

Лекція 2-3 ГЕНОМ ПРОКАРІОТІВ

Сукупність послідовностей ДНК в клітинах даного організму називається геномом. На сьогодні повністю встановлена послідовність понад 700 бактеріальних і близько 100 еукаріотичних геномів. Головна відмінність між ними полягає в тому, що в прокаріотичних геномах кодуючі послідовності складають близько 95%, тоді як частка кодуючих послідовностей в геномах еукаріот не перевищує 3%.

Таблиця 1.1. Розміри геномів і кількість білкових генів деяких організмів

Організм	Розмір геному (пари основ)*	Кількість молекул ДНК*	Кількість генів
Бактеріофаг φX-174	5386	1	10
Бактерія <i>Escherichia coli</i>	$4,6 \cdot 10^6$	1	4100
Аскоміцет <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,2 \cdot 10^7$	16	6700
Нематода <i>Caenorhabditis elegans</i>	10^8	6	20000
Плодова мушка <i>Drosophila melanogaster</i>	$1,3 \cdot 10^8$	4	14000
Курка <i>Gallus gallus</i>	10^9	33	13000
Миша <i>Mus musculus</i>	$3,3 \cdot 10^9$	20	22000
Людина <i>Homo sapiens</i>	$3,2 \cdot 10^9$	23	21000

Прокаріоти - це організми, в клітинах яких відсутнє оформлене ядро. Його функції виконує бактеріальна хромосома (кільцева ДНК), розташована в зоні - **нуклеоїд** (тобто «подібний ядру»).

Тіло прокаріотів, як правило, складається з однієї клітини. Однак при неповному розходженні клітин, які діляться, виникають нитчасті, колоніальні і полінуклеоїдні форми (бактероїди). В прокаріотичних клітинах відсутні постійні двумембранні і одномембранні органели: пластиди і мітохондрії, ендоплазматична сітка, апарат Гольджі і їх похідні. Їх функції виконують *мезосоми* - складки плазматичної мембрани. У цитоплазмі фотоавтотрофних прокаріот є різноманітні мембранні структури, на яких протікають реакції фотосинтезу. Іноді їх називають бактеріальними хроматофорами.

Специфічною речовиною клітинної стінки прокаріот є *муреїн*, однак у деяких прокаріотів муреїн відсутній. Зовні клітинної стінки часто є слизова капсула. Простір між мембраною і клітинною стінкою служить резервуаром протонів при фотосинтезі і аеробному диханні.

Розміри прокаріотичних клітин змінюються від 0,1-0,15 мкм (мікоплазми) до 30 мкм і більше. Більшість бактерій має розміри 0,2-10 мкм. У рухливих бактерій є джгутики, основою яких служать білки флагеліни.

Прокаріотична клітина відрізняється порівняно простою організацією (відсутність ядра і розвиненою компартменталізацією, відсутністю мейозу, порівняно невеликою кількістю ДНК), що робить її зручним об'єктом досліджень. Саме вивчення прокаріотів відіграло провідну роль у з'ясуванні багатьох базових принципів функціонування генетичного апарату, особливо в перше десятиліття після початку інтенсивних досліджень молекулярних основ спадковості. При збереженні загальних принципів, організація і функціонування спадкового апарату таких порівняно простих систем має певні особливості.

Як правило, бактеріальний геном представлений однією циркулярною молекулою ДНК (бактеріальною хромосоною). Ця ДНК взаємодіє з білками, формуючи **нуклеоїд**, що займає певну зону бактеріальної клітини. Нуклеоїд по морфології нагадує суцвіття цвітної капусти і займає приблизно 30% об'єму цитоплазми. Бактеріальна хромосома являє собою кільцеву двуспіральну правозакручену молекулу ДНК, яка згорнута у вторинну спіраль (суперспіралізація). Довжина бактеріальної хромосоми становить приблизно 4,7 млн. нуклеотидних пар (п.н.), або $\sim 1,6$ мм, близько 90% яких припадають на кодуючі послідовності. Вторинна структура хромосоми підтримується за допомогою гістоноподобних (основних) білків і РНК. Основний пакувальний білок - **HU** структурно дуже відрізняється від гістонів, але діє подібним чином, утворюючи тетрамер, навколо якого намотується приблизно 60 пар основ, також є білки ДНК-гіраза та ДНК-топізомераза-1.

Середній розмір гена *E. coli* - 950 пар основ (прокаріотичні гени не містять інтронів), середня довжина міжгенних ділянок - 118 пар основ. Однак міжгенні зони мають досить нерівномірний розподіл по довжині, варіюючи від 0 до 1730 пар основ.

Одна бактеріальна хромосома містить до 1000 відомих генів. Зазвичай це гени «домашнього господарства», необхідні для підтримки життєдіяльності клітини.

