

# Понимание биологии

## Часть вторая

На фоне успешных моделей,  
объясняющих существование видов  
и эволюцию эвкариот понимание  
мира прокариот зашло в тупик.



Карл Воз

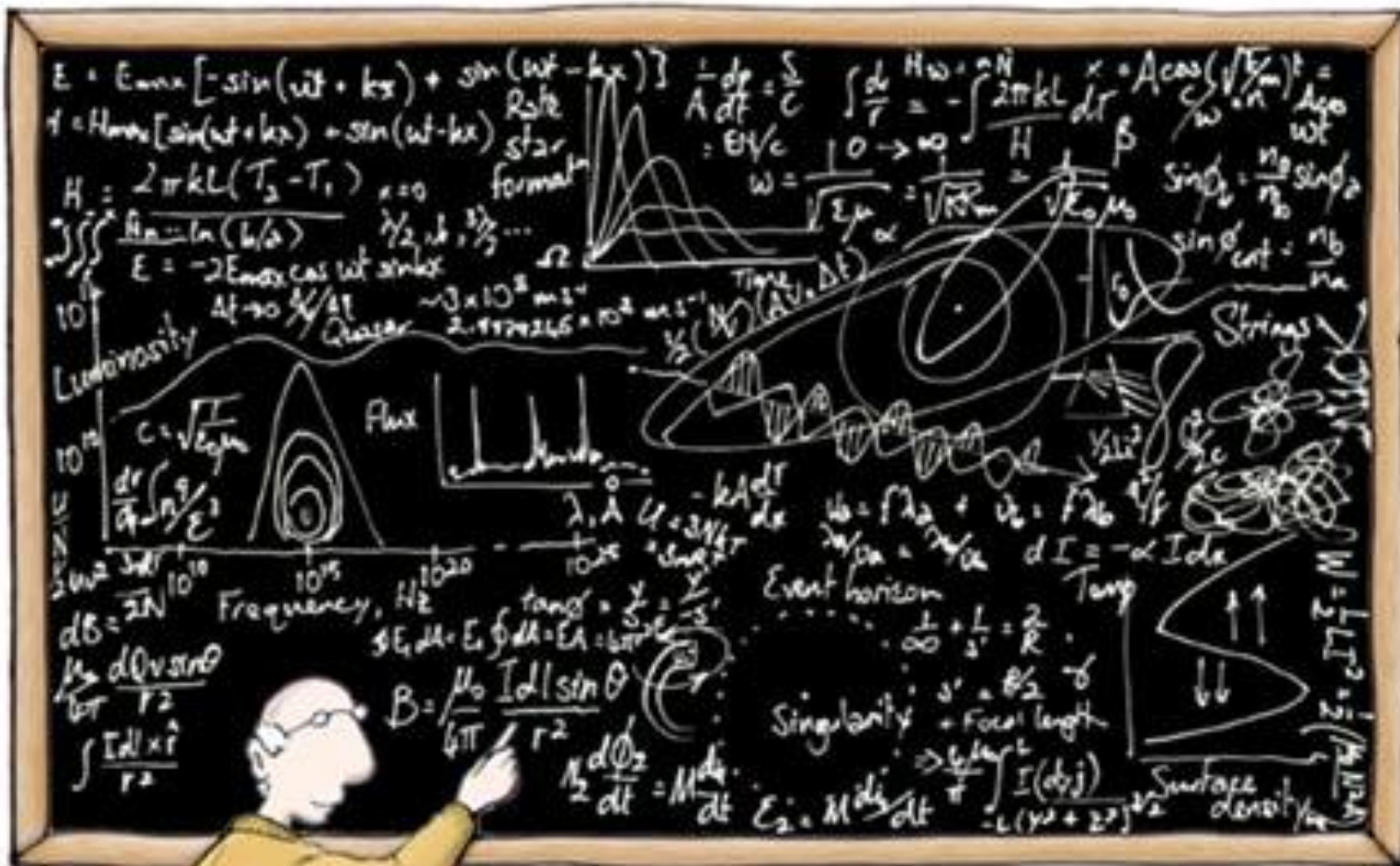


Я - не любитель слова  
«концепция», я – любитель слова  
«ясность»



Однако речь  
пойдёт о  
концепциях,  
придающих  
ясность.

Надеюсь, что всё будет понятно.





NARA/U. of Illinois 306-PS-E-77—5743

*«Мало кто знает сегодня, что в начале XX века микробиология могла пойти другим путём. В этом случае она выросла бы в науку, мало схожую с микробиологией сегодняшней. Это привело бы к метаморфозе микробиологии в одну из центральных биологических наук, и она не слилась бы с молекулярными дисциплинами и не стала их «падчерицей»»*

Карл Воз



*«Главные результаты микробиологии являются «полным позорищем», неудачной наукоподобной попыткой познать основополагающие принципы организации живого»*

*Stanier R. Y., van Niel C. B. (1962). The concept of a bacterium. Arch. Mikrobiol. **42**, 17–35.*

# Об одном умалчиваемом тупике



*«И вот в середине XX века микробиология зашла в тупик, — одной только биохимии перестало хватать для описания принципов существования мира микробов. Ни изучение на уровне организма, ни изучение на уровне популяции не могли стать достаточными при таком редуccionистском подходе...»*

*Карл Воз*

# Объяснение с единой точки зрения:

- Целостный взгляд на прокариотно-вирусное единство.
- Почему существование бактерий и архей без вирусов немыслимо?
- Почему прокариоты предпочитают быть полиплоидными?
- Могут ли эукариоты вести себя как прокариоты, и наоборот
- Как бактерии узнают свой-чужой, то есть формируют то, что напоминает у них существование видов?
- Системы рестрикции-модификации – это не только бактериальный иммунитет, но и нечто более важное.

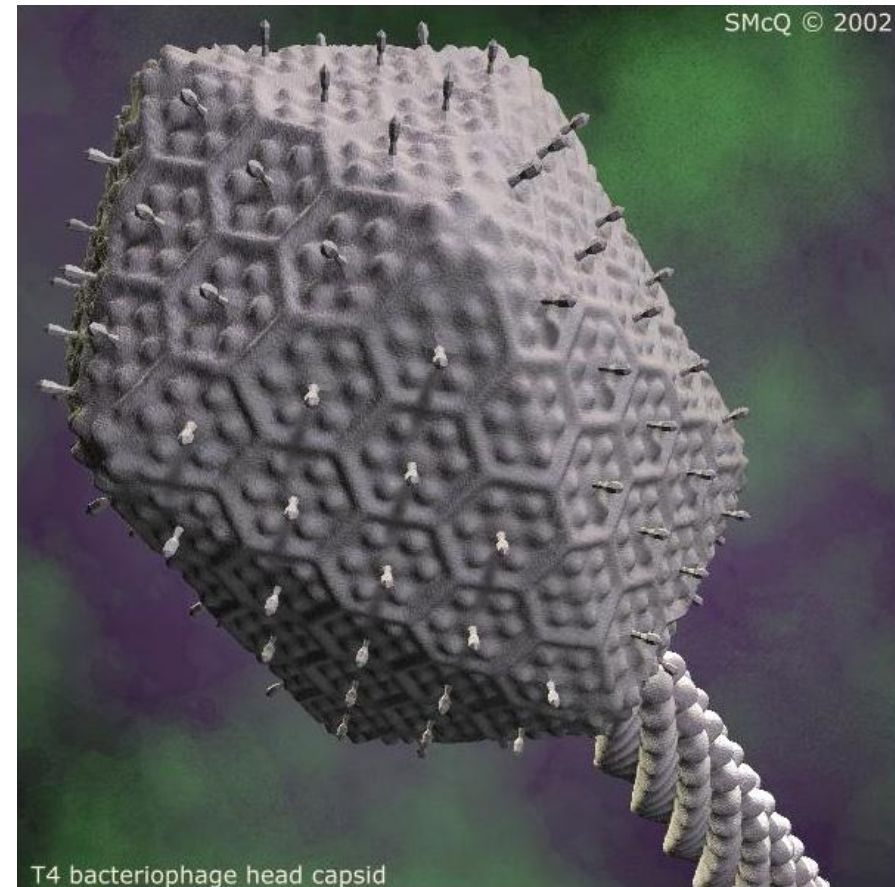
# Но главное в другом...

- Эта презентация о том, как мы сильно недооцениваем роль процессов, которые как нить Ариадны удерживают виды от генетического шума и позволяет им существовать в виде видов.



# Данное обобщение позволяет предсказать всеобщий характер распространения бактериофагов в бактериальных сообществах

- Предсказание: без бактериофагов большинство прокариотических организмов не смогут длительно адаптивно существовать.



Для контраста вернёмся ненадолго в мир эвкариот, где картина кажется более ясной.



# Вспомним одно фундаментальное обобщение

- Копирование генетической информации обязательно происходит с теми или иными ошибками.
- Например, человеческий детеныш от родителей отличается порядка сотней мутаций, причем он выживает при условии отсутствия у него летальных мутаций.

Даже слабовредные мутации при клональном размножении будут неизбежно накапливаться.

- Вступает в действие так называемый Храповик Меллера.
- Так как клональное размножение подразумевает отсутствие рекомбинации генов, то число вредных мутаций в бесполом организме может быть либо постоянным путём более сильного отбора, либо увеличиваться (храповик вращается только в одну сторону).

# Правило Мёллера (Muller 1950)

- Смертность потомков в половых популяциях будет меньше, чем в бесполом.
- Для удаления вредных генов из популяции в случае рекомбинирующих геномов требуется существенно меньше производить потомков для отбора.

# Рекомбинация порождает разнообразие: искусство немножко отличаться

- Делает некоторых потомков исключительными, некоторых – безнадёжными, некоторых – очень похожих на родителей.
- При клональном размножении потомки или такие же, или хуже родителей (храповик Меллера).

У эвкариот половой процесс и его аналоги являются правилом для размножения.

- Многочисленные модели, объясняющие роль полового размножения, изложены более-менее системно.
- Критерии вида как рекомбинационно изолированные сообщества генетически близких организмов, на первый взгляд кажутся совершенно неприменимыми к миру прокариот.

В случае прокариот процессы рекомбинации на первый взгляд кажутся менее регулярными и более хаотичными.

## НА САМОМ ДЕЛЕ

Многие явления оказались просто сильно недооцененными, и роль этих явлений лишь в последние два десятилетия стала проясняться.



Постепенно возникает новое  
более цельное понимание  
того, как в мире прокариот  
поддерживается генетическая  
стабильность видов.

# У прокариот.

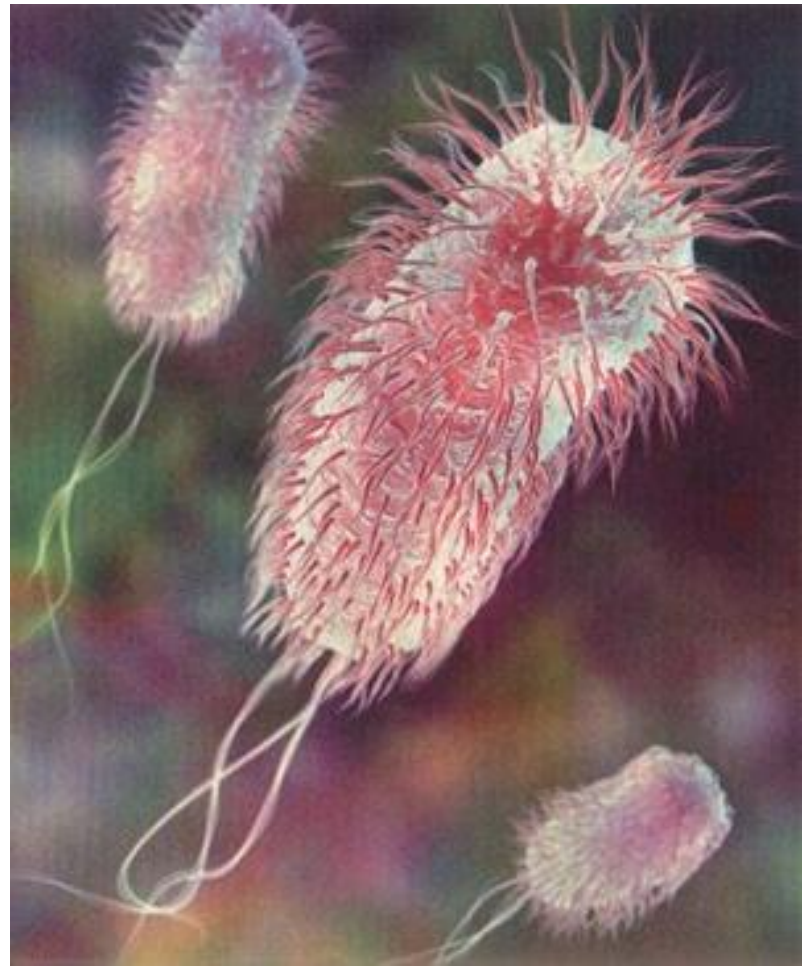
- У прокариот рекомбинация выглядит более случайной.
- При рекомбинации часть генетического материала, как правило, теряется.
- **Тем не менее она представляет собой по-видимому обязательный процесс для всех без исключения прокариотических организмов.**

# Однако...

- Понимание того, как прокариоты осуществляют рекомбинацию возникло не сразу.
- Поначалу большое внимание уделялось такому хорошо известному из учебников явлению, как конъюгация у бактерий.

# Пойдём от частного к общему.

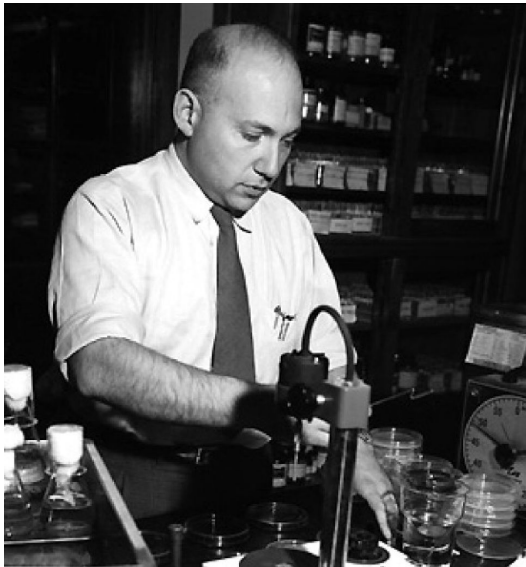
- Как конъюгация происходит у кишечной палочки?



# Конъюгация у бактерий

- Перенос генетического материала от одной бактериальной клетки (донора) к другой (реципиенту) при их непосредственном контакте был открыт Дж.Ледербергом и Э. Татумом в 1946 г.
- Процесс назван конъюгацией.
- Контакт клеток может осуществляться т.н. *пилями* (у грамотрицательных) или непосредственно.

# Ледерберг и Татум доказали, что при конъюгации происходит рекомбинация генетической информации



Дж. Ледерберг



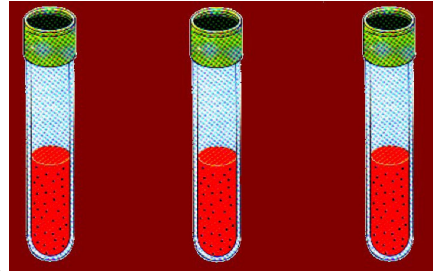
Э. Татум

# В основе их доказательства лежало использование ауксотрофных сред

- Культуры, растущие на наиболее бедной питательной среде из сред, обеспечивающих рост микроорганизма данного вида, называются **прототрофными**.
- • Культуры, требующие добавки к простой среде, называются **ауксотрофными**.

