

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение
высшего образования «Оренбургский государственный университет»
Химико-биологический факультет
Кафедра биохимии и микробиологии

Пути обмена генетической информацией у микроорганизмов

Лекция №7

Лектор:

Давыдова Ольга Константиновна, к.б.н., доцент

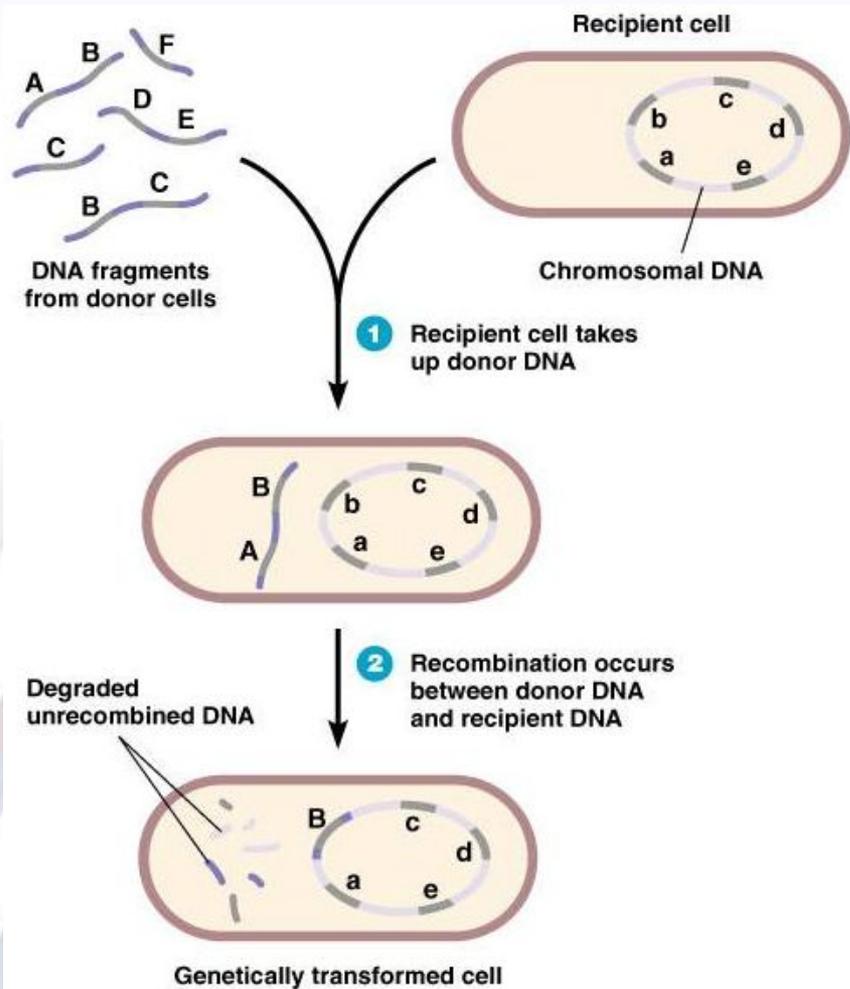
План лекции:

- **Трансформация.** Особенности переноса генетического материала при трансформации: компетентность, проникновение ДНК донора в клетку реципиента, эффективность и механизм включения ДНК донора в геном реципиента.
- Трансформация у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Генетическое картирование при трансформации. Трансфекция.
- **Конъюгация.** Открытие конъюгации у *E. coli* и особенности этого процесса.
- Половая дифференцировка у кишечной палочки (свойства F-, F+ и Hfr - штаммов). Половой фактор, его функции, интеграция в хромосому и исключение. Стадии процесса конъюгации. Перенос хромосомы при конъюгации. Картирование хромосом.
- **Трансдукция.** Общая трансдукция и специфическая: особенности и механизмы.
- Возможности генетического картирования при неспецифической трансдукции.
- Abortивная трансдукция.

Пути обмена генетической информацией у микроорганизмов

- У прокариот существует три способа включения в геном чужеродной ДНК:
 - **трансформация** (путем прямого переноса ДНК через мембрану),
 - **конъюгация** (одна из клеток передает генетическую информацию другой клетке, при этом увеличения числа особей не происходит) и
 - **трансдукция** (с помощью вирусов)

Трансформация



© http://www.bio.miami.edu/dana/250/25008_7.html

Передачу генов из клетки в клетку без всякого межклеточного контакта и без каких-либо переносчиков при помощи свободной растворимой ДНК, выделенной из клеток-доноров, называют **трансформацией**.

В 1928 г. Гриффит описал превращение бескапсульного R-штамма *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*) в штамм, образующий капсулу, т.е. в S-форму

В 1944 г. Эйвери с коллегами продолжили этот эксперимент показав, что трансформирующим фактором является ДНК

В 1960-х гг. началось изучение трансформации у животных

В конце 1970-х гг. – у растений

Трансформация

- Для трансформации **не требуется непосредственного контакта** между двумя клетками.
- Способность ДНК проникать в клетку-реципиент зависит как от **природы самой ДНК**, так и от **физиологического состояния клетки-реципиента**.
- Трансформирующей ДНК могут быть только **высокомолекулярные двухцепочечные фрагменты**, при этом проникать в бактериальную клетку может ДНК, выделенная из разных биологических источников, но **включаться в геном** — только **ДНК с определенной степенью гомологичности**.
- После того как экзогенный фрагмент ДНК, проникший в клетку, нашел гомологичный фрагмент ДНК клетки-реципиента, между ними происходит генетический обмен

Бактериальная трансформация

```
graph TD; A[Бактериальная трансформация] --> B[Естественная (конститутивная)]; A --> C[Индукцибельная];
```

**Естественная
(конститутивная)**
(у представителей
родов
Bacillus, Rhizobium,
Streptococcus)

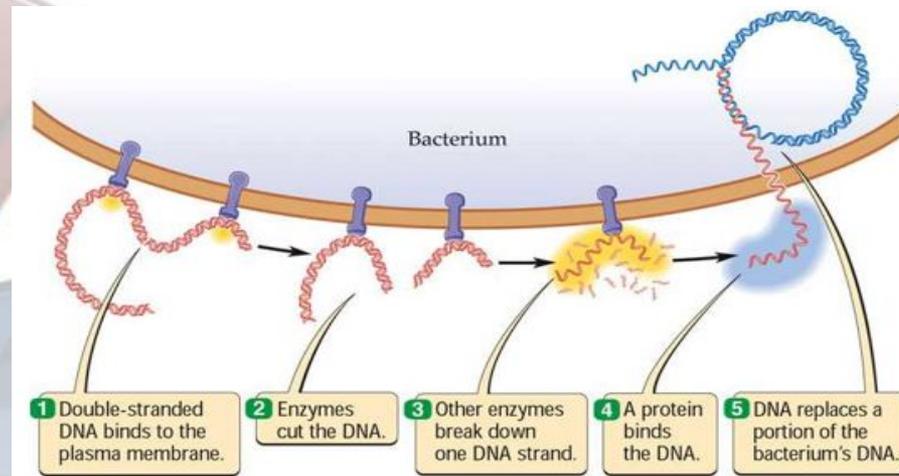
Индукцибельная
(бактериальная клетка
приобретает компетентность
к трансформации)