Всі відомі гени діляться на 10 груп, які контролюють такі процеси (в дужках вказано кількість вивчених генів):

1. Транспорт різних з'єднань та іонів в клітину (92).
2. Реакції, які постачають енергію, включаючи катаболізм різних природних сполук (138).
3. Реакції синтезу амінокислот, нуклеотидів, вітамінів, компонентів ланцюгів перенесення електронів, жирних кислот, фосфоліпідів і деяких інших з'єднань (221).
4. Генерація АТФ при перенесенні електронів (15).
5. Катаболізм макромолекул (22).
6. Апарат білкового синтезу (164).
7. Синтез нуклеїнових кислот, включаючи гени, які контролюють рекомбінацію і репарацію (49).
8. Синтез клітинної оболонки (42).
9. Хемотаксис і рухливість (39).
10. Інші гени, в тому числі з невідомою функцією (110).

В лаг-фазі в клітині є одна бактеріальна хромосома, але в фазі експоненціального росту ДНК реплікується швидше, ніж відбувається поділ клітини; тоді число бактеріальних хромосом на клітину збільшується до 2 ... 4 ... 8. Такий стан генетичного апарату називається полігаплоїдністю. При поділі клітини сестринські копії бактеріальної хромосоми розподіляються по дочірнім клітинам за допомогою мезосоми.

В бактеріальному геномі присутні також мобільні елементи класу ДНК-транспозонів, абсолютно аналогічні транспозонам в геномах еукаріот. Бактеріальні транспозони поділяють на два типи, які дещо відрізняються між собою за будовою послідовностей і довжиною: *IS-елементи* (insertion sequences), розмір яких варіює від 700 до 1400 пар основ, і *власне транспозони* (Tn) більшого розміру. Транспозони обох типів часто містять гени транспозази. Транспозаза здійснює каталіз хімічних реакцій, які забезпечують переміщення транспозона в інше місце генома. Крім генів транспозази в складі Tn-транспозонів можуть бути присутніми інші гени.

Точка прикріплення бактеріальної хромосоми до мезосоми (складці плазмалеми) є точкою початку реплікації ДНК (ця точка зветься *OriC*). Реплікація бактеріальної хромосоми починається з ділянки оріджіна (як правило, єдиного) і триває в обидві сторони двома реплікативними вилками і завершується в точці *TerC*. Вважається, що оріджин при цьому взаємодіє з клітинною мембраною, між новим (тільки синтезованим) і старим оріджинами при реплікації нарощується клітинна оболонка, по завершенні реплікації відбувається поділ дочірніх клітин і до кожної переходить повний материнський набір генів за допомогою мезосоми.

Характерною відмінністю бактерій є наявність в клітині, поруч з бактеріальною хромосомою, невеликих автономних елементів геному - **плазмід**. Плазміда є циркулярною молекулою ДНК (типовий розмір близько 3 тис. пар основ), яка містить кілька десятків генів. Може бути кільцевої або лінійної. Зазвичай це «гени розкоші», що забезпечують стійкість до антибіотиків, важких металів, які кодують специфічні токсини, а також гени кон'югації і обміну генетичним матеріалом з іншими особинами. Вважається характерним для плазмід присутність **інтегрона** - набору генів, що дозволяють плазмідам захоплювати гени бактеріофагів і інших плазмід. Відомі також дрібні плазмиди довжиною 2 - 3 тпн, що кодують не більше 2 білків. У багатьох бактерій відкриті мегаплазмиди довжиною близько мільйона пн, тобто трохи менше бактеріальної хромосоми. Плазмиди можуть бути прикріплені до мезосоми, можуть перебувати в автономному стані і в інтегрованому стані. В останньому випадку плазміда включається до складу бактеріальної хромосоми в певних точках *attB*. Таким чином, одна і та ж плазміда може включатися до складу хромосоми і може вирізатися з неї. Існують плазмиди, представлені однією копією - вони реплікуються синхронно з ДНК бактеріальної хромосоми. Інші плазмиди можуть бути представлені багатьма копіями, і їх реплікація відбувається незалежно від реплікації бактеріальної хромосоми. Реплікація вільних плазмід часто протікає за принципом «кільця, що котиться» - з однієї кільцевої матриці ДНК зчитується «нескінченна» копія.

Плазмиди широко використовуються як зручний інструмент молекулярно-біологічних досліджень.

Микроорганизм	Геном
<i>Escherichia coli</i>	1 кольцевая хромосома 4.6 Mb
<i>Bacillus cereus</i>	1 кольцевая хромосома 1 кольцевая мегаплазмида
<i>Brucella melitensis</i>	2 кольцевых хромосомы 2.1 Mb и 1.2 Mb
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Линейная хромосома 0.9 Mb + до 20 плазмид
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	2 кольцевых хромосомы
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	1 линейная хромосома



Мінімальний набір генів живої клітини

Аналіз повних геномів дозволив визначити мінімальний набір генів, необхідний кожній живій клітині. Показано, що як мінімум 265-350 генів необхідні для клітинної

форми життя. Зараз ведуться спроби синтезувати ДНК, що містить 250 генів для того, щоб подивитися, чи вийде жива клітина з того, що п'ять ЛНК буде кодувати.

