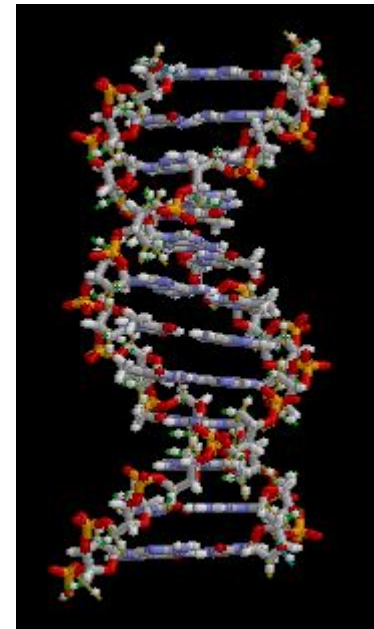
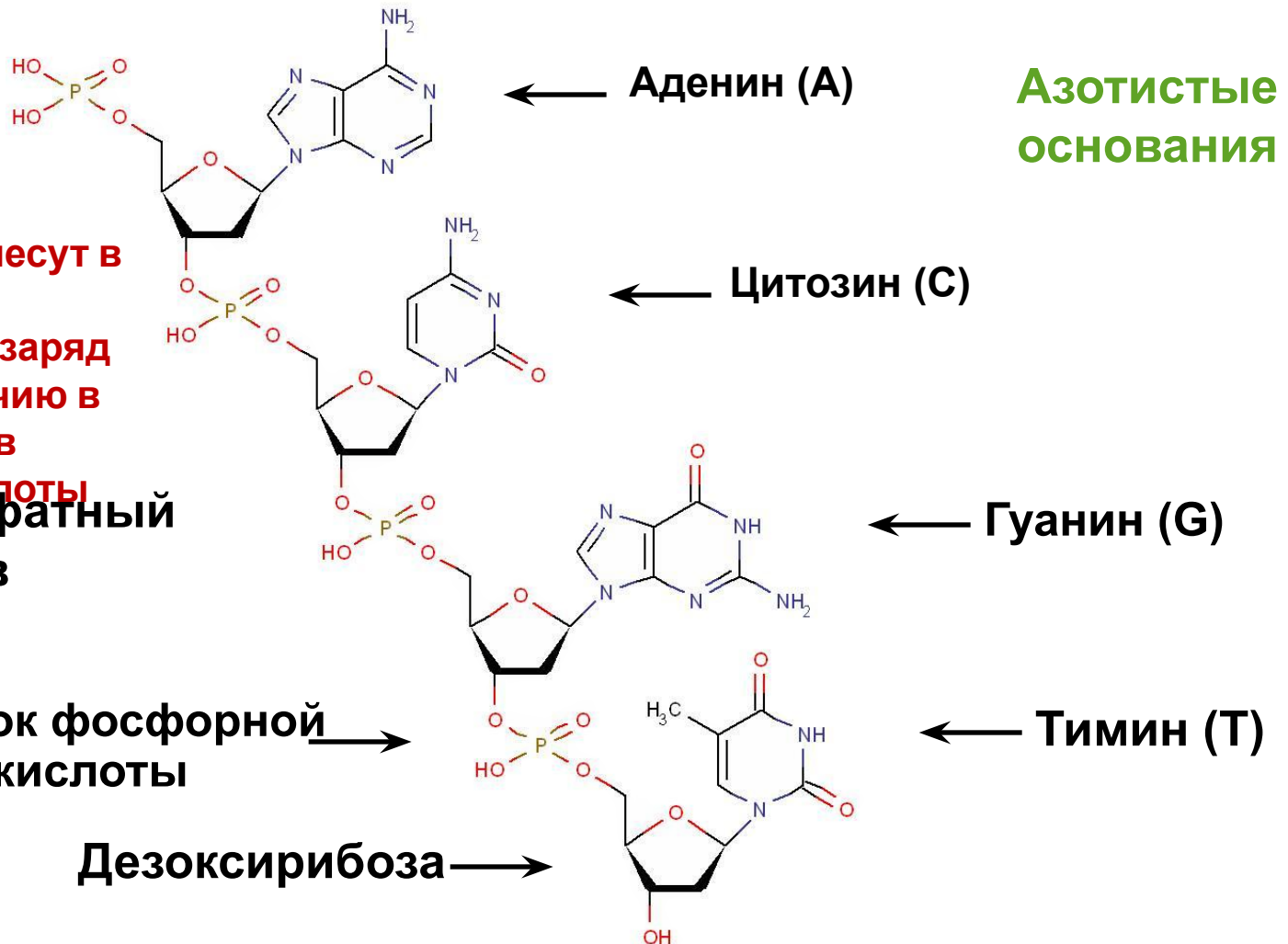


ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

Организация генома прокариот



ДНК – носитель наследственной информации



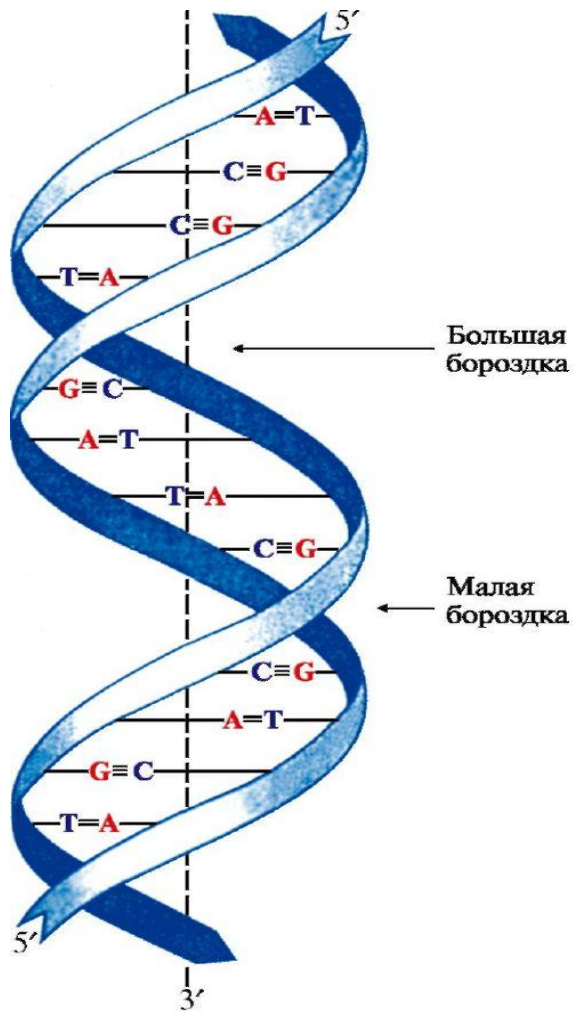
Молекулы ДНК несут в растворе отрицательный заряд благодаря наличию в составе остатков фосфорной кислоты

Сахарофосфатный остов

Остаток фосфорной кислоты

Дезоксирибоза

Двойная спираль ДНК



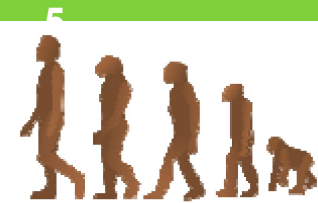
- Макромолекула ДНК представляет собой две антипараллельные неразветвленные полинуклеотидные цепи, правозакрученные вокруг общей оси в **двойную спираль**.
- Такая пространственная структура удерживается множеством водородных связей, образуемых азотистыми основаниями, направленными внутрь спирали.
-

Генетический код – способ записи информации о структуре белка, тРНК, рРНК

Свойства кода:

- Триплетность
- Универсальность
- Вырожденность (синонимичность)
- Неперекрываемость
- Фиксированная стартовая точка: началом трансляции любого гена является кодон AUG, в конце UAA, UAG, UGA- стоп-кодоны
- Если генетический код считывается неперекрывающимися триплетами, есть только три возможности транслирования нуклеотидной последовательности в аминокислотную в зависимости от стартовой точки
- Эти три возможности называют рамками считывания
- Соответственно участок двойной спира ДНК содержит 6 рамок считывания





Размеры геномов

- Вирусы, плазмиды
 - От 1 т.п.н. до 100 т.п.н. ...HIV 9181 п.н.
- Бактерии, археи
 - От 1 м.п.н. до 10 м.п.н. ...E.coli 4.6 м.п.н.
- Простейшие эукариоты
 - От 10 м.п.н. до 100 м.п.н. ...Malaria 23 м.п.н.
- Животные, растения
 - От 100 м.п.н. до 150 млрд.п.н. ...Human 3.2 млрд. п.н.

Геном – физическая и генетическая совокупность всех генов и генетических элементов клетки или вируса.

- Геномы прокариот включают 2 типа генетических структур:
 - - нуклеоид
 - - внехромосомные элементы-плазмиды
- В состав хромосомы входят:
 - Структурные гены, кодирующие белки и РНК
 - Межгенные участки (спейсеры)
 - Регуляторные элементы
 - Мобильные элементы

Состав генома прокариот

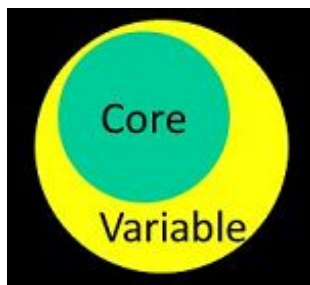
Локализация	Структуры
Хромосома Плазмиды	Кодированные последовательности генов Нетранслируемые области генов: 5'- и 3'-концевые районы, интроны Регуляторные элементы генома: промоторы, терминаторы транскрипции, сайты связывания регуляторных белков, сайты связывания рибосом Сайты связывания с клеточными мембранами Мобильные элементы Интегроны Профаги и интегрированные в хромосому плазмиды CRISPR – структуры

- Большую часть генома прокариот (80-90%) составляют кодирующие области
- Интроны встречаются в генах, кодирующих РНК и белки, но значительно реже, чем у эукариот

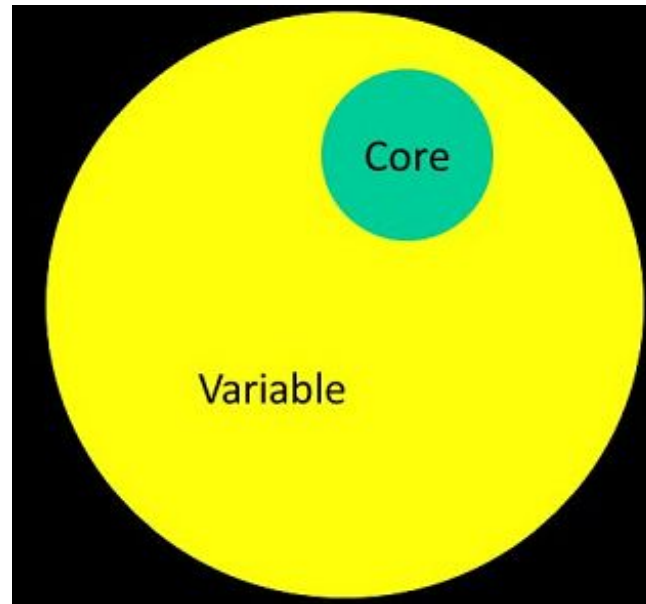
- Геномы прокариот – динамичные структуры даже в пределах вида
- Исходя из внутривидовой вариабельности геномов, выделяют:
- - **Кор-геном** (базовый, core) – включает гены «домашнего хозяйства», ответственные за системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих видовую/родовую принадлежность
- - **Вспомогательные гены** – контролируют процессы и признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише; многие из таких генов локализованы в плазмидах и мобильных элементах, которые не обязательно присутствуют во всех штаммах одного вида