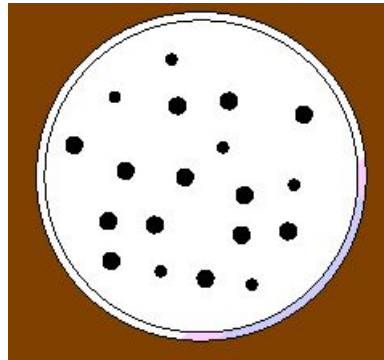
# Смешанная культура

Met<sup>-</sup> Bio<sup>-</sup>

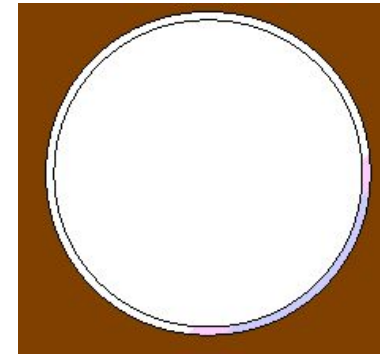


Thr<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Thi<sup>-</sup>

Клетки высевали на чашки с минимальной средой. В результате ~~вырастали~~ только прототрофы, то есть рекомбинанты



Колонии из смешанной культуры



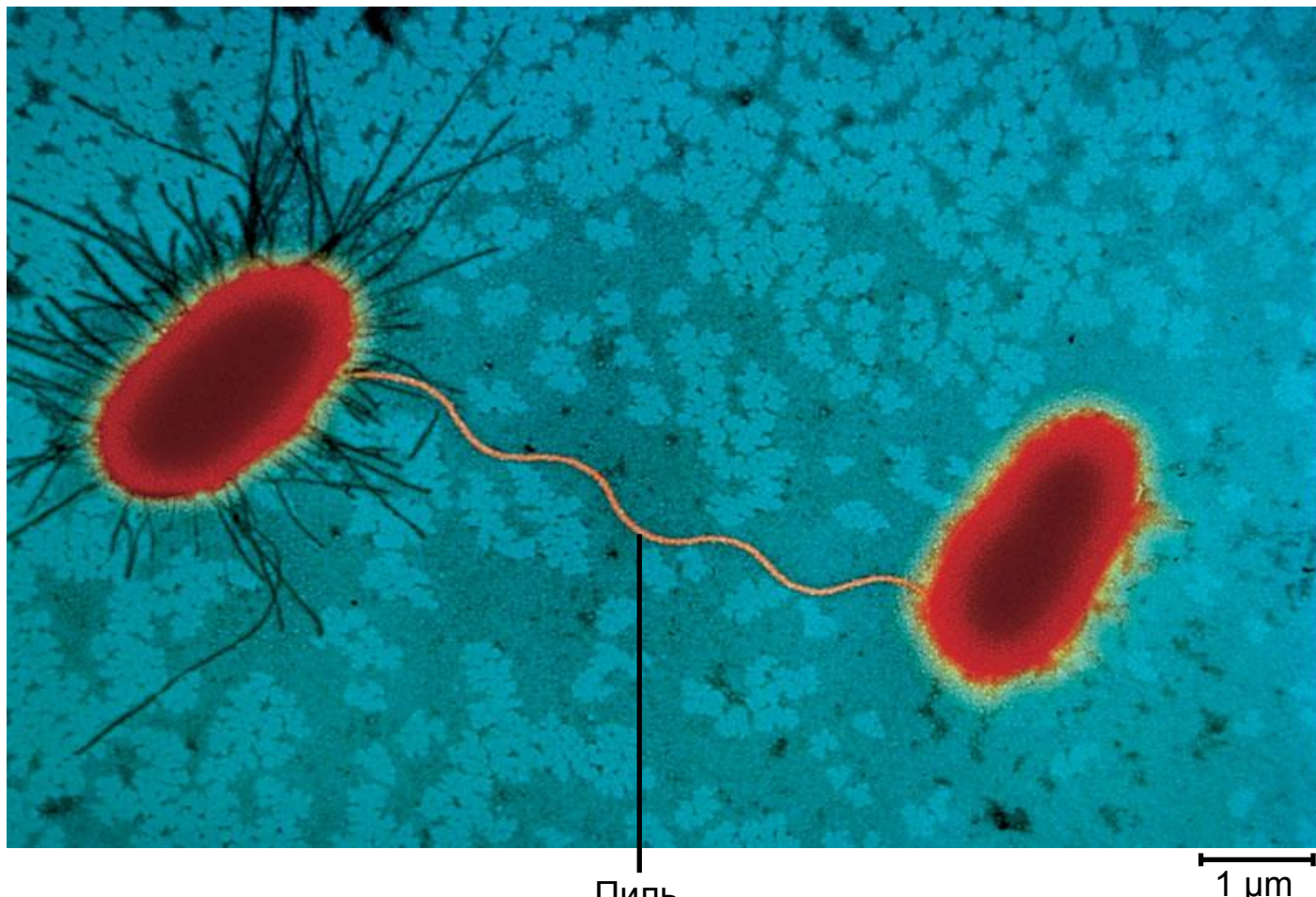
При высевае чистых культур колонии не появляются



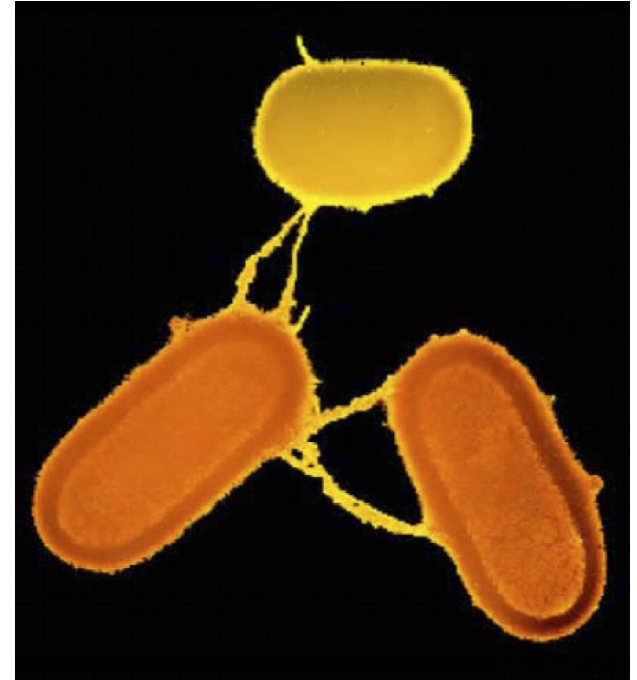
# Пили бывают разные...

- Помимо жгутиков, бактериальная клетка может нести тонкие отростки – *пили*. Обычно они нужны, чтобы бактерия прикреплялась к субстрату.
- Есть особый тип отростков – F-пили. Их наличие кодируется особой плазмидой, называемой F-фактор – независимой небольшой кольцевой ДНК, произвольное число копий которой может находиться в цитоплазме.

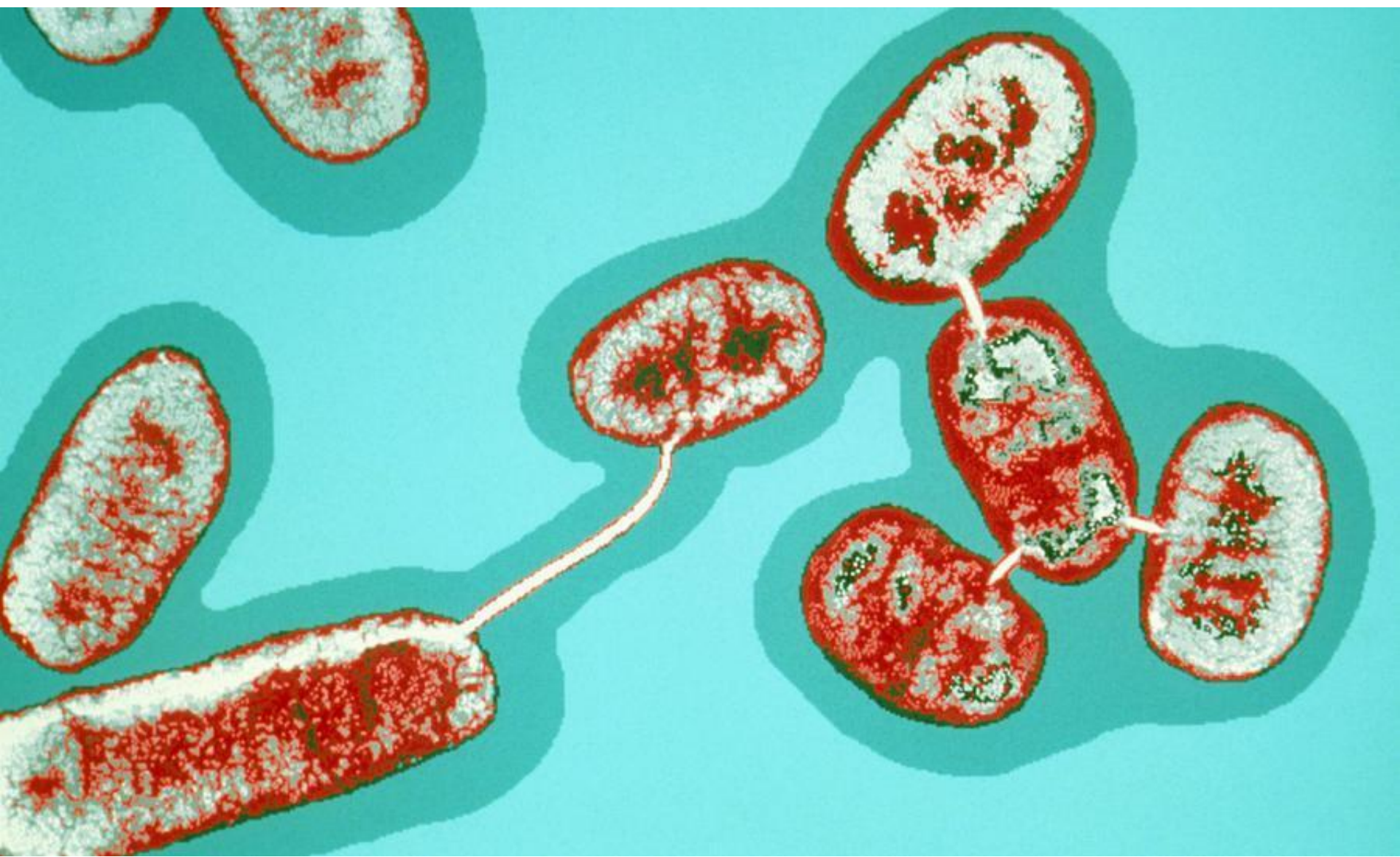
# Пили бывают разные...



- Донорные, мужские клетки, содержащие F-плазмиду, имеют от 1 до 3 пилей.



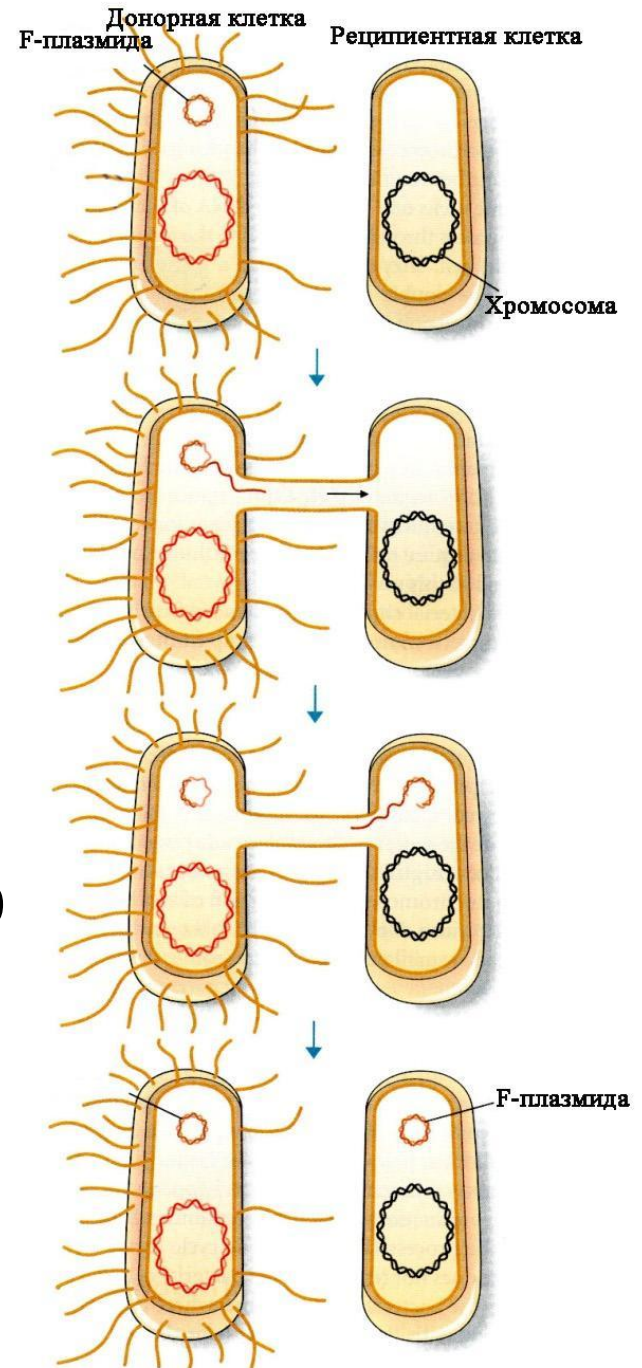
- Пили имеют осевой канал. Они обеспечивают контакт между клетками конъюгирующей пары.



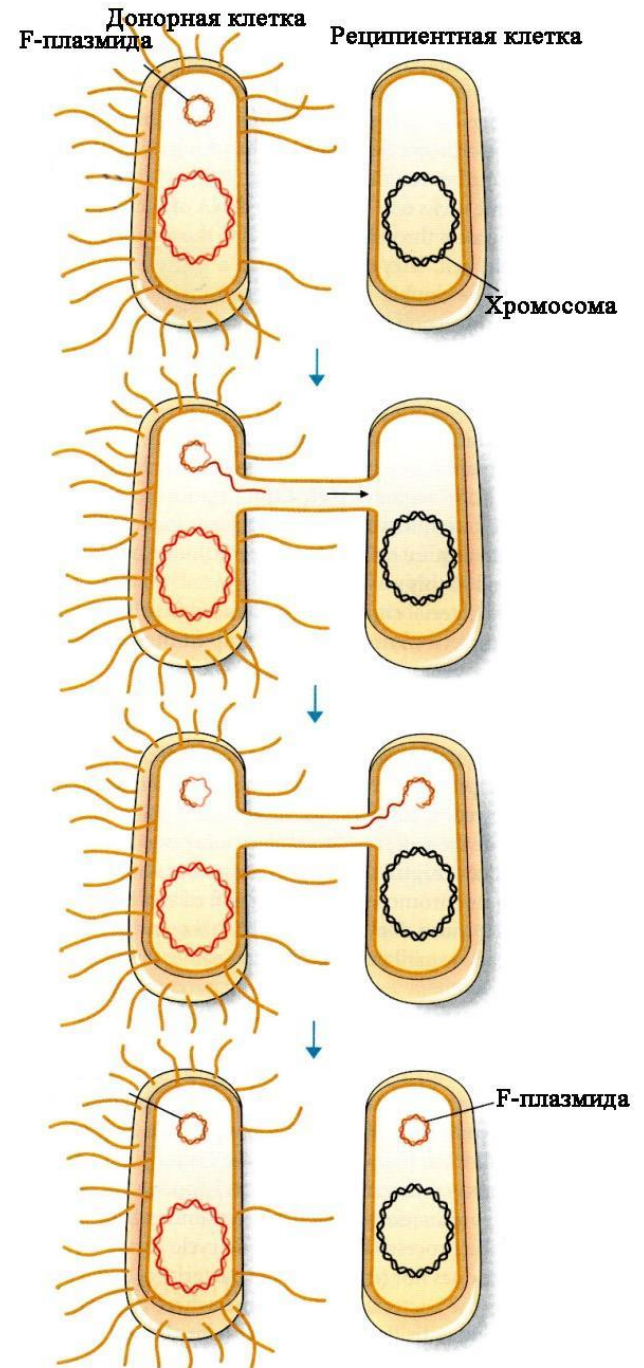
Обычно конъюгация рассматривается на одном частном примере у *E. coli*, хотя её механизмы очень разнообразны.



- После установления контакта пили сокращаются и клетка входит в тесный контакт.
- В сайт плазмиды *ori* (точка начала репликации) вводится однонитиевый разрыв и эта нить передаётся в реципиентную клетку.



- В донорной и реципиентной клетках синтезируется комплементарная нить.
- В реципиентной клетке линейная ДНК замыкается в кольцо.