Мінімальний набір 256 генів необхідний живій клітині

Функция белков	Число белков
Преобразование энергии	28
Транспорт и метаболизм аминокислот	11
Транспорт и метаболизм нуклеотидов	20
Транспорт и метаболизм углеводов	5
Метаболизм липидов	6
Метаболизм кофакторов	8
Биогенез рибосом и трансляция	94
Репликация, рекомбинация, Репарация, транскрипция	35
Структурная функция	7
Секрция и адгезия	5
Шапероны	13
Транспорт неорганических ионов	4
Предсказана гипотетическая функция	15
Функция неизвестна	4

Установлен по сравнению наборов генов *M.genitalium* и *H.influenzae*.

Экспериментально исследован по инактивации генов *B.subtilis* (существо, часть генома 318 kb)

Різна кількість генів відповідає за різні клітинні функції. Нижче наведено розподіл генів за функціями в геномі кишкової палички.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИЙ ГЕНОВ *E.coli*, выявленное по полной нуклеотидной последовательности генома



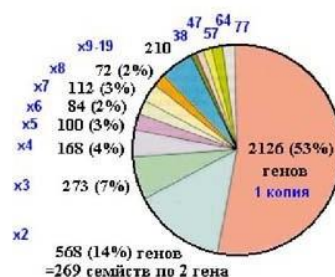
Гомологічні гени та копійність генів

У геномі бактерій можуть бути присутні гени, схожі за нуклеотидною послідовністю. Такі гени називаються гомологічними. Гомологічні гени можуть з'явитися в геномі в результаті подвоєння (дуплікації) одного гена.

Деякі гени, подібні за будовою, але трохи відрізняються за функціями, мають велику копійність в геномі. Нижче представлено кількість копій різних генів в геномі вільноживучої бактерії *Bacillus subtilis*. Копійність генів пов'язана зі способом життя бактерій. Це ті гени, які обумовлюють екологічну специфічність.

Nature 1997, 390: 249-256

Число паралогів в геномі *B.subtilis* (Всього - 4100 генів)



Паралоги - гомологичные гены внутри одного генома.
Уникальных (единичных) генів в геномі *B.subtilis* 53%,
повторяющихся последовательностей - 47%.

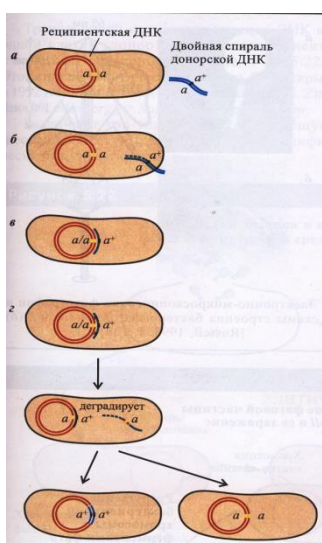
Обмін генетичним матеріалом між бактеріями.

З 1944 по 1952 роки у бактерій були розшифровані три основні процеси, що призводять до об'єднання і рекомбінації генетичного матеріалу: трансформація, кон'югація і трансдукція.

Явище **трансформації** вперше спостерігав ще в 1924 році бактеріолог Ф.Гріффіт, який працював з різними штамми пневмококів; зокрема зі штамом S – що володіє полісахаридною капсулою і має гладку блискучу поверхню колоній і зі штамом R – що не має полісахаридної капсули (ознака - шорсткі колонії). S-форма була патогенною для мишей, а R-форма - ні. Гріффіт робив ін'єкцію мишам - вводив спільно обидва штами, однак, штам S він попередньо вбивав нагріванням, в той час як штам R вводився живим. Через певний час із заражених мишей були виділені живі пневмококи, що мали полісахаридну капсулу і гладку поверхню колоній. Поява в організмі заражених мишей живих клітин S - форми (це явище Гріффіт назвав трансформацією пневмокока) можна було пояснити або виникненням нової мутації, або наявністю своєрідної гібридизації між живими і мертвими бактеріями. У 1944 році групі американських дослідників (Освальд Ейвері, Колін Мак-Леод і Маклін Мак-Карті) вдалося з'ясувати причину виявленого Гріффітом явища. Їм вдалося експериментально спростувати припущення про можливість мутаційної природи трансформації. Стало очевидним, що ознака штаму (S) за допомогою спадкового чинника передавалася до штаму (R), тобто виникало спрямована спадкова зміна. Це спадкова речовина була виділена з екстракту клітин S-форми і названо трансформуючим фактором (ТФ). З'ясувалося, що ТФ за своєю біохімічною природою був молекулами ДНК. Т.ч. явище трансформації стало одним з основних доказів ролі ДНК як носія спадкової інформації.

В даний час терміном «трансформація» позначають особливий спосіб гібридизації у мікроорганізмів, при якому відбувається включення ДНК з клітин одного генотипу (донора) в клітини іншого генотипу (реципієнта). Трансформація можлива у ряді бактерій (зокрема у представників родів *Bacillus*, *Rhizobium*, *Streptococcus*), актиноміцет, ціанобактерій і деяких інших мікроорганізмів.