- **Пан-геном** - все имеющиеся в пределах вида/рода гены (набор всех генов, присутствовавших хотя бы в одном штамме кишечной палочки)

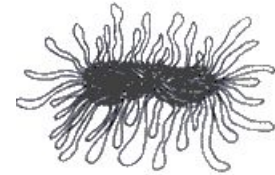
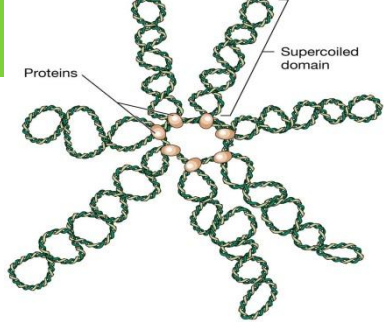
Геном одного
организма



Геном «вида»

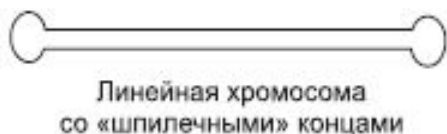
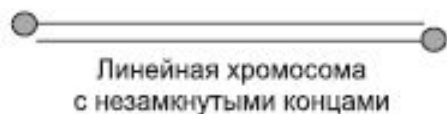


Пан-геном (желтый+голубой)
прокариотического вида гораздо
больше генома одного
организма или кор-генома вида

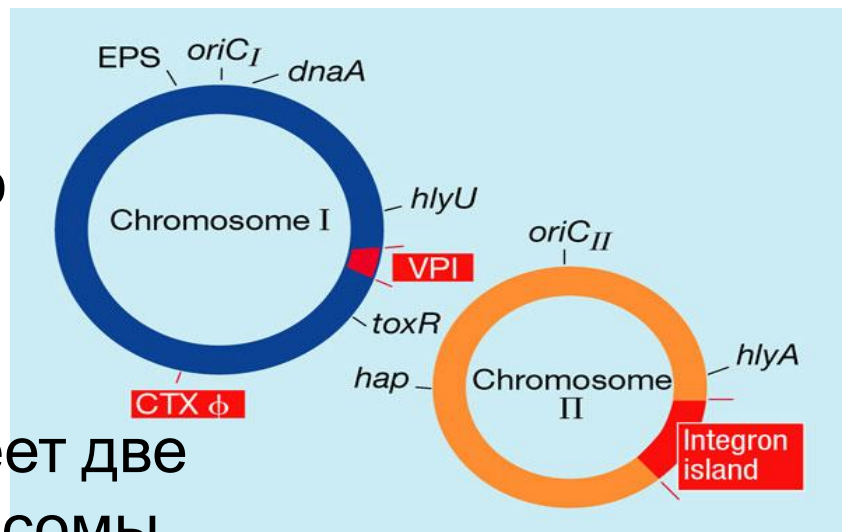


- **Бактериальная хромосома** – это двуспиральная правозакрученная ДНК, замкнутая в кольцо – нуклеоид
- Нуклеоид располагается в цитоплазме
- С нуклеоидом ассоциированы молекулы РНК-полимеразы, ДНК-топоизомеразы и гистоноподобного белка ДНК нуклеоида находится в состоянии отрицательной сверхскрученности.
- Супервитки можно рассматривать как форму запасания энергии, которая может использоваться для разделения цепей ДНК при инициации транскрипции.
- Суперспирализация необходима для упаковки громадной молекулы ДНК в малом объеме клетки
- Помимо этого, суперспирализация ДНК, облегчающая ее расплетение, обеспечивает начало репликации и транскрипции

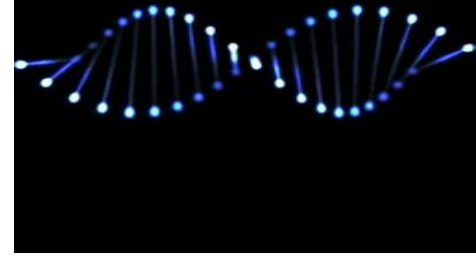
- Некоторые бактерии имеют линейные молекулы ДНК, но их структура отличается от эукариотических, имеющих специальные концевые последовательности – теломеры
- Так, у стрептомицетов к 5'-концам ковалентно присоединены белки, обеспечивающие свободный 3'-конец для инициации репликации.
- Другой тип линейных хромосом, имеющих ковалентно замкнутые «шпильчатые» концы, обнаружен у спирохет рода *Borrelia*
- Фитопатогенная бактерия имеет одну кольцевую и одну линейную



Vibrio cholerae имеет две кольцевые хромосомы



ДНК



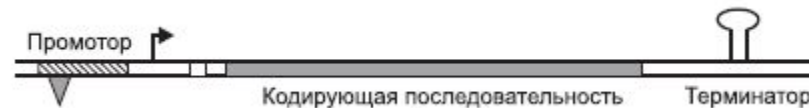
В структуре ДНК можно выделить следующие участки

- **Ген** - участок молекулы ДНК, отвечающий за синтез одного конечного продукта (белка или функциональной РНК)
- **Оперон** - участок молекулы ДНК, считывающийся в составе одной молекулы мРНК и кодирующий синтез нескольких функционально связанных конечных продуктов
- **Мобильные элементы:**
- IS- последовательности
- Транспозоны

Регуляторные элементы генома прокариот

Экспрессия генов – процесс, в ходе которого наследственная информация (последовательность нуклеотидов в ДНК) реализуется в синтезе РНК или белка.

- Индивидуально экспрессируемый прокариотический ген помимо кодирующей структуры белка или РНК области содержит промотор и терминатор транскрипции

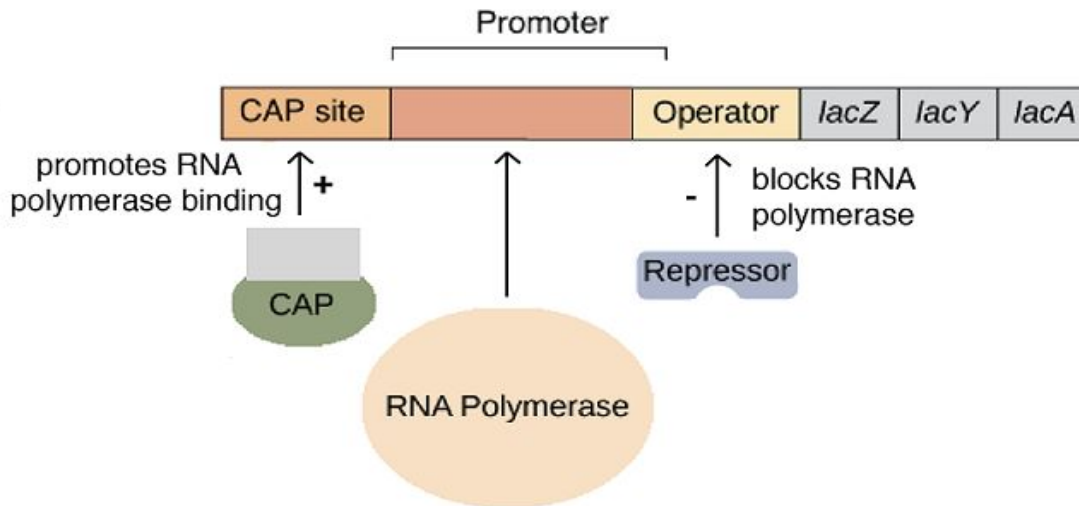


- Функционально родственные гены часто располагаются один за другим, транскрибируются в составе одной полицистронной мРНК и регулируются координированно.
- Объединение в оперон облегчает горизонтальный перенос целого кластера генов

Строение лактозного оперона

- **Оперон** - набор функционально связанных генов, транскрибирующихся в составе одной молекулы мРНК

The *lac* operon:

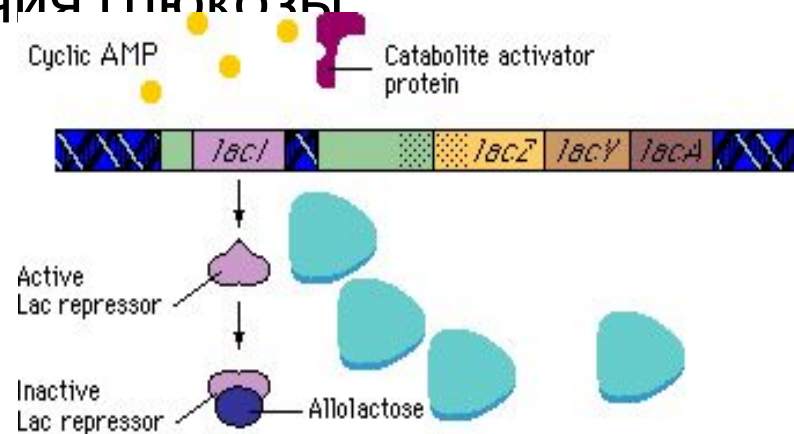


- **CAP** сайт – сайт связывания комплекса с белком, активирующим катаболизм (CAP, catabolism activating protein), обеспечивает связывание РНК-полимеразы
- **Промотор** - место начала транскрипции; промотор определяет, какая из двух цепей ДНК будет служить матрицей для синтеза иРНК.
- **Оператор**- участок обратимого связывания белка-репрессора (продукт гена *LacI*; перекрывается с промоторным участком
- ***lacA*, *lacY*, *lacZ*** – гены, кодирующие ферменты утилизации лактозы и белок-транспортер