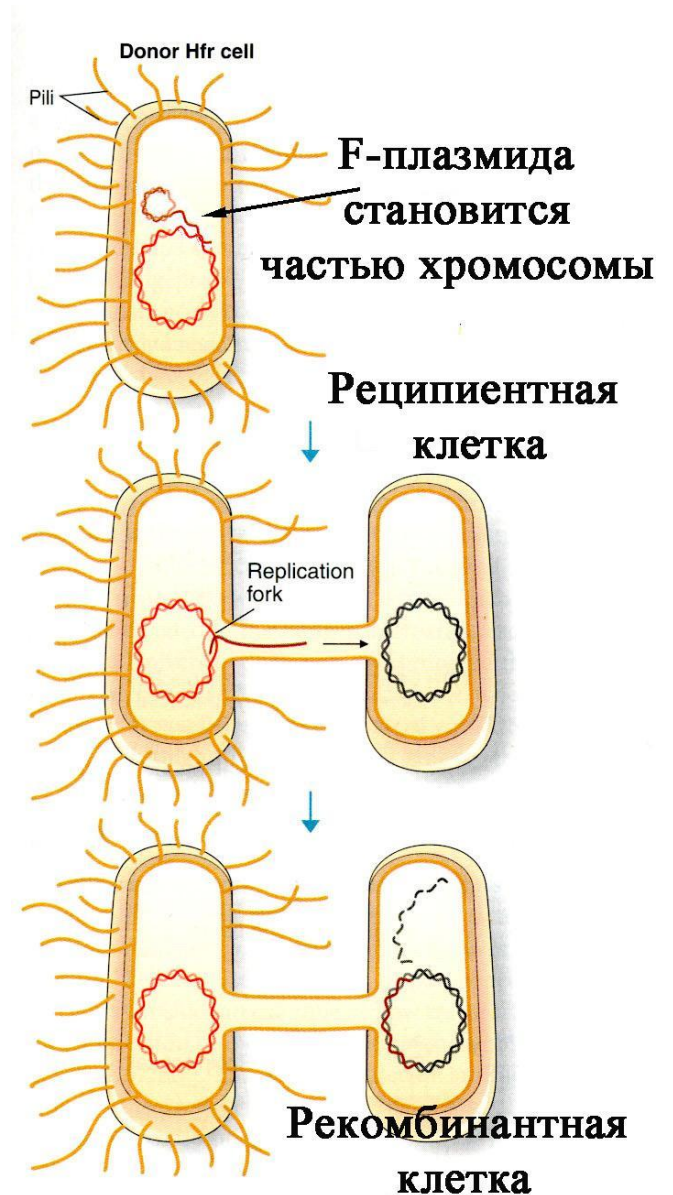


Но здесь же просто перенос плазмиды, а где же рекомбинация хромосомного материала?





- F-плазмида может интегрироваться в хромосому. При ее переносе реципиентную клетку также будет происходить перенос хромосомной ДНК.
- Рекомбинантная клетка станет мерозиготой.
- Что с ней происходит?



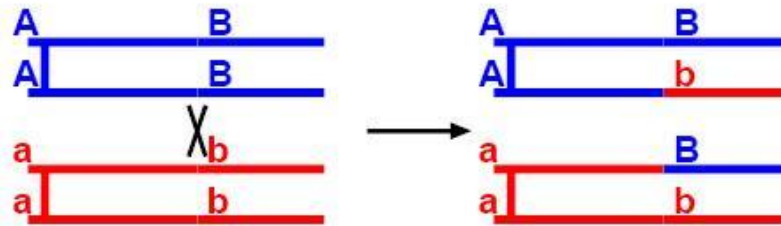
# Фундаментальный факт

- Если в бактериальную клетку проникнет фрагмент ДНК, гомологичный участку хромосомы, то с высокой частотой происходит гомологичная рекомбинация.

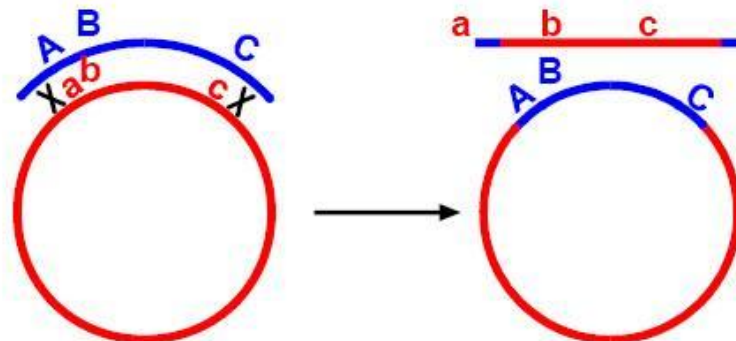
Почему при мейозе у эукариота возможен только один кроссинговер, а при конъюгации у прокариот обязательно хотя бы 2?

Общая схема кроссинговера

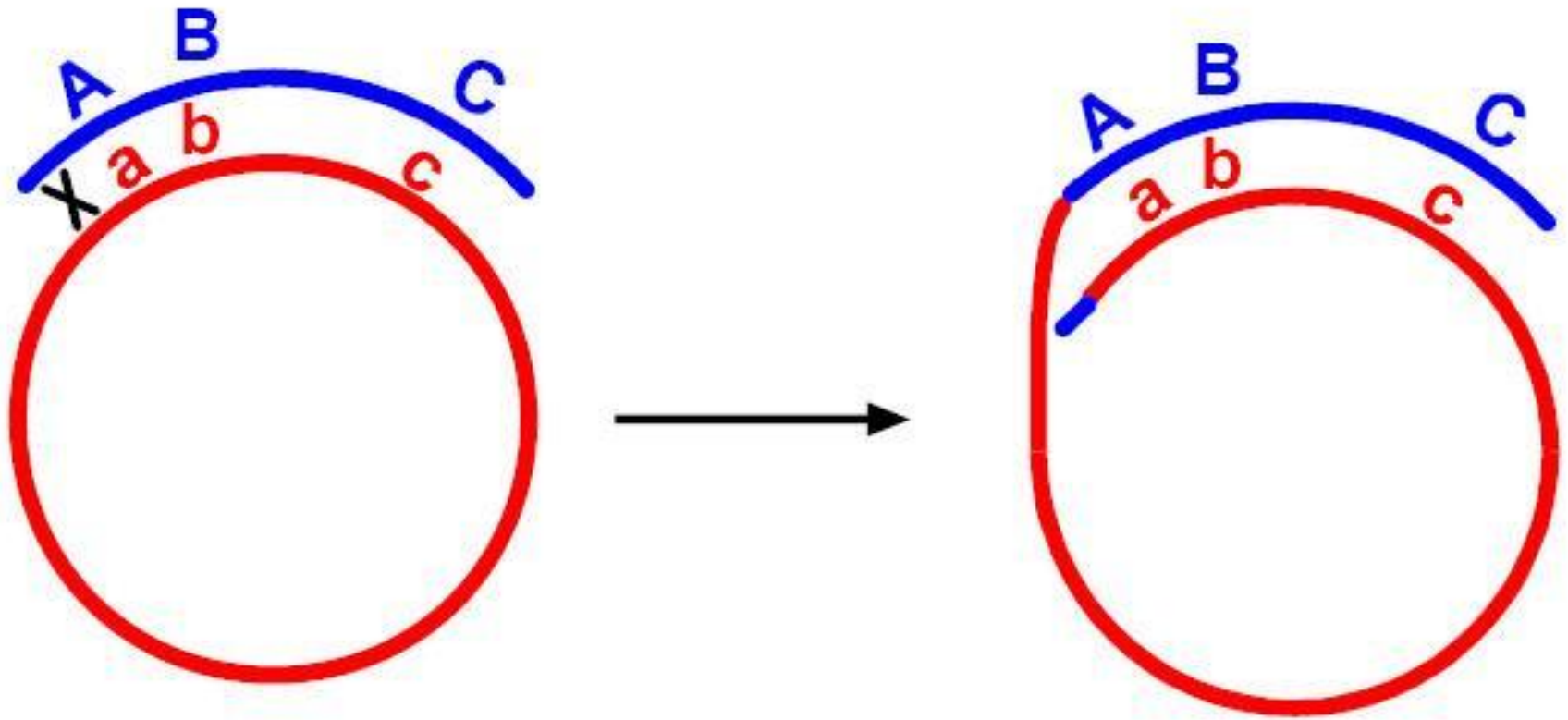
В мейозе



При конъюгации у E.coli



Одиночный кроссинговер привел бы к образованию линейной молекулы и гибели клетки



# Очень важное замечание

- F-фактор ведет себя как геномный паразит, а конъюгация и f-пили несомненно являются всего лишь средствами передачи инфекции.
- На этой основе и возник полезный для самой бактерии половой процесс; возможно, способность F-фактора встраиваться в бактериальную хромосому была поддержана естественным отбором.

# Насколько распространена конъюгация у бактерий?

- Обнаружены разные механизмы конъюгации, однако лишь у небольшой части бактерий.
- Встречается у десятков родов бактерий: энтеробактерий, псевдомонад и др.
- Возможна конъюгация между разными «видами» бактерий, например, кишечной палочкой и сальмонеллой.

# Наряду с конъюгативными плазмидами в рекомбинации могут участвовать конъюгативные транспозоны

- В отличие от плазмид конъюгативные транспозоны не содержат точки *ori*.
- Обнаружены у представителей родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Pseudomonas* и др. (более 50 родов).
- Важно, что нередко с конъюгативными плазмидами и транспозонами одновременно переносятся большие фрагменты хромосом.

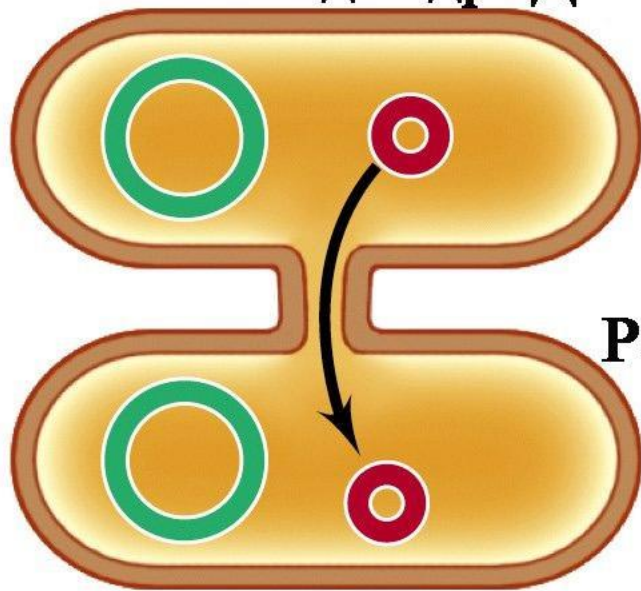
# Системы конъюгативного переноса у грамположительных бактерий более разнообразны.

- Как правило, клетки не образуют пилей, а просто агрегируют.
- В последние два десятилетия ученые пришли к пониманию того, что механизмы процессов конъюгации очень разнообразны.



# Разнообразие конъюгативного переноса

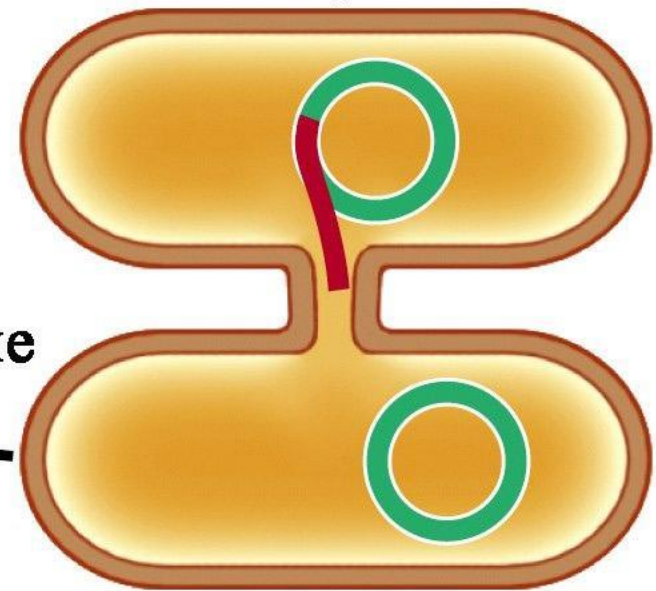
Донорская клетка с плазмидой  
Возможен попутный перенос  
плазмид и др. ДНК



ПЕРЕНОС  
ПЛАЗМИДЫ

Донорская клетка  
с интегрированной плазмидой  
или особым транспозоном

Реципиентные  
клетки



ПЕРЕНОС  
ХРОМОСОМЫ

# Насколько распространена конъюгация?

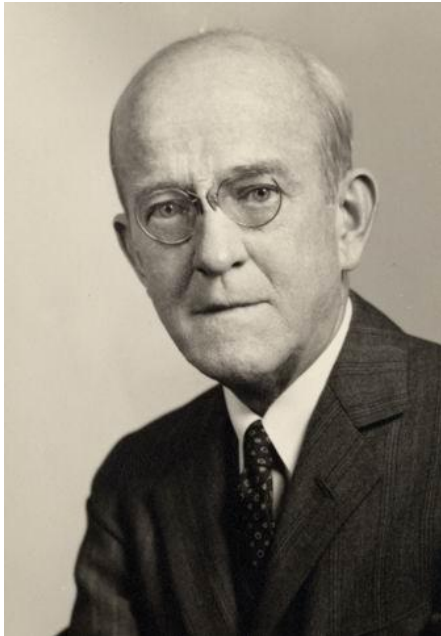
- Даже у хорошо изученных видов бактерий в последние годы обнаруживают разные виды конъюгаций.
- Однако возможно, что у большинства видов она все же отсутствует.
- Как же будет осуществляться рекомбинация у большинства прокариот?



# Первый намёк на понимание возник в связи с открытием явления трансформации у бактерий.

- Эта история началась в 1928 году.
- *Первый объект, который подсказал существование у бактерий одного фундаментального свойства, был *Pneumococcus pneumoniae*. Вирулентность ее определяется наличием или отсутствием мукополисахаридной капсулы на поверхности клетки, которая защищает бактерию от воздействия со стороны организма – хозяина.*
- В результате размножившиеся бактерии убивают зараженное животное. Бактерии этого штамма (S-штамм) образуют гладкие колонии. Авирулентные формы не имеют защитной капсулы и образуют шероховатые колонии (R-штамм).

- Ф. Гриффитс и О. Эвери инъекцировали мышам культуру живого пневмококка R-штамма вместе с S-штаммом, убитым высокой температурой.

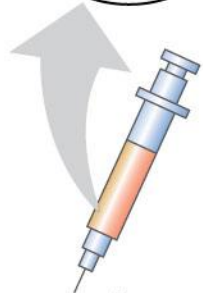
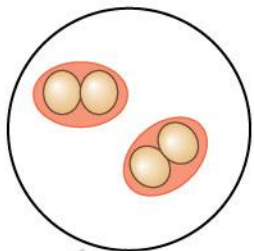


О. Эвери.



Ф. Гриффитс

**Живые S-  
клетки  
(контроль)**

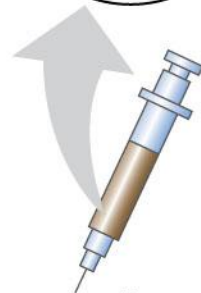


**Результаты**

**Мышь умерла**



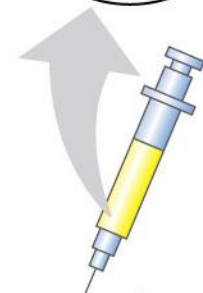
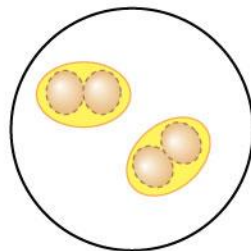
**Живые R-  
клетки  
(контроль)**



**Мышь здорова**



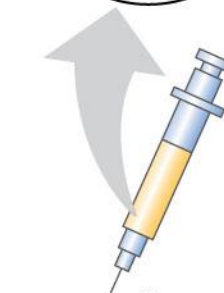
**Убитые  
Нагреванием  
S-клетки**



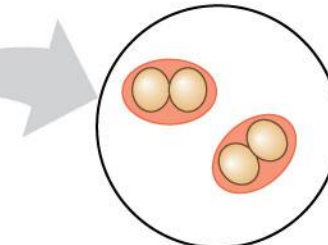
**Мышь здорова**



**Смесь  
убитых  
Нагреванием  
M  
S-клеток и  
живых  
R-клеток**



**Мышь умерла**



**Живые S-  
клетки**

**Трансформация - направленный перенос и встраивание в генетический аппарат клетки небольшого фрагмента чужеродной ДНК, происходящая участия вирусов – бактериофагов.**

- Поначалу роль явления трансформации учитывалась при развитии молекулярной биологии (генетической роли ДНК, методов генной инженерии).
- Однако...