Особенности переноса ДНК при трансформации

- Способность клетки к трансформации возможна при особом ее состоянии, которое называется **компетентностью**.
- Компетентность зависит от **физиологического состояния клетки**: она наиболее высока в середине фазы экспоненциального роста, а затем быстро снижается до минимума
- Компетентными бактерии могут становиться в результате **обработки их химическими и физическими агентами**, которые способствуют поглощению трансформирующей ДНК.
- У компетентных клеток **изменяется состав клеточной стенки и плазмалеммы**: стенка становится **пористой**, плазмалемма образует многочисленные **впячивания**, а на внешней поверхности появляются особые антигены – **факторы компетентности** (в частности, специфические белки с низкой молекулярной массой).
- **Природная компетентность**- это генетически и физиологически детерминированное, специфическое свойство штамма. В природных условиях внеклеточная чистая ДНК образуется при гибели (лизисе) прокариот.
- Как правило, трансформация происходит в пределах одного вида прокариот, но при наличии гомологичных генов наблюдается и **межвидовая трансформация** (между *Haemophilus parainfluenzae* и *Haemophilus influenzae*).

Модель процесса трансформации

- Экзогенная **дцДНК** связывается со **специальными белковыми комплексами** на поверхности клетки.
- В узнавании ДНК, а также в ее поглощении и защите от нуклеаз участвуют везикулярные мембранные выросты, называемые **трансформосомами**.
- После фрагментации ДНК в сайтах связывания, **одна цепь ДНК поглощается**, тогда как комплементарная цепь на поверхности клетки расщепляется нуклеазой.
- Импортированная **оцДНК** включается в **бактериальную хромосому** путем гомологичной рекомбинации.



Стадии трансформации

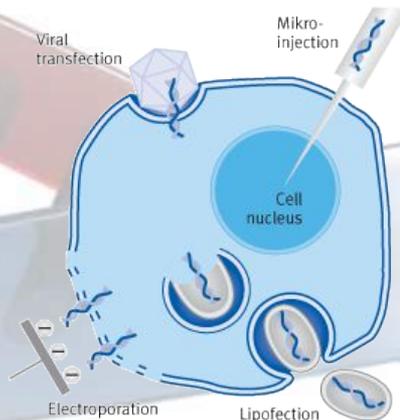
- Длина трансформирующей ДНК должна быть от 10 до 20 тысяч н.п. Энергия, выделяющаяся при деградации одной из нитей ДНК, используется для активного транспорта оставшейся нити вовнутрь клетки.
- Первые три стадии трансформации не зависят от нуклеотидного состава ДНК. Однако процесс интеграции трансформирующей ДНК в хромосому реципиента более вероятен при высокой гомологичности этой ДНК по отношению к ДНК реципиента.
- После окончания репликации ДНК **клетка–реципиент делится с образованием двух клеток**: частично трансформированной клетки с хромосомой, включающей гетеродуплексный участок ДНК, и нетрансформированной клетки.
- Таким образом, при трансформации происходит **не добавление новых генов, а замещение генов** реципиента на гомологичные нуклеотидные последовательности.
- **Частота трансформации у прокариот зависит**
 - от свойств трансформирующей ДНК,
 - от ее концентрации,
 - от состояния клетки–реципиента,
 - от вида бактерий.Максимальная частота трансформированных клеток не превышает 1 на 100 клеток.

Спонтанная трансформация

- Процесс трансформации может **произвольно** происходить в природе у некоторых видов бактерий, чаще **грамположительных**, когда ДНК, выделенная из погибших клеток, захватывается реципиентными клетками.
- Как правило, любая чужеродная ДНК, попадающая в бактериальную клетку, расщепляется рестрикционными эндонуклеазами; но при некоторых условиях такая ДНК может быть интегрирована в геном бактерии.
- По происхождению **ДНК может быть плазмидной либо хромосомной** и нести гены, трансформирующие реципиента. Подобным путем процессы трансформации могут распространять гены, кодирующие факторы вирулентности, среди бактериальных популяций; однако в обмене генетической информацией трансформация играет незначительную роль.

Трансфекция

- Трансформация известна и для эукариот. Однако на поверхности эукариотических клеток отсутствуют рецепторные сайты, и трансформирующую ДНК вводят в клетки искусственно. Например, в яйцеклетки животных ДНК вводят путем прямой **микроинъекции**, а в яйцеклетки растений – путем микроинъекции в пыльцевую трубку.
- **Трансфекция** - это встраивание чужеродной ДНК в культивируемые эукариотические клетки в результате обработки их изолированной ДНК.
- Эффективного поглощения ДНК удалось достичь при добавлении к ней ионов Са. Клетки поглощают частицы кальциевого преципитата ДНК по механизму фагоцитоза, а затем небольшая часть проникших в клетку молекул встраивается в хромосомную ДНК.



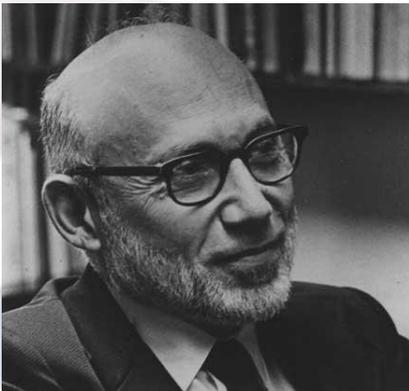
- В середине двадцатого века был описан половой процесс у бактерий (Дж. Ледерберг и Э.Татум, 1946). При **конъюгации**, для которой необходим непосредственный контакт между бактериальными клетками, осуществляется направленный перенос генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент.
- Как правило, в клетку-реципиент переносится только часть генетического материала клетки-донора. Участки перенесенной от донора ДНК находят гомологичные участки в молекуле ДНК реципиента, между которыми происходит генетический обмен. В результате часть донорной ДНК встраивается (интегрируется) в геном реципиента, а соответствующая часть реципиентной ДНК из него исключается.

