

Факультативні структурні елементи геному прокариот

Плазміди бактерій – факультативний елемент геному

- ❑ Це позахромосомні кільцеві або лінійні молекули ДНК, що здатні до автономної реплікації
- ❑ Плазміди, здатні до інтеграції в хромосому бактерій, називають **епісомами**
- ❑ Розміри плазмід – від декількох **тисяч п.н.** до декількох **сотень тисяч п.н.**
- ❑ Плазмідна ДНК зазвичай складає **декілька відсотків (1-2 – 20%)** сумарної ДНК клітини бактерій
- ❑ Кожній плазміді властива певна **кількість її копій**, що припадають на одну хромосому бактерії. Розрізняють плазміди: **малокопійні** (плазмідна F *E. coli* -1-2 копії на хромосому), **олігокопійні** (ColE1 – 10-15 копій) і **мультикопійні** (pUC18, 200-500 копій)
- ❑ Плазміди забезпечують горизонтальне перенесення генів; їх використовують у генетичній інженерії як вектори

Ознаки, які контролюються плазмідами бактерій

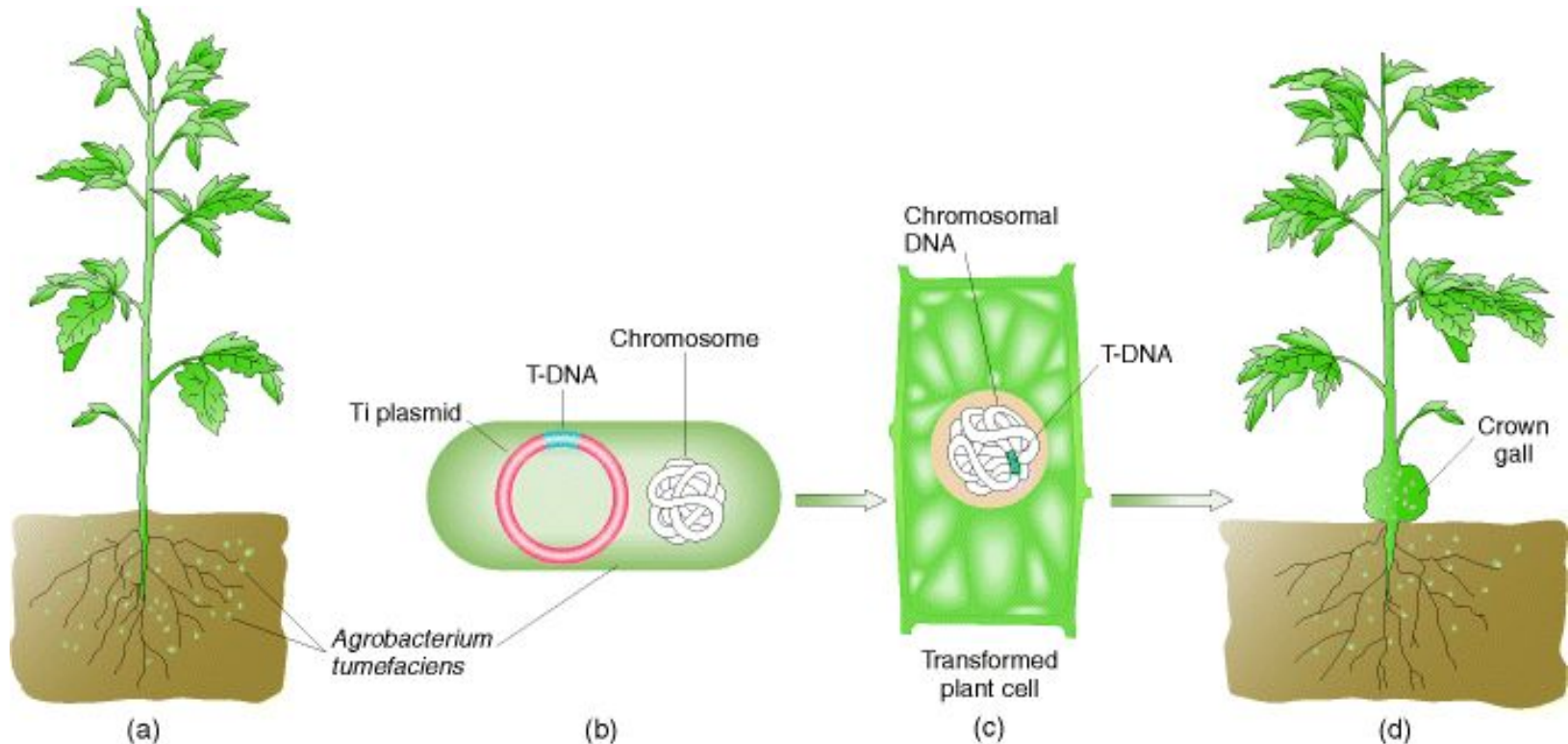
Ознаки	Плазміди
Здатність до автономної реплікації	Усі природні плазміди
Здатність клітин бути донорами генів у схрещуванні, забезпечують фертильність	F, R100, RK2
Стійкість до антибактерійних агентів	R100, RK2, R1, R6-5
Синтез антибіотиків	SCP1
Синтез бактеріоцинів (білків з токс.дією на інші бактерії)	ColEI
Синтез гемолізину, ентеротоксину	Hly, Ent
Синтез та катаболізм опінів (онкобілків), надсинтез фітогормонів, що зумовлює утворення пухлин у дводольних рослин	Ti, Ri
Катаболізм лактози та галактози, протеоліз білків, утилізація цитрату та стійкість лактобацил до фагів	Lac ⁺ , Prt ⁺
Катаболізм n-алканів, толуолу, камфори	OCT, pWWO, CAM
Здатність до азотфіксації, утворення бульбочок на коріннях бобових рослин	Sym
Система репарації, схильна до помилок (SOS-репарація)	pKM101
Система рестрикції-модифікації чужорідної ДНК	R1

□ *A. tumefaciens* – фітопатогенні бактерії, що зумовлюють появу пухлин (корончастих галлів) або “волосатих” коренів у дводольних рослин

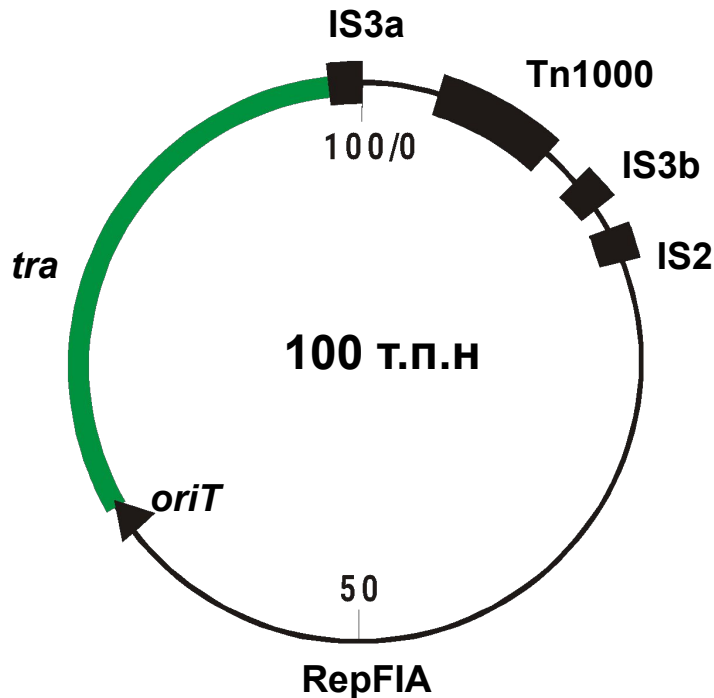
□ Здатність індукувати пухлини зумовлена **Ti-плазмід**ами