- В 90-е годы прошлого века стало ясно, что трансформация важна и для того, чтобы организмы в ходе эволюции не изобретали велосипед.
- Трансформация – одна из основ горизонтального захвата генов между даже удалёнными формами, что резко ускоряет эволюцию.

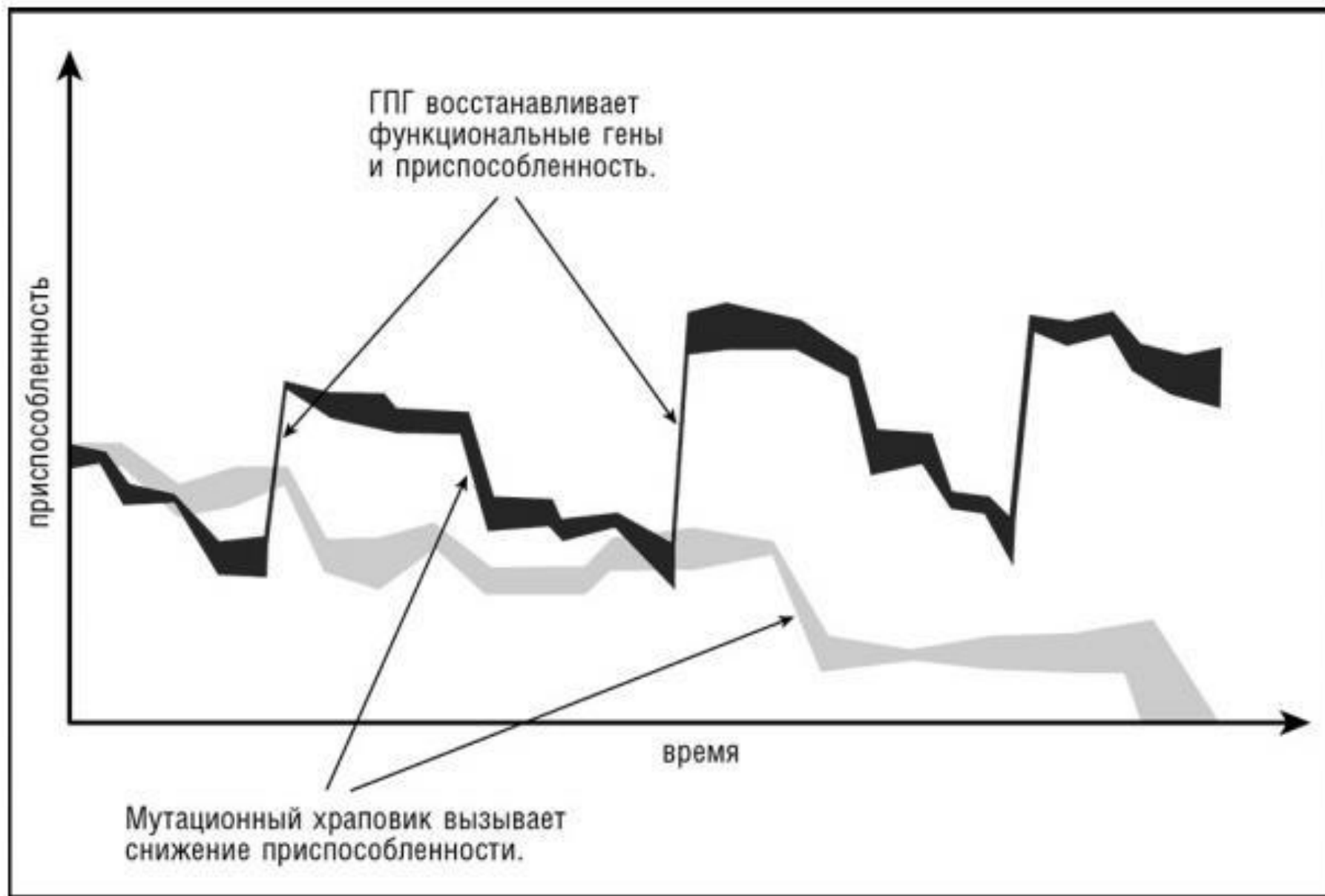


# Однако...

- Как увидим ниже, трансформация лежит в основе и другого фундаментального явления, связанного с избавлением от Храповика Мёллера



# Как перенос генов спасает популяцию

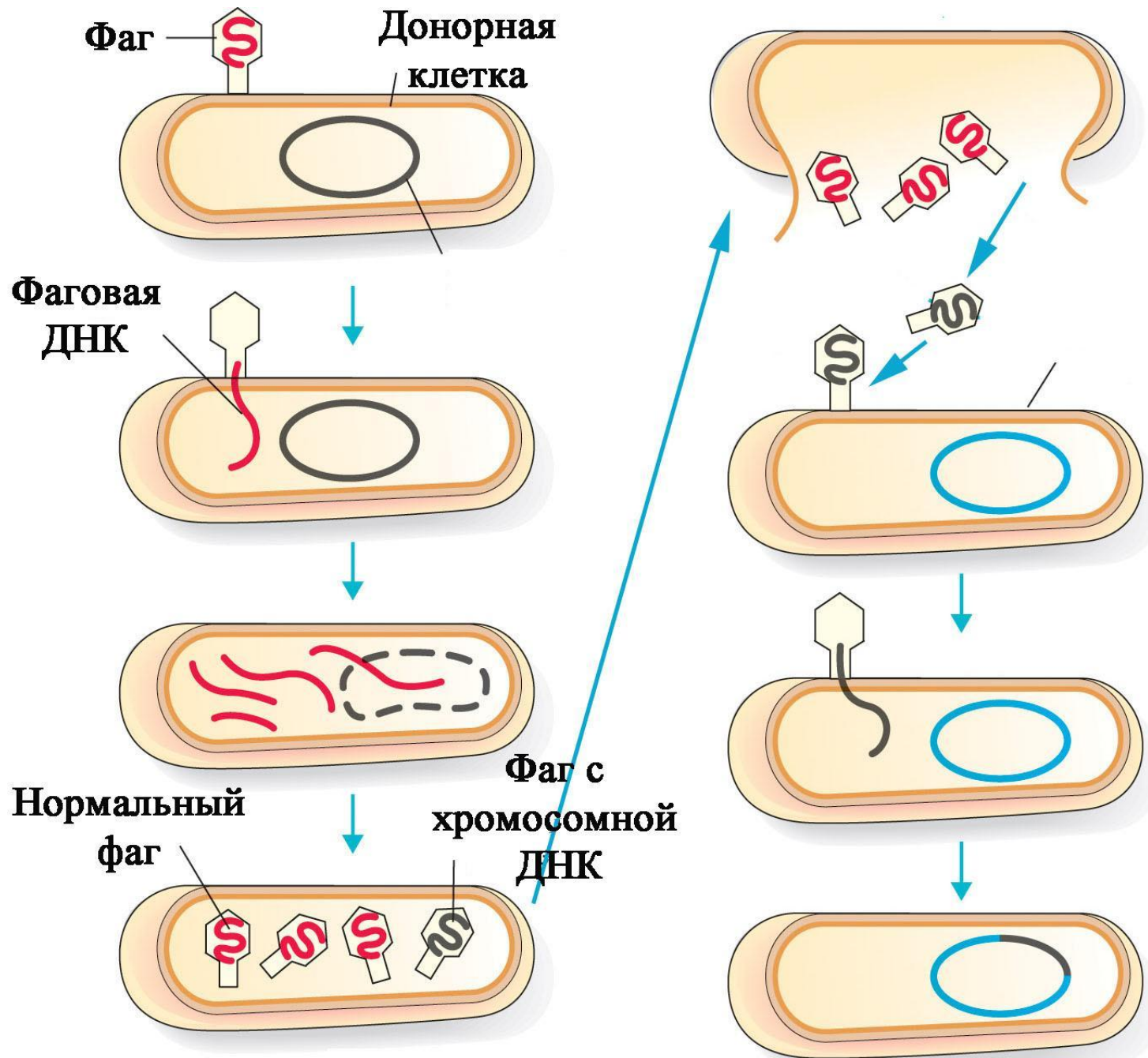


Инфекция вирусами – это прежде всего критически необходимое для прокариот приобретение эволюции.



Трансдукция - процесс переноса бактериальной ДНК из одной клетки в другую бактериофагом.

- Попадая в другую бактериальную клетку, фрагмент ДНК может включаться в её геном, обычно путём гомологичной рекомбинации.

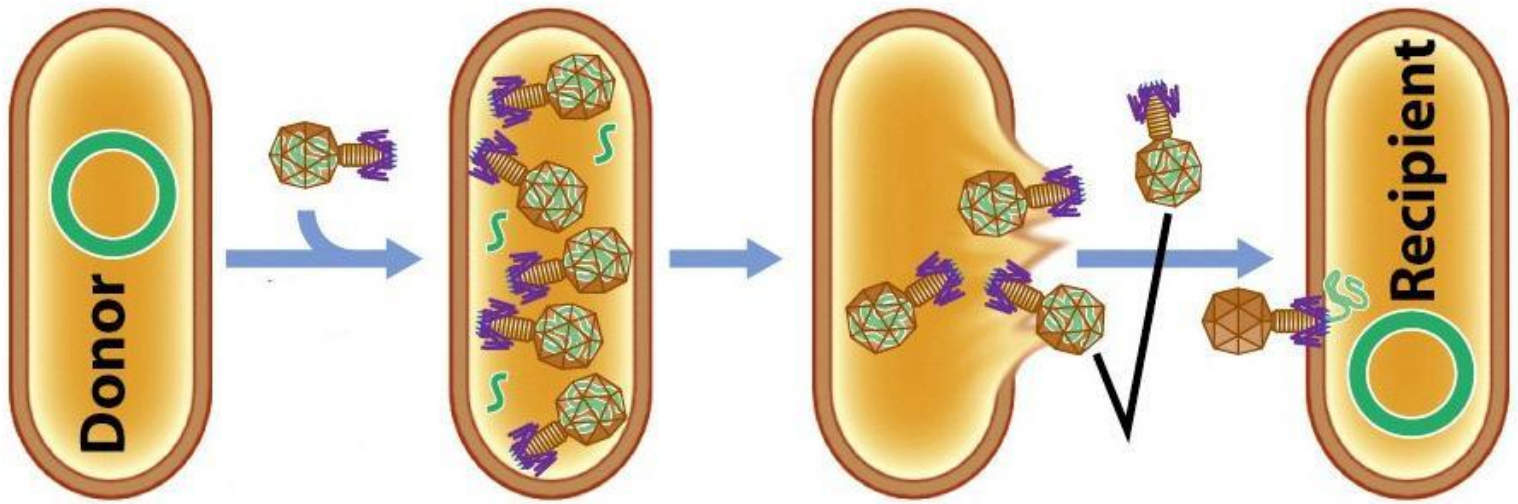


Таким образом, фаги оказываются полезными для популяций бактерий.

- Фаги, убивая часть бактерий, переносят их ДНК, обеспечивая избавление от Храповика Меллера.

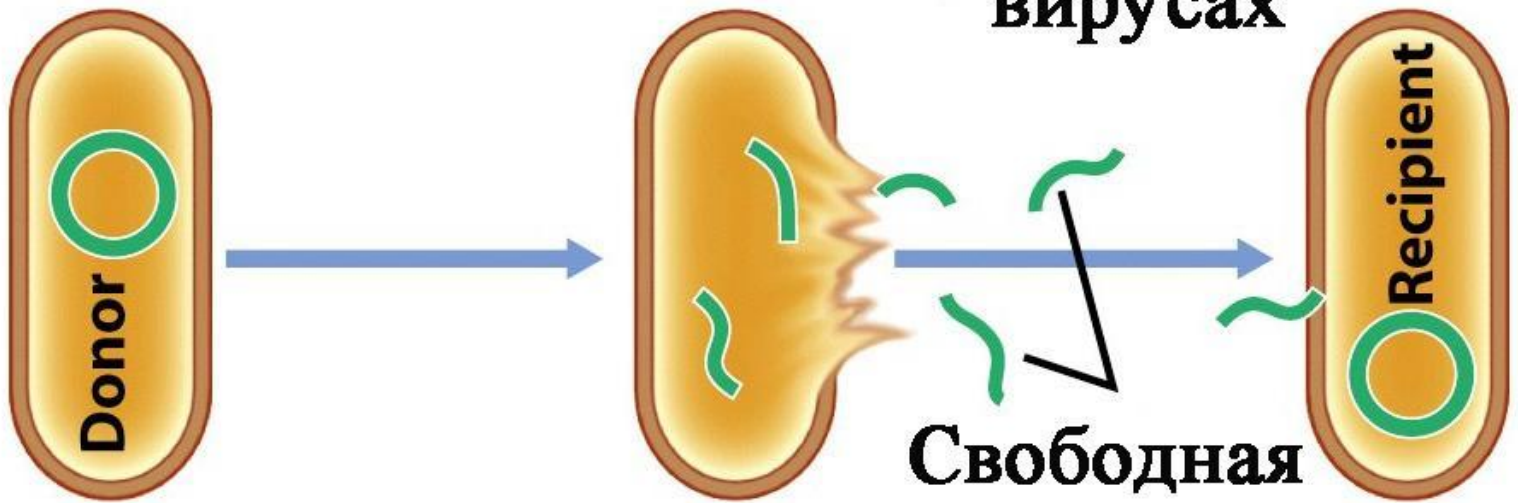
# А теперь внимание!!!

- Принципиально новая идея №1!
- Задача на логическое воображение: могут ли эти два процесса – трансформация и трансдукция быть связанными и участвовать в ОБЩЕМ механизме рекомбинации?