Конъюгация



Эдуард Татум

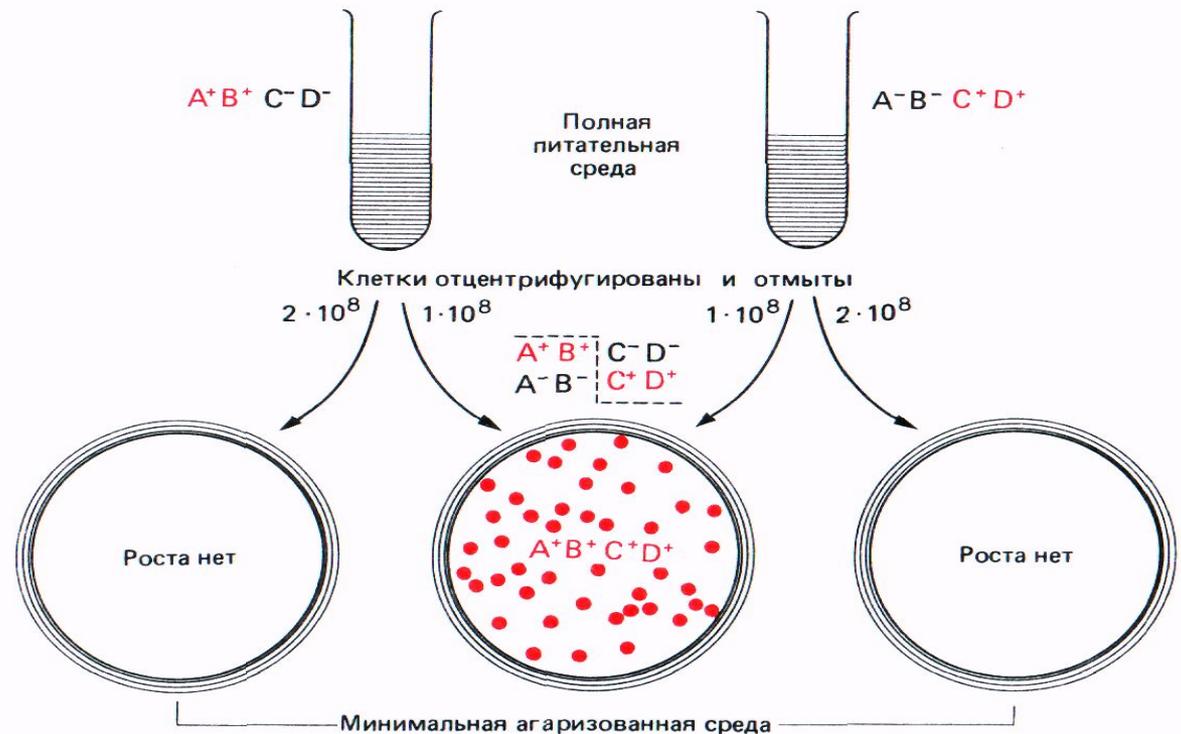
© <http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1207758>



Джошуа Ледерберг

© http://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/biologiya/LEDERBERG_DZHOSHUA.html

Дж. Ледерберг и Э. Татум провели опыт с двумя мутантами *E. coli* K12, каждый из которых был ауксотрофным по двум различным аминокислотам. Один двойной мутант нуждался в аминокислотах А и В, но был способен синтезировать С и D (A⁻ B⁻ C⁺ D⁺); другой мутант был ему комплементарен (A⁺ B⁺ C⁻ D⁻).



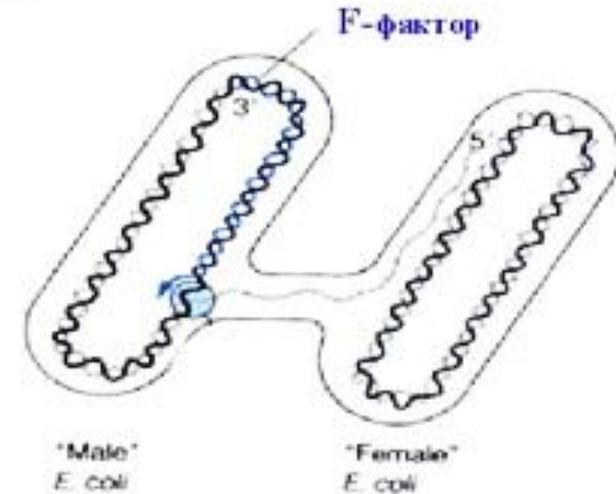
© <http://www.ngpedia.ru/id250807p1.html/>

Доказательство возможности передачи ДНК при прямом контакте

- Эти мутанты не росли на минимальной питательной среде и не образовывали колоний. Однако если на ту же минимальную среду высевали смесь суспензий обоих мутантов, то колонии появлялись. Клетки этих колоний обладали наследственной способностью синтезировать все аминокислоты, т.е. принадлежали к типу А⁺ В⁺ С⁺ D⁺ (были прототрофными).
- Такие клетки возникали с частотой 1: 10⁶; это были генетические рекомбинанты – они объединяли в себе генетическую информацию двух реципрокно дефектных (взаимодополняющих) родительских клеток.
- Использование в качестве исходных штаммов множественных мутантов исключало возможность появления ревертантов, так как вероятность одновременной реверсии по двум генам составляет величину порядка 10⁻¹⁴ – 10⁻¹⁶ на генерацию. Необходимой предпосылкой рекомбинации служил прямой контакт родительских клеток.

Особенности конъюгации

- Во время конъюгации образуется цитоплазматический мостик, по которому происходит перенос молекулы ДНК из одной клетки в другую.
- У кишечной палочки имеется молекула ДНК, которая называется **F-фактор** (fertility factor - фактор плодовитости). Молекула F-фактора способна встроиться в геномную ДНК.
- В F-факторе кодируется специальный белок, который образует половые ворсинки, они называются F-пили.
- Эти самые ворсинки прикрепляются к другой клетке, которые F-фактор не содержат, и F-фактор инициирует репликацию.
- В процессе репликации образуется две копии молекулы ДНК, причем одна копия остается в исходной клетке, а вторая копия переносится в другую клетку. То есть, генетическая информация из одной клетки попадает в другую.



Схематическое изображение конъюгации у *E. coli*

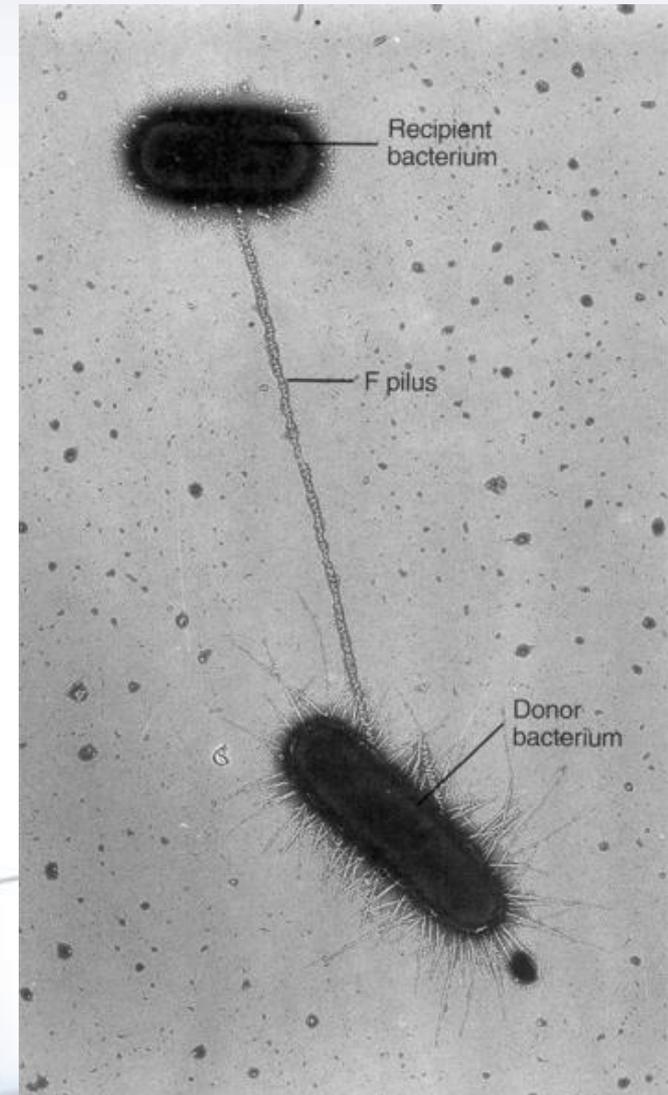
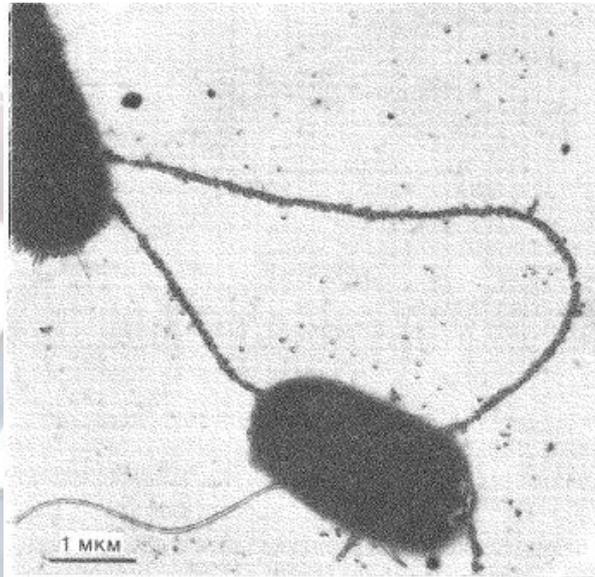
© <http://biologylib.ru/books/item/f00/s00/z0000009/st012.shtml>