□ Частина плазміди – **T-ДНК**, яка містить гени, що зумовлюють пухлинний ріст та синтез опінів (агропіну, октопіну, нопаліну) переноситься у рослинні клітини та стабільно інтегрується у хромосоми. Бактерія використовує опіни, які синтезує хвора рослина, як джерело азоту та вуглецю

□ У генетичній інженерії рослин найчастіше використовують вектори, сконструйовані на основі **Ti-плазмід** *Agrobacterium tumefaciens*



Статевий фактор *E. coli* – плазміда F



Донори генів у схрещуванні:
F⁺ - з автономною плазмідною
Hfr - з інтегрованою в хромо-
сому

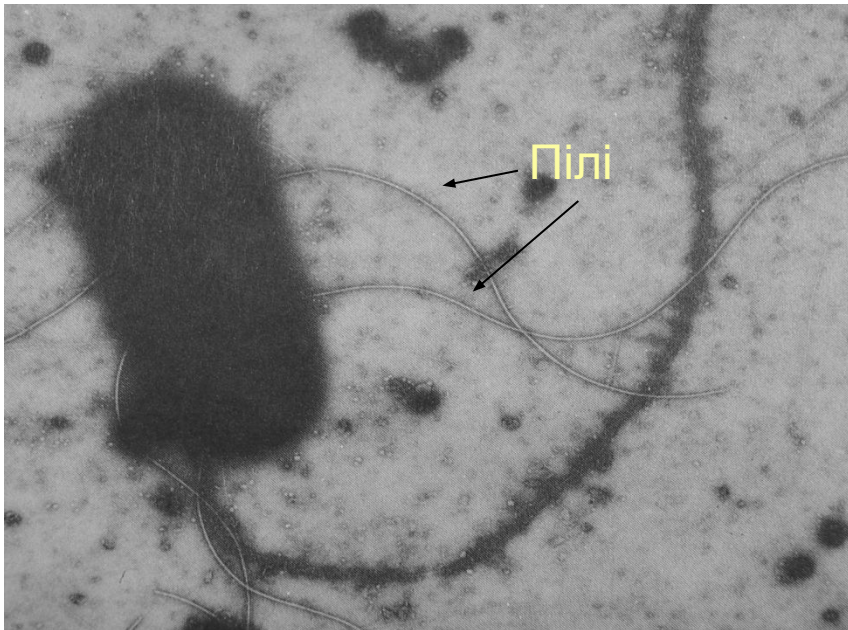
Реципієнти: F⁻ - не містять її

- Кільцева двониткова молекула ДНК розміром у **100 т.п.н.**
- Містить чотири мобільних генетичних елементи – 1- **IS2**, 2- **IS3** (**IS3a** та **IS3b**), 1-**Tn1000**. Інтеграція F-фактора в хромосому може відбуватися за рахунок рекомбінації між гомологічними мобільними генетичними елементами в плазміді та хромосомі. У хромосомі *E. coli* є більше **20** сайтів інтеграції плазміди F.
- Реплікацію та підтримання плазміди F у клітинах контролюють 3 **Rep-райони**, де містяться сайти початку реплікації.
- Експресія генів відбувається з **11** промоторів
- У клітині *E. coli* – **1** копія F – плазміди на **1** хромосому

tra-ділянка F- плазміди

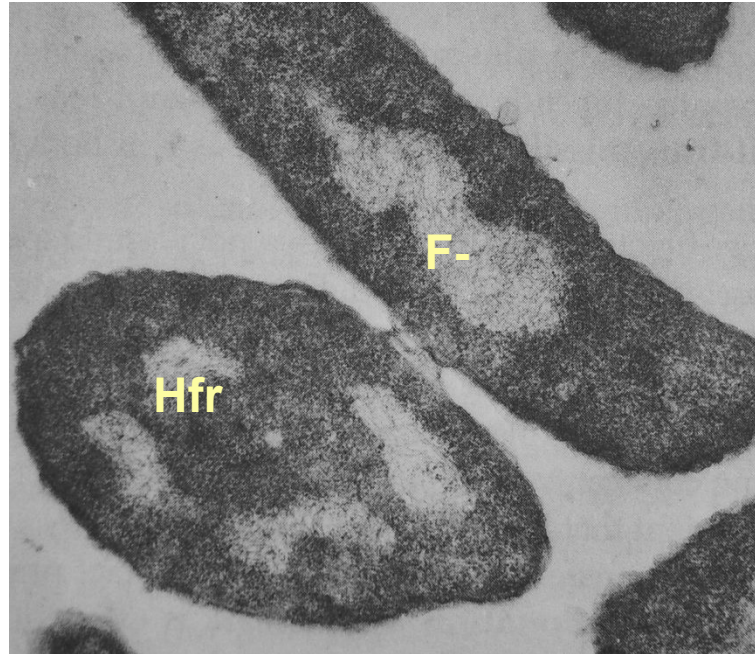
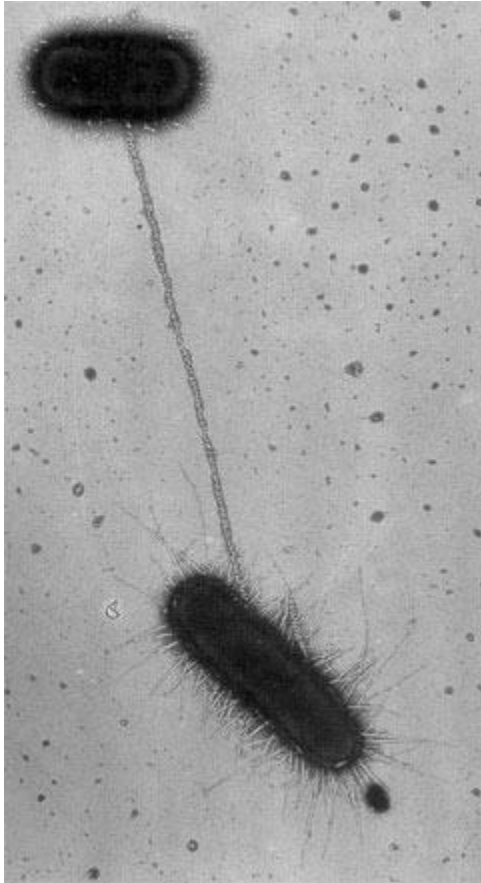
Ділянка *tra* (33,3 т.п.н) містить близько 40 генів, що контролюють:

- ❑ утворення статевих ворсинок - пілів
- ❑ „поверхнєве виключення”, яке унеможлиблює кон’югацію між F⁺-клітинами
- ❑ стабілізацію контактів клітин, що кон’югують
- ❑ регулювання кон’югаційного процесу
- ❑ одонитковий розрив у ділянці *oriT* та перенесення ДНК з клітини - донора в клітину - реципієнт



