**Лекція 5**

**МОБІЛЬНІ ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ ПРОКАРОТІВ**

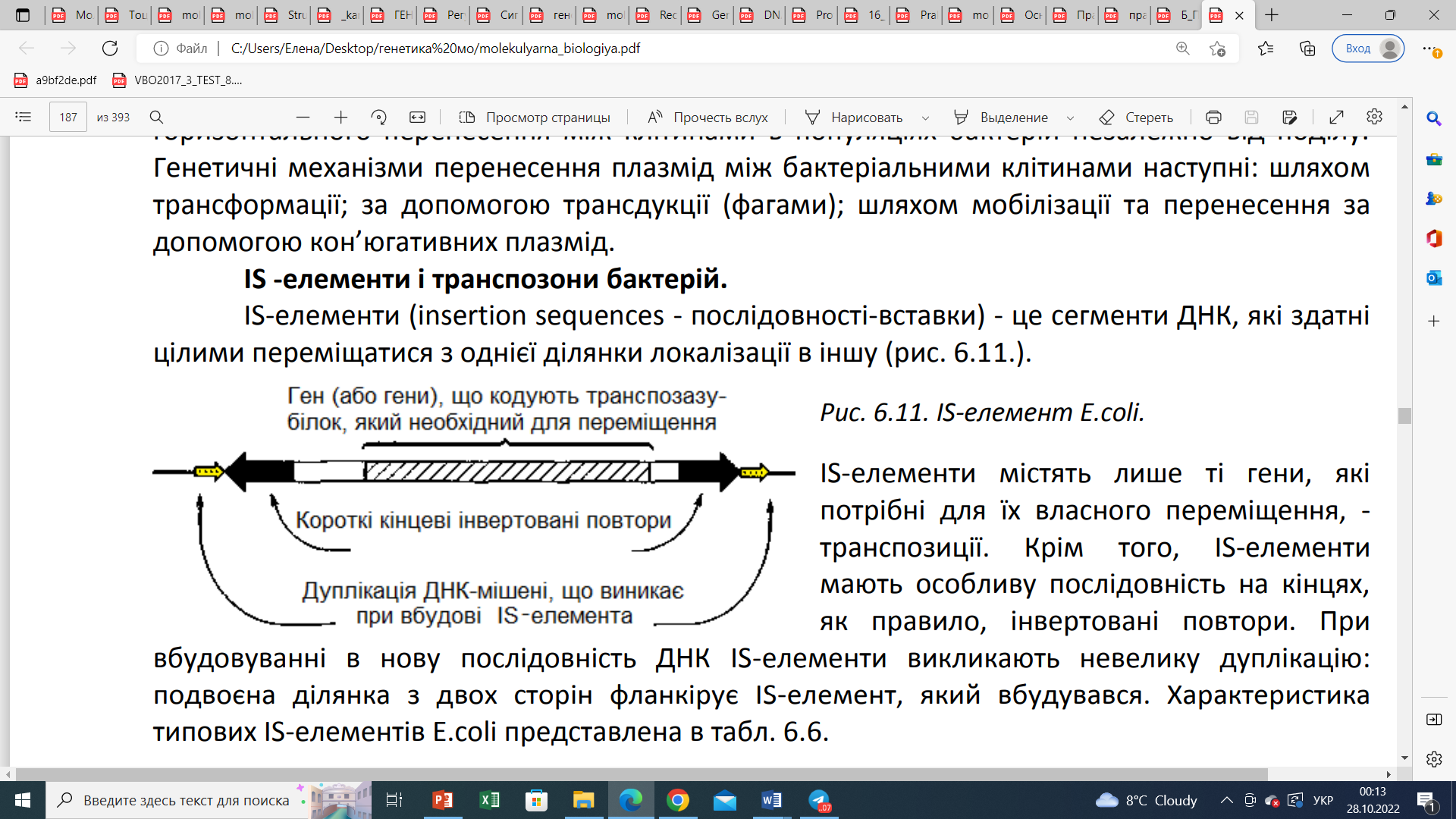
**Мобільні генетичні елементи** (мігруючі, стрибаючі гени) - ділянки ДНК, здатні до транспозиції, або випадкового переміщення, з одного місця в інше: в межах однієї молекули ДНК, з однієї ДНК в іншу. Не здатні до самостійної реплікації. Розмножуються у складі бактерійної хромосоми або плазмид.