Відомі два типи бактеріальної трансформації: природна, наприклад у *Bacillus subtilis*,



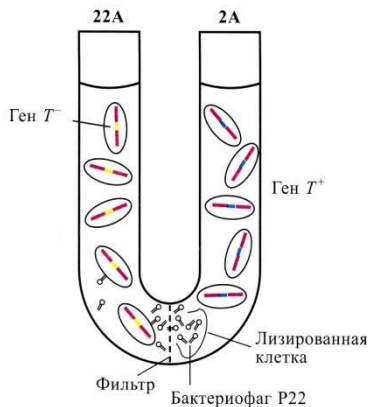
і індукована, яка пов'язана з тим, що бактеріальна клітина спеціально готується до процесу перенесення ДНК, тобто вона набуває компетентність до трансформації. Для проникнення ДНК в бактеріальний геном спочатку необхідний стан компетентності. Цей стан притаманний не для всіх клітин культури і здобувається за допомогою особливого білка, що виробляється в процесі росту культури. Спочатку ДНК зв'язується з поверхнею компетентних клітин, потім вона розщеплюється нуклеазами на фрагменти молекулярної масою не менше 3×10^5 дальтон; після цього фрагменти ДНК проникають в бактеріальну клітину - реципієнта, де відбувається деградація одного ланцюга ДНК - тобто дволанцюгова ДНК перетворюється в одностанцюгову; в кінцевому підсумку відбувається інтеграція одностанцюгового фрагменту, що трансформується з ДНК клітини-реципієнта (відбувається їх

фізичне об'єднання).

Одиначний ланцюг донорської ДНК спарюється з гомологічним районом хромосоми реципієнта, формуючи трохнитчасту структуру, подвійний кросинговер продукує

рекомбінантну ДНК (гетеродуплекс) і лінійний фрагмент, який деградує. Після реплікації половина нащадків є трансформантами, а інша половина має батьківський фенотип.

Трансдукція (від лат. *transductio* - переміщення) - перенесення бактеріофагом генетичного матеріалу з однієї бактеріальної клітини в іншу, що призводить до зміни



спадкових властивостей клітини. Перенесений генетичний матеріал може залишатися в складі ДНК фага або включатися в ДНК бактерії.

Це явище було відкрито в 1952 році М. Зиндер і Дж. Ледербергом у *Salmonella typhimurium*. Два штами бактерій сальмонели поміщали в різні відділення U-подібної трубки, розділеної внизу бактеріальним фільтром. Штам (22A) ніс мутацію, яка блокує синтез триптофану, штам (2A) мав мутацію, яка блокує синтез гістидину і тому потребував його при культивуванні. Після спільної інкубації в U-подібній трубці

ці штами розсіювали на мінімальних середовищах і спостерігали появу рекомбінантних колоній з частотою $\approx 10^{-5}$.

Поява прототрофних рекомбінантів не можна було пояснити як наслідок кон'югації, так як клітини бактерій різних штамів були розділені фільтром. Трансформуючий фактор в середовищі не було виявлено. Можливість реверсій (або зворотних мутацій) до дикого типу з такою високою частотою також була відкинута. З'ясувалося, що фільтруючимся через бактеріальний фільтр трансдукуючим ДНК агентом є бактеріофаг.

Трансдукуючі бактеріофаги відносяться до розряду помірних фагів, тобто вони при зараженні бактеріальної клітини не викликають її лізис, а дають т.зв. лізогенну реакцію. В цьому випадку інфікуючий фаг переходить в стан профага і реплікується в бактеріальній клітині синхронно з її хромосою. Крім того, між генетичним матеріалом бактерії і профага відбувається рекомбінація, тоді фаг, що звільнився може в подальшому передати частину ДНК від однієї інфікованої клітини до іншої.

Розрізняють загальну, обмежену і абортивну трансдукцію. Загальна - фрагменти бактеріальної донорської ДНК випадково включаються в дозріваючу частинку разом з фаговою ДНК, або навіть замість неї. Обмежена - відбувається рекомбінація між фаговою і бактеріальною ДНК, тому фагові трансдукуючі частинки обов'язково містять ДНК обох типів. Абортивна - трансдукований фрагмент ДНК донора не включається в хромосому бактерії-реципієнта; він залишається в цитоплазмі і в такому вигляді здатний підтримуватися і проявлятися.

Кон'югація - передача генетичного матеріалу від однієї бактеріальної клітини до іншої шляхом безпосереднього контакту між клітиною-донором і клітиною-реципієнтом.