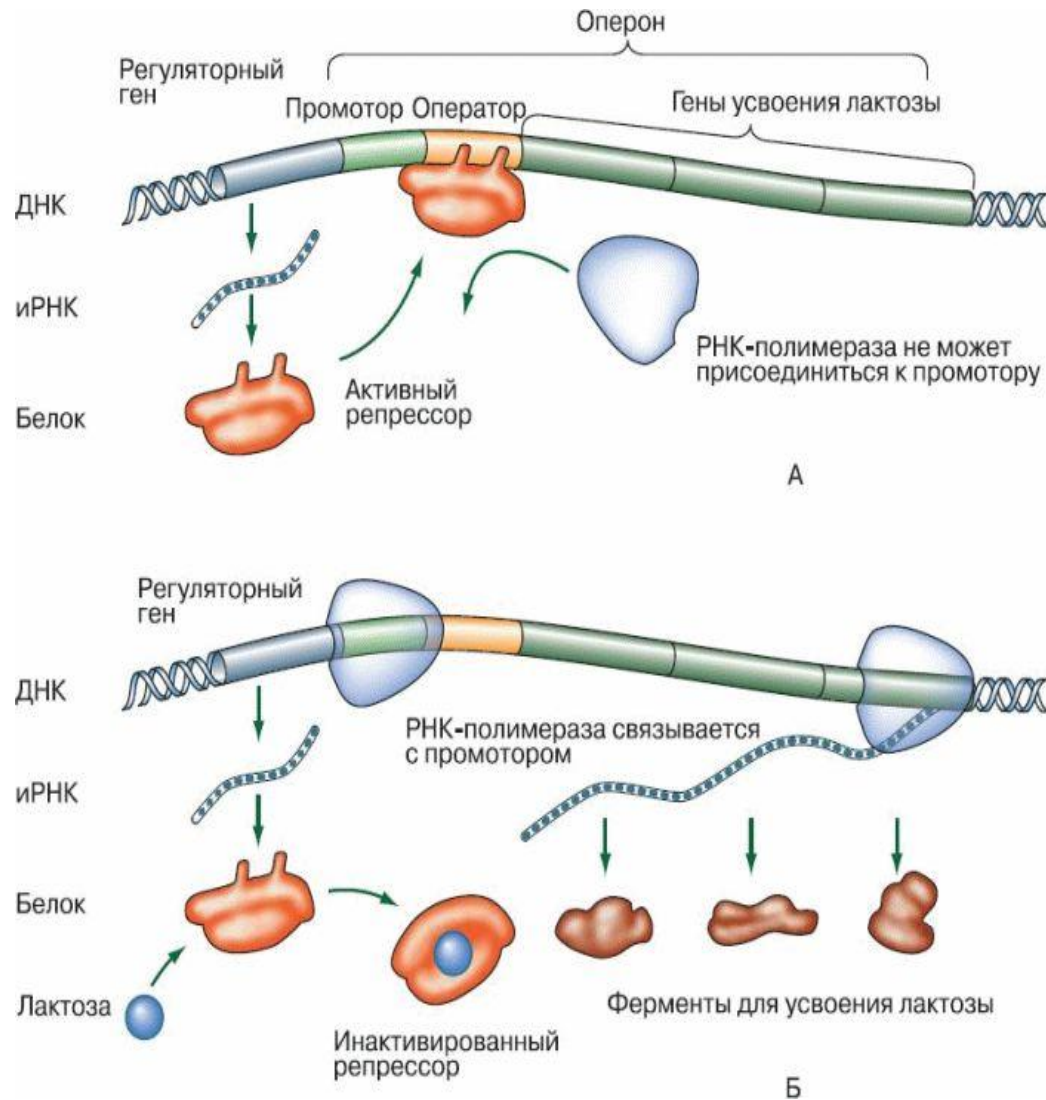
Регуляция транскрипции

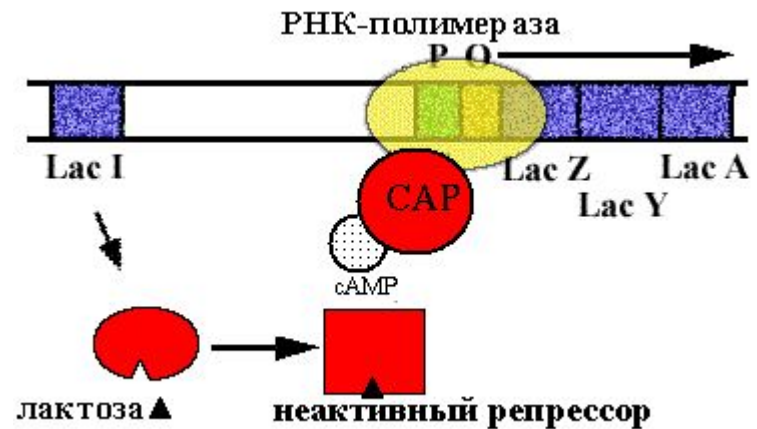
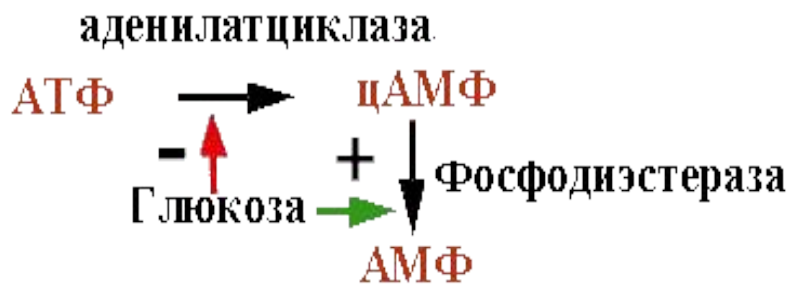
Работа лактозного оперона регулируется двумя системами:

- ❑ белком-репрессором – индивидуальный сигнал на наличие лактозы
- ❑ белком, активирующим катаболизм (CAP), действующим опосредованно, через глобальный сигнал цАМФ- сенсор наличия глюкозы



1. В отсутствие индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором. РНК-полимераза не может присоединиться к промотору, транскрипция структурных генов оперона не идёт
2. В присутствии лактозы белок-репрессор присоединяет её, изменяет свою конформацию и теряет сродство к оператору. РНК-полимераза связывается с промотором и





- цАМФ образуется из АТФ ферментом аденилатциклазой.
- Фосфодиэстераза превращает цАМФ в АМФ.
- Глюкоза активирует второй и инактивирует первый фермент.
- Чем больше в клетке глюкозы, тем меньше цАМФ.

- Если нет глюкозы, то цАМФ соединяется с белком катаболической репрессии (CAP) и образуется комплекс CAP•цАМФ, активирующий посадку РНК-полимеразы на промотор.
- В присутствии лактозы lac-оперон включается и работает.
- Если же в клетке есть еще и глюкоза (более экономичный источник энергии), то нет цАМФ - и активатор не образуется, lac-оперон работает слабо, без дополнительной индукции.

Плазмиды, вирусы и мобильные элементы

- Помимо хромосомных генов, кодирующих белки и РНК, в состав геномов прокариот входят другие генетические структуры:
- Мобильные элементы
- Плазмиды
- Интегроны
- Профаги
- CRISPR локусы
- Различные регуляторные элементы

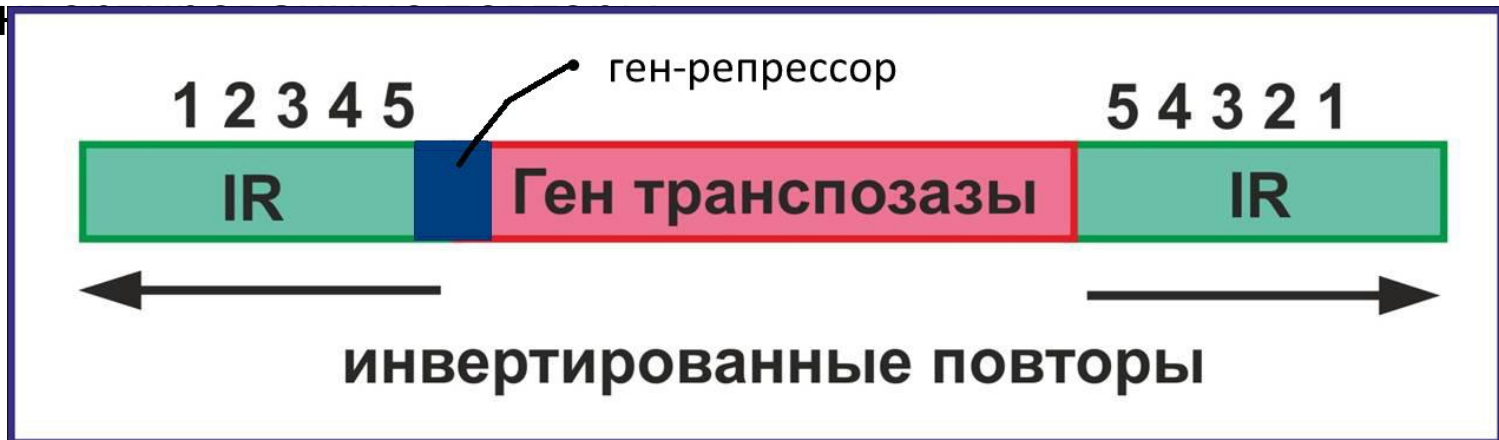
МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ



Вставочные (инсерционные) последовательности (IS-элементы)

- Это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами
- ~1000 н.п.
- Содержат только гены транспозиции (их собственного перемещения):
 - Ген транспозазы (фермента, обеспечивающего процесс исключения IS-элемента из ДНК и его интеграцию в новый локус)
 - Ген, детерминирующий синтез репрессора (регулирует весь процесс перемещения)

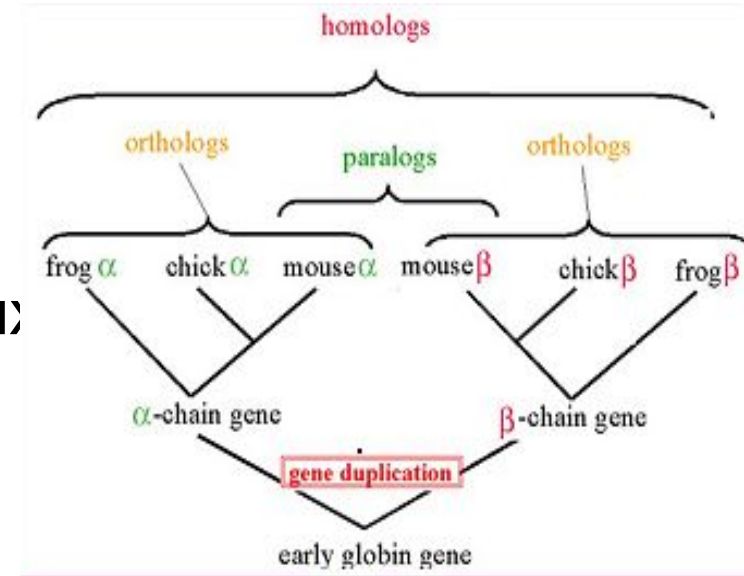
И



Что такое повтор?

- - **участок ДНК**, который встречается **более одного раза в геномной последовательности**.
- Наиболее частые:
 - **Транспозоны**
 - Дублицированные гены (**паралоги**)
 - **VNTR** – локус с варьирующим числом тандемных повторов; послерасщепления таких аллелей рестриктазами образуются рестриктсионные фрагменты различной длины, которые могут быть использованы в качестве маркеров при картировании генов
 - **Короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами** (*CRISPR — Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) — это прямые и разделяющие их уникальные последовательности в ДНК бактерий и архей, которые совместно с ассоциированными генами (*Cas, CRISPR-associated genes*) обеспечивают защиту клетки от чужеродных генетических элементов (бактериофагов, плзмид).