До рухливих генетичних елементів відносяться: IS-елементи, транспозоны, інтегрони. Транспозиція забезпечується ферментом - **транспозазой**. Ген, кодуючий цей фермент, входить до складу усіх мобільних генетичних елементів. Транспозаза володіє ендонуклеазною і лігазною функцією : вона розрізає ДНК по краях мобільного генетичного елементу (ендонуклеазна функція) і зшиває його з розривом ДНК в новому місці (лігазна функція). В деяких випадках транспозиція супроводжується подвоєнням мобільних генетичних елементів і переміщенням копії в інше місце.

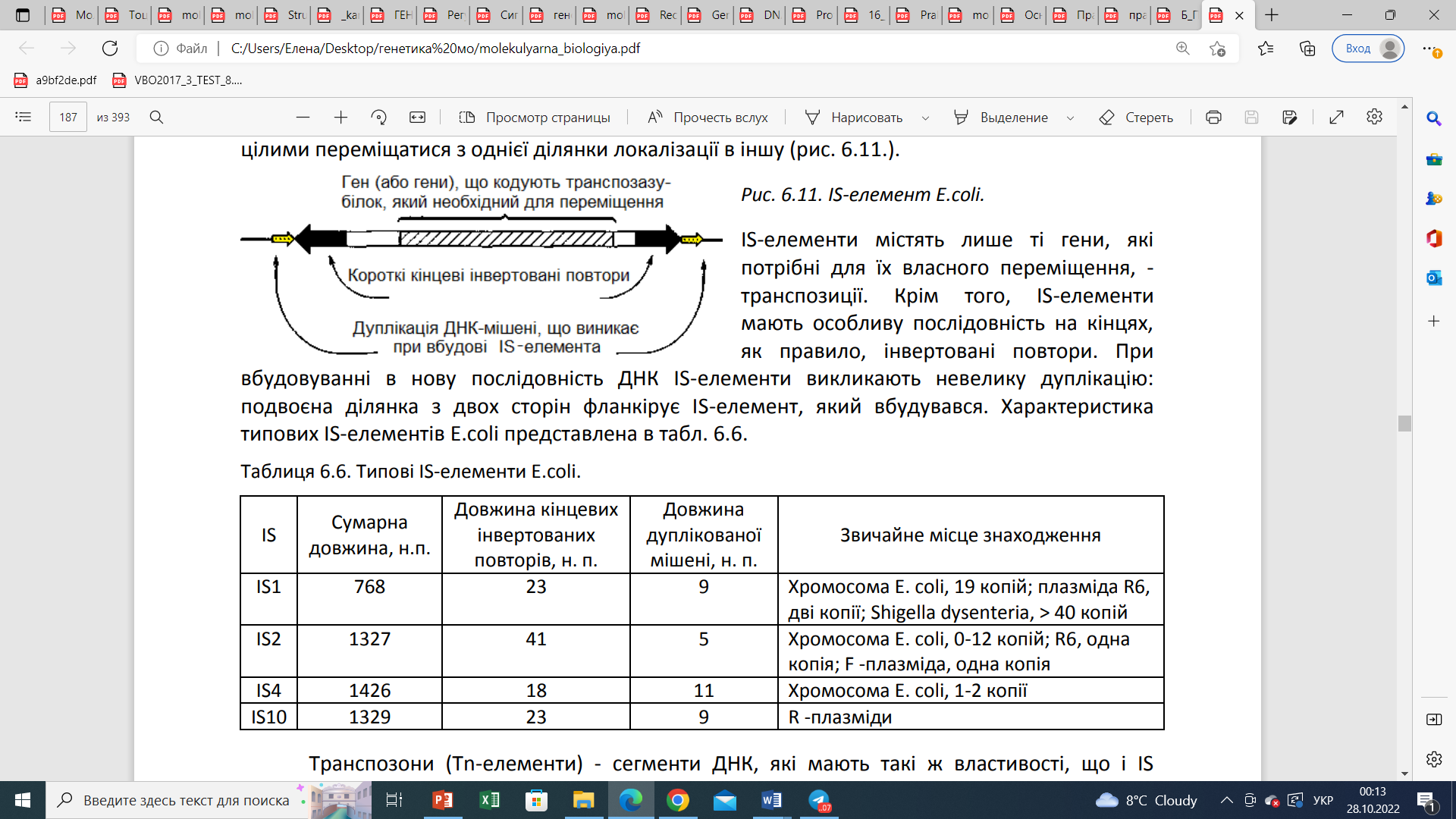
**Інсерціонні послідовності, або IS- елементи** (insertion sequences - послідовності-вставки) - це сегменти ДНК, які здатні цілими переміщатися з однієї ділянки локалізації в іншу.

**.** Це різновид мобільних генетичних елементів, які не несуть у своєму складі структурні гени, а тільки гени, що відповідають за переміщення- транспозицію. Різноманіття IS- елементів означають цифровими індексами - IS1, IS 6010. Їх розмір менший, ніж транспозонів, і складає від 700 до 1800 п.н., але описані й IS - елементи більших і дрібніших розмірів - 5700 п.н. і 200 п.н.

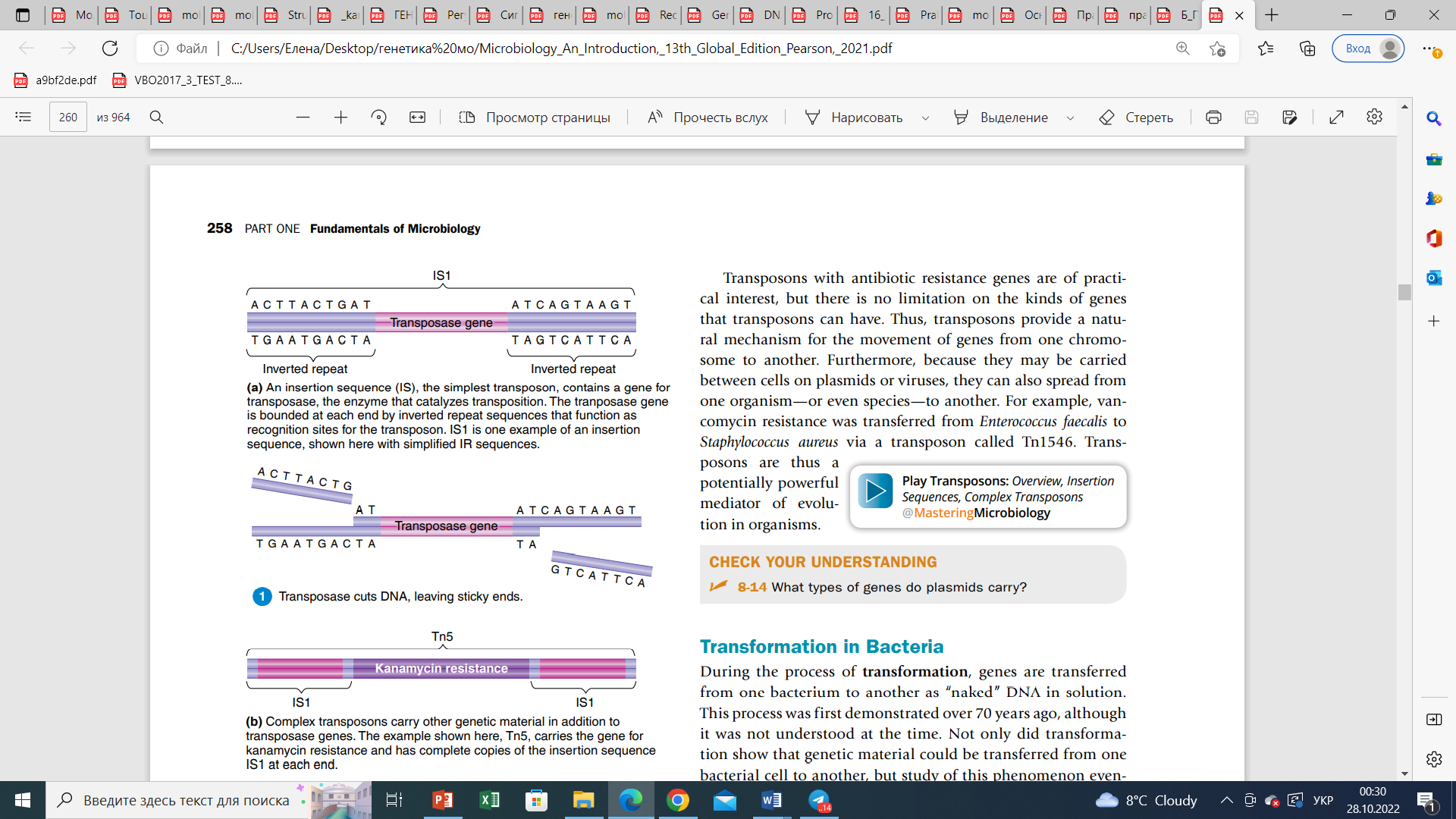
Центральну частину IS-елементу займає ген, кодуючий **траспозазу**; деякі IS-елементи несуть промотори або репресори генів, або їх частини. На обох кінцях IS- елементу знаходяться послідовності, що повторюються, або **паліндромы**, розміром 10-40 п.н., по яких транспозаза розпізнає його і вирізає.

 У геномі бактерій є присутньою, як правило, невелика кількість їх до копій: у геномі *E. coli* IS1 зустрічається у 6–10 копіях, а IS2 – у 5 копіях.

Характеристика типових IS-елементів Е.coli представлена в табл.:



Транспозиція відбувається двома шляхами: 1) консервативним: залишаючи одну ділянку IS-елемент вбудовується в іншу; 2) реплікативним: синтезується копія, яка вбудовується в іншу ділянку геному. Вбудовування, зазвичай, здійснюється у ділянках багатих А/Т. При вбудовуванні в нову послідовність ДНК IS-елементи викликають невелику дуплікацію: подвоєна ділянка з двох сторін фланкірує IS-елемент, який вбудувався.



**Значення IS-елементів:**

1. Беруть участь у мутаційній мінливості мікроорганізмів – інсерціях та делеціях. Інсерція IS-елементів у бактеріальну ДНК призводить до синтезу неповноцінного білка. При вбудовуванні деяких IS-елементів по обох їхніх кінцях відбувається подвоєння невеликої ділянки хромосоми розміром 5-9 п.н. З меншою частотою (10-3-10-4) IS-елементи призводять до делецій в прилеглих генах: залишаючи ДНК, IS4 вирізує ділянки хромосомальної ДНК з обох своїх кінців.

2. Є генетичними маркерами виду чи роду бактерій.

Деякі IS послідовності специфічні для певних видів мікроорганізмів, що дозволяє їх використовувати для видової ідентифікації бактерій

3. Є місцем розпізнавання та вбудовування плазмід та генно-інженерних векторів. Плазміди та генно-інженерні вектори вбудовуються в бактеріальну хромосому в області IS послідовностей.