Процес кон'югації був відкритий і вивчений в 1946 році Джошуа Ледербергом і Едвардом Тейтум у *E. coli*. Ці дослідники працювали з двома штамми *E. coli*, геном яких був маркований декількома мутаціями по ауксотрофності. Перший штам потребував для зростання треонін, лейцин і тіамін, другий штам потребував біотин і метіонін. Ці два штами змішувалися в повноцінному середовищі і інкубувалися протягом 24 годин. Потім суміш штамів висівали на мінімальному середовищі. На мінімальному середовищі з частотою в декілька разів перевищуючу частоту спонтанних реверсій (10^{-7}) виростили прототрофні колонії *E. coli*. Ледерберг і Тейтум припустили, що поява прототрофів обумовлена

своєрідною гібридизацією клітин бактерій з різних штамів, що представляє із себе варіант статевого процесу.

Для з'ясування питання про те, як відбувається перенос генетичного матеріалу, У. Хейес в 1953 році провів реципрокні схрещування між двома вихідними штамми, які, крім того, розрізнялися по стійкості і чутливості до антибіотика - стрептоміцину (S-чутливим і R-стійким).

1) Str (S) thr leu thi ++ x Str (R) +++ bio met

2) Str (R) thr leu thi ++ x Str (S) +++ bio met

Для обліку рекомбінантів Хейес висівав суміш клітин на два середовища: зі стрептоміцином і без нього. Виявилось, що в першому схрещуванні рекомбінанти з'являлися тільки на середовищі без стрептоміцину, а в другому схрещуванні - на обох середовищах. Був зроблений висновок про те, що обов'язковою умовою для утворення рекомбінантів є збереження батьківського штаму thr leu thi ++, що був позначений як жіночий (F-), відповідно, другий штам +++ bio met був донором ДНК і позначався як чоловічий (F+). Таким чином У. Хейес встановив, що обмін інформацією при кон'югації у бактерій відбувається тільки в одному напрямку.

У 1958 році Т. Андерсон показав, що F+ і F- клітини можуть відрізнятися морфологічно (F+ клітини довгасті; F- клітини більш округлі). Таким чином, процес кон'югації виявилось можливим спостерігати візуально під електронним мікроскопом. Електронна мікрофотографія пари кон'югуючих бактерій, з'єднаних F-пілем - структурою, утвореною клітиною-донором. Через F-піль ДНК потрапляє в клітину-реципієнта.

З'ясувалося, що існує різноманітність по частоті утворення рекомбінантів при різних варіантах схрещувань: при спільній інкубації двох штамів F- клітин рекомбінанти не утворюються; при схрещуванні F- і F+ клітин рекомбінанти утворюються з частотою 10^{-4} - 10^{-6} . При цьому 90% клітин F- за 1 годину перетворюються в клітини F+ (заражаються F фактором). Звідси можна зробити висновок, що F фактор має інфекційну природу.

Нарешті, були виявлені такі штами, які при схрещуванні з клітинами F- дають дуже високу частоту рекомбінантів (10^{-1}). Показано, що при цьому F- клітини не заражаються F фактором. Такі високоефективні донори позначаються як *Hfr*. З'ясувалося, що клітини F+ можуть перетворюватися в клітини *Hfr* і назад. Генетичний аналіз показав, що в лінії *Hfr* F фактор передається зчеплено з іншими генами і займає певний локус в хромосомі бактерії.

Хоча бактерії розмножуються шляхом клітинного поділу, у них спостерігається також своєрідний "статевий процес" перенесення генетичного матеріалу від однієї клітини до іншої. Таке перенесення відбувається під час кон'югації і безпосереднього контакту між клітинами. Залежить кон'югація від присутності в одній з клітин особливої плазмиди - F-фактора (фактора фертильності), яка, як і багато інших плазмід, може існувати автономно, а може вбудовуватися в бактеріальну хромосому шляхом сайтспецифічної рекомбінації. У *E.coli* існує два "статевих" типа клітин, що позначаються як F+ і F-, кон'югація супроводжується перенесенням ДНК від клітини F+ до F-.

F-фактор містить кілька генів, в тому числі ті, що відповідають за утворення так званих пілів - трубчастих виростів на поверхні клітини. Пілі з'єднуються з рецепторами клітин F-, і між клітинами двох типів утворюється цитоплазматичний місток. Специфічна нуклеаза робить одноланцюговою розріз в ДНК F-фактора, інтактний ланцюг служить матрицею для добудови 3'-кінця, що залишився в місці розрізу, відбувається реплікація циркулярної ДНК F-фактора по так званому типу кільця, що котиться (такий механізм реплікації використовується також для копіювання ДНК багатьох бактеріофагів). Процес

добудови 3'-кінця виштовхує 5'-кінцеву одноланцюгову ділянку, проникає в клітину F-, де використовується як матриця для синтезу другого ланцюга ДНК. В результаті клітина F- перетворюється в F+.