- В сравнительной геномике для выяснения родственных связей и происхождения таксонов принято использовать понятие ортологичных и паралогичных генов



- ❑ Гомологичные последовательности называют *ортологичными*; копии этого гена у дочерних видов называются *ортологами*.
- ❑ Гомологичные последовательности называют *паралогичными*, если к их разделению привело удвоение гена: если произошло удвоение гена, то его копии называют *паралогами*

Репликативная (незаконная) рекомбинация – перемещение IS-элементов

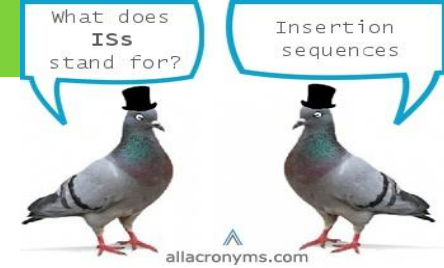
Инвертированные повторы узнает транспозаза и осуществляет одноцепочечные разрывы цепей ДНК, расположенных по обе стороны от IS-элемента



Оригинальная копия IS-элемента остается на прежнем месте, а её дубликат перемещается на новый участок

Транспозаза определяет, какой участок ДНК будет перемещен и идентифицирует место будущего расположения – целевую последовательность

Значение IS элементов



- 1. Участвуют в мутационной изменчивости микроорганизмов – инсерциях и делециях. Инсерция IS элементов в бактериальную ДНК приводит к синтезу неполноценного белка.
- 2. Являются генетическими маркерами вида или рода бактерий. Некоторые IS последовательности специфичны для определенных видов микроорганизмов, что позволяет их использовать для видовой идентификации бактерий.
- 3. Являются местом распознавания и встраивания плазмид и генно-инженерных векторов. Плазмиды и генно-инженерными векторы встраиваются в бактериальную хромосому в области IS последовательностей.
- 4. Участвуют в регуляции функций генов – активации или репрессии.

Транспозоны (Tn-элементы)

- состоят из 2000-25 000 пар нуклеотидов
- содержат фрагмент ДНК, несущий специфические гены, и два концевых **IS-элемента**
- На обоих концах Tn находятся прямые или инвертированные повторы, по которым транспозаза распознает их и вырезает.



Транспозоны (Tn-элементы)

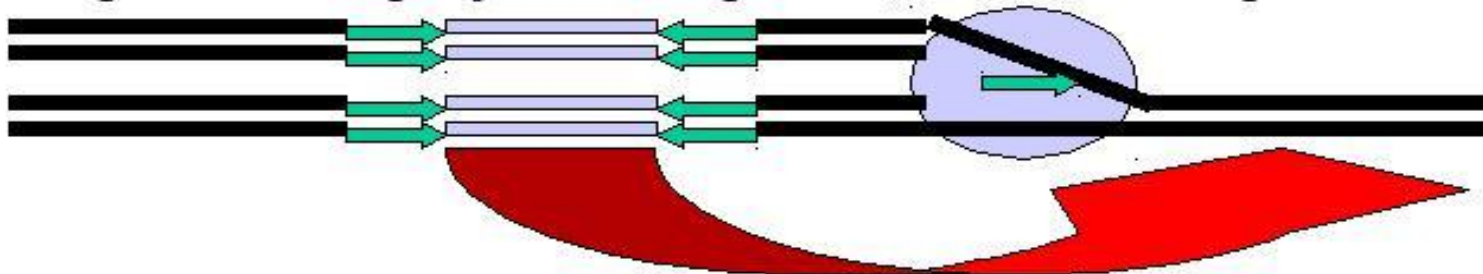
- Перенос транспозонов осуществляется *консервативным* или *репликативным* механизмом.
- *Консервативный перенос* происходит путем вырезания транспозона из одного участка и транспозицией в другой без увеличения количества копий, при этом участок ДНК, откуда вырезается транспозон, утрачивает свои функции.
- При *репликативном способе* переноса синтезированная копия транспозона перемещается в новое место, при этом механизме увеличивается количество копий.

Репликативная транспозиция: синхронизация с репликацией ДНК.

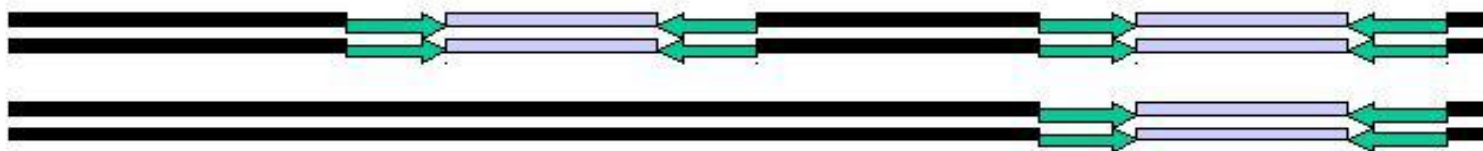
Активный транспозон



Вырезание - сразу после прохождения вилки репликации

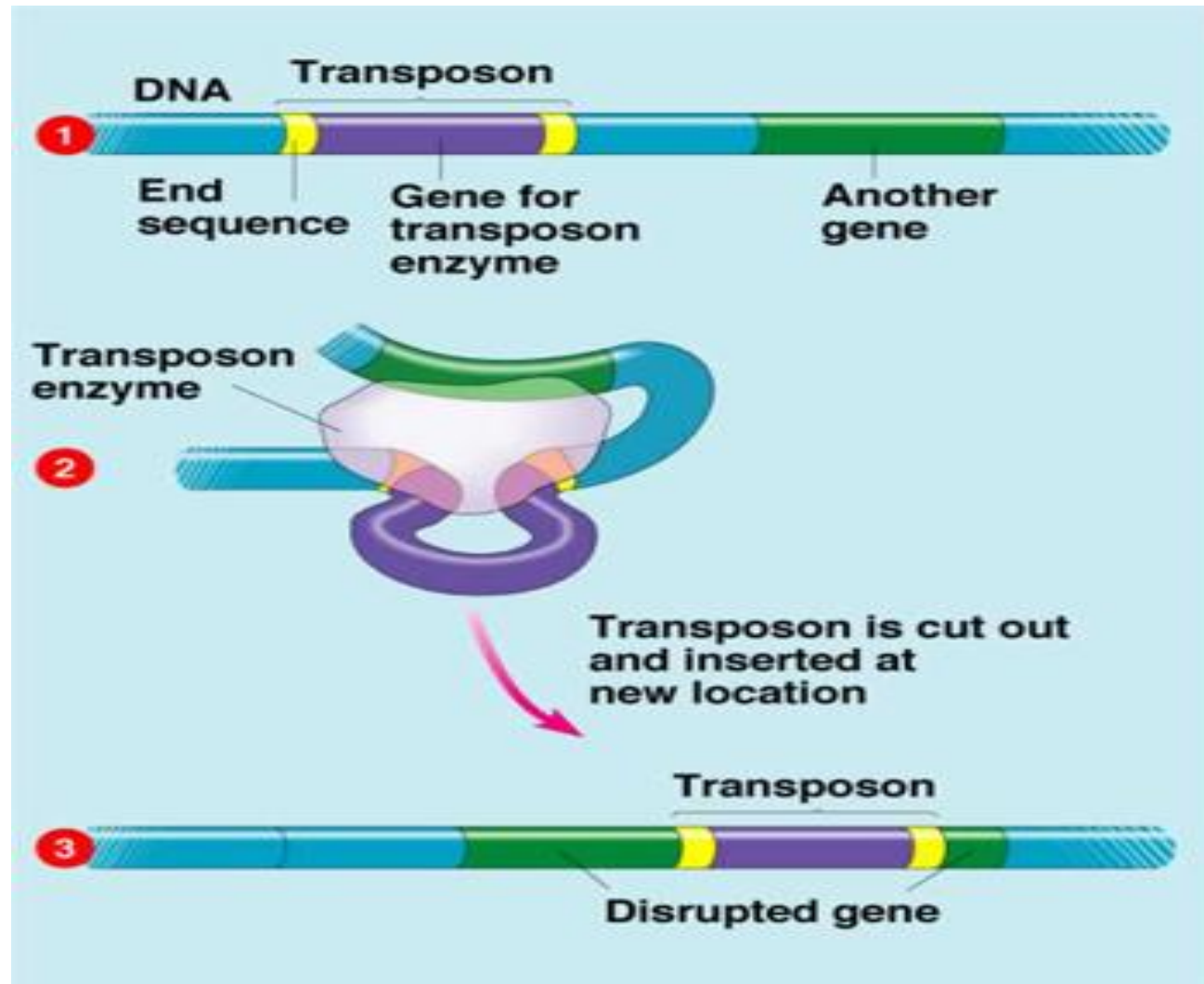


Встраивание перед вилкой репликации



Повторная репликация транспозона

Консервативная транспозиция



Транспозоны (Tn-элементы).

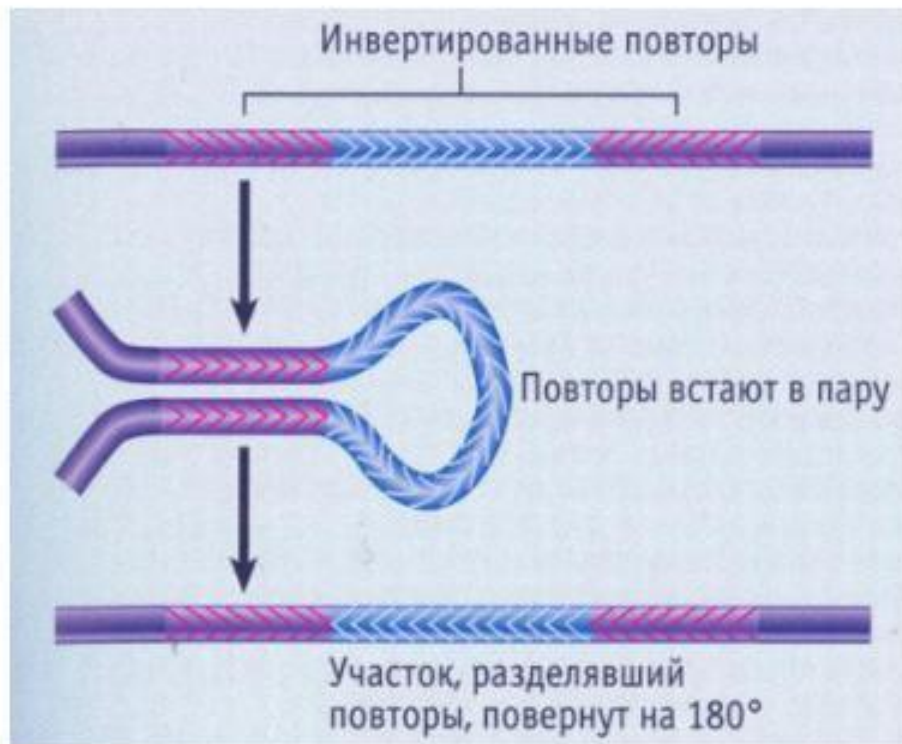
Функции

- Транспозоны участвуют в регуляции активности генов, инактивируя их или активируя.
- Осуществляют горизонтальный перенос генов, например, вирулентности или резистентности, обуславливая распространение устойчивости к антибиотикам среди микроорганизмов.
- Перемещение подвижных генетических элементов по репликону или между репликонами вызывает:
 - инактивацию генов тех участков ДНК, куда они, переместившись, встраиваются;
 - образование повреждений генетического материала;
 - слияние репликонов, т.е. встраивание плазмиды в хромосому;
 - распространение генов в популяции бактерий, что может приводить к изменению биологических свойств популяции, смене возбудителей инфекционных заболеваний, а также способствует эволюционным процессам среди микробов.