Стадии конъюгации

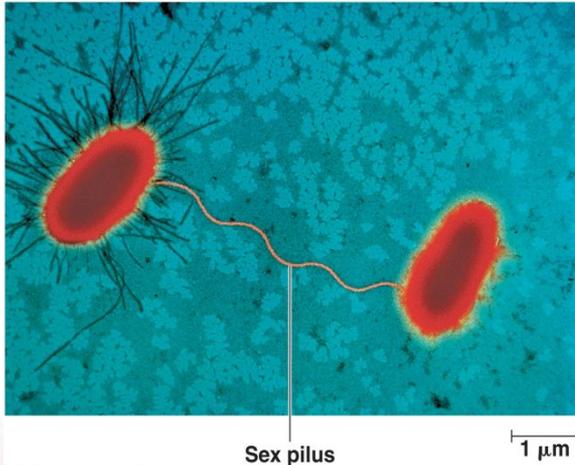
- Передача генетического материала при конъюгации начинается с расщепления ДНК в районе локализации F -фактора.
- Одна нить донорской ДНК передается через конъюгационный мостик в клетку-реципиент. Процесс сопровождается достраиванием комплементарной нити до образования двунитевой структуры.
- Переданная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

F+ и F- -клетки

- У кишечной палочки клетка-донор («мужская») имеет продолговатую форму, клетка-реципиент («женская») – изодиаметрическую.
- Клетка-донор образует половые ворсинки (пили), которые притягивают ее к клетке-реципиенту и образуют цитоплазматические каналы. По этим каналам ДНК из клетки-донора переходит в клетку-реципиент.



F-фактор



© <http://vunivere.ru/work29458>

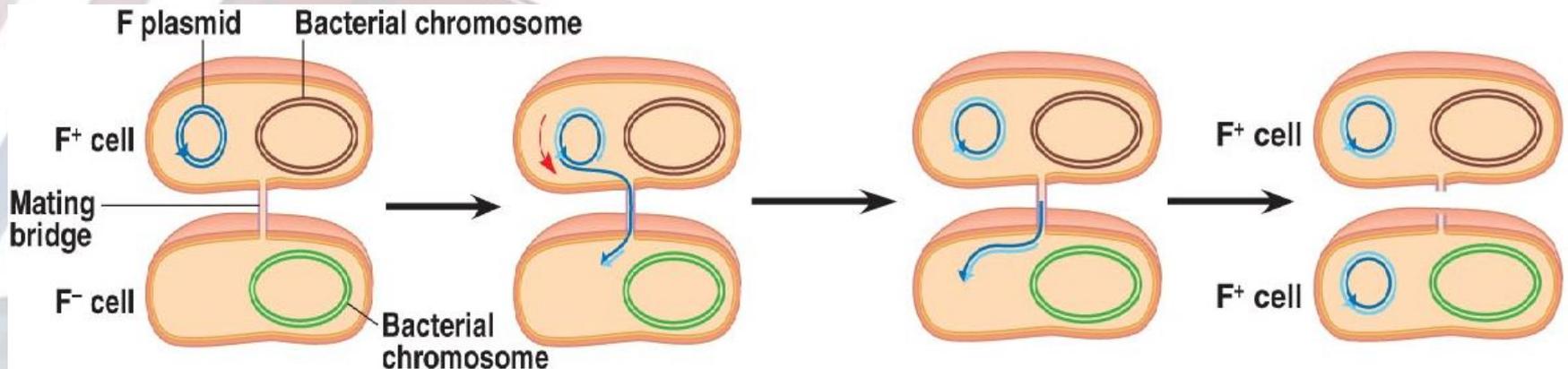
Половой фактор F (от fertility - плодовитость) – фактор, передающийся при конъюгации из одной клетки в другую и определяющий способность клетки быть донором.

Клетки, не содержащие фактора F (клетки F^-) - реципиенты.

Клетки, содержащие фактора F (клетки F^+) - доноры.

Фактор F - кольцевая двухцепочечная молекула ДНК с массой $45 \cdot 10^6$ Да.

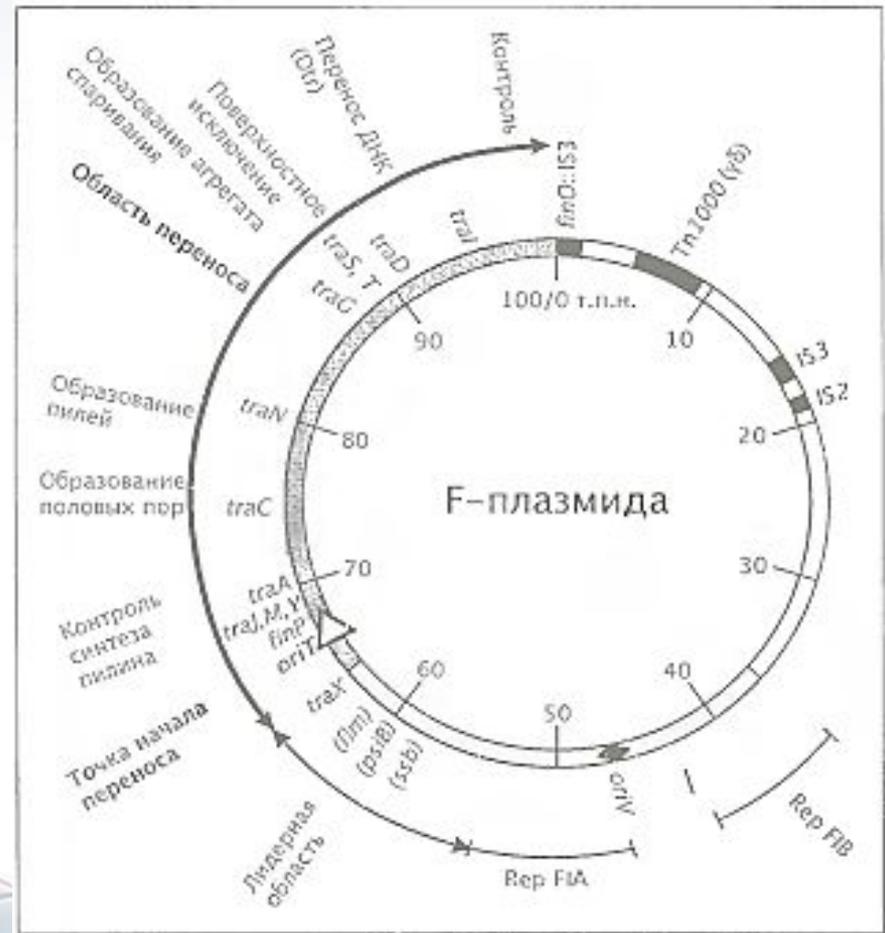
В популяции F^+ лишь те клетки способны быть донорами хромосомной ДНК, в которых фактор F интегрировался в бактериальную хромосому.