Частота кон'югації і подвоєння і переносу F-фактора невисока ($\sim 10^{-5}$), якщо F-фактор існує автономно від бактеріальної хромосоми. Коли F-фактор вбудовується в бактеріальну хромосому, частота зростає до 10^{-2} - 10^{-1} - такі штами клітин F+ позначаються як *Hfr* (high frequency recombination). При кон'югації клітин F- і *Hfr* вбудований F-фактор ініціює реплікацію цілої бактеріальної хромосоми за типом кільця, що котиться: в клітині *Hfr* хромосома відновлюється, в клітину F- переноситься її копія. Насправді ж ціла хромосома потрапляє в клітину F- дуже рідко - як правило, відбувається порушення кон'югаційної трубки і розрив хромосоми, яка переноситься. Оскільки на початку процесу в клітину F- потрапляє лише частина F-фактора, а щоб він опинився там повністю, вихідна хромосома повинна зробити повний "оборот", як правило, клітина F- чи не перетворюється в F+ при кон'югації з клітиною *Hfr*.

Коли в клітині F- виявляється частина гомологічної ДНК іншої бактерії, починається гомологічна рекомбінація - обмін ділянками між донорської ДНК і ДНК клітини-реципієнта. Результуюча клітина-реципієнт залишається гаплоїдною - "зайва" ДНК, яка не потрапила в хазяйську хромосому, піддається деградації нуклеазами, оскільки вона не є циркулярною. Таким чином, між двома бактеріальними штамми відбувається своєрідне часткове схрещування, яке можна дослідити за допомогою звичайних методів генетичного аналізу. Оскільки перенесення генів з клітини *Hfr* в F- відбувається послідовно, починаючи з сайту інтеграції F-фактора, можна картувати розміщення генів в бактеріальній хромосомі (в порядку потрапляння їх в клітини F-). Для цього кон'югацію (після змішування клітин двох типів в рідкому середовищі) зупиняють шляхом струшування пробірки через певні проміжки часу. Це дозволило свого часу отримати детальні генетичні карти бактеріальної хромосоми (відстані на таких картах вимірюють у хвиликах) і довести її циркулярність.

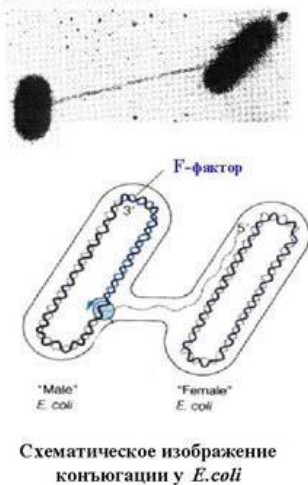
F-фактор, інтегрований в хромосому, може також вирізатися з неї зі створенням

Половий процес у бактерій

Бидл и Тейтум, 1946; У. Хейс, 1952



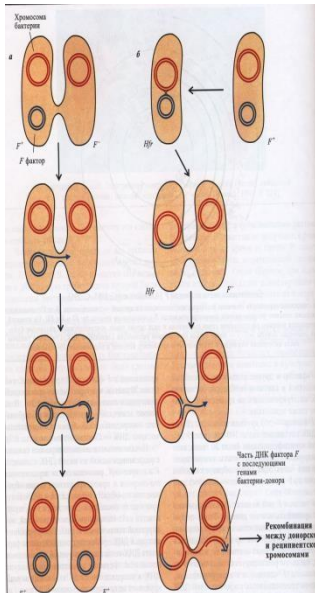
Кольцевая ДНК, называемая F-фактор (fertility factor) способна встраиваться в геном бактерии. Содержащие F-фактор клетки образуют особые F-пили (половые ворсинки), с помощью которых прикрепляются к клеткам, не имеющим F-фактора, образуя конъюгационный мостик. При репликации встроенного F-фактора бактериальная хромосома также реплицируется. F-фактор "мобилизует" ее и переносит часть хромосомы через конъюгационный мостик в другую клетку.



автономної плазмиди. Таке вирізання іноді буває неточним: ділянка F-фактора залишається в хромосомі, замінюючись на ділянку хромосоми в складі плазмиди.

Утворюється так званий F'-фактор, який здатний переносити в інші клітини бактеріальні гени незалежно від бактеріальної хромосоми (явище сексдукції). Після такого перенесення можна отримати частково диплоїдні клітини - по генам, що знаходяться в складі F'-фактора. Між ним і хромосомою клітини-реципієнта можлива гомологічна рекомбінація,

що призводить або до утворення *Hfr*-клітин і дуплікації генів (одиначний кросинговер - вбудовування F'-фактора в хромосому), або до обміну ділянками між хромосомою і F'-фактором (подвійний кросинговер).



Таким чином, F-фактор може існувати в двох станах: в автономному (в клітинах F+) і інтегрованому (в разі *Hfr* клітин).

F-фактор, а також інші плазміди, що здатні знаходитися в клітині в автономному стані або інтегруватися в хромосому, називають також *episomi*.