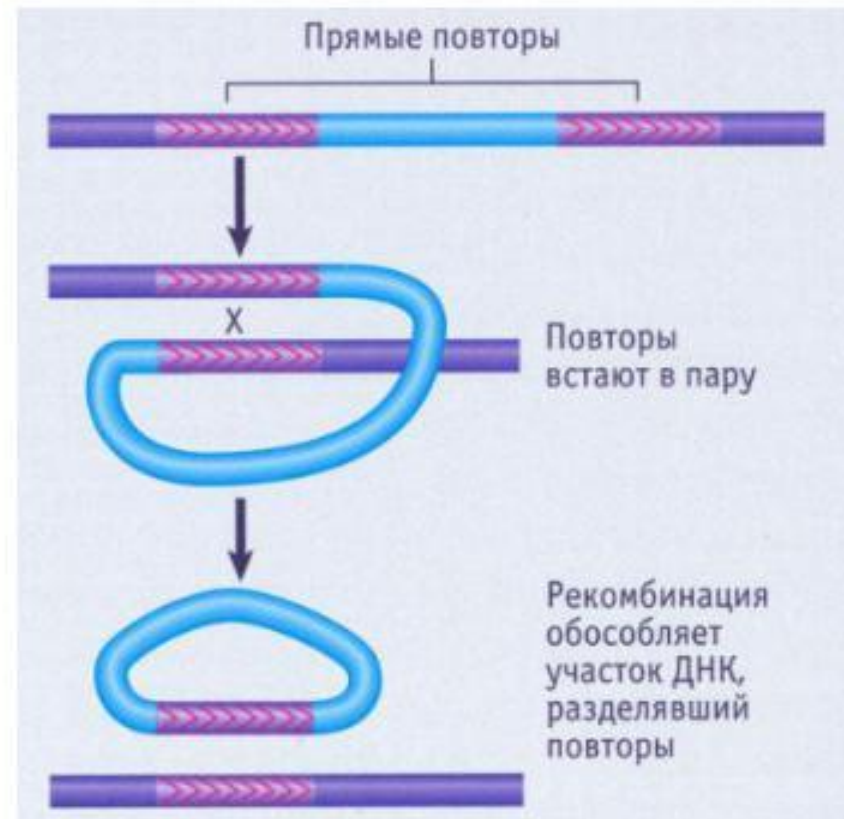
Горизонтальный перенос - МГЭ

Роль транспозонов:

- Перестройка генома хозяина



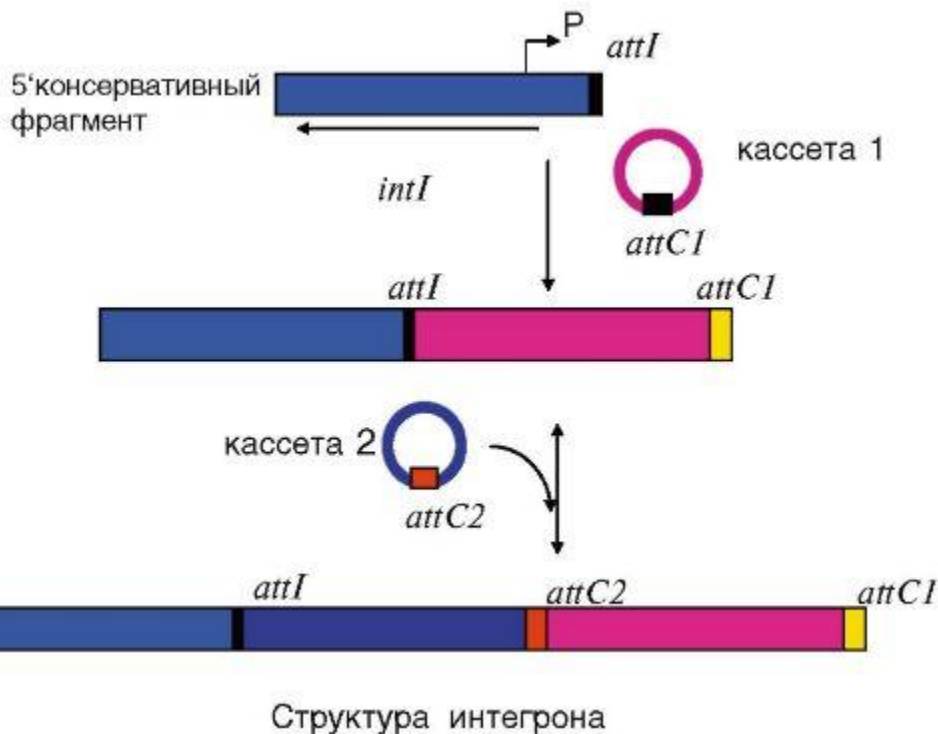
Рекомбинация между инвертированными повторами меняет ориентацию вставки относительно геномного окружения



Рекомбинация между прямыми повторами приводит к вырезанию фрагмента; каждый продукт рекомбинации имеет одну копию повтора

Интегроны

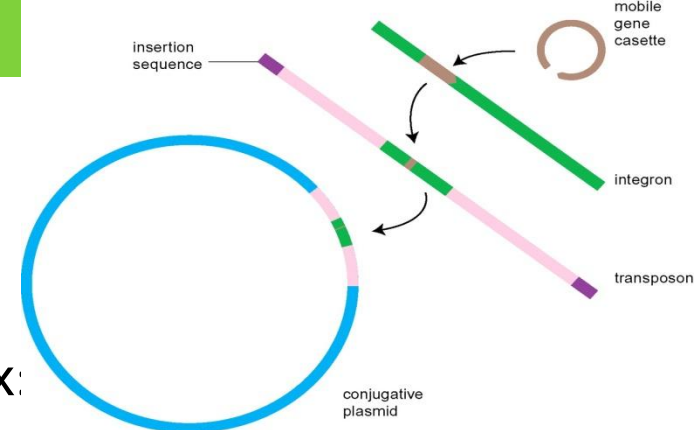
- генетические элементы, имеющие в своем составе интеграционный модуль с геном интегразы, сайтом интеграции и промотором, направленным в противоположную от гена интегразы сторону
- благодаря этому модулю интегроны способны встраиваться в геном и экспрессировать чужие гены в составе кассеты



- Строение интегрона:
- ✓ *attI* - сайт рекомбинации интегрона;
 - ✓ *intI* - ген, кодирующий интегразу;
 - ✓ P - промотор;
 - ✓ *attC* - сайты рекомбинации кассет антибиотикорезистентности

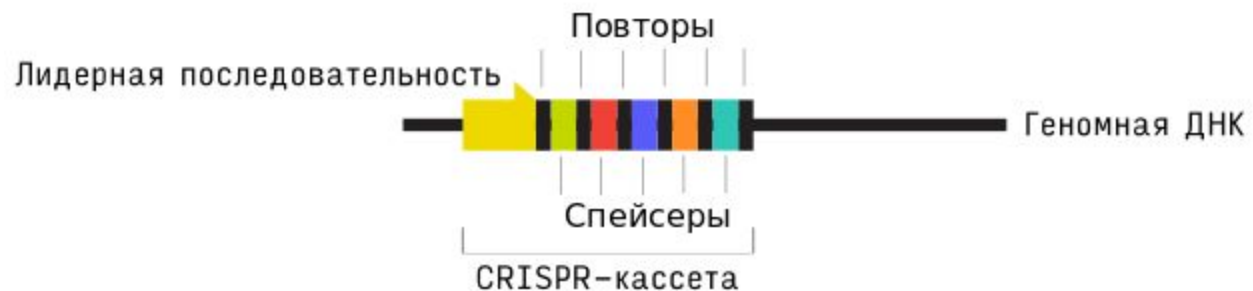
Интегроны

- Кассета может существовать в двух формах: кассета интегрирована в интегрон, и в виде маленькой кольцевой двухцепочечной ДНК.
- Кассеты имеют размеры от 260 до 1500 н.п. Они содержат преимущественно 1 ген антибиотикорезистентности и сайт рекомбинации, состоящий из 59 пар оснований, расположенный на 3'-конце.
- Интеграза осуществляет рекомбинацию между участком 59 н.п. кассеты и участком *att* интегрона, включая гены кассеты в интегрон в такой ориентации, чтобы они могли экспрессироваться с промотора *P* интегрона.
- Интеграция кассет в интегрон является обратимым процессом.
- Интегроны могут располагаться как на хромосоме, так и на плаزمиде.
- Один интегрон может захватывать несколько кассет антибиотикорезистентности.