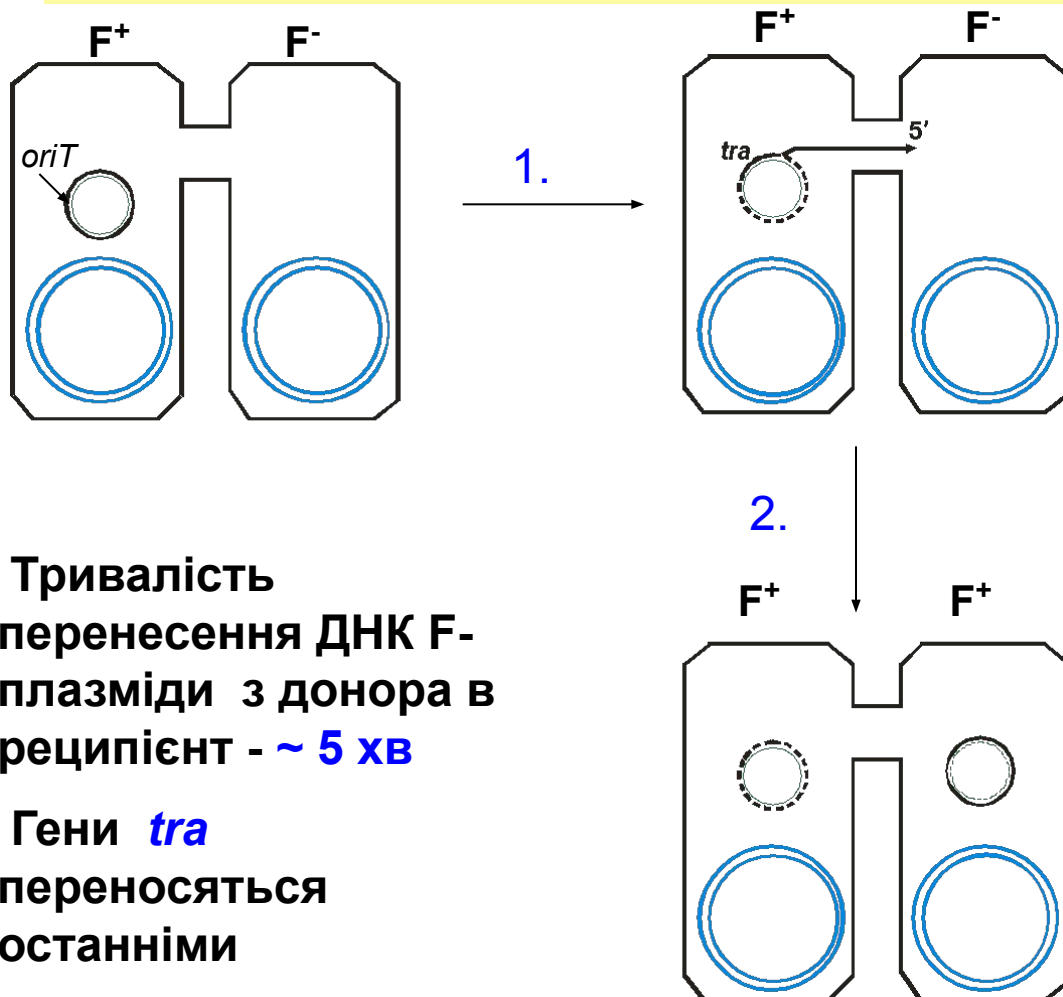
- На клітинах донорів є від 1 до 3 пілів.
- Пілі - ниткоподібні структури довжиною від 1 до 2 мкм, що складаються з спіралью розташованих субодиниць білка піліну.
- Функції пілів:
впізнавання та приєднання реципієнтних клітин; впізнавання білків, що зумовлюють явище поверхневого виключення та звільняють від контактів з клітинами, що вже містять плазмиду F

Кон'югація клітин *E. coli*, зумовлена F-фактором



- ❑ Спершу контакти пілів з F⁻ - клітинами нестабільні, потім клітини зближуються і їх зовнішні мембрани щільно прилягають.
- ❑ У місцях прилягання мембран нагромаджуються білки, що зумовлюють стабільні контакти донора та реципієнта.
- ❑ Формується місток, по якому ДНК переноситься з донорної в реципієнтну клітину.

Перенесення ДНК F-плазміди під час кон'югації



❑ Тривалість перенесення ДНК F-плазміди з донора в реципієнт - ~ 5 хв

❑ Гени *tra* переносяться останніми

1. а) Розщеплення одного з ланцюгів ДНК F-плазміди в сайті *oriT*;

б) перенесення ланцюга в F⁻ - клітину починаючи з 5'-кінця;

в) реплікація ДНК F-плазміди в F⁺ - клітині за механізмом “*rolling circle*”

2. а) Синтез комплементарного ланцюга ДНК F-плазміди

б) циклізація плазміди в клітині екс-реципієнта

Виявлення плазмід у клітинах бактерій

- ❑ **Генетичні підходи – аналіз успадкування ознак, які ймовірно визначаються плазмідами**
 - генетичний детермінант ознаки не зчеплений з хромосомними генами (статевий фактор F, що визначає здатність клітин *E. coli* бути донором генів у схрещуваннях)
 - висока частота успадкування генетичного детермінанта у схрещуваннях перенесення (всі нащадки від схрещування $F^+ \times F^-$ успадковують F – фактор)
 - висока частота спонтанної незворотної втрати ознаки (штами F^+ перетворюються у F^- з частотою $\sim 10^{-2}-10^{-3}$). Ця частота сильно зростає під впливом чинників, що селективно інгібують реплікацію плазмід (акридинові барвники, бромід етидію, УФ – опромінення)
- ❑ **Фізичне виділення плазмідної ДНК**
 - ультрацентрифугування в градієнті густини CsCl з бромідом етидію
 - гель-електрофорез

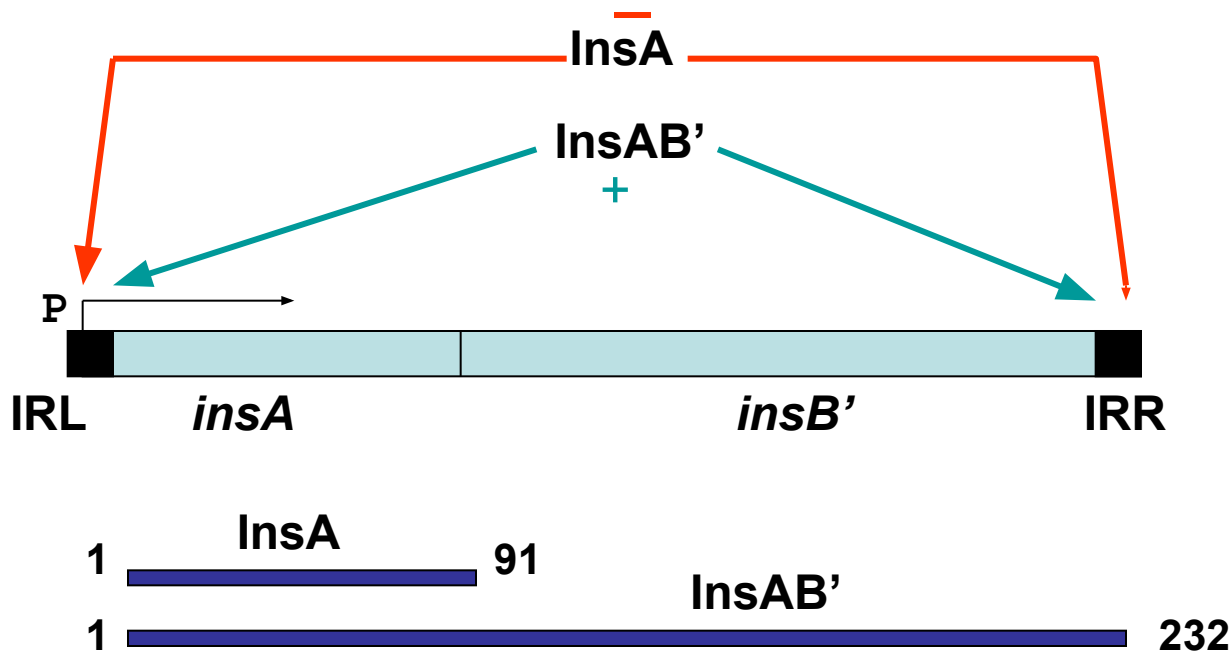
***Мобільні генетичні
елементи прокаріот***