ТРАНСДУКЦИЯ

Хромосомная  
ДНК в  
вирусах



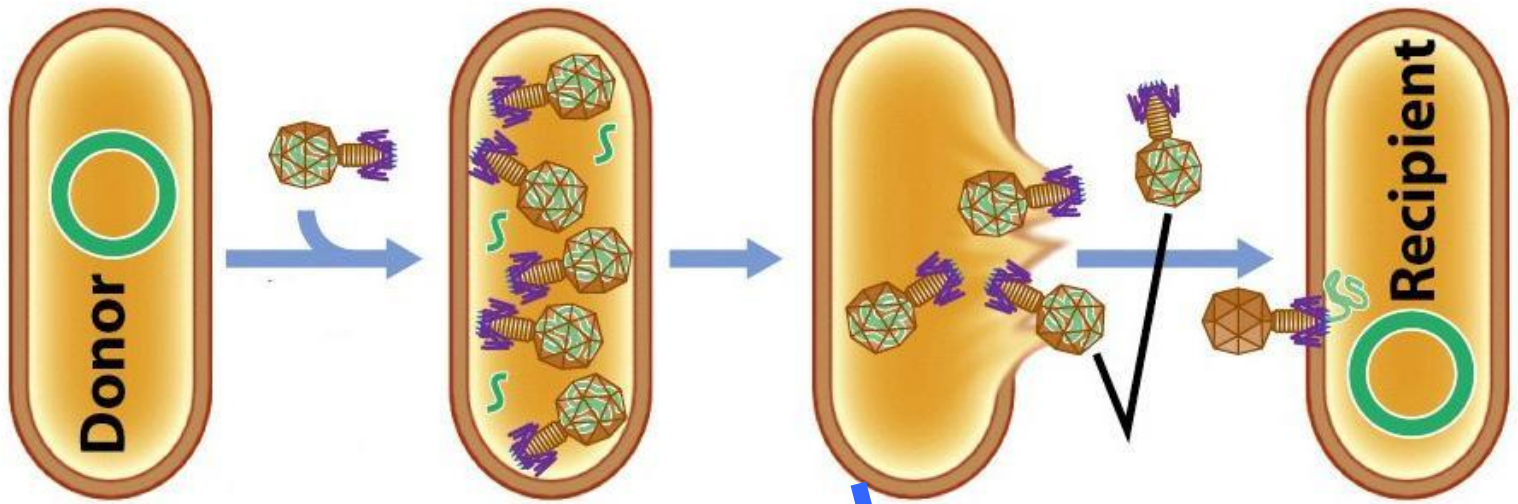
ТРАНСФОРМАЦИЯ ДНК

Свободная  
ДНК

# Ответ – ДА!

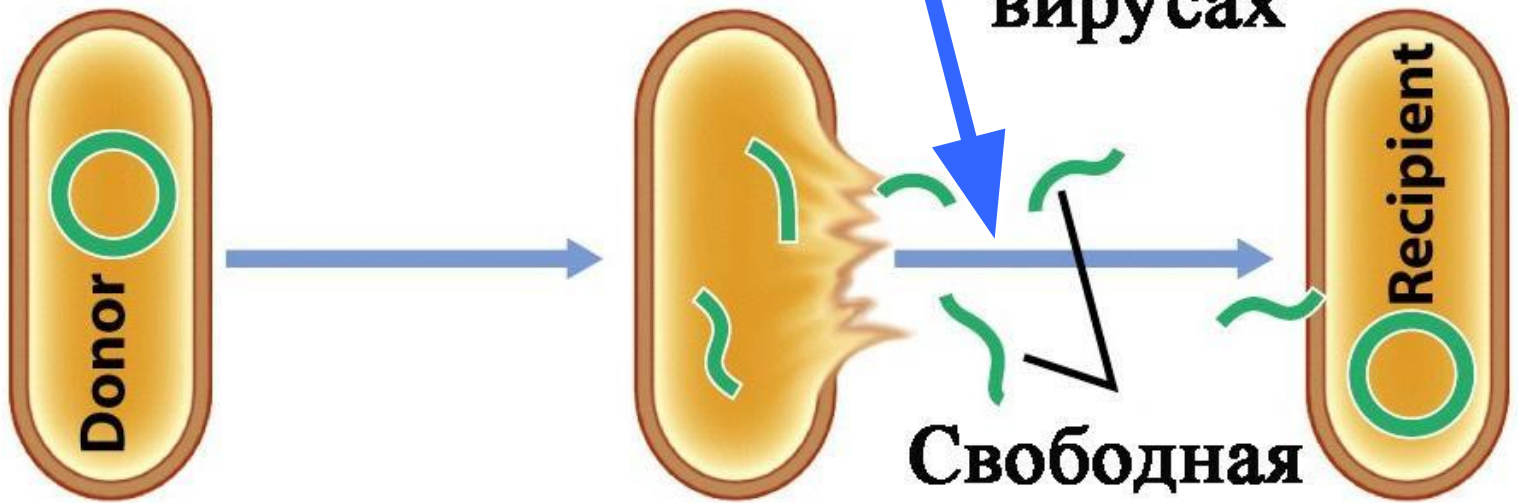
- Лизис фагом прокариотической клетки приводит к образованию свободной бактериальной ДНК, которая может трансформировать.
- Для указания этой логической связи добавляем новую стрелку.





ТРАНСДУКЦИЯ

Хромосомная  
ДНК в  
вирусах



Свободная  
ДНК

ТРАНСФОРМАЦИЯ ДНК

# Попробуем кое в чём посомневаться.



*«Наука — не место для догм. Учёный имеет право и обязан задавать любые вопросы, ставить под сомнение любые утверждения, искать любые доказательства, исправлять любые ошибки».*

*Роберт Оппенгеймер.  
«Открытый разум» (The open mind. Simon and Schuster, 1955)*

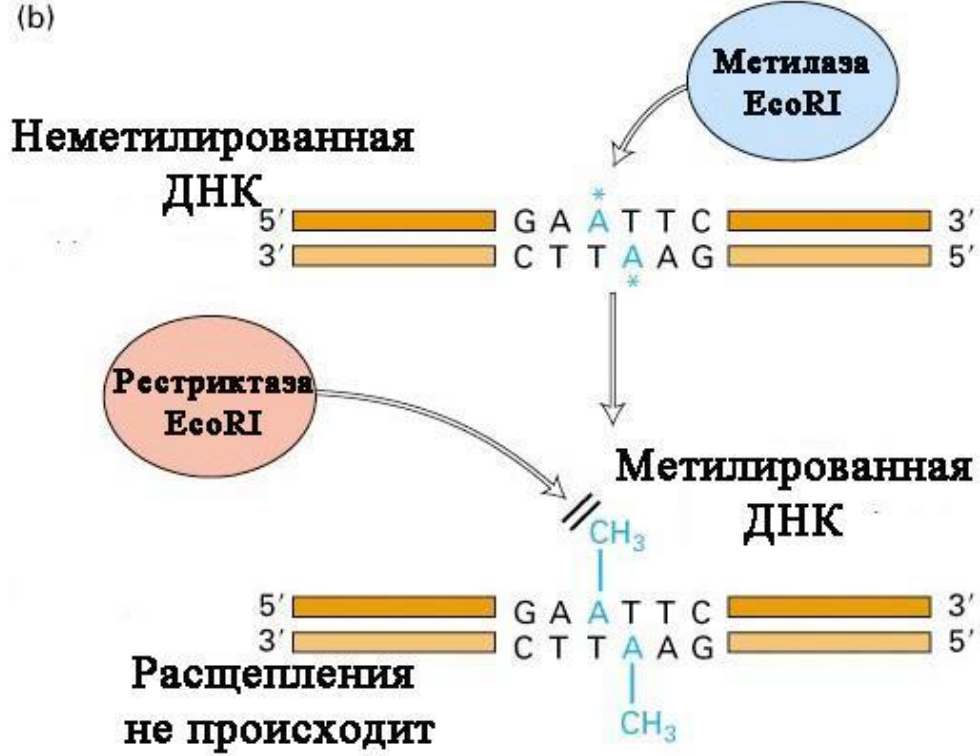
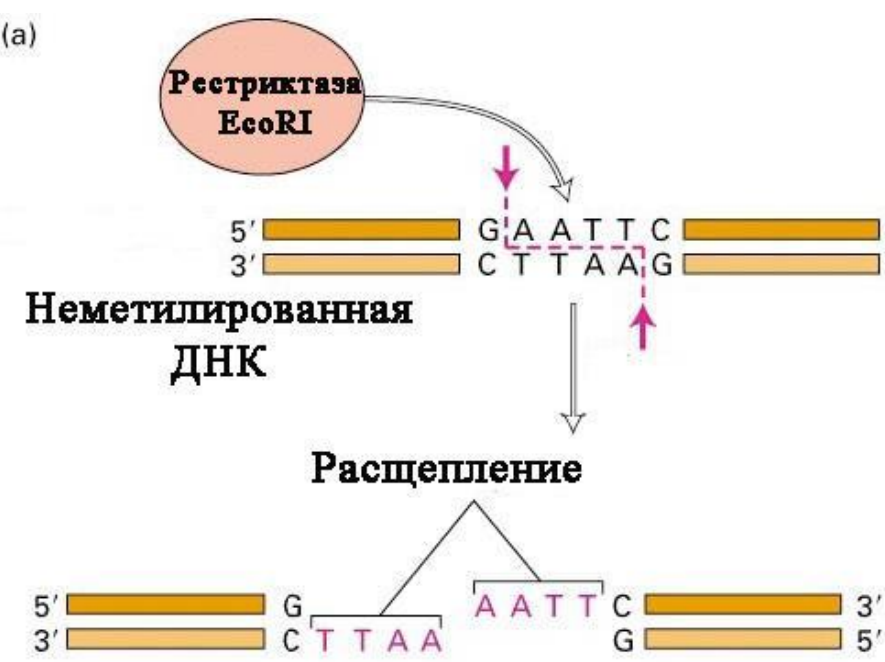
# Какой процесс более значим?

- Казалось бы, фаги, благодаря специфичности инфицирования должны быть более важны для осуществления именно гомологической рекомбинации.
- Однако в значительной части популяции прокариот существует особая система распознавания «своей-чужой» - система рестрикции-модификации.

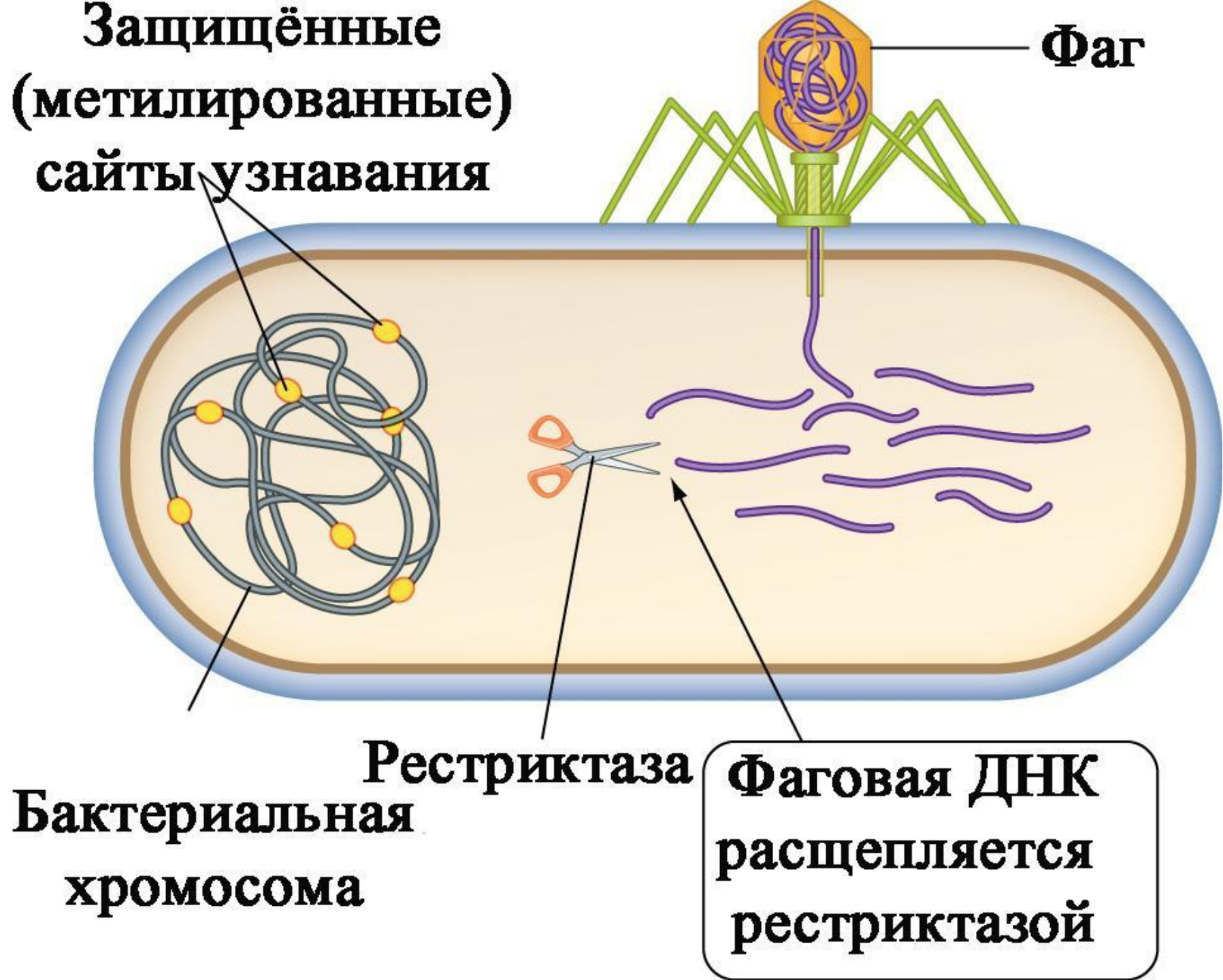
# Система рестрикции-модификации обеспечивается двумя типами ферментов.

- Первый тип – «ножницы», которые режут ДНК по определённым последовательностям (обычно длиной 4-8 пар нуклеотидов). Это – рестриктазы, или эндонуклеазы рестрикции.
- Второй тип – ферменты, которые «спасают» эти узнаваемые участки длиной 4-8 пар нуклеотидов от разрезания – метилазы.

- Рестриктаза расщепляет чужеродную ДНК по определённому сайту узнавания.



- Собственная ДНК клетки не расщепляется рестриктазой, так как метилаза **метирует** основание в сайте узнавания.



# Кстати:

- Даже порезанная ДНК из фага может участвовать в рекомбинации.

# Почему рестриктазы так называются?

- Система рестрикции-модификации предотвращает фаговую инфекции не на 100%, а только уменьшает её вероятность на порядок.
- Таким образом, эта система **ОГРАНИЧИВАЕТ** долю инфицируемых клеток.
- По английски «ограничение» - restriction

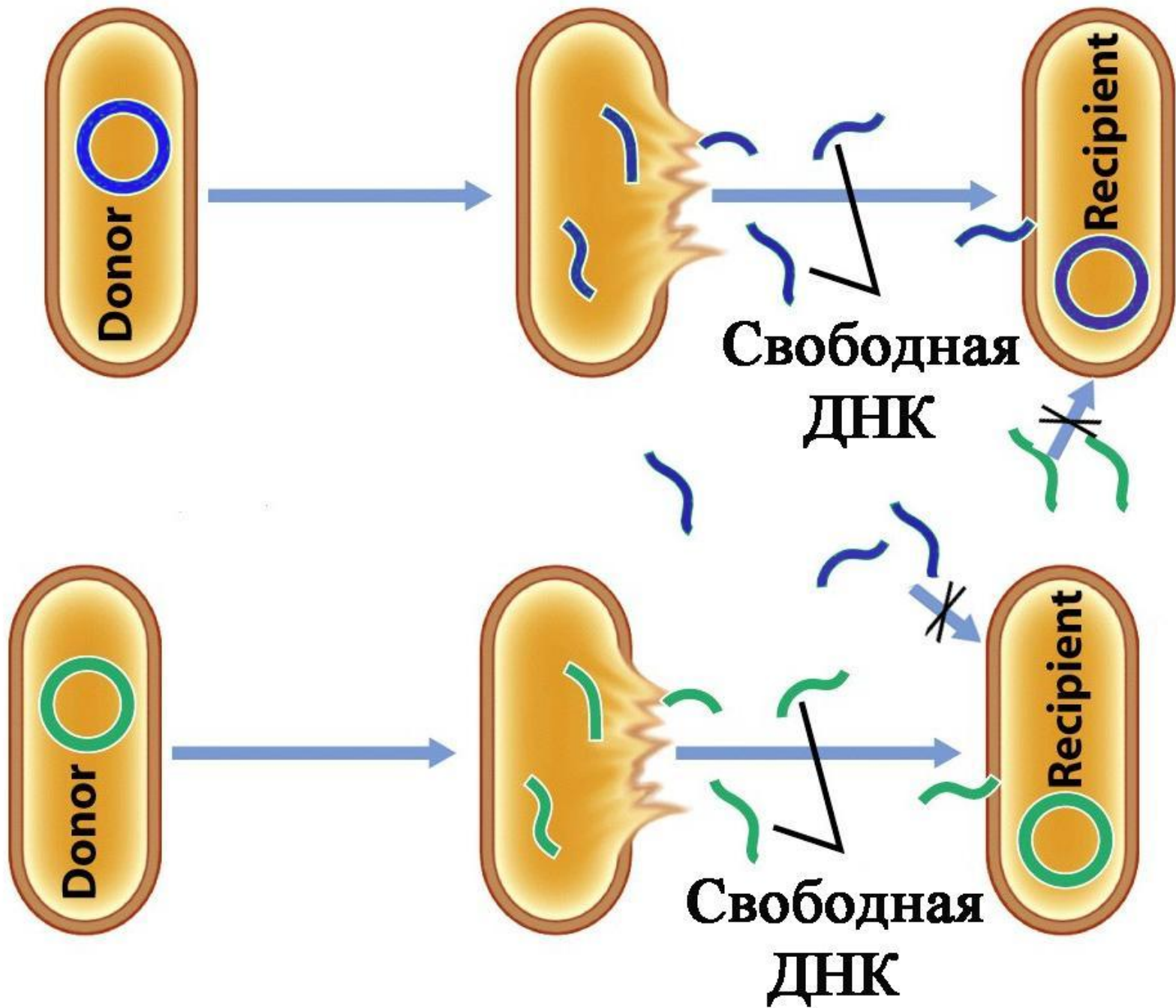


# Нетривиальная идея №2!

- В научной и учебной литературе чаще всего пишут, что системы рестрикции-модификации нужны для защиты от фаговой инфекции.
- Это – только часть правды.
- Возможно, что в первую очередь они нужны для избирательного попадания ДНК только очень близкого штамма, несущего сходную систему рестрикции-модификации.