© <https://prezi.com/wty3nxsr0syd/bacteria-replication/>

F-фактор

- Фактор F представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК с массой $45 \cdot 10^6$ Да. В качестве внехромосомного автономно реплицируемого элемента ДНК ее следует отнести к плазмидам.
- Эта молекула содержит гены, ответственные за процесс конъюгации, в том числе гены, детерминирующие особые структуры клеточной поверхности, например половые волоски, или F-пили, необходимые для конъюгации.

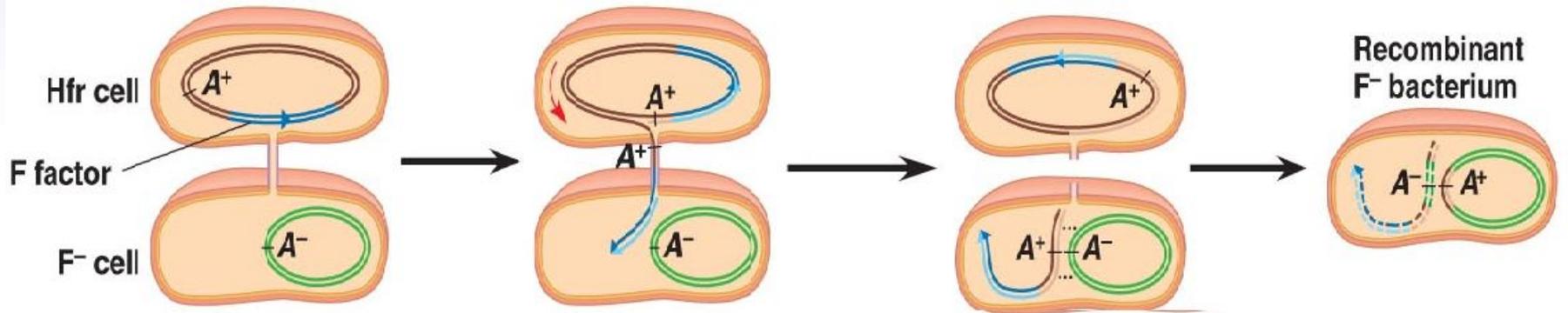


© <http://biotech.gsu.edu/houghton'04/4564'15/lecture3.html>

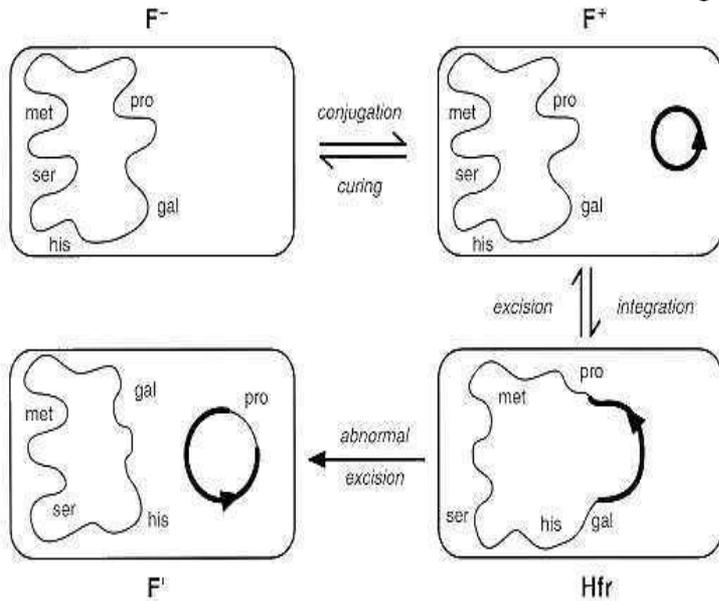
F+ и F- -клетки

- F+ -доноры содержат в цитоплазме половой фактор – специфическую F-плазмиду.
- F-плазида – это автономный репликон длиной около 100 т.н.п. В составе F-плазмиды изучено более 20 генов. Примерно половина из них образует гигантский оперон *tra* (длиной около 30 т.н.п.); продукты этого оперона контролируют образование контакта между донором и реципиентом и собственно перенос ДНК. Остальные гены регулируют работу *tra*-оперона.
- Клетка-реципиент не содержит F-плазмиды и обозначается как F- – клетка.

Hfr-клетки



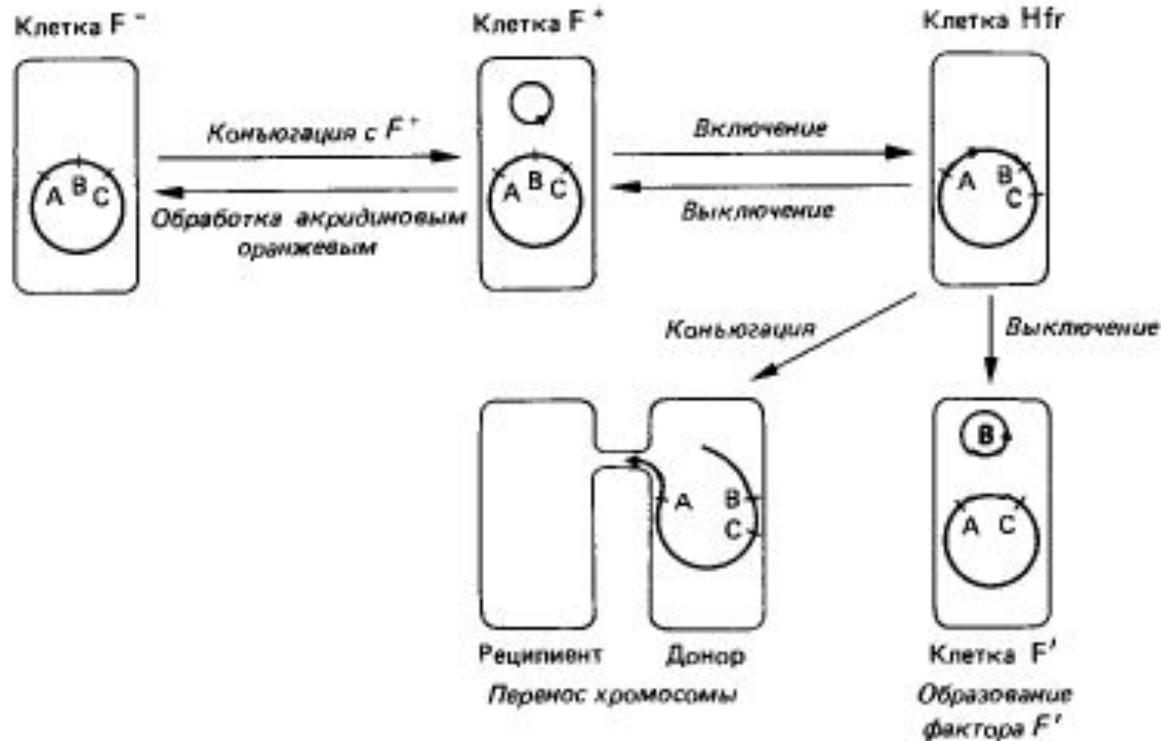
© <http://www.quia.com/jg/2536816list.html>