IS-елементи *E. coli*

IS-елемент	Розмір, п.н.	Інвертовані термінальні повтори	Прямі повтори ДНК-мішені	Сайти інсерцій
IS1	768	23	9	випадкові
IS2	1327	41	5	гарячі точки
IS4	1428	18	11 або 12	AAAN ₂₀ TTT
IS10R	1329	22	9	NGCTNAGCN
IS50R	1533	19	8	гарячі точки

- Відкриті в середині 60-х років XX століття під час вивчення причин спонтанних мутацій у бактерій
- Відносно короткі послідовності (зазвичай < 2000 п.н.), містять на кінцях короткі інвертовані повтори нуклеотидних послідовностей та 2-3 гена, що контролюють їх транспозицію
- Виявляються за здатністю викликати мутації генів, в які вони включаються
- Викликають дуплікації ДНК-мішені

IS1- елемент, 768 пн



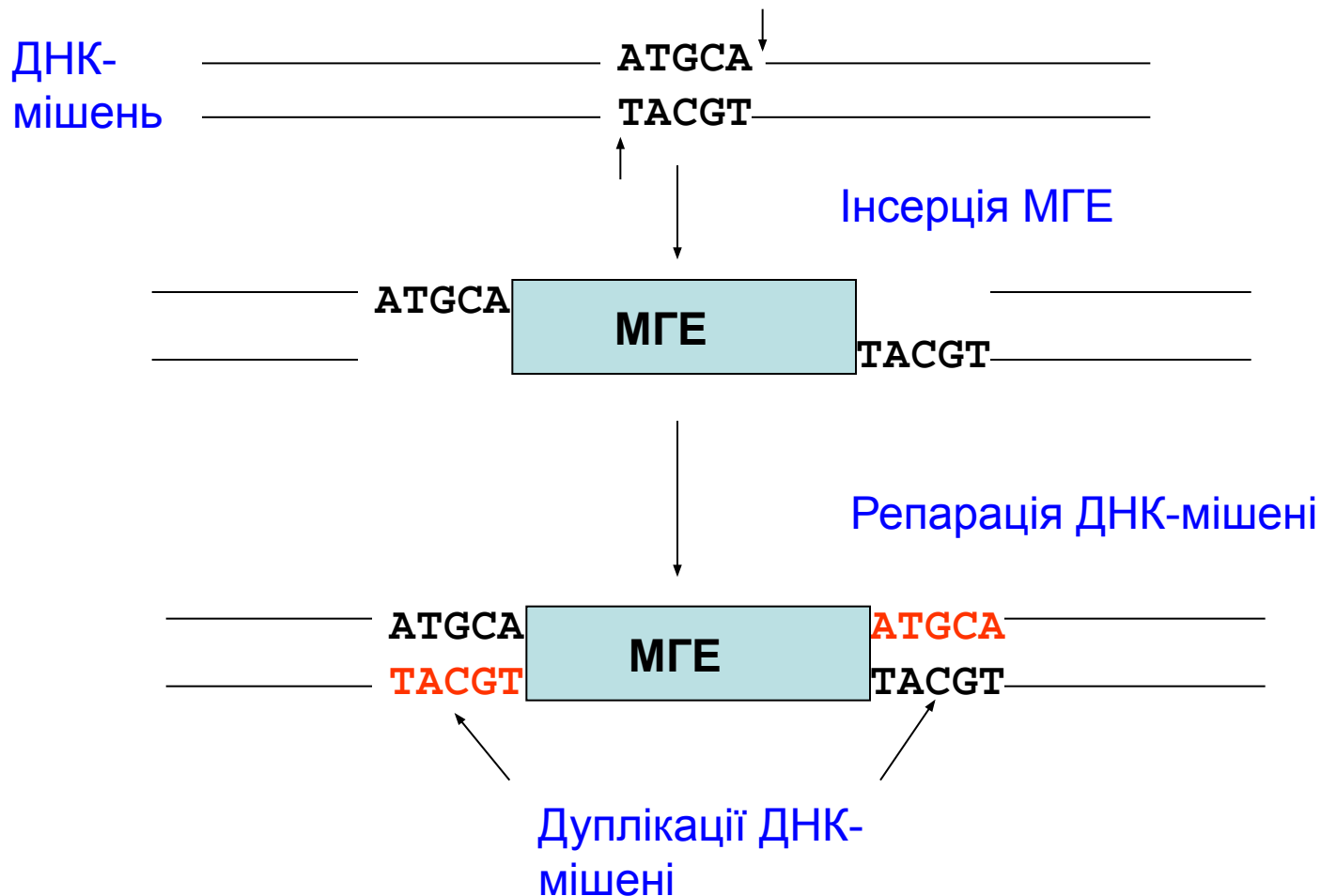
IRL, IRR – лівий та правий інвертовані термінальні повтори (по 23 пн)

pIRL-промотор з якого починається транскрипція генів *insA* та *insB'* (позначена стрілкою)

Гени *insA* та *insB'* частково перекриваються

- Білок **InsA** (91 амінокислотний залишок) зв'язується з **IRL** та **IRR**, інгібує транскрипцію з **pIRL** та транспозицію
- Білок **InsAB'** (232 амінокислотних залишки) є транспозазою і забезпечує транспозицію

Дуплікації ДНК-мішені після інсерції МГЕ

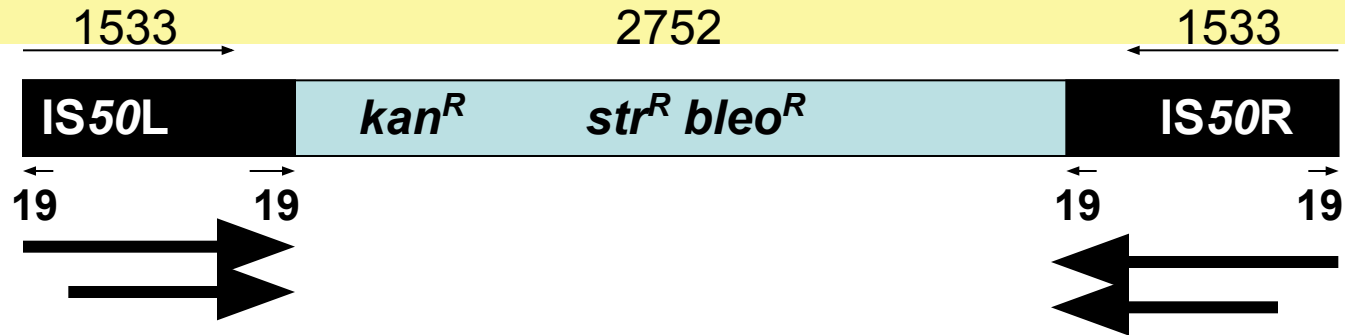


Tn-елементи *E. coli* (транспозони)

