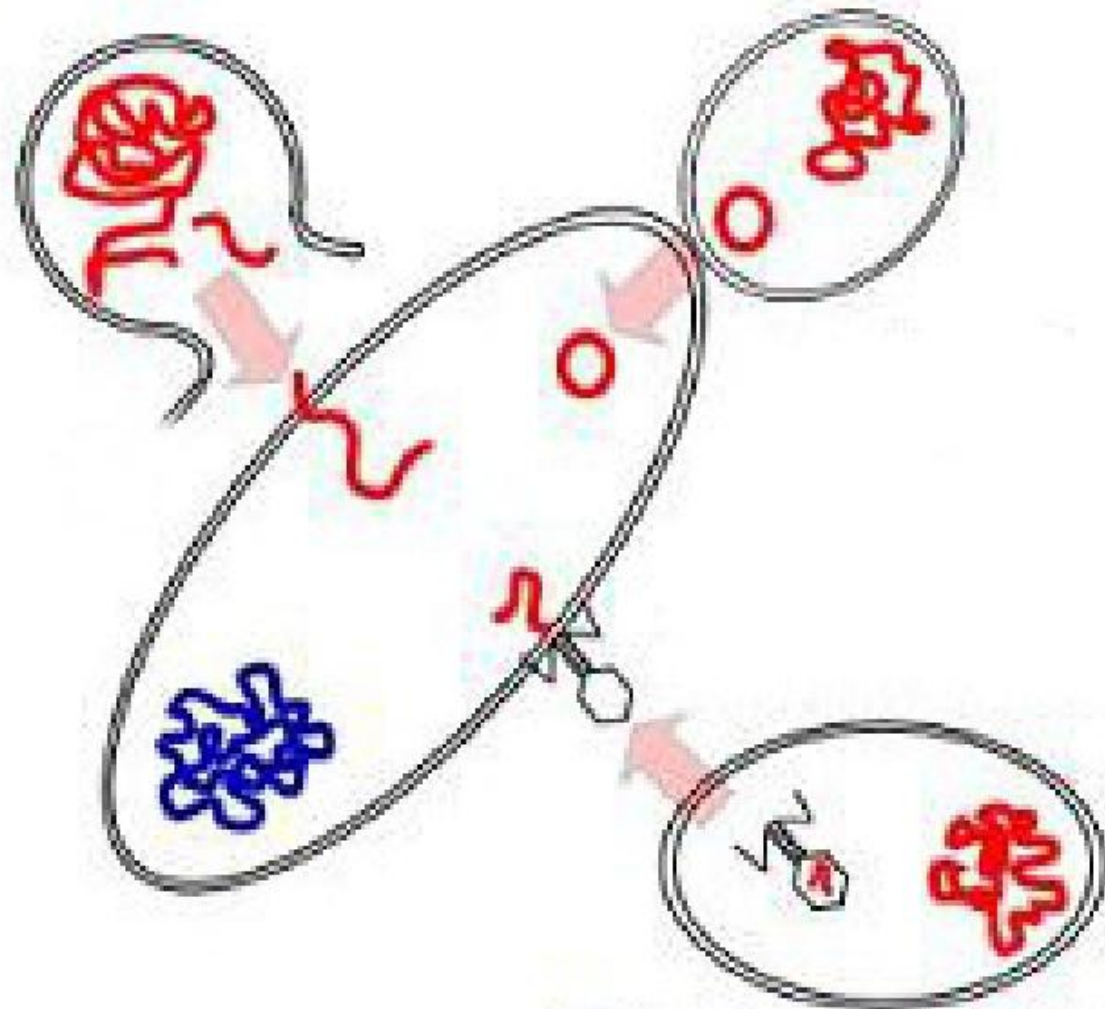
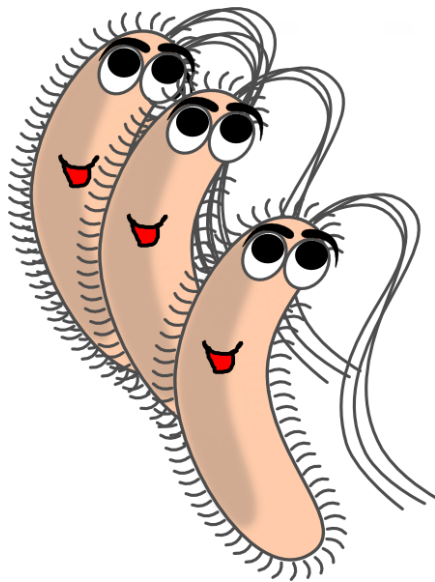
Hfr x F^-



Hfr - от англ. High Frequency Recombination

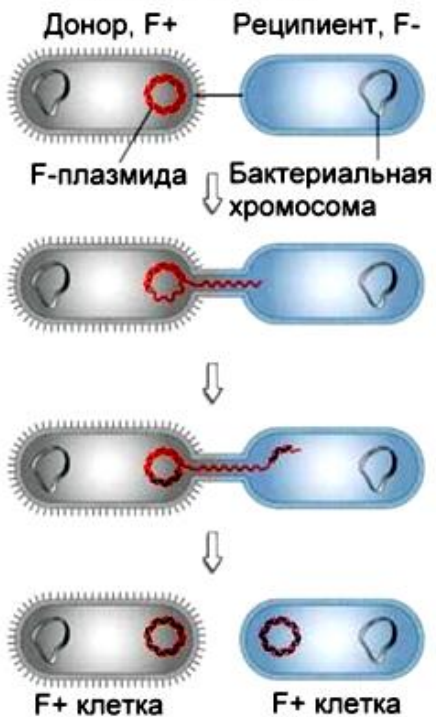
Трансформация

Конъюгация

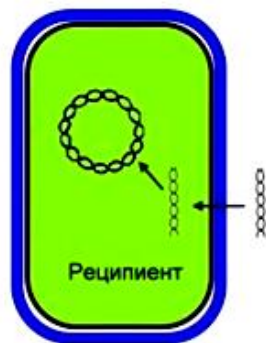


Трансдукция

Конъюгация



Трансформация



Бактериофаг



Трансдукция