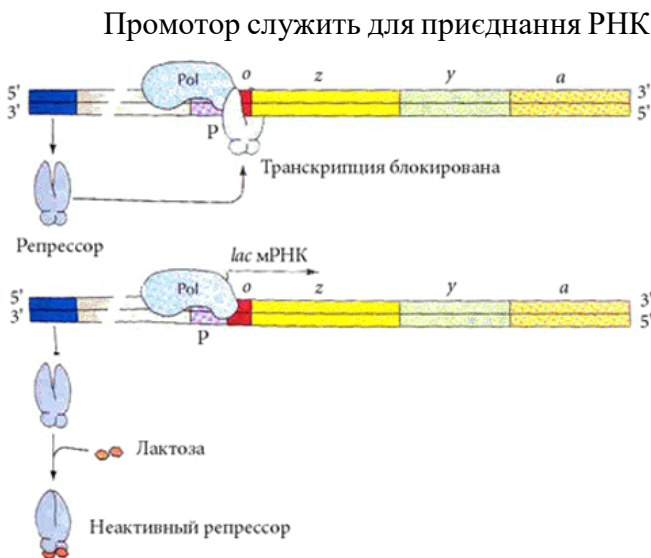
Процес реплікації у кишкової палички триває 20 хвилин, а процес кон'югації триває 3-5 хвилин (в проміжку від 0 до 90 хвилин). За цей час встигає перейти не вся хромосома, а тільки її шматочок. Чим довше триває кон'югація, тим більший шматочок встигає перейти з однієї клітини в іншу. Тому один відомий мікробіолог жартував, що кишкова паличка - це дивовижний організм, у якого життя триває 20 хвилин, а статевий процес - 90 хвилин.

Механізми регуляції активності генів

1. Схема негативної індукції Жакоба і Моно

Лас-оперон *E. coli* містить 3 гена, що відповідають за утворення білків, що беруть участь в перенесенні в клітку дисахариду лактози і в її розщепленні.

Оперон включає наступні ділянки ДНК: **P** - промотор, **O** - оператор, **Z**, **Y**, **A** - структурні гени: **Z-β-галактозидаза** (розщеплює лактозу на глюкозу і галактозу); **Y-β-галактозидпермеаза** (переносить лактозу через мембрану клітини); **A-тіогалактозидтрансацетилаза** (ацетилює галактозу) та **T** - термінатор.



Промотор служить для приєднання РНК-полімерази до молекули ДНК за допомогою комплексу CAP-цАМФ (CAP - специфічний білок; у вільній формі є неактивним активатором; цАМФ - циклоаденозинмонофосфат - циклічна форма аденозинмонофосфорної кислоти). Оператор здатний приєднувати білок-репресор (який кодується відповідним геном). Якщо репресор приєднаний до оператора, то РНК-полімераза не може рухатися уздовж молекули ДНК і синтезувати іРНК.

Структурні гени кодують три ферменти, необхідні для розщеплення лактози (молочного цукру) на глюкозу і галактозу. Молочний цукор лактоза - менш цінний продукт харчування, ніж глюкоза, тому в присутності глюкози зброжування лактози є не вигідним для бактерії процесом. Однак при відсутності глюкози бактерія змушена переходити на харчування лактозою, для чого синтезує відповідні ферменти Z, Y, A.

Термінатор служить для від'єднання РНК-полімерази після закінчення синтезу іРНК, відповідно ферментам Z, Y, A, необхідним для засвоєння лактози.

Для регуляції роботи оперона необхідні ще два гени: ген, що кодує білок-репресор, і ген, що кодує білок СУА. Білок СУА каталізує утворення цАМФ з АТФ. Якщо в клітині є глюкоза, то білок СУА вступає з нею в реакцію і переходить в неактивну форму. Таким чином, глюкоза блокує синтез цАМФ і унеможливорює приєднання РНК-полімерази до промотора. Отже, глюкоза є репресором.

Якщо ж в клітині є лактоза, то вона взаємодіє з білком-репресором і перетворює його в неактивну форму. Білок-репресор, пов'язаний з лактозою, не може приєднатися до оператора і не перешкоджає шлях РНК-полімерази. Отже, лактоза є індуктором.

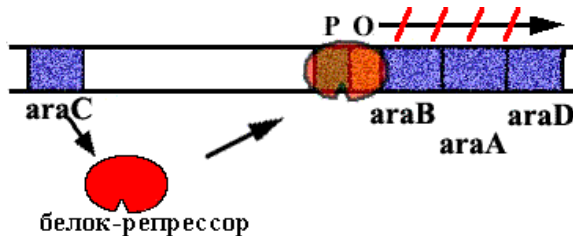
Припустимо, що спочатку в клітині є тільки глюкоза. Тоді білок репресор приєднаний до оператора, а РНК-полімераза не може приєднатися до промотора. Оперон не працює, структурні гени вимкнені.

При появі в клітині лактози і при наявності глюкози білок-репресор відщеплюється від оператора і відкриває шлях РНК-полімеразі. Однак РНК-полімераза не може приєднатися до промотора, оскільки глюкоза блокує синтез цАМФ. Оперон як і раніше не працює, структурні гени вимкнені.