Tn-елемент	Розмір, п.н.	Ген стійкості	Термінальні елементи	Орієнтація термін. елементів
Tn5	5818	<i>kan^R str^R bleo^R</i>	IS50	інвертовані
Tn9	2638	<i>cam^R</i>	IS1	прямі
Tn10	~9300	<i>tet^R</i>	IS10	інвертовані

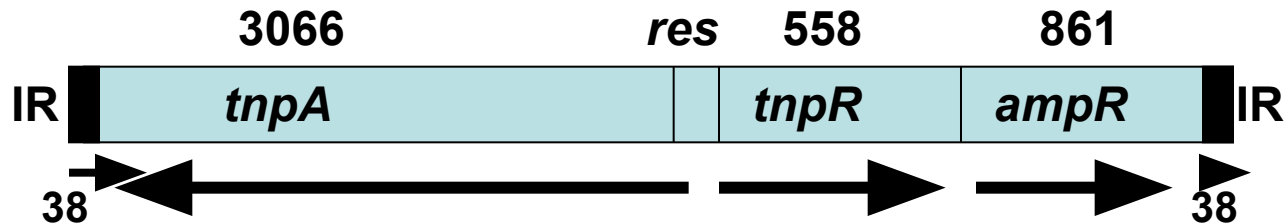
- ❑ Містять на кінцях прямі або інвертовані повторення **IS-елементів** та один або декілька генів, що зазвичай визначають стійкість до антибактерійних агентів
- ❑ Здатність Tn-елементів до транспозиції визначається **IS-елементами**. **IS-елемент** може переміщатися незалежно від транспозона, в який він входить
- ❑ Функціональними можуть бути обидва **IS-елементи**, або лише один з них

Транспозон Tn5



- Містить гени стійкості до канаміцину (*kan^R*) стрептоміцину (*str^R*) та блеоміцину (*bleo^R*), оточені інвертованими послідовностями IS50-елементів

Транспозон Tn3



- Містить на кінцях короткі інвертовані повтори та **3** гени:
 - *ampR* – β -лактамази (визначає стійкість до ампіциліну)
 - *tnpA* – транспозази
 - *tnpR* – інгібітора транскрипції гена *tnpA* та власного гена

Кон'югативні транспозони (сТп)

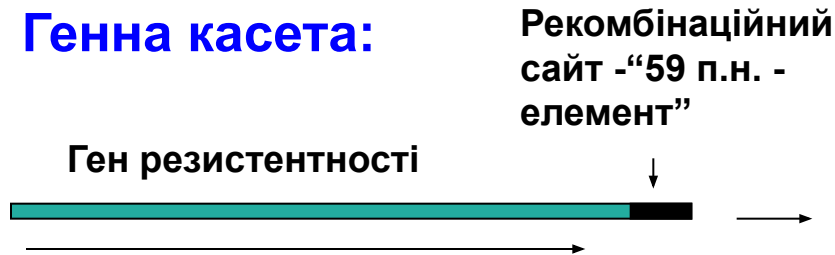
- ❑ Відкриті в кінці 70-х років ХХ століття під час вивчення механізму резистентності бактерій до антибіотиків, що не пов'язана з плазмідами
- ❑ Широко розповсюджені серед бактерій – збудників інфекцій
- ❑ Розміри: **сТп** грам-позитивних бактерій – **18-60 т.п.н.**
сТп грам-негативних бактерій - **65-150 т.п.н.**
- ❑ Не мають повторів нуклеотидних послідовностей на кінцях, не викликають дуплікацій ДНК-мішені під час транспозиції
- ❑ Як **транспозони** - вбудовуються у різні реплікони клітини і можуть переміщатися в інші місця реплікону, несуть гени стійкості до антибіотиків
- ❑ Як **плазмід** – мають власні **tra**-системи і зумовлюють кон'югацію
- ❑ Як **помірні бактеріофаги** – вбудовуються у ДНК мішень і вирізаються з неї. Ці процеси каталізують білки, що кодуються **сТп** – інтеграза **Int** та білок вирізання (ексцизиї) **Xis**

сТп916 з *Enterococcus faecalis* - 18 т.п.н.- 24 ORF



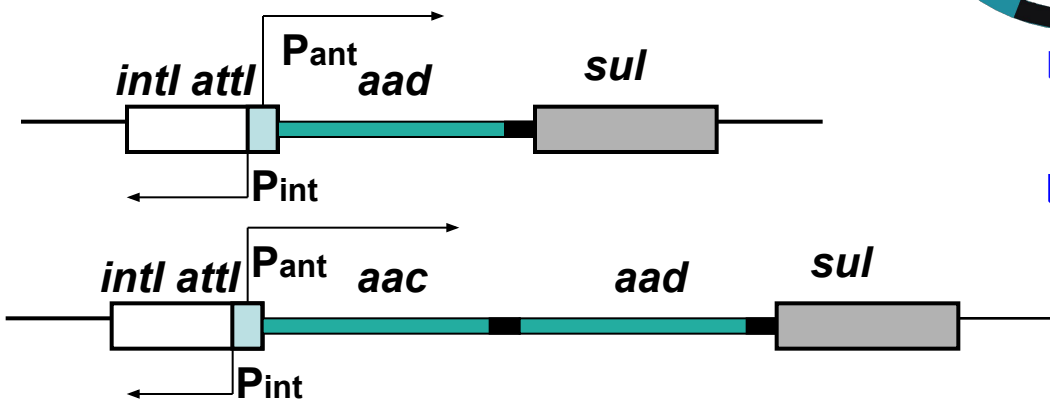
Генні касети та інтегрони

Генна касета:



Автономна кільцева форма генної касети

Інтегрони:



intI – ген інтегрази інтегрона

attI – послідовність, яка бере участь у сайт-специфічній рекомбінації між інтегроном та генною касетою

aac – ген аміноглікозидацетилтрансферази

aad – ген аміноглікозидаденілтрансферази

sul – ген стійкості до сульфамідів

P_{int} – промотор гена інтегрази

- Генні касети – найменші з МГЕ бактерій – від ~260 до ~1500 п.н.
- Існують: 1) як частини інтегронів у хромосомі (часто поруч з іншими генними касетами); 2) як кільцеві молекули – поза хромосоною
- Генні касети можуть бути інтегрованими у неспецифічні сайти хромосоми
- Генні касети транскрибуються з промоторів інтегронів (P_{ant})

Транспозиції відбуваються:

- 1) за участю транспозази;
- 2) рекомбінаційними механізмами

Відмінності рекомбінації при транспозиції і кросинговері:

- при транспозиції не потрібна гомологія послідовностей (recA-незалежна рекомбінація);
- при кросинговері у бактерій - recA-залежна рекомбінація

МГЕ – важливі чинники мінливості бактерій

- ❑ МГЕ зумовлюють мутації генів, в які вони включаються. При їх видаленні – реверсія до дикого типу
- ❑ МГЕ виявляють полярні ефекти, тобто впливають на функції розташованих за вставкою генів (на дистальні гени)
- ❑ МГЕ можуть виконувати роль “мандрівних” промоторів/термінаторів транскрипції генів – “перемикачів” роботи генів

Частота транспозицій у прокариот:

$1 \times 10^{-4} - 10^{-5}$ на елемент/за клітинну генерацію

Це важлива причина спонтанних мутацій

За дії екстремальних чинників частота транспозицій може зростати на декілька порядків

Геном бактеріофагів (облігатних внутрішньоклітинних паразитів)

- ❑ Бактеріофаги – найпростіші моделі вивчення:
 - структури і функції як окремих генів, так і геному загалом
 - генетичних аспектів взаємодії “паразит – господар”
- ❑ Це важливі чинники мінливості геномів бактерій
- ❑ Це модель, на якій вчать конструювати геноми
- ❑ Це джерело векторних молекул ДНК для генетичної інженерії

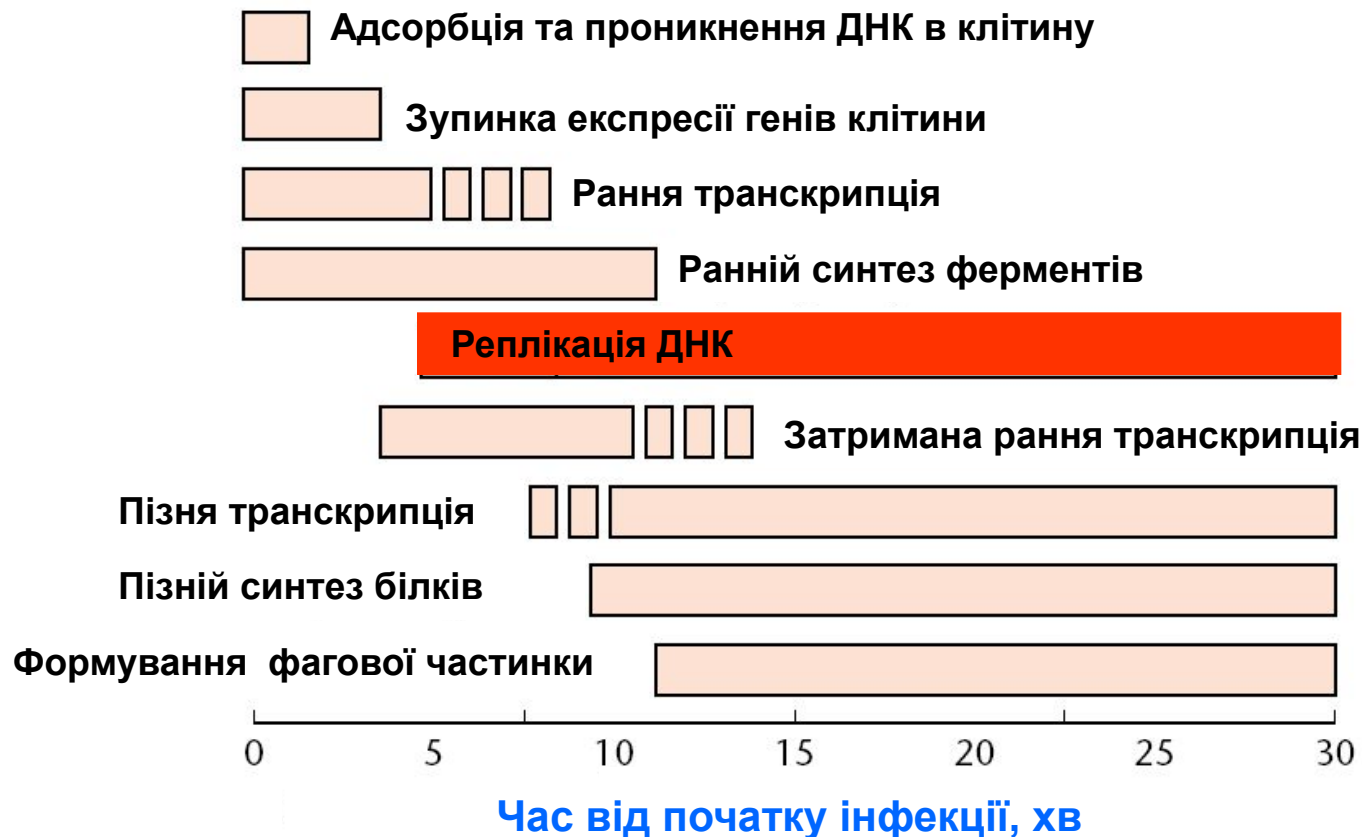
Основні особливості організації геномів бактеріофагів

- ❑ Види молекул нуклеїнових кислот, які виконують роль носіїв генетичної інформації фагів:
 - Двониткова лінійна ДНК – фаги *E. coli* T4, P1, Mu, λ , T1, T5, T7, P22
 - Двониткова кільцева ДНК – фаги *Alteromonas* PM2, *Sulfolobus* SSV1, SNDP
 - Однониткова кільцева ДНК – фаг *E. coli* ϕ X174
 - Однониткова лінійна РНК – фаги *E. coli* MS2, Q β
 - Двониткова сегментована РНК - фаг *Pseudomonas* ϕ 6
- ❑ У геномах бактеріофагів від декількох до декількох сотень генів
- ❑ Геноми бактеріофагів мають модульну організацію

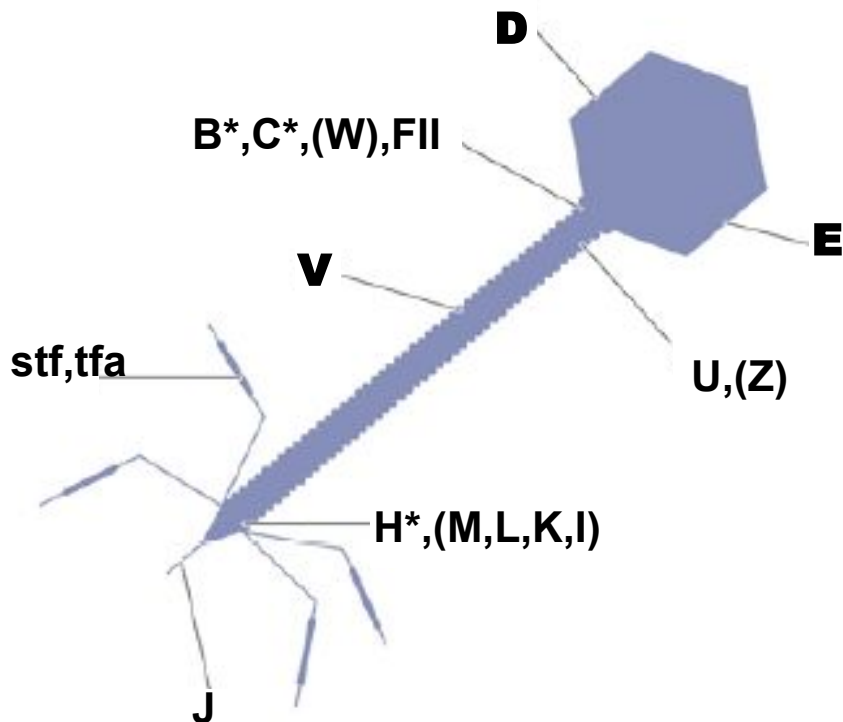
- Модулі – ділянки геному, які кодують функціонально подібні продукти
- Модулі – це групи генів, окремі гени, ділянки генів
- Успадковуються в схрещуваннях споріднених фагів як єдине ціле
- Виконують в реципієнтному геномі ті ж функції, що і в донорному геномі
- Близькоспоріднені фаги мають подібний пул модулів