CRISPR- Cas

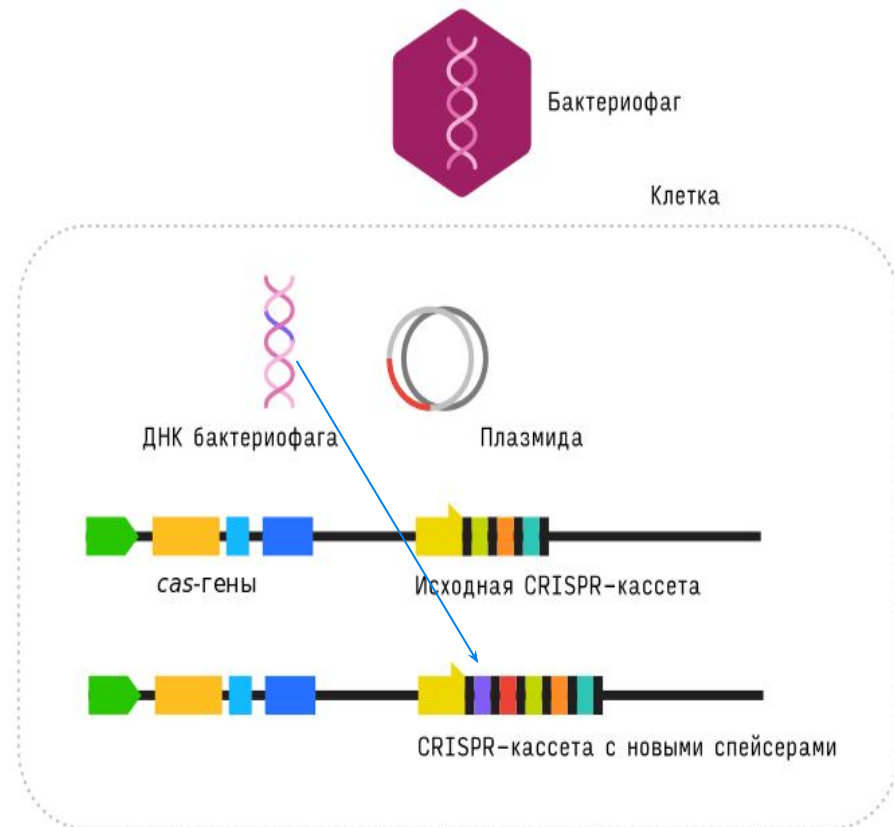
- Название локуса CRISPR — фактически его словесный портрет: «скопление разделенных регулярными промежутками коротких симметричных повторов» (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*).
- одинаковые короткие повторы чередуются с неповторяющимися последовательностями, как в детском стишке Даниила Хармса: «Чиж-судомойка, чиж-поломойка, чиж-огородник, чиж-водовоз...» — только вместо «чижа» палиндром, одинаково читающийся с обоих концов.
- CRISPR-структуры чаще располагаются на основной хромосоме (нуклеоиде), но иногда входят в состав плазмид
- CRISPR — это сложная многокомпонентная система, состоящая из кассет, содержащих повторы и спейсеры



Структура CRISPR-кассеты.

CRISPR- Cas

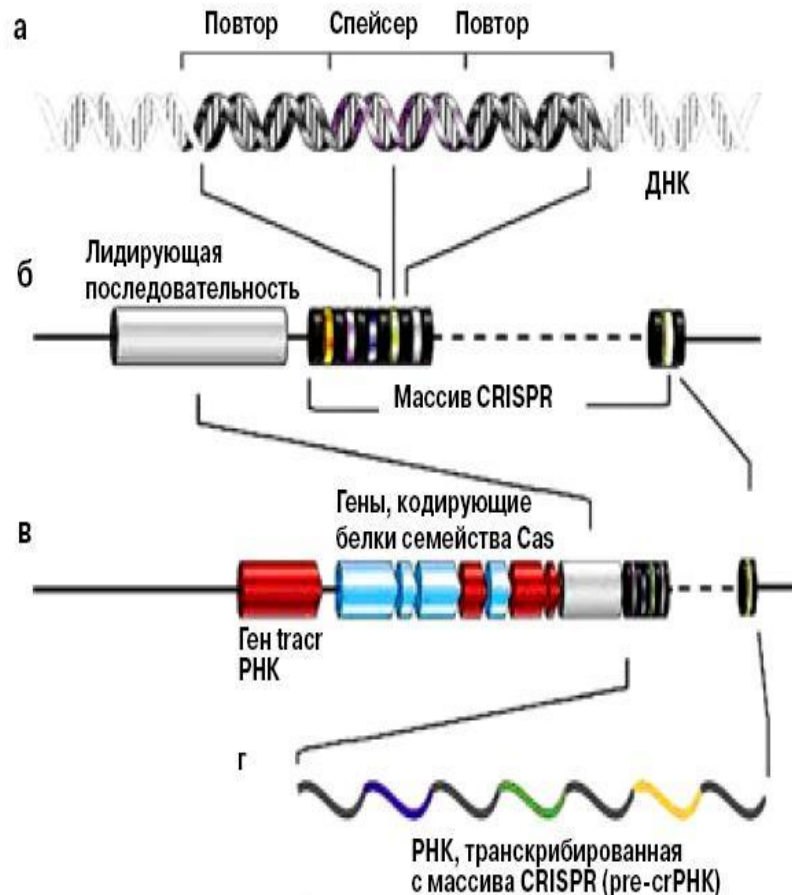
- Между идентичными повторами располагаются отличающиеся друг от друга фрагменты ДНК — спейсеры, многие из которых соответствуют участкам геномов вирусов, паразитирующих на данной бактерии.
- CRISPR — это база данных бактерии о контактах с вирусами, подобная тому, как лимфоциты человека хранят информацию о контактах с инфекционными агентами,
- если бактерии удавалось победить вирус, она как бы подбирала фрагменты его ДНК и встраивала в свой геном, формируя своего рода картотеку вирусов, с которыми она сталкивалась прежде



Возможно, лидерная последовательность узнает белки, участвующие во встраивании новых спейсеров: как новые участки ДНК от нападавших микроорганизмов, так и новые повторы обычно встраиваются на границе между ней и CRISPR

CRISPR- Cas

- Итак, к локусу CRISPR примыкает лидерная последовательность, а также CRISPR-ассоциированные гены (CAS), кодирующие белки семейства Cas.
- Лидерная последовательность играет роль промотора — стартовой площадки, с которой начинается транскрипция массива CRISPR, то есть «переписывание» последовательности на РНК (не кодирует белки)
- Длинная молекула РНК, которая образуется после транскрипции CRISPR, разрезается на фрагменты.
- Они называются CRISPR РНК (crРНК), причем каждый содержит спейсер и часть повтора

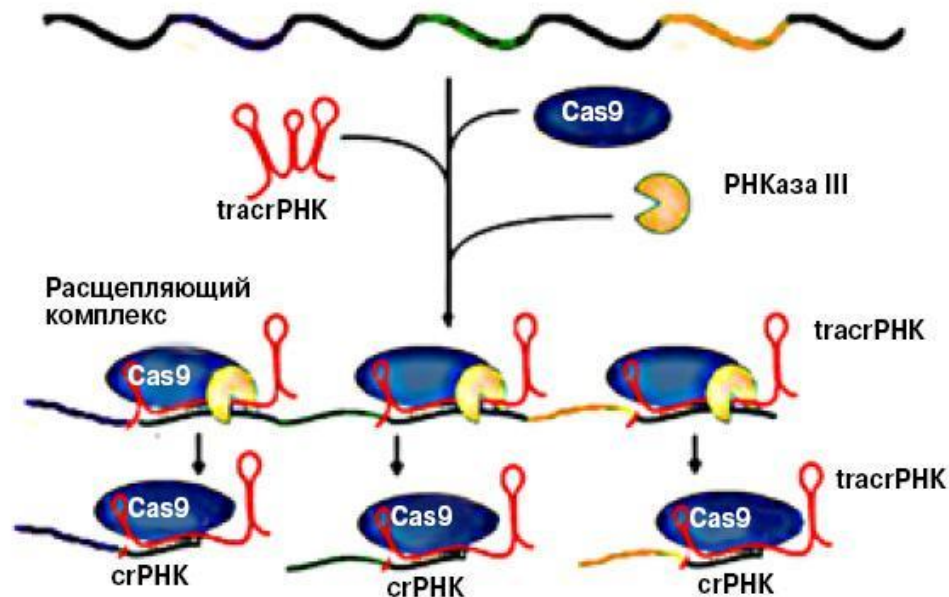


Структура локуса CRISPR

- а — строение участка CRISPR;
б — массив CRISPR и лидерная последовательность;
в — те же и «соседи» — гены, кодирующие tracrРНК, и гены белков семейства Cas;
г — молекула РНК, возникшая при транскрипции массива CRISPR; как и в самом CRISPR, в ней чередуются повторы и разнообразные участки, комплементарные участкам геномов, нападавших на бактерию плазмид и фагов

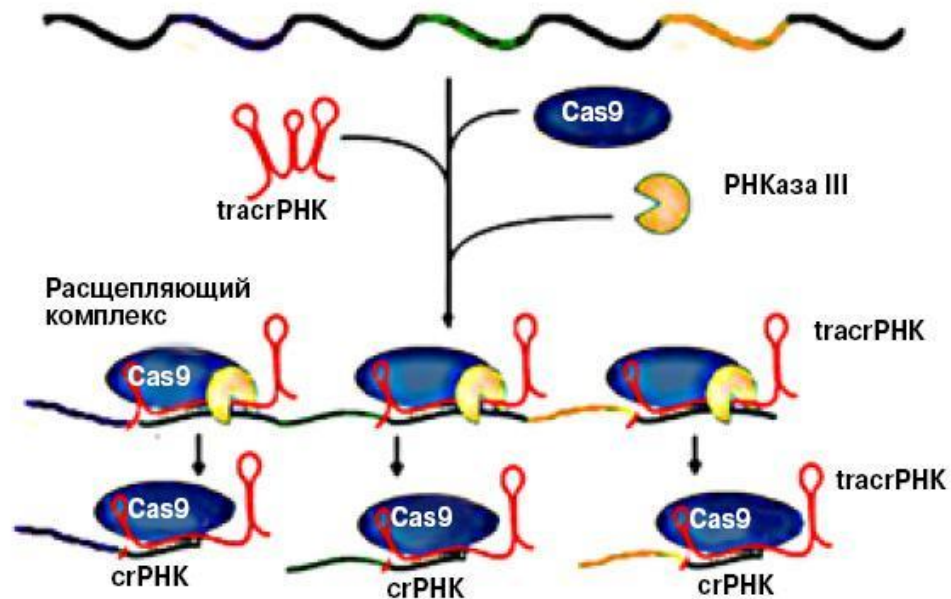
CRISPR- Cas

- В процессе нарезки участвует небольшая РНК, комплементарная повторам, — tracrРНК:
- она служит «наводчицей» для белка Cas9, к которому подсоединяется фермент РНКаза III, нарезающий длинную молекулу РНК.
- Исполнив свою роль, РНКаза III уходит.



- Остается комплекс двух молекул crРНК и tracrРНК с белком Cas9.
- Этот белок — нуклеаза, то есть фермент, разрезающий ДНК.
- Сам по себе Cas9 неактивен, но при связывании с tracrРНК его трехмерная структура изменяется, и он приобретает способность взаимодействовать с ДНК-мишенью — защелкивается на ее двух нитях, превращаясь в нечто подобное замку застёжки-«молнии».