Система рестрикции модификации  
помогает осуществлять  
преимущественно рекомбинацию только  
между очень родственными штаммами!

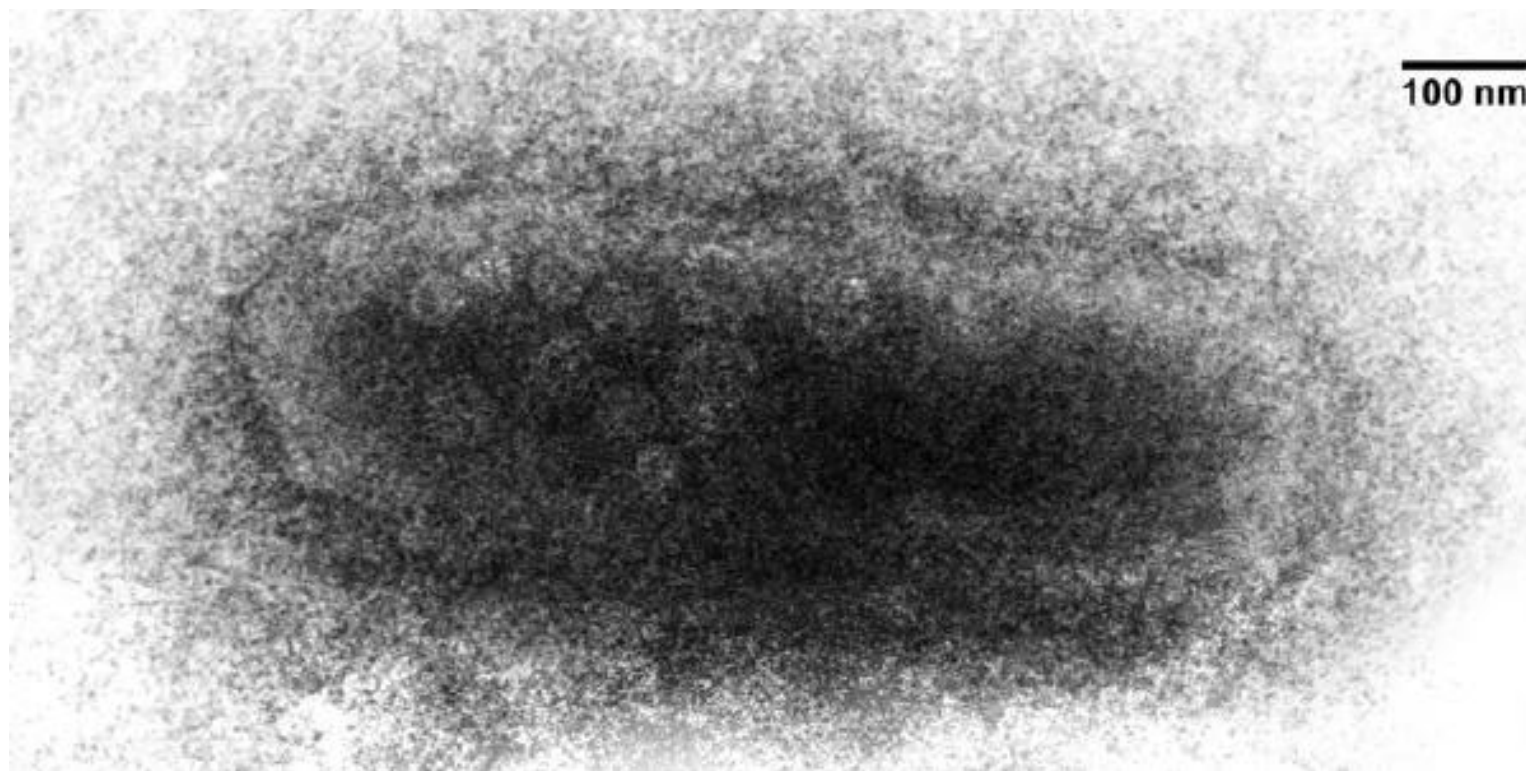
- Фаги с определённой частотой (не излишне высокой благодаря системе рестрикции модификации) осуществляют периодический лизис клеток.
- В растворе оказывается ДНК разных видов бактерий.
- Но в трансформации будет участвовать преимущественно ДНК своего штамма, которая благодаря метилированию будет защищена от действия рестриктаз.



В настоящее время общепризнанным является тот фундаментальный факт, что бактериофаги и археофаги играют ключевую роль в постоянном массовом лизисе клеток в прокариотических сообществах.

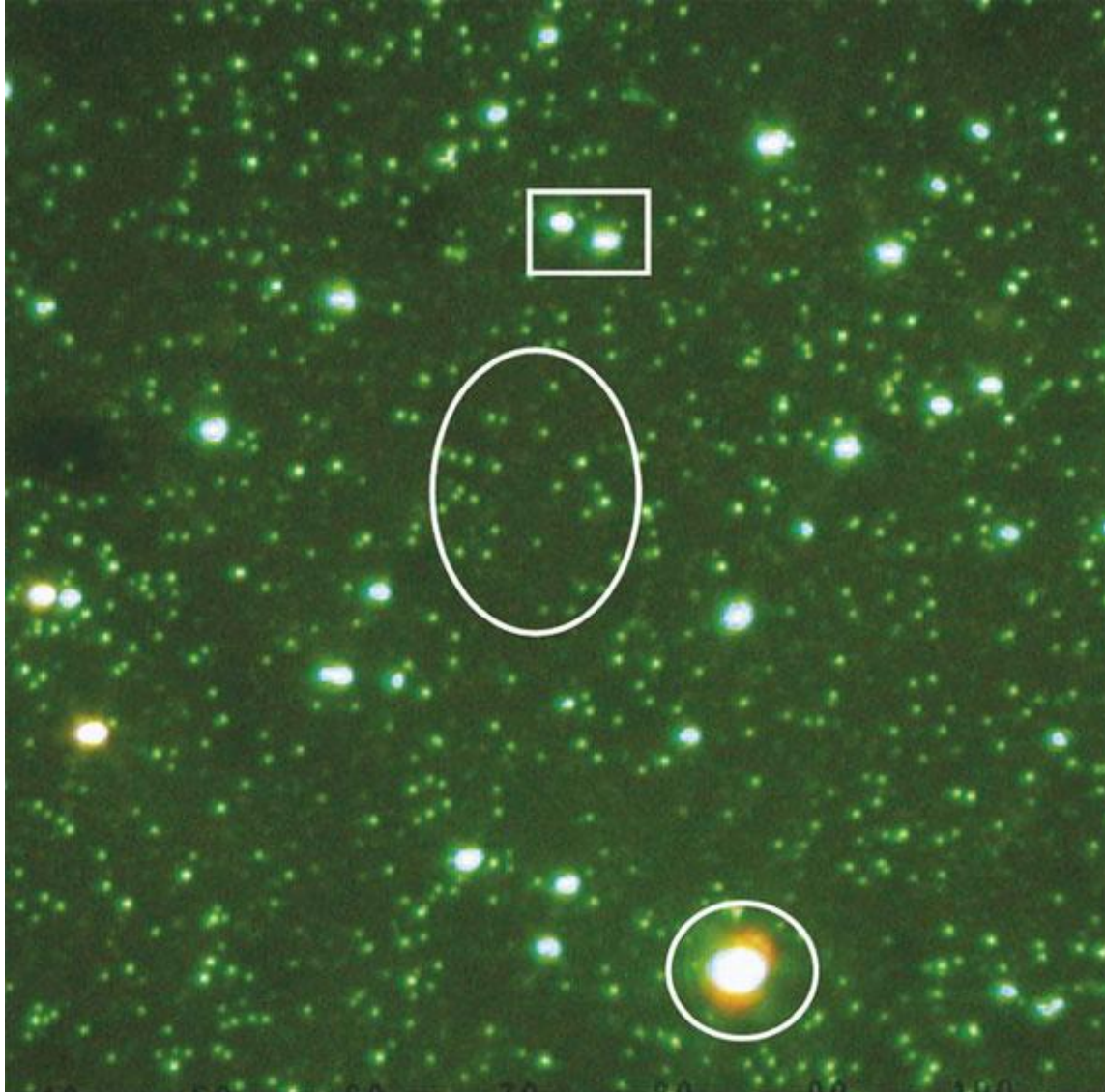
- Совсем недавно пришли к пониманию, что фаги обеспечивают регуляцию биогенных элементов в подземной и океаническом прокариотических сообществах (*Roberto Danovaro, Antonio Dell'Anno, Cinzia Corinaldesi, et al. Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems // Nature. V. 454. P. 1084–1087*).

Это утверждение может быть дополнено не менее фундаментальным обобщением: массовый лизис бактерий – критически необходимый элемент для существования бактериальных видов.



Бактерия, заражённая вирусами из донных отложений

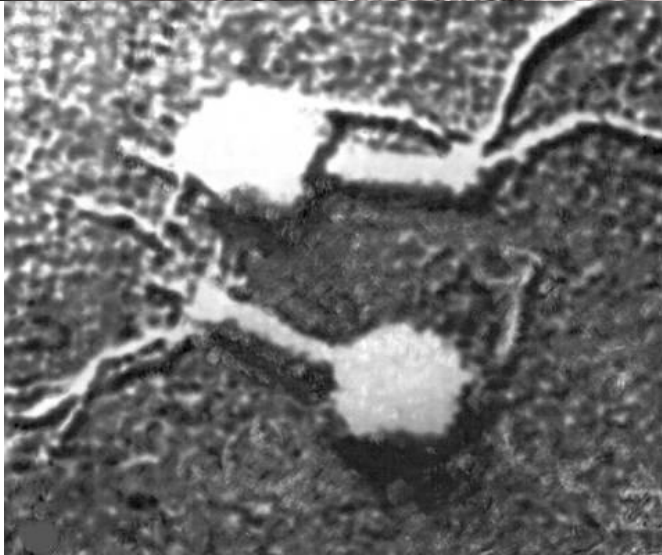
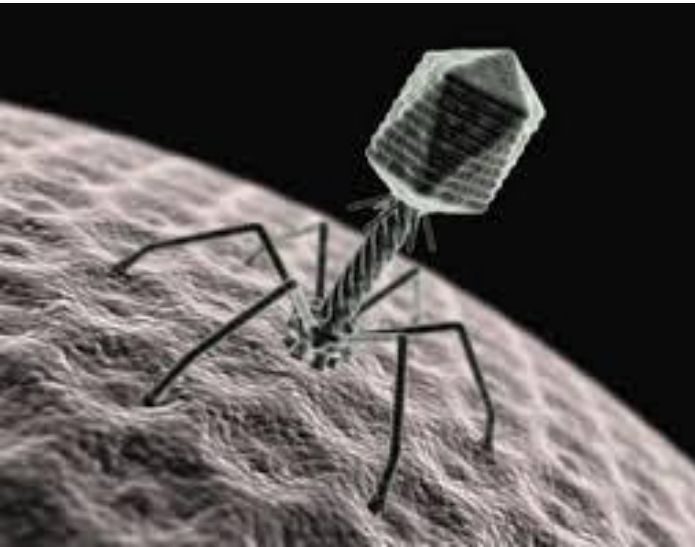
Бактерии (в прямоугольнике) и вирусные частицы (овал) из морской воды.



# Таким образом

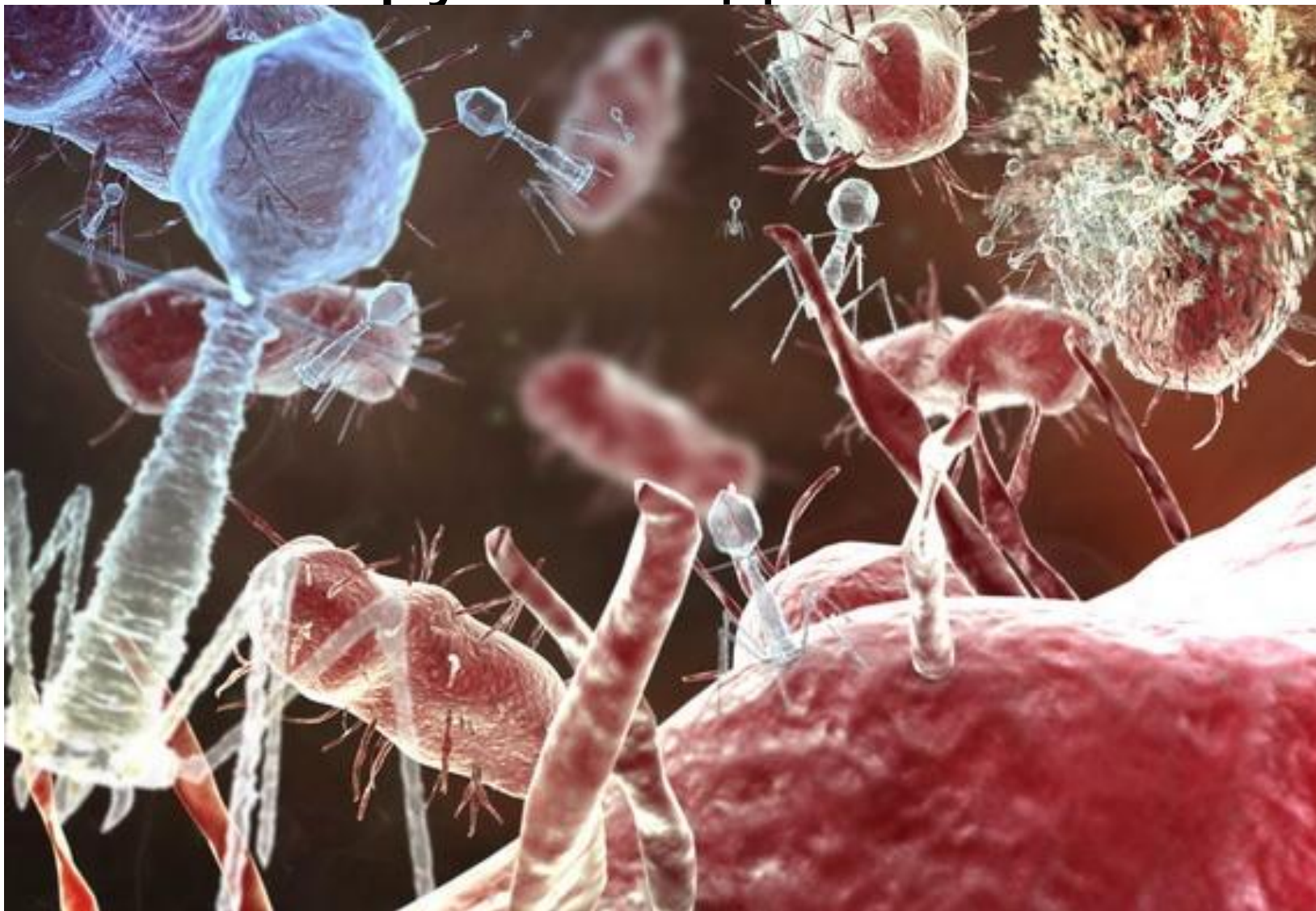
- Фаги оказываются исключительно полезными не только благодаря тому, что они сами (быть может таксоноспецифично) осуществляют перенос участков хромосомной ДНК в другие клетки.
- Благодаря лизису прокариотических клеток, который может происходить с определёнными периодами, сама ДНК лизируемой клетки может участвовать в трансформации, а, значит, и рекомбинации.
- В общей мешанине ДНК из разных видов, преимущественно трансформироваться будет ДНК из близких штаммов благодаря системам рестрикции-модификации.