Гени та регуляторні сайти, які контролюють близькі функції та функціонують одночасно в ході онтогенезу, утворюють кластери

Хронологія подій під час інфікування бактеріофагом T4 клітин *E. coli*



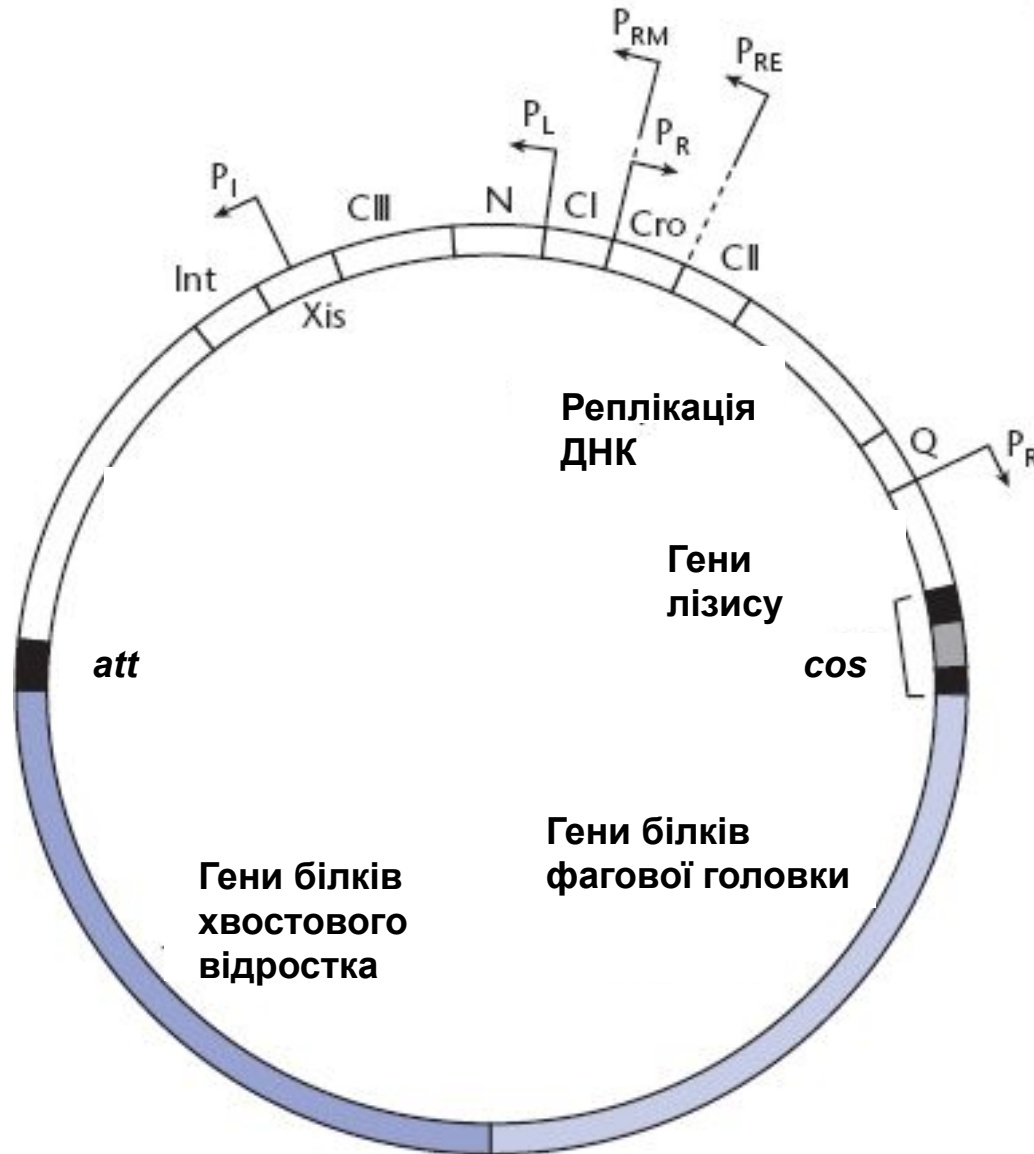
Бактеріофаг λ *E. coli* – модельний об'єкт генетики бактеріофагів



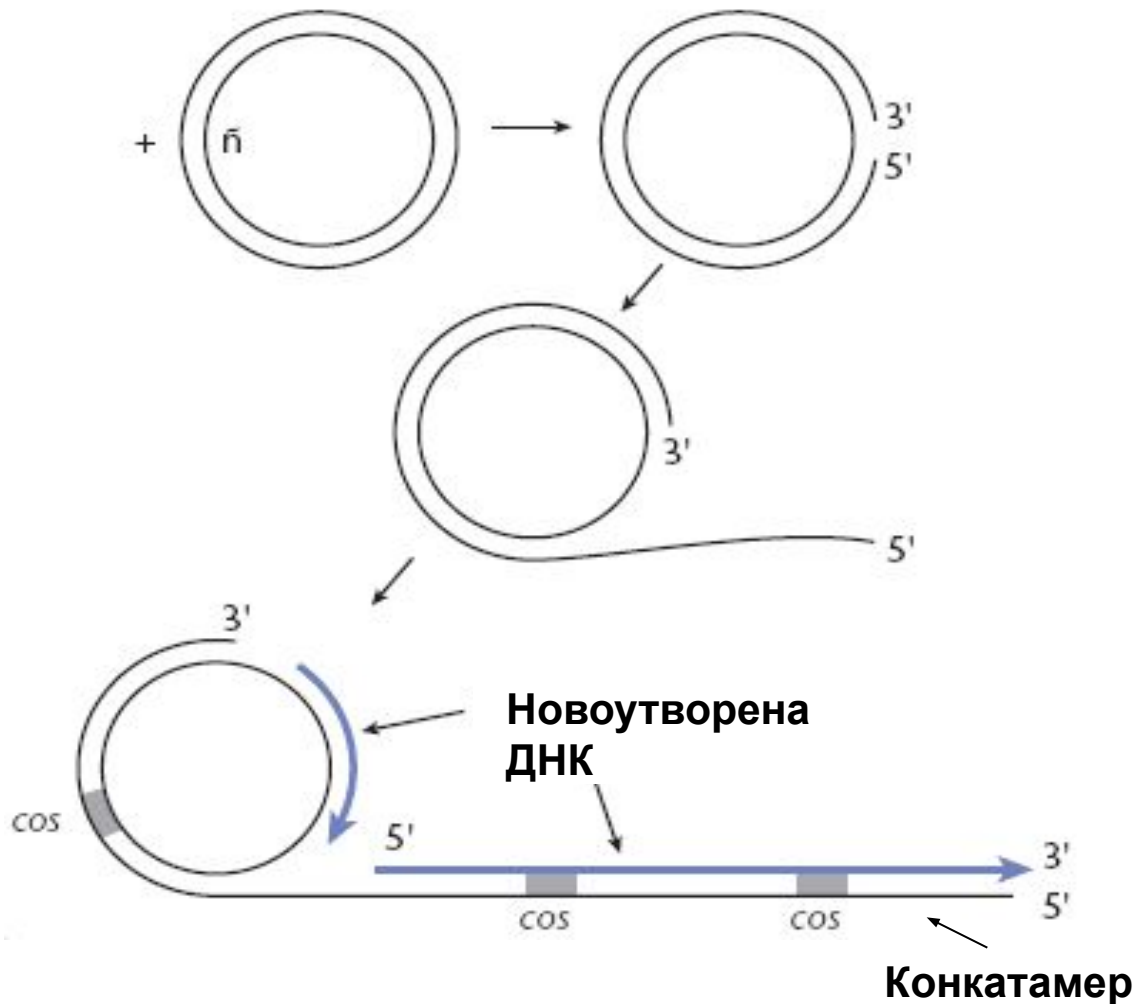
Буквами позначено продукти генів, що формують віріон. В дужках – продукти генів, що ймовірно є компонентами віріону. Зірками позначені білки, які ковалентно модифікуються