CRISPR- Cas



- Так образуются комплексы crPHK/tracrPHK-Cas9—оружие иммунной системы прокариот.
- А затем начинают расправу с врагом: спейсерные участки crPHK находят комплементарные им участки вражеских нуклеиновых кислот и приносят к ним активированные Cas-белки, те вызывают их расщепление и последующую деградацию.
- Таким образом, crPHK выполняет роль проводника, направляющего нуклеазу к цели, за что она и получила свое другое название: «PHK-гид»

CRISPR- Cas

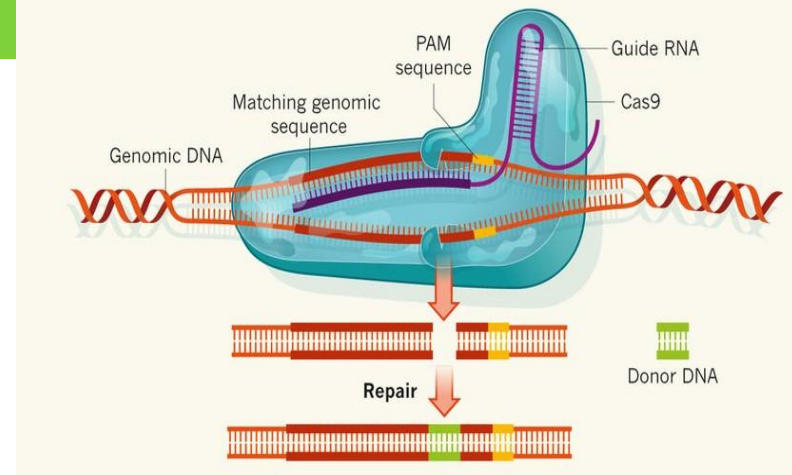


- При попадании вируса в бактериальную клетку он обнаруживается с помощью специализированных Cas-белков (CRISPR-associated sequence — последовательность, ассоциированная с CRISPR), связанных с CRISPR РНК.
- Если фрагмент вируса «записан» в спейсере CRISPR РНК, Cas-белки разрезают вирусную ДНК и уничтожают ее, защищая клетку от инфекции.

CRISPR- Cas

Чтобы белки Cas узнали и затем расщепили опознанную РНК-гидом последовательность ДНК, непосредственно после сайта-мишени должна находиться короткая (от трех до девяти нуклеотидов) последовательность, называемая PAM — *protospacer adjacent motif*.

- Таким образом, атакуются только те участки вражеской ДНК, рядом с которыми находятся эти короткие последовательности.
- У разных видов бактерий PAM различаются.
- Если участок ДНК комплементарен crРНК, но рядом с ним нет PAM, то комплекс crРНК/tracrРНК-Cas9 его не распознает.
- У этой особенности есть биологическое объяснение, пока экспериментально не подтвержденное.
- Дело в том, что в локусе CRISPR наряду со спейсерами, комплементарными инородной ДНК, встречаются и спейсеры, нацеленные на собственную ДНК бактерии.
- И таких спейсеров-«самоубийц» немало — порядка 20%.
- Гены эти, однако, не разрушаются, возможно, из-за отсутствия рядом с ними PAM



CRISPR- Cas.

Практическое использование



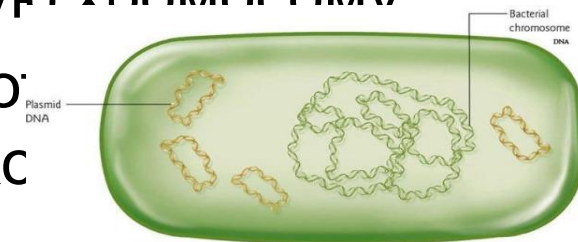
- **Маркировка и типирование штаммов.** Жизнь каждого бактериального штамма неповторима и уникальна, как и череда перенесенных им инфекций, записанная языком спейсеров. Индивидуальный рисунок CRISPR-кассеты служит естественной генетической маркировкой запатентованных коммерческих штаммов. Типирование штаммов на основании множества спейсеров CRISPR-кассет давно применяется для определения эпидемиологической разновидности разных видов болезнетворных бактерий.
- **Прививки для бактерий.** Бактериофаги представляют серьезную угрозу для культур промышленных бактерий. CRISPR — это отличная настраиваемая платформа. На ее основе можно собрать нужный профиль устойчивости только за счет добавления спейсеров к соответствующим бактериофагам. Благодаря CRISPR-системам можно увеличивать продолжительность жизни ценных штаммов.
- **Прививки от бактерий, фаготерапия.** Существенная часть бактерий, населяющих тело человека, в том числе, болезнетворных, содержит CRISPR-системы. Находясь в условиях непрекращающейся гонки вооружений с бактериями, фаги научились красть их оружие, CRISPR-системы, и использовать для избегания клеточного иммунитета. В ближайшем будущем с помощью CRISPR можно будет сконструировать суперфаги, очень специфичные и высоко эффективные против тяжелых бактериальных инфекций человека.
- **Генетические ножницы на основе CRISPR.** Последовательности-мишени специфически узнаются с помощью crPНК в составе эффекторного комплекса. Эти crPНК можно модифицировать, а значит менять мишень для эффекторного комплекса. Таким образом, CRISPR-системы можно легко перепрограммировать и использовать как удобный инструмент направленной манипуляции с геномами: для встраивания, удаления и модификации структурных генов и регуляторных последовательностей. Хотя CRISPR-система — это исключительно прокариотическая придумка, она может быть успешно перенесена в клетки человека и многих других эукариот без потери функциональности и без негативного эффекта для реципиента.

Отличительные особенности организации генома прокариот

- ❑ Относительно высокое (70%) содержание структурных генов на имеющуюся ДНК .
- ❑ Высокое абсолютное число генов.
- ❑ Организация генов в опероны – целостно транскрибируемые группы функционально родственных генов.
- ❑ Отсутствует интрон- экзонная структура – гены непрерывны.
- ❑ Присутствие внехромосомной ДНК – плазмид
- ❑ Репликация, транскрипция и трансляция происходят в цитоплазме
- ❑ Процесс транскрипции и трансляции проходит одновременно
- ❑ Полицистронные мРНК

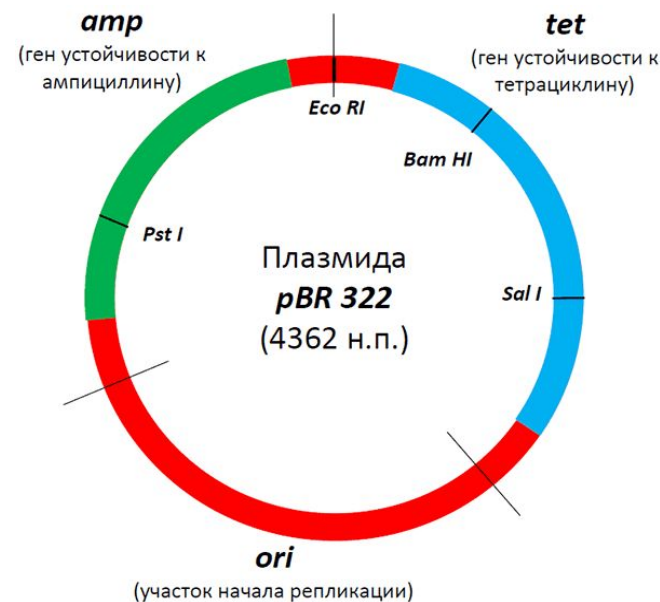
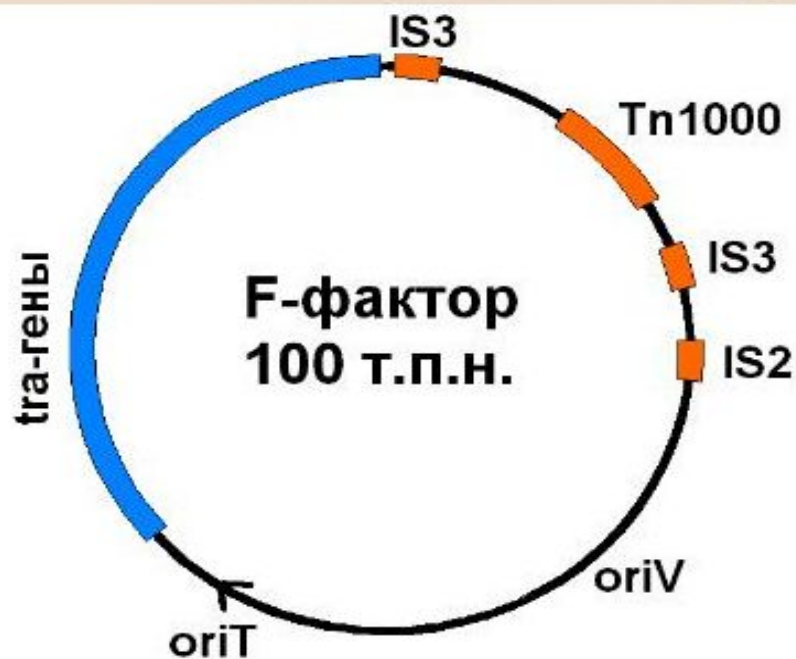
Плазмиды — кольцевые двунитевые ДНК, способные к автономной репликации

- Плазмиды – независимые репликоны, т.е. способны самостоятельно инициировать собственную репликацию
- Для репликации используют синтетический аппарат клетки, ее пластические и энергетические ресурсы
- Все плазмиды контролируют собственную репликацию и следовательно число копий в клетке.
- Плазмиды с одним и тем же типом контроля репликации несовместимы.
- В клетке бактерии могут находиться в цитоплазме или быть интегрированными в бактериальную хромосому
- Плазмиды существенно различаются в отношении круга хозяев: узкоспецифичные и широкие



Плазмиды

- Плазмиды состоят из модулей: обязательный модуль основного репликона, и, помимо него, модули распределения, переноса и различных биохимических свойств



Плазмиды. Классификация

□ По способности инициировать процесс конъюгации

▣ *Конъюгативные* (трансмиссивные)

Имеют более крупные размеры; содержат область tra-генов (tra - от TRAnsfer genes), то есть генов, белковые продукты которых обеспечивают конъюгацию. Продукты tra-генов вызывают формирование пили, образуют комплекс ферментов, изменяющих ДНК нужным образом во время переноса, а также противодействуют прикреплению пилей других бактерий к клеточной стенке данной.

▣ *Неконъюгативные* (нетрансмиссивные)

Не содержат области tra-генов, а потому не способны к самостоятельной передаче генетического материала в другие бактериальные клетки.