Клетки-доноры, обеспечивающие высокую частоту рекомбинаций, получили название клеток **Hfr** (от англ. high frequency of recombinants). Фактор *F* включается в бактериальную хромосому лишь в определенных участках, число которых ограничено.

Особенности конъюгации

© <https://www.studyblue.com/notes/n/genetics-test-2-goldstein/deck/7962964>



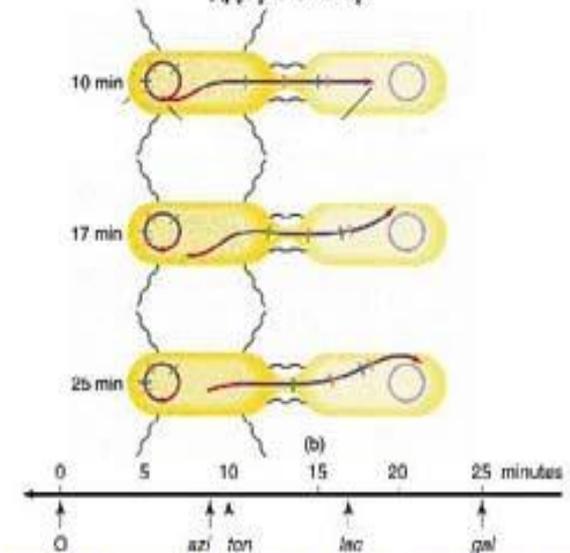
Взаимоотношения между половыми типами *Escherichia coli*:

Клетка F⁻ может служить только реципиентом. При конъюгации с клеткой штамма F⁺ или Hfr она может получить фактор F и в результате стать клеткой F⁺. В клетке F⁺ фактор F представляет собой кольцевую молекулу ДНК. При включении фактора F в бактериальную хромосому клетка переходит в состояние Hfr. Фактор может включиться в разные участки хромосомы и в различной ориентации; от этого зависит, с какого места начнется и в каком направлении будет происходить перенос хромосомы. В случае неправильного выключения фактора F из хромосомы он может превратиться в фактор F', содержащий кусочек хромосомной ДНК.

Построение генетических карт

- Процесс репликации у кишечной палочки продолжается 20 минут, а процесс конъюгации длится 3-5 минут. За это время успевает перейти не вся хромосома, а только ее кусочек. Чем дольше длится конъюгация, тем больший кусочек успевает перейти из одной клетки в другую. Этот процесс позволяет определить какие маркеры поступили в клетку, если исходно клетки различались по нескольким генам.
- Проводили эксперимент, в котором после конъюгации клетки встряхивали, и мостики между ними разрывались. Это встряхивание проводили через 2, 3, 5 минут, и смотрели, какие маркеры (и, соответственно, какой фрагмент хромосомы) за это время войдут. По этим данным строили генетическую карту. На этой карте были гены-маркеры, расположенные по всей кольцевой хромосоме, а координаты генов на карте обозначались в минутах. Итоговая карта, построенная в 60-х годах, имела координаты в промежутке от 0 до 100 минут.
- Поэтому микробиологи шутят, что кишечная палочка – это удивительный организм, у которой жизнь длится 20 минут, а половой процесс – 100 минут.

Чем дольше клетки конъюгируют, тем большая часть хромосомы (и большее число генетических маркеров) успевает перейти в другую клетку.

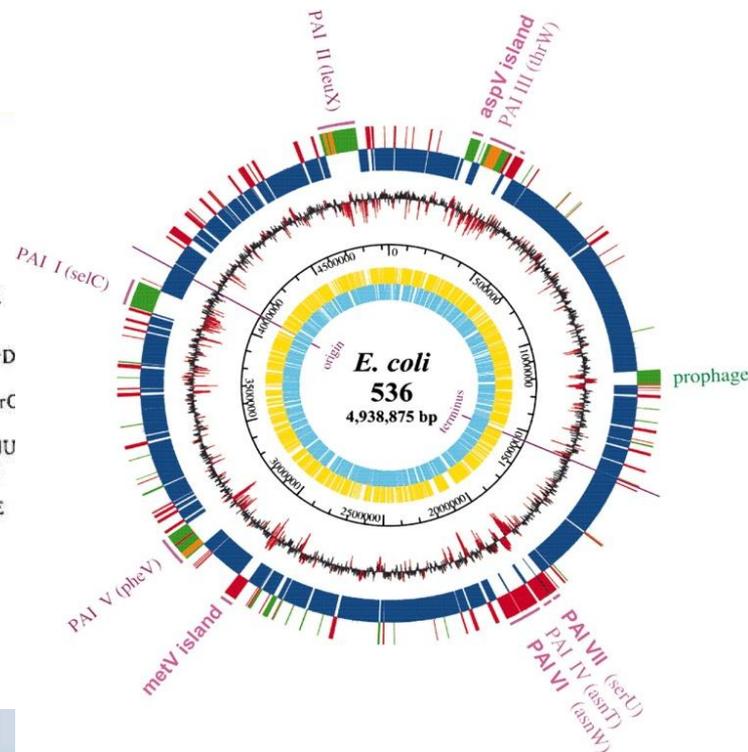
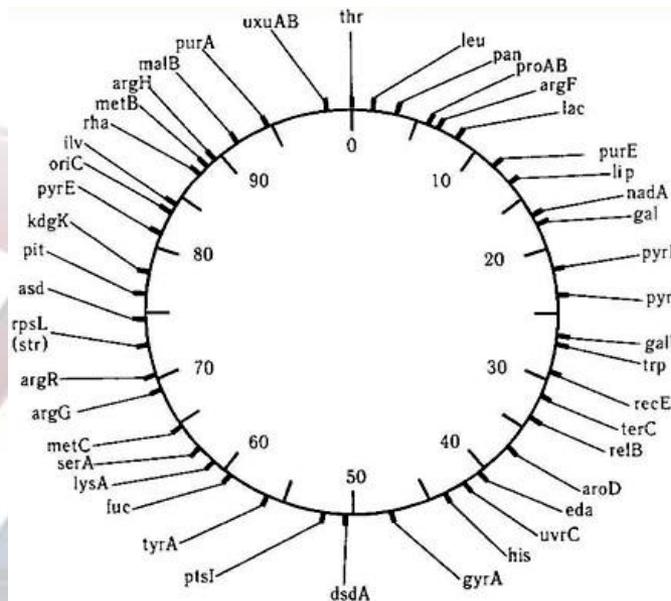