Бактериофаги и археофаги – это не гибель прокариотических популяций, а критически необходимый элемент их выживания



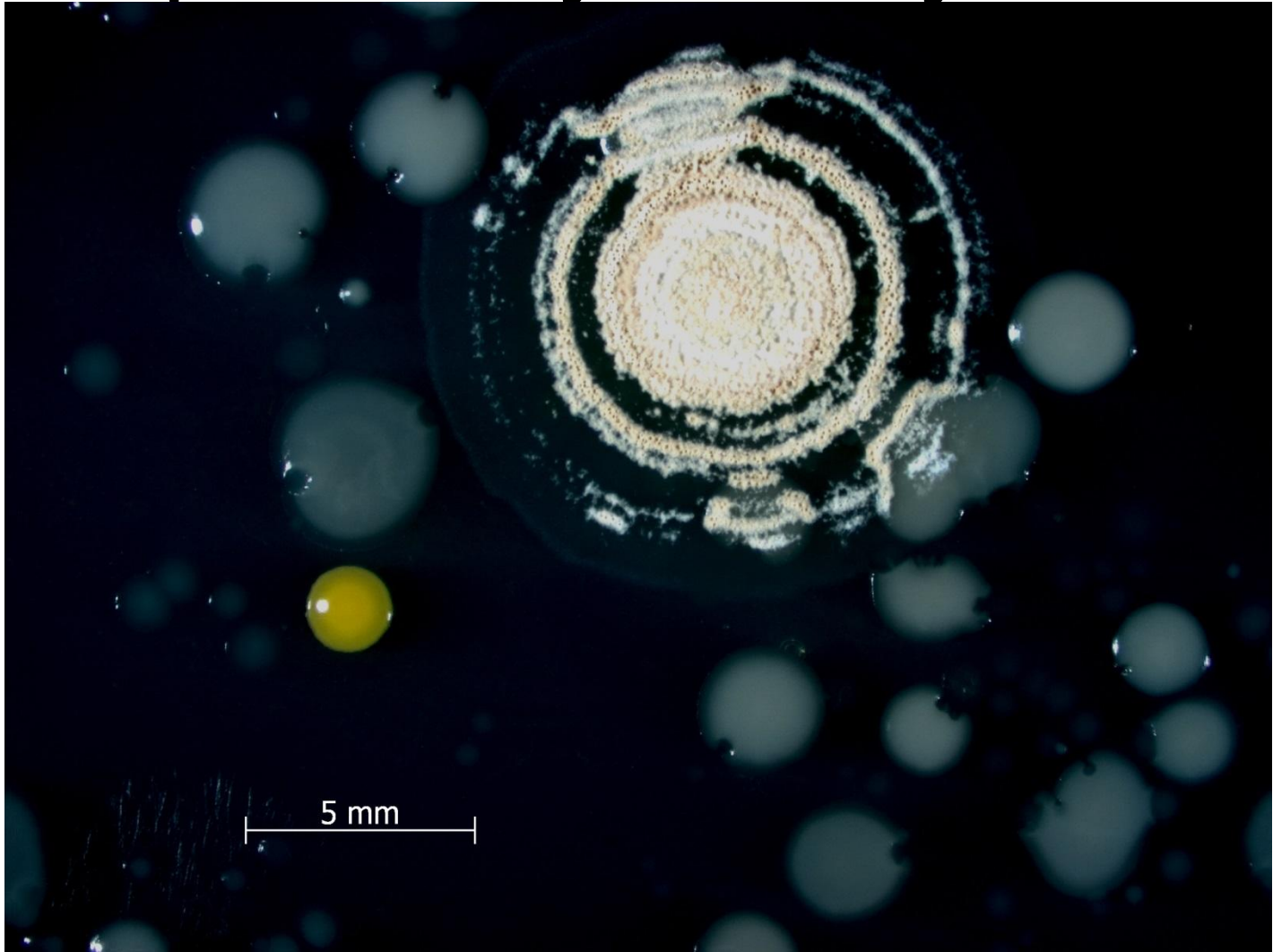


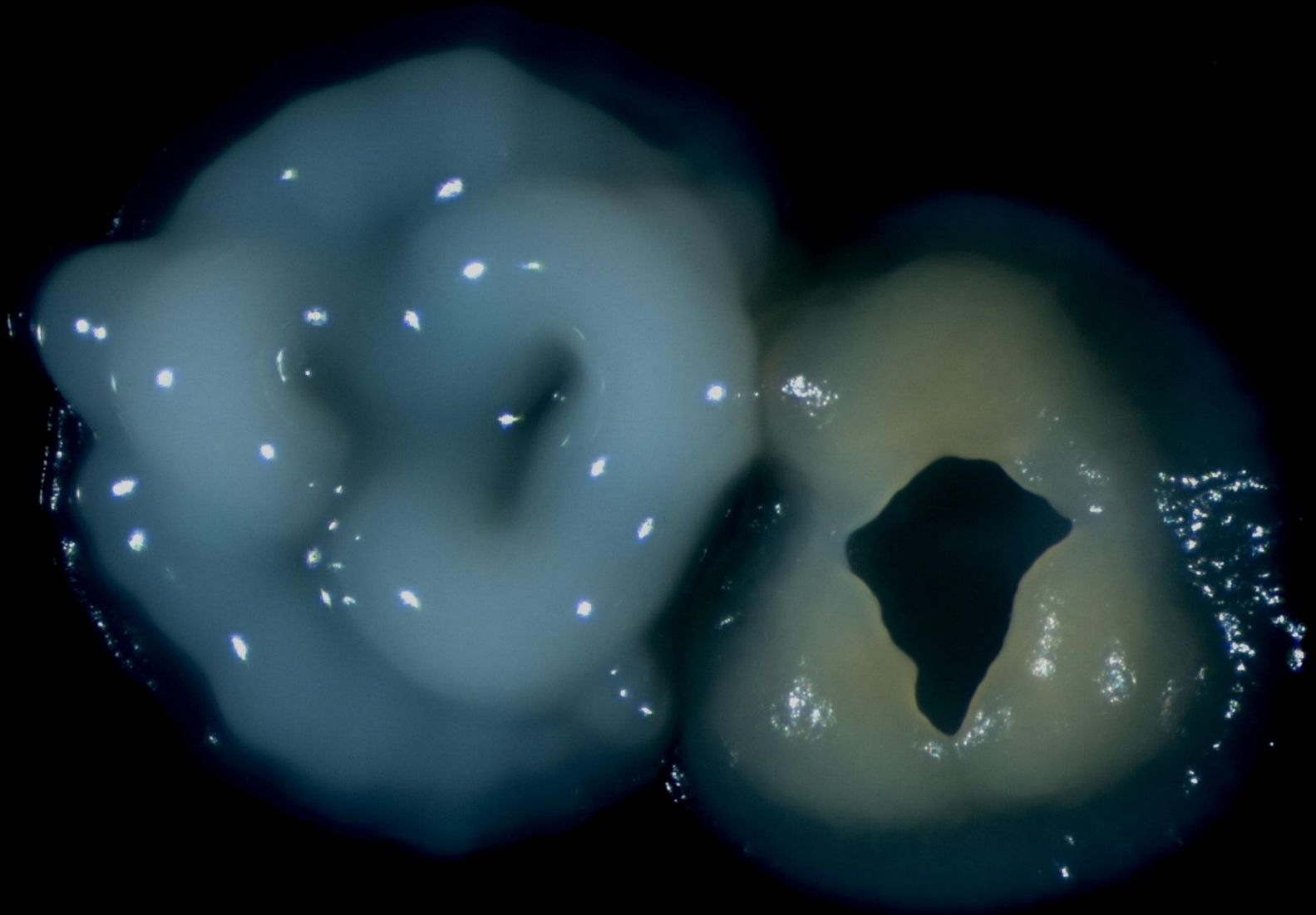
# Бактериально-архейное- вирусное единство



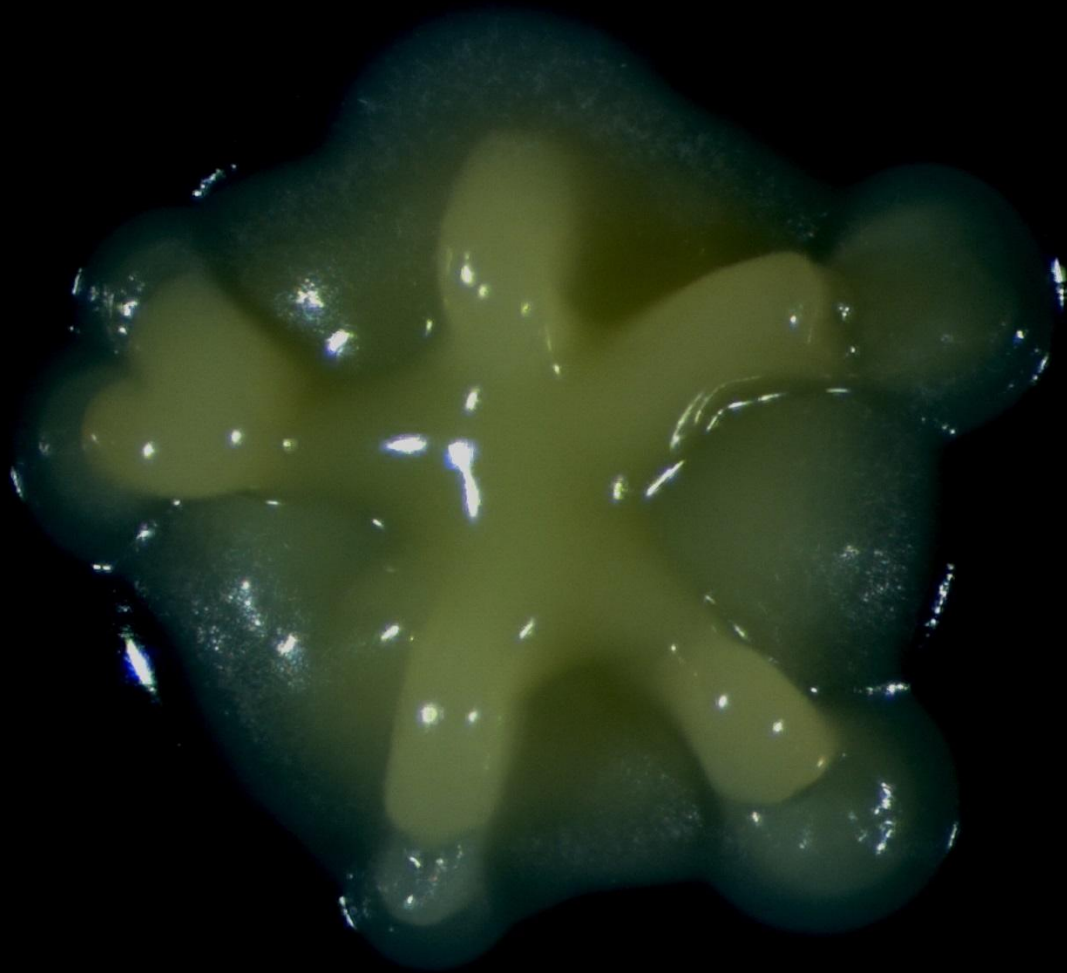


# Программируемый лизис клетки – альтернатива фаговому лизису.

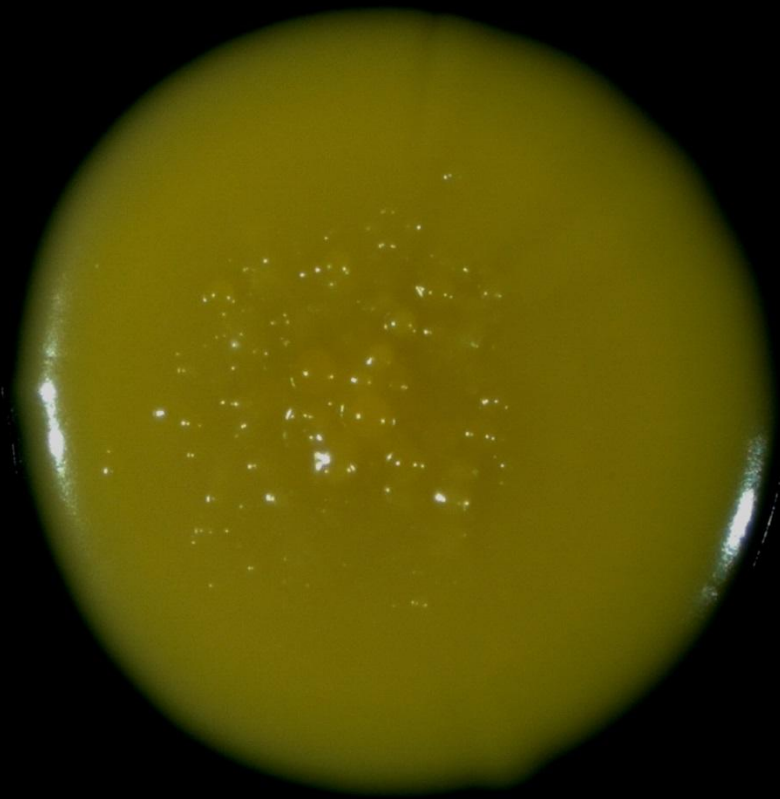
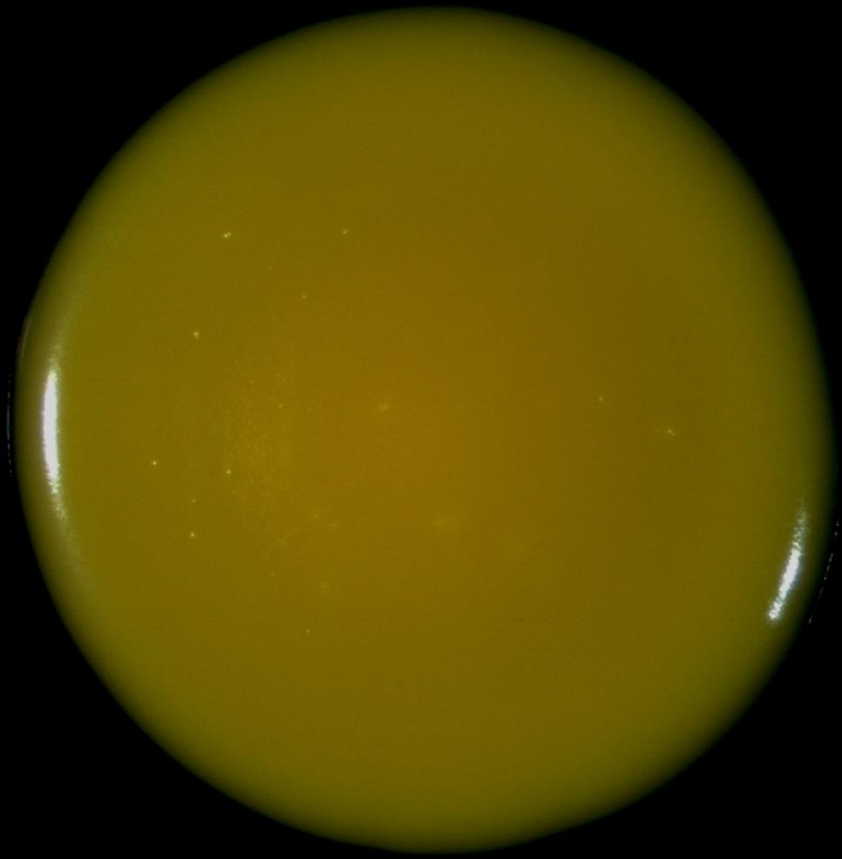