▣ *Мобилизуемые*

Некоторые исследователи выделяют также класс мобилизуемых плазмид, которые содержат только часть tra-генов. Они также способны передавать свой ДНК-материал в

Плазмиды. Классификация

- ❑ **По обычному числу копий плазмиды данного типа в клетках:**
 - ❑ Высококопийные
 - ❑ Низкокопийные

- ❑ **По группам несовместимости**
 - Совместимость — это способность двух или нескольких плазмид стабильно сосуществовать в одной клетке. Родственные плазмиды (с одним типом контроля репликации) обычно не совместимы друг с другом, и вместе образуют одну группу несовместимости

Плазмиды. Классификация

□ По функции:

- Половые *F-плазмиды* (от англ. Fertility — способность к размножению). Содержат tra-гены, способны инициировать половой процесс у бактерий — конъюгацию.
- Плазмиды лекарственной устойчивости — *R-плазмиды* (от англ. Resistance — устойчивость). Кодировать белковые продукты, обеспечивающие устойчивость бактерий к антибиотикам и др.
- *Col-плазмиды* — содержат гены колицинов (бактериоцинов — белков, подавляющих жизнедеятельность близкородственных бактерий других разновидностей). Средство борьбы за существование.
- *Плазмиды биодеградации* — плазмиды, продукты которых позволяют утилизировать необычный пищевой или энергетический субстрат (например, салициловую кислоту).
- *Плазмиды патогенности* кодируют факторы патогенности бактерий.
- Например, Ent-плазмида — синтез энтеротоксина; Hly-плазмида — синтез гемолизина

Профаги

- - вирусные геномы, встроенные в состав генома клетки-хозяина и реплицирующиеся в его составе
- некоторые бактериофаги (P1, N15) в лизогенном состоянии не включаются в хромосому хозяина, а представляют собой плазмиды
- Интегрированные профаги могут накапливать мутации и терять способность к литическому развитию; такие «дефектные» фаги имеются в геномах большинства прокариот
- Часто профаги и другие мобильные элементы входят в состав «геномных островов», привносимых в геном в результате горизонтального переноса генов

Геномные острова



- Геномные острова (genomic islands, **ГО**) — сегменты ДНК, присутствующие в геноме одних штаммов и отсутствующие у других, даже близкородственных штаммов одного вида.
- Отличные от ДНК-мишени нуклеотидные характеристики: G+C состав, частоты тетрануклеотидов и использование кодонов;
- Несут ген тирозиновой рекомбиназы (интегразы), обеспечивающей встраивание ГО в специфические районы хромосомы — гены тРНК
- Часто фланкированы 16—20-п.н. повторами ДНК-мишени, которые могут использоваться для вырезания острова.
- Часто содержат IS-элементы и транспозоны, участвующие в приобретении или удалении генетической информации в пределах острова
- Играют важную роль в эволюции и адаптации бактерий к изменяющимся условиям среды обитания, кодируя факторы патогенности, симбиотического «стиля жизни», резистентности к тяжёлым металлам и антибиотикам, ферменты деградации ксенобиотиков и т.п.



Фенотипическая/Модификационная ИЗМЕНЧИВОСТЬ

- **Морфологическая модификация** выражается в изменениях формы и величины бактерий. Например, при добавлении пенициллина к питательной среде клетки некоторых бактерий удлинняются. При длительном росте бактерий в одной и той же среде возникает полиморфизм, обусловленный влиянием накопившихся в ней продуктов их жизнедеятельности.
- **Культуральная модификация** состоит в изменении культуральных свойств бактерий при изменении состава питательной среды. Например, при недостатке кислорода у стафилококка утрачивается способность образовывать пигмент.
- **Биохимическая (ферментативная) модификация**. Например, посеве на питательную среду с лактозой и без глюкозы бактер *Escherichia coli* начинают синтезировать ферменты, расщепляющие лактозу.



Модификация - это способ приспособления микроорганизма к условиям внешней среды

- В процессе изучения изменчивости микроорганизмов была обнаружена особая форма модификационной изменчивости - диссоциация.
- Этот вид изменчивости выражается в том, что при посеве некоторых культур на плотные питательные среды происходит разделение колоний на два типа: гладкие, круглые, блестящие колонии с ровными краями - S-форма (от англ. smooth - гладкий), и плоские, непрозрачные колонии неправильной формы, с неровными краями - R-форма (от англ. rough - шероховатый).
- Существуют также переходные формы: M-формы (слизистые) и g-формы (карликовые).
- Колонии, относящиеся к гладкой S-форме, могут при определенных условиях переходить в R-форму и обратно, однако переход R-формы в S-форму происходит труднее.
- Диссоциация сопровождается изменениями биохимических, морфологических, антигенных и вирулентных свойств.
- Диссоциация наблюдается у ряда бактерий, в частности у возбудителей сибирской язвы, чумы и др.



МУТАЦИИ

Мутации – изменения в первичной структуре ДНК, которые выражаются в наследственно закрепленной утрате или изменении какого-либо признака (признаков).

По происхождению выделяют

- **Спонтанные** – составляют естественный фон, величина которого колеблется в зависимости от типа мутации и вида микробной популяции.
- **Индукцированные** – получают в эксперименте под влиянием каких-либо мутагенов.

По локализации

Генные мутации:

- **Точковые мутации** – изменения, затрагивающие только одну пару оснований и приводящие к замене одной пары оснований на другую (транзиции - замена пурина на пурин или пиримидина на ; трансверсии - замена пурина пиримидином, и наоборот).
- **Мутации со сдвигом рамки считывания** – результат вставки или выпадения пары оснований

МУТАЦИИ

- Мутации, затрагивающие множество пар нуклеотидов, называют **хромосомными**:
 - **Дупликации** – возникновение в данной нуклеотидной последовательности одного или, чаще, нескольких повторов.
 - **Делеции** – утрата двух или нескольких пар оснований.
 - **Инверсии** – изменение порядка нуклеотидов в ДНК на обратный по отношению к ориентации в штаммах дикого типа, возникающее обычно в результате рекомбинации с переворотом (flip-flop).
 - **Транслокации** – перенос фрагмента ДНК в новое положение.

МУТАЦИИ

- Мутации, приводящие к утрате или изменению какой-то функции клетки – **прямые мутации**. Например, бактерии *E. coli*, способные в норме сбраживать лактозу (Lac⁺-фенотип), могут утрачивать данный признак, и поэтому мутация Lac⁺ Lac⁻, будет считаться прямой.
- В результате **обратной мутации** у мутантного организма восстанавливается исходный (или дикий) фенотип.
- Обратные мутации бывают истинными (истинные реверсии) и вторичными.
- При **истинных обратных мутациях** в результате второй мутации восстанавливается исходный генотип.
- Если эффект первой мутации компенсирован мутацией в другой части этого же или расположенного рядом гена - **вторичные реверсии**.
- Если мутации возникают в других участках генома и за счет различных механизмов обеспечивают обходные пути для снятия эффекта первой мутации - **супрессорные мутации**.

МУТАЦИИ

- Мутации носят случайный, ненаправленный характер (за исключением целенаправленного эксперимента)
- Например, при посеве бактерий на питательную среду смогут вырасти колонии тех бактерий, который случайным образом приобрели «подходящую» мутацию



МУТАГЕНЫ

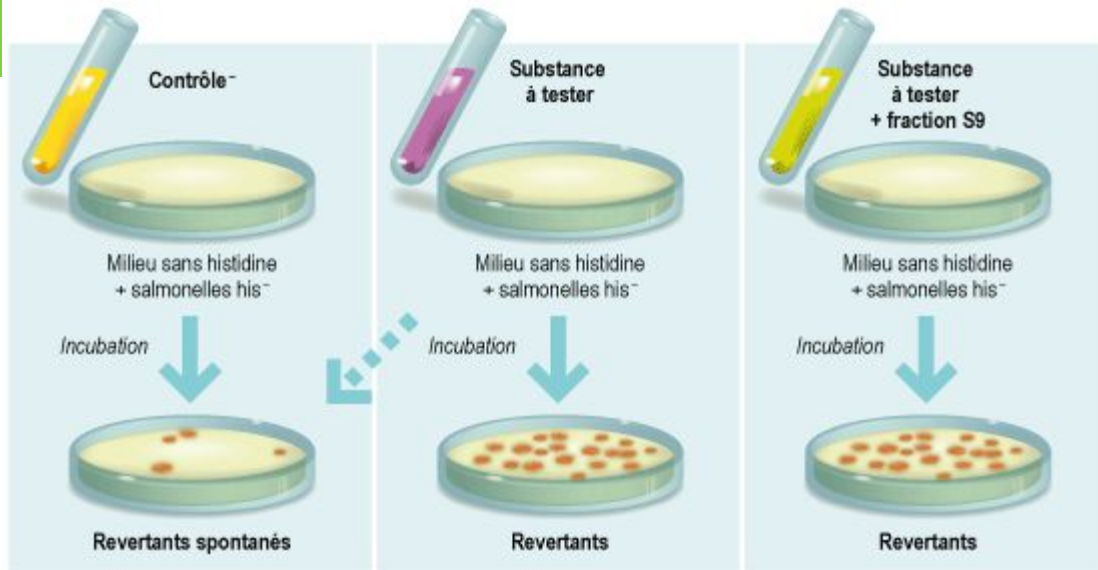
- **Азотистая кислота (HNO_2)** дезаминирует (отщепляет аминогруппу и замещает другой группой) аденин, гуанин или цитозин, что приводит к ошибкам при репликации ДНК. Происходит простая замена оснований, или транзиция.
- **Гидроксиламин (NH_2OH)** вступает в реакцию главным образом с цитозином и изменяет его так, что он при репликации ДНК предпочтительно спаривается с аденином вместо гуанина (транзиция). Переход в другую таутомерную форму может привести к неправильному образованию пар во время репликации ДНК.
- Часто для выделения мутантов используют **5-бромурацил и 2-аминопурин**. 5-Бромурацил представляет собой соединение, сходное по строению с тиминном и может включаться вместо тимина в цепь ДНК как комплементарное аденину основание. При переходе в енольную форму 5-бромурацил (БУ*) ведет себя при репликации ДНК как цитозин и спаривается с гуанином. После третьего цикла репликации вместо пары А–Т в молекуле ДНК обнаруживается пара Г–Ц.

МУТАГЕНЫ

- Молекулы **акридиновых красителей** внедряются между соседними азотистыми основаниями в цепи ДНК и увеличивают расстояние между ними. Такое пространственное изменение при репликации ДНК может вызывать ошибки двух типов – утрату нуклеотида или включение дополнительной пары нуклеотидов.
- **УФ-лучи** действуют на тиминовые основания, следствием чего является образование димеров тимина в ДНК (**Наиболее уязвимы участки ДНК с двумя соседними тиминами**). Такие димеры служат источником возникновения ошибок при репликации ДНК. УФ-лучи вызывают мутации типа транзиций, трансверсий или делеций.
- **Ионизирующее излучение** может изменять структуру азотистых оснований и вносить разрывы в цепи ДНК

Тест Эймса

— биотест на мутагенность химических веществ, метод анализа повреждений ДНК, основанный на измерении мутагенеза в тест-штаммах бактерий.



- Тест-штаммы бактерии [Salmonella](#), ауксотрофные по гистидину, растут на агаровой среде, содержащей гистидин, и не растут на среде с глюкозой; способность к росту на среде с глюкозой возникает только у ревертантных бактерий, способных синтезировать гистидин.
- Оценку мутагенного действия определенного химического соединения проводят по числу ревертантов, возникающих в присутствии этого соединения.
- С помощью Э.т. проверяют на канцерогенность многие вещества: промышленные химикаты, лекарственные препараты, консерванты, пестициды, косметические средства и т. д.

- http://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/432418/Umnye_nozhnitsy_dlya_DNK
- <http://biomolecula.ru/content/1498>
- <https://postnauka.ru/faq/59807>
- <http://biomolecula.ru/content/1488><http://biomolecula.ru/content/1488>