Генетическая карта участка генома *E. coli*, построенная на основе конъюгативного переноса маркеров

<http://bio.fizteh.ru/student/files/biology/biolections/lection08.html>

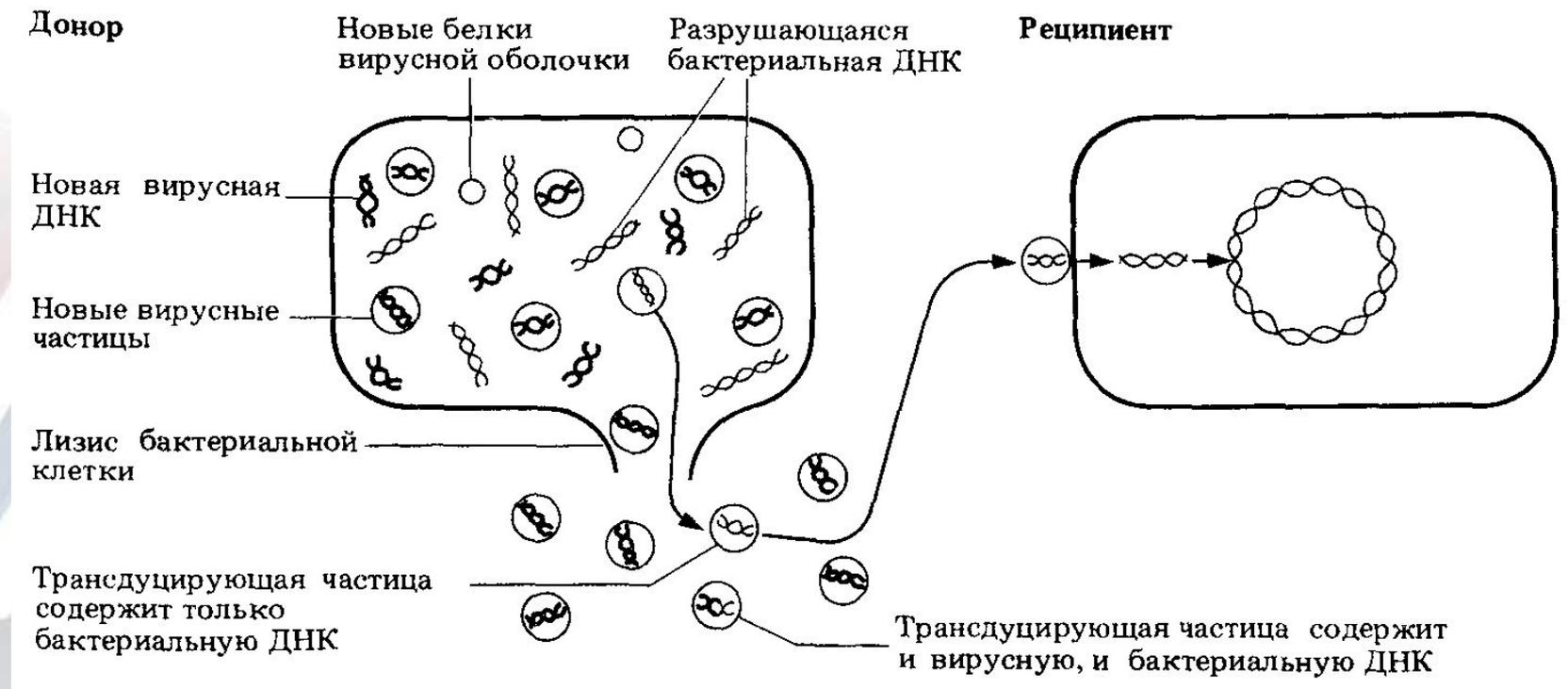
Генетическая карта хромосомы E.coli

- В результате применения метода прерванной конъюгации, позволяющего выяснить временную последовательность переноса генов из клетки-донора, можно составить карту расположения генов в бактериальной хромосоме.
- Скорость их переноса в течение всего процесса остается постоянной. Моменты перехода внутрь клетки-реципиента позволяют судить о расстояниях между ними в хромосоме.



Трансдукция

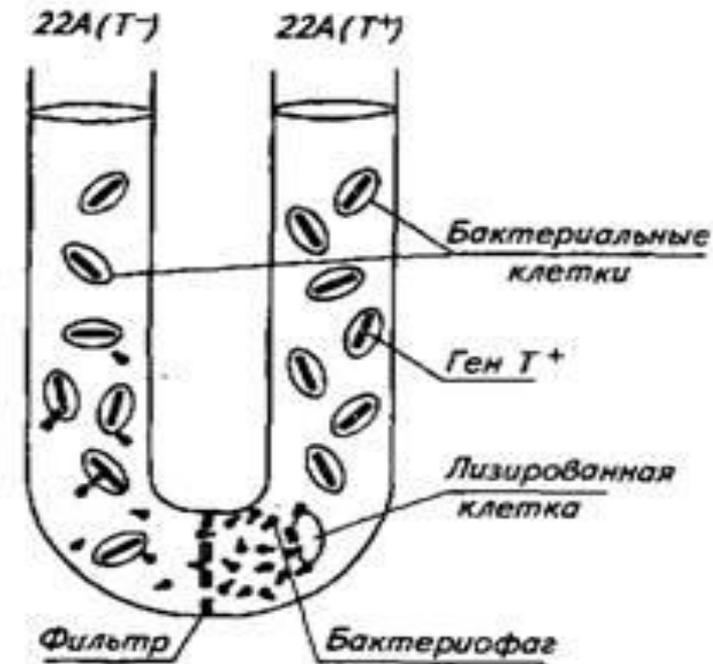
Трансдукция оказывается возможной, если в процессе размножения фага одна из частиц случайно захватит фрагмент бактериальной хромосомы, как правило, содержащий очень небольшое число генов. Когда такая фаговая частица заражает бактерию-реципиент, бактериальная ДНК проникает в клетку таким же путем, как фаговая. Между трансдуцированной бактериальной ДНК и гомологичным участком бактериальной хромосомы может произойти обмен, и как следствие его возникают рекомбинанты, несущие небольшую часть генетического материала клетки-донора.



Открытие трансдукции

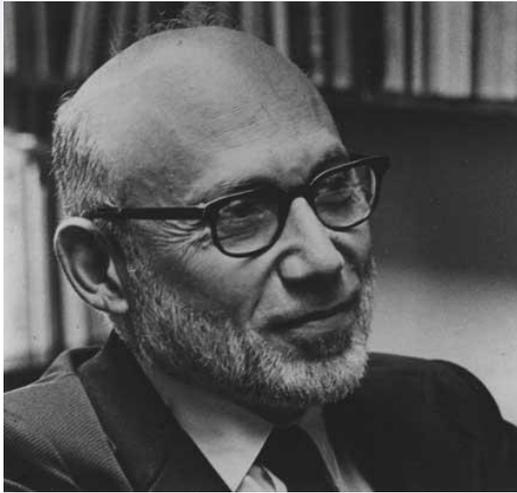
Явление трансдукции открыли в 1952 г. Н. Зиндер и Дж. Ледерберг.