- Віріон складається з головки (діаметр ~ **63 нм**) та хвостового відростку (довжина ~ **150 нм**)
- Помірний бактеріофаг, відкритий **Естер Ледерберг** у **1951** році після опромінення клітин лізогенного штаму ***E. coli* K12** ультрафіолетом
- Віріон містить двониткову лінійну ДНК розміром **48502 п.н.** з одонитковими кінцями з **12** нуклеотидів що взаємно комплементарні (“липкими” кінцями)
- У геномі фага виявлено **71 ORF** Ідентифіковано білкові продукти **45** генів. **28** з них необхідні для літичного розвитку
- Шляхи розвитку:
 - Літичний
 - Лізогенізація клітин (існує в клітині як профаг)
 - Перехід від стану профага до літичного розвитку (індукція профага)

Кільцева генетична карта фага λ

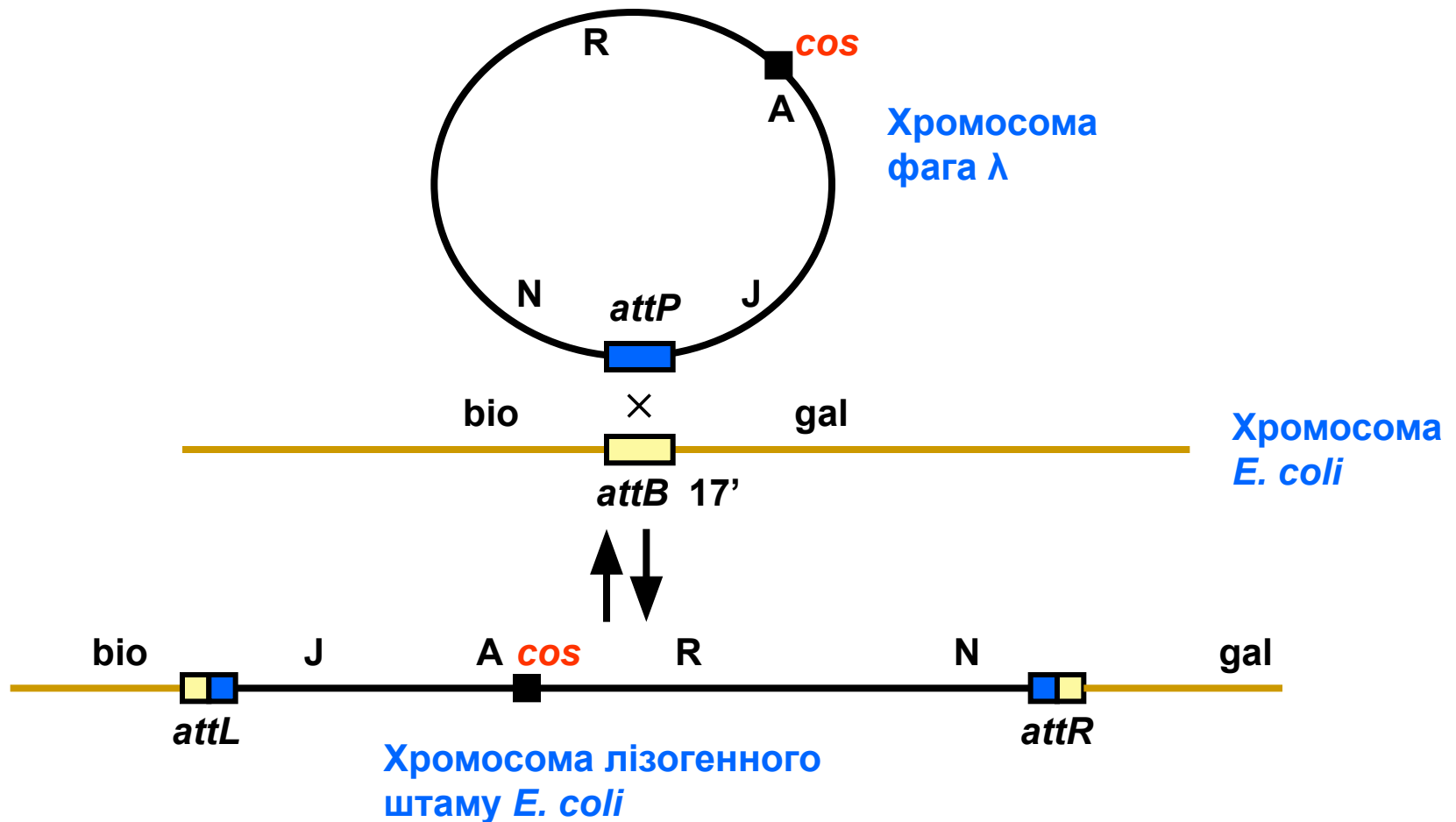


Реплікація хромосоми фага λ за механізмом “кільця, що котиться” (*rolling circle*)



- ❑ Продуктом *rolling circle* – реплікації є конкатамер – лінійна молекула, що складається із сотень хромосом фага, з'єднаних **COS**- ділянками
- ❑ Терміназа розщеплює конкатамер у **COS**-сайті

Інтеграція хромосоми бактеріофага λ в хромосому *E. coli*



Засновники генетики бактеріофагів – Макс Дельбрюк, Альфред Херші, Сальвадор Лурія



Max Delbrück
(1906 - 1981)



Alfred D. Hershey
(1908 - 1997)



Salvador E. Luria
(1921 - 1991)

Нобелівські лауреати з медицини та фізіології,
1969 р.



М. Чейз та А. Херші (1953)



**М. Дельбрюк та С. Лурія на симпозиумі з
кількісної біології в Лабораторії Колд
Спрінг Харбор (1953)**