Якщо ж в клітині є тільки лактоза, то білок-репресор зв'язується з лактозою, відщеплюється і відкриває шлях РНК-полімеразі. У відсутності глюкози білок СУА каталізує синтез цАМФ, і РНК-полімераза приєднується до промотора. Структурні гени вмикаються, РНК-полімераза синтезує іРНК, з якої транскрибуються ферменти, що забезпечують зброджування лактози.

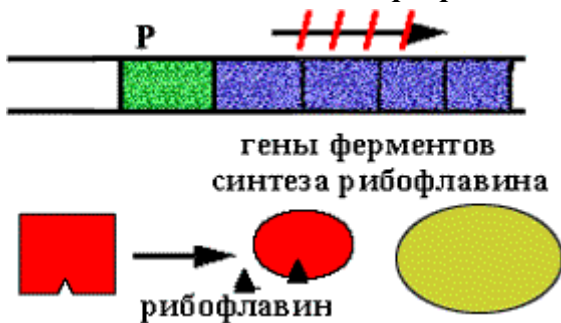
Таким чином, лактозний оперон знаходиться під подвійним контролем індуктора (лактози) і репресора (глюкози).

2. Схема позитивної індукції



В **Ara-опероні** *E. coli* 3 цистрони, що кодує ферменти, які розщеплюють цукор арабінозу. У нормі оперон закритий. Білок-репресор зв'язаний з оператором. Коли в клітину потрапляє арабіноза, вона взаємодіє з білком-репресором. Білок-репресор змінює конформацію і перетворюється з репресора на активатор, що взаємодіє з промотором і полегшує посадку РНК-полімерази на промотор. Ця схема регуляції називається позитивною індукцією, оскільки контролюючий елемент - білок-активатор "вмикає" роботу оперона.

3. Схема позитивної репресії

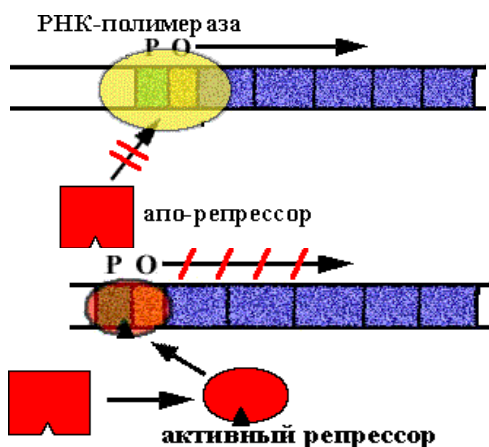


полімерази на промотор.

В опероні синтезу рибофлавіну у *Bacillus subtilis* розташовуються цистрони ферментів синтезу рибофлавіну. Є білок-активатор, що забезпечує посадку РНК-полімерази на промотор. У нормі оперон відкритий. Утворюється N молекул рибофлавіну. N+ 1-ша молекула (зайва) взаємодіє з активатором і він втрачає здатність активувати посадку РНК-

Позитивна репресія, оскільки в регуляції бере участь білок-активатор, а сама регуляція полягає в вимкненні транскрипції.

4. Схема негативної репресії



В опероні синтезу триптофану у *E. coli* є 5 цистронів, які кодують ферменти послідовного ланцюга реакцій синтезу триптофану. У нормі оперон ввімкнений. Білок-репресор неактивний (у формі апо-репресора), він не здатний сідати на оператор.

Клітині потрібно N молекул триптофану. N+ 1-ша молекула взаємодіє з апо-репресором. Він змінює конформацію, сідає на оператор і синтез РНК припиняється.

Схема регуляції - негативна репресія, тому що білок репресор "вимикає" оперон.

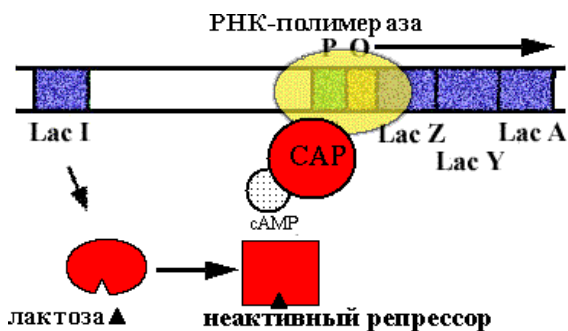
5. Позитивний контроль роботи lac- оперона



Lac-оперон, який підкоряється схемі негативної індукції, має і позитивний контроль. цАМФ утворюється з АТФ ферментом аденилатциклазою.

Фосфодіестерази перетворюють цАМФ в АМФ.

Глюкоза активує другий і інактивує перший фермент. Чим більше в клітині глюкози, тим менше цАМФ.



Якщо немає глюкози, то цАМФ з'єднується з білком катаболічної репресії (CAP) і утворюється комплекс CAP•цАМФ, який активує посадку РНК-полімерази на промотор. У присутності лактози lac-оперон вмикається і працює. Якщо ж в клітині є ще і глюкоза (більш економічне джерело енергії), то немає цАМФ - і активатор не утворюється, lac-оперон працює слабо, без додаткової індукції.