При трансдукции в вирионы попадает ДНК клетки-хозяина. Вирионы заражают другие клетки, и ДНК исходной бактериальной клетки проникает в другую бактериальную клетку.



©http://www.labogen.ru/20_student/020_mol_base_hered/imag_mol_base/img_05_salmonella.png

Трансдукция



Джошуа Ледерберг

©http://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/biologiya/LEDERBERG_DZHOSHUA.html



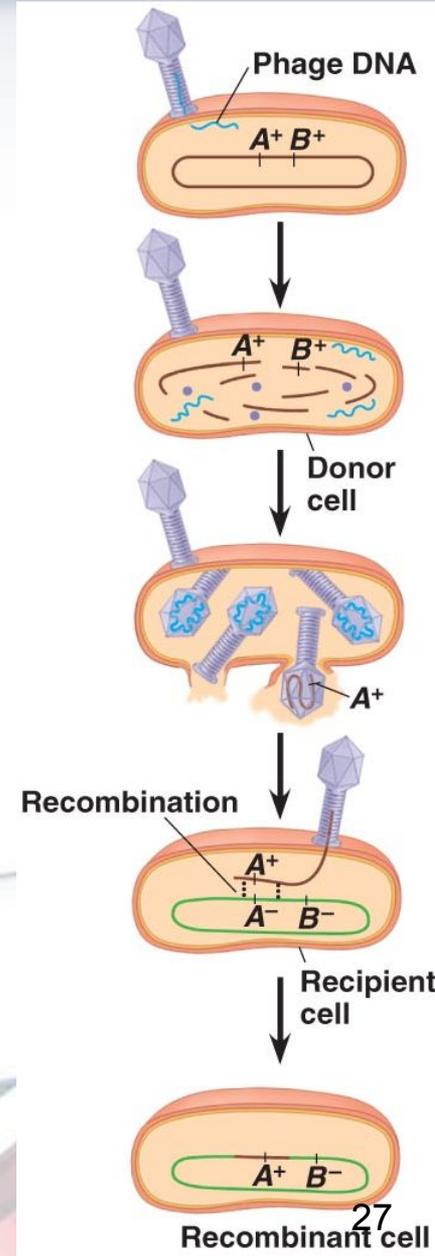
Нортон Зиндер

©<http://newswire.rockefeller.edu/2012/02/06/norton-zinder-pioneering-molecular-geneticist->

В эксперименте штамм-донор В⁺ инфицировали умеренным бактериофагом Р22. После лизиса клетки-хозяина выделяли свободные фаги и инкубировали их вместе со штаммом-реципиентом В⁻, который генетически отличался от штамма В⁺ по меньшей мере одним признаком. После посева инкубированных клеток на подходящую среду появлялись рекомбинанты, обладавшие признаками штамма-донора В⁺.

Вероятность рекомбинации, затрагивающей какой-то определенный признак, составляет от 10^{-6} до 10^{-8} .

Количество бактериальной ДНК, сравнимое с геномом фага, составляет лишь 1-2% всего количества ДНК, содержащегося в бактериальной клетке.



Виды трансдукции

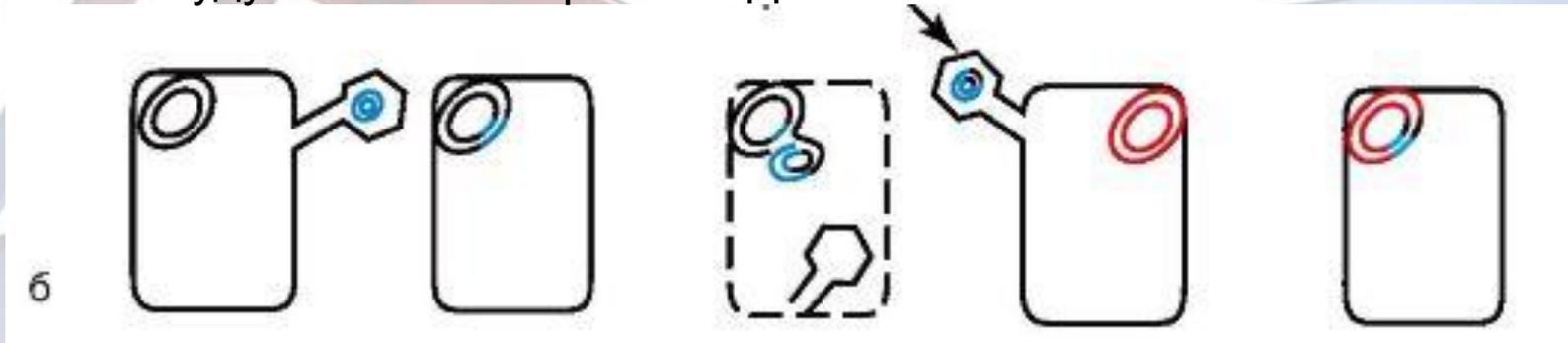
- Различают общую (неспецифическую), ограниченную (специфическую) и abortивную трансдукцию.
- **Общая трансдукция**
- При общей трансдукции фрагменты бактериальной ДНК донора случайно включаются в созревающую фаговую частицу вместе с фаговой ДНК или вместо фаговой ДНК.
- Фрагменты бактериальной ДНК образуются при ее разрезании ферментом, контролируемым фагом. В состав фаговой частицы может включаться до 100 бактериальных генов.
- При инфицировании клетки-реципиента дефектной фаговой частицей ДНК клетки-донора «впрыскивается» в нее и рекомбинирует гомологичной рекомбинацией с гомологичным участком хромосомы-реципиента с образованием стабильного рекомбинанта.



Виды трансдукции

- **Ограниченная (специфическая) трансдукция**

- Фаговая ДНК интегрирует в бактериальную хромосому с образованием профага. В процессе исключения ДНК фага из бактериальной хромосомы в результате случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы, становясь дефектным фагом.
- Так как большинство умеренных бактериофагов интегрирует в бактериальную хромосому в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК клетки-донора.
- ДНК дефектного фага рекомбинирует с ДНК клетки-реципиента сайт-специфической рекомбинацией. В частности, бактериофаг передает специфической трансдукцией *gal*-ген у *E. coli*. Отделение фаговой ДНК от бактериальной хромосомы может произойти неточно, т.е. какой-то фрагмент ее останется в хромосоме, а близко расположенные гены клетки-хозяина будут захвачены фаговой ДНК.



- При общей и ограниченной трансдукции донорская ДНК замещает гомологичные участки ДНК реципиента. Этот процесс сходен с трансформацией.
- **Абортивная трансдукция**
- может быть и неспецифической, и специфической. Ее сущность заключается в том, что трансдуцируемый фагом фрагмент ДНК не включается в хромосому реципиента, а существует как цитоплазматический репликон, который потом утрачивается.

Заключение

- Бактерии подобно высшим организмам обладают способностью к обмену генетического материала, но существенно отличаются способами его передачи от донорной клетки к реципиентной
- Обмен генетического материала у бактерий имеет место при трансформации, конъюгации и трансдукции