0,5 mm



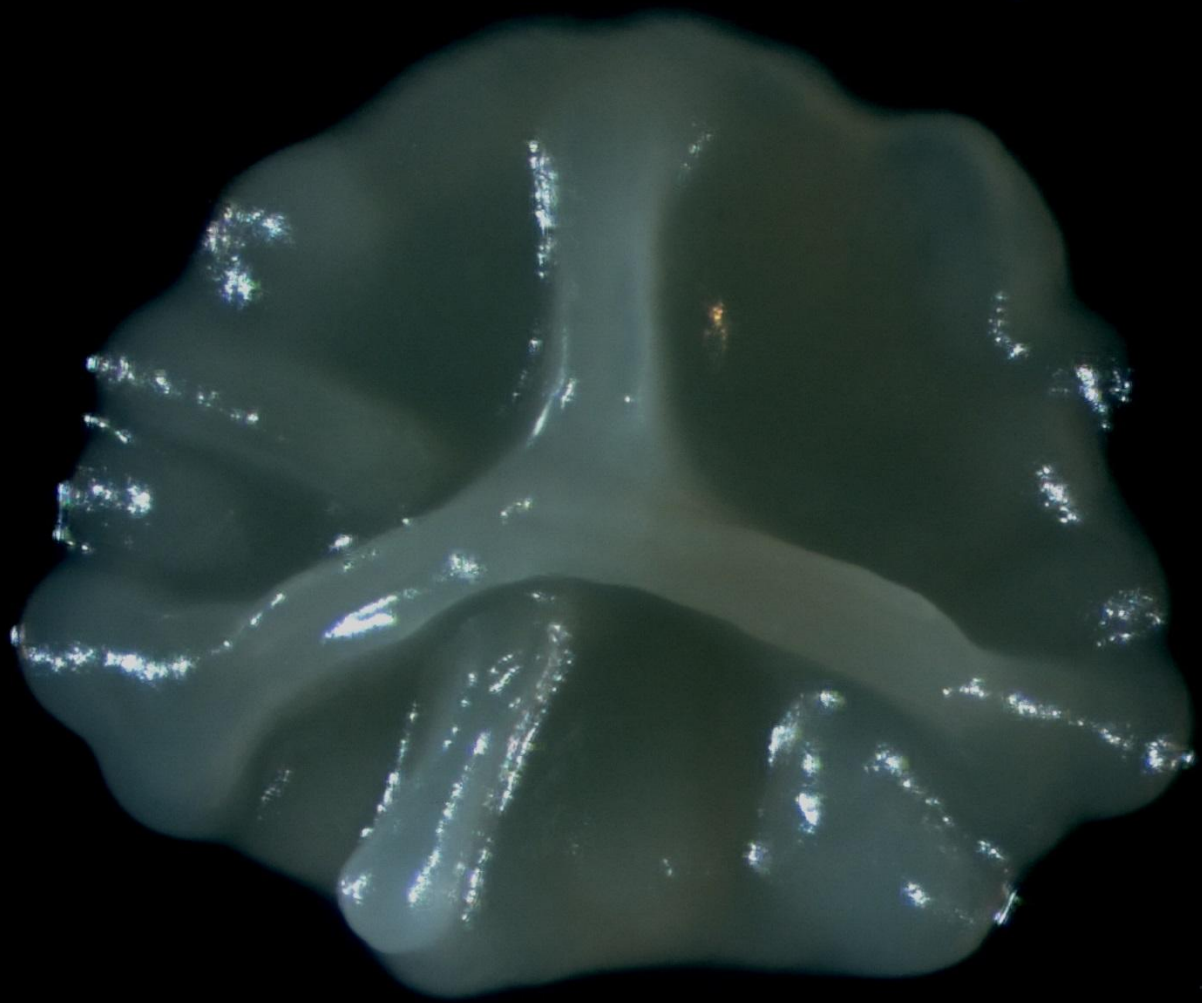
0,5 mm



2 mm



5 mm

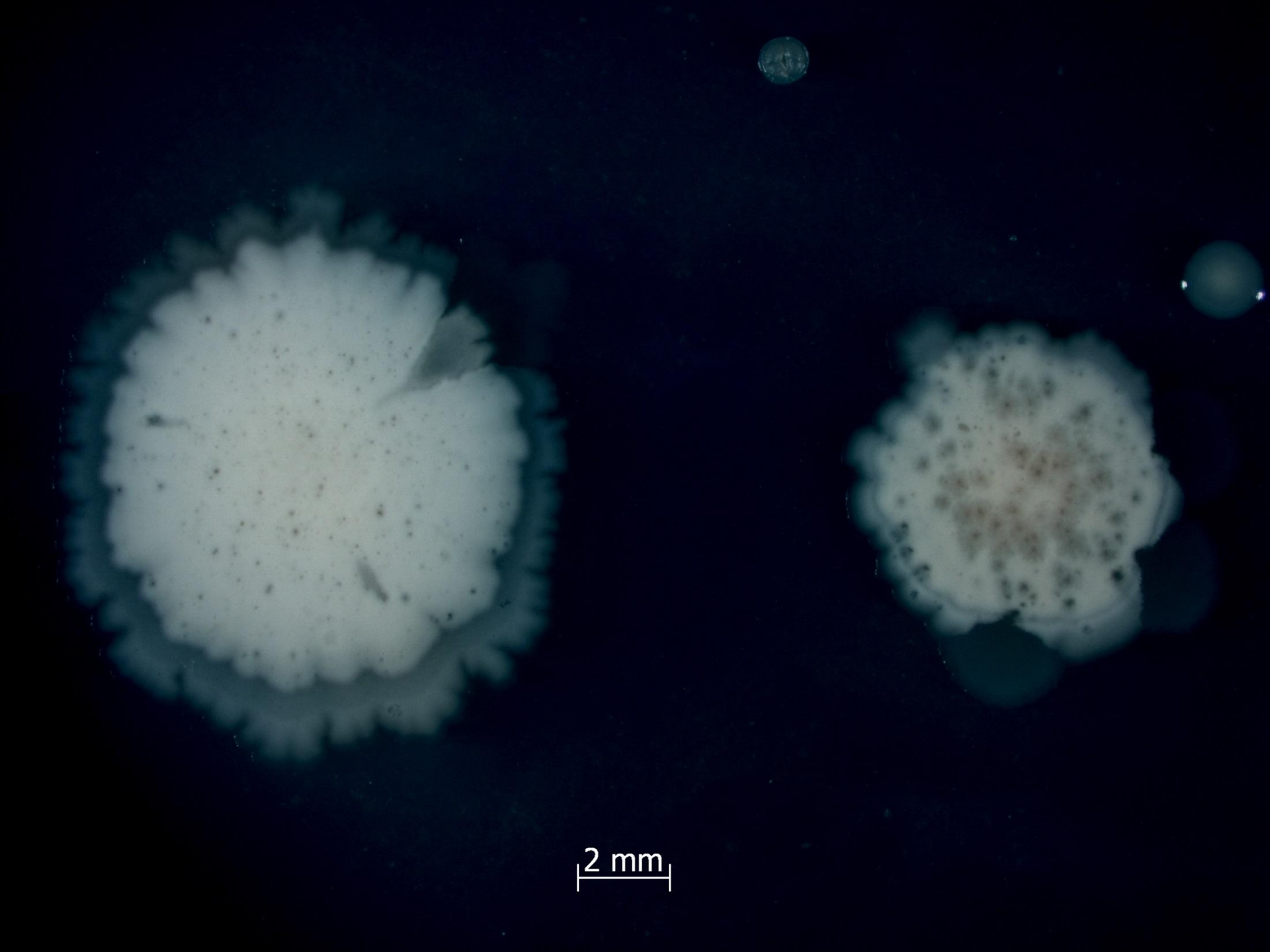


0,5 mm



2 mm

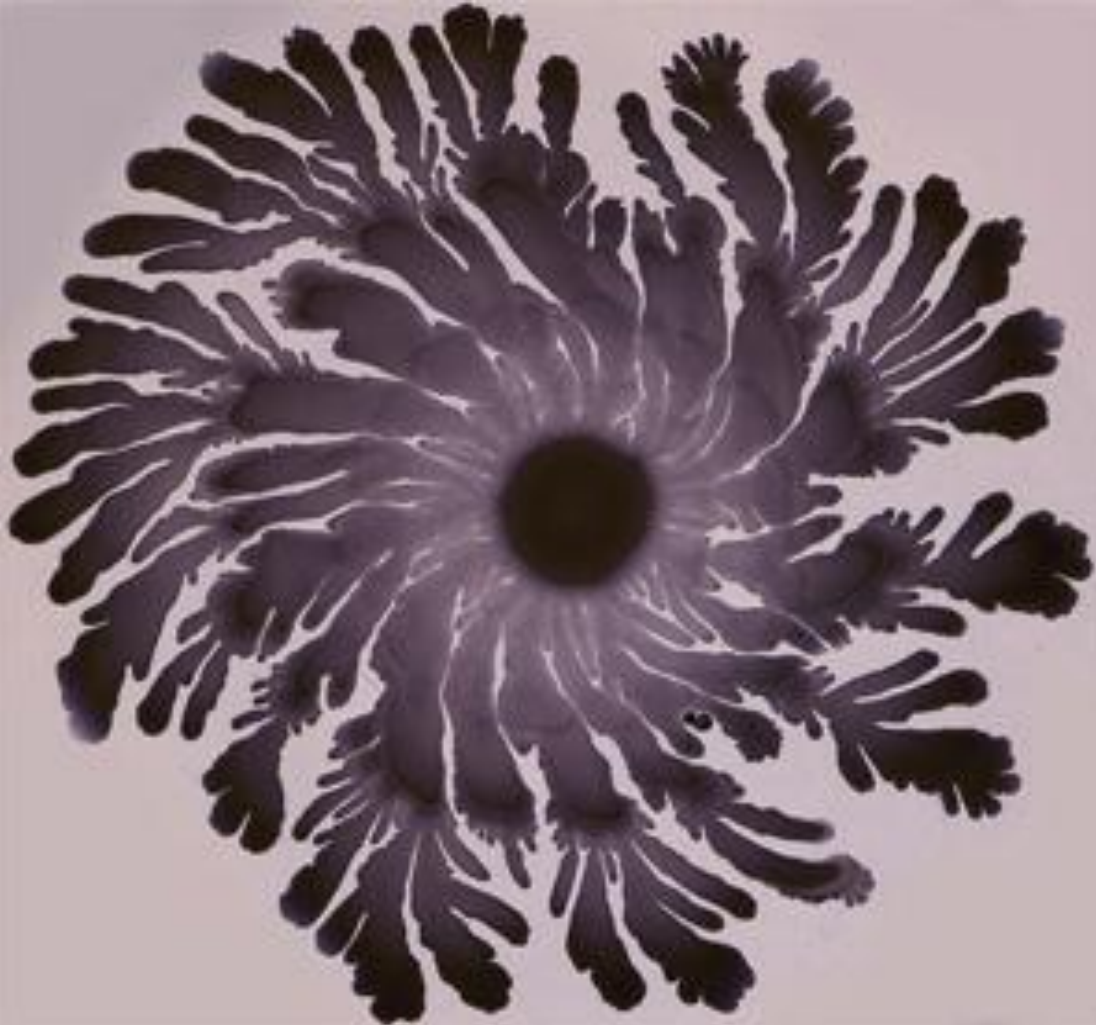




Two circular biological specimens are shown against a dark background. The specimen on the left is a light-colored, circular structure with a scalloped or lobed edge and a granular, porous internal texture. The specimen on the right is a similar circular structure, but with a more irregular, darker, and possibly more densely textured center. A scale bar at the bottom center indicates a length of 2 mm.

2 mm

У *Bacillus subtilis* есть простая генетическая система, приводящая к лизису половины популяции.



# Программируемый лизис бактериальных клеток необходим для рекомбинации



P.S. Ещё один недооцененный возможно  
распространённейший механизм спасения  
прокариот от Храповика Мёллера

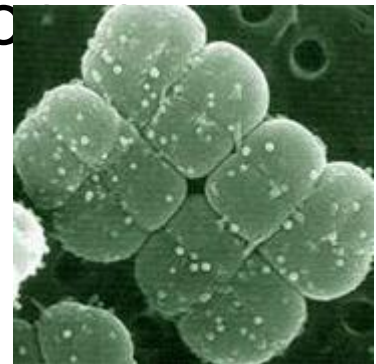
- «Бактерии гаплоидны» - такая чушь постоянно повторяется в школьных учебниках и вопросах ЕГЭ.
- Часто пренебрегаемый факт, тем не менее известный уже с конца 60-х годов прошлого века: бактерии как правило полиплоидны.

# Полиплоидия – возможность частично избавиться от храповика Меллера.

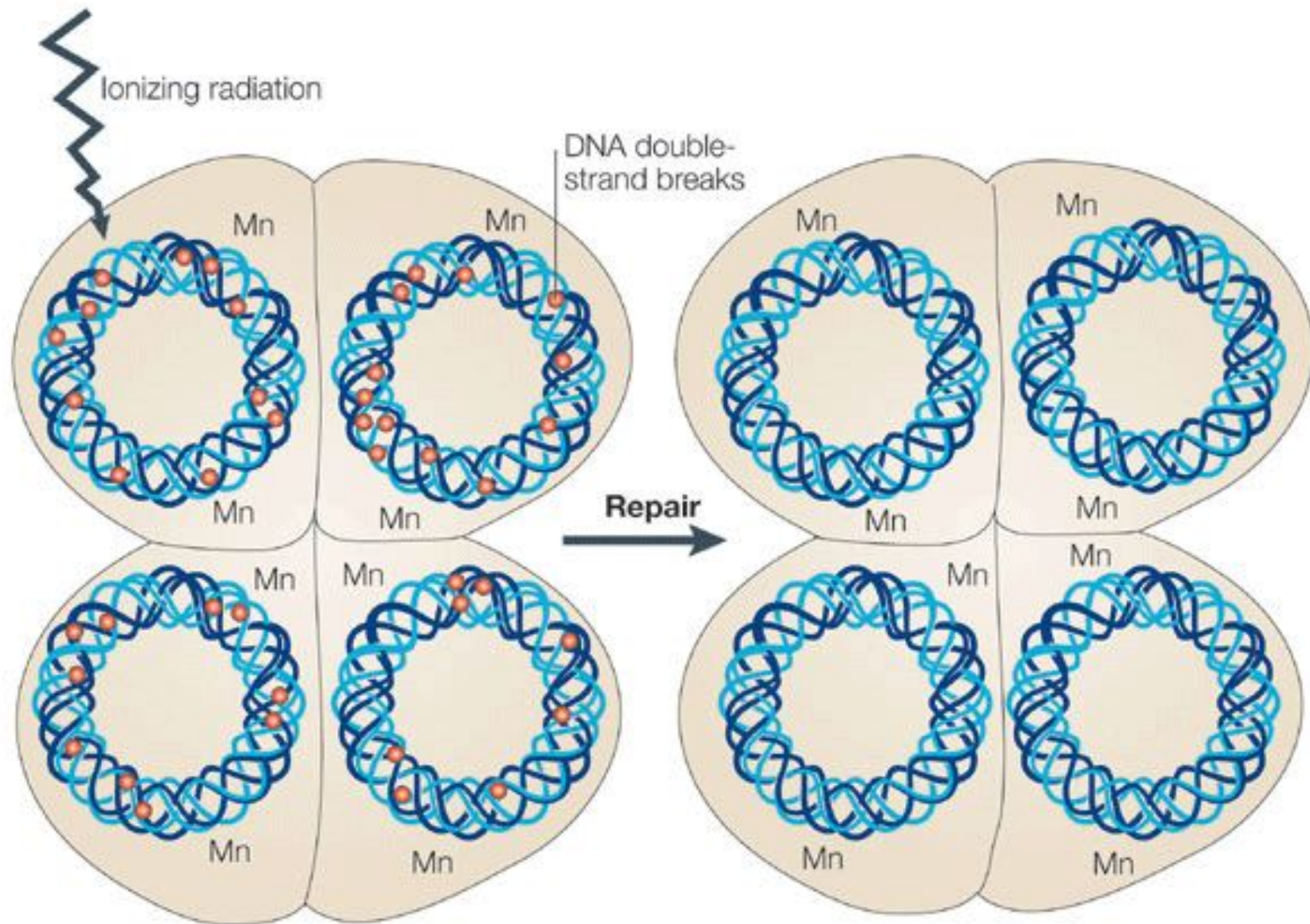
- Нередко сестринские хромосомы в прокариотах рекомбинируют, давая возможность «починить» поломки в хромосомах.
- Благодаря изменению ploидности, клетка проходит через «узкое горлышко», освобождаясь от груза мутаций.

# Почему *Deinococcus radiodurans* способен выдерживать чудовищные дозы радиации?

- Дейнококк является тетраплоидом — в его клетках присутствует сразу четыре копии генома.
- "Запасные" копии нужны этому обитателю ядерных реакторов для оперативной репарации (починки) ДНК. Когда под воздействием радиации в одной из хромосом возникают мутация или разрыв, запасные хромосомы, по-видимому, используются как матрицы, с которых можно скопировать "правильные" последовательности нуклеотидов в испорченную хромосому.



Deborah M. Tobiason, H. Steven Seifert. *The Obligate Human Pathogen, Neisseria gonorrhoeae, Is Polyploid II* PLoS Biology. 2006. V. 4. Issue 6.)







# Литература

- Эволюция между молотом и наковальней, или как микробиология спасла эволюцию от поглощения молекулярной биологией  
<http://biomolecula.ru/content/613>
- **Разрушая бактериальные клетки, вирусы активно участвуют в круговороте веществ в глубинах океана** <http://elementy.ru/news/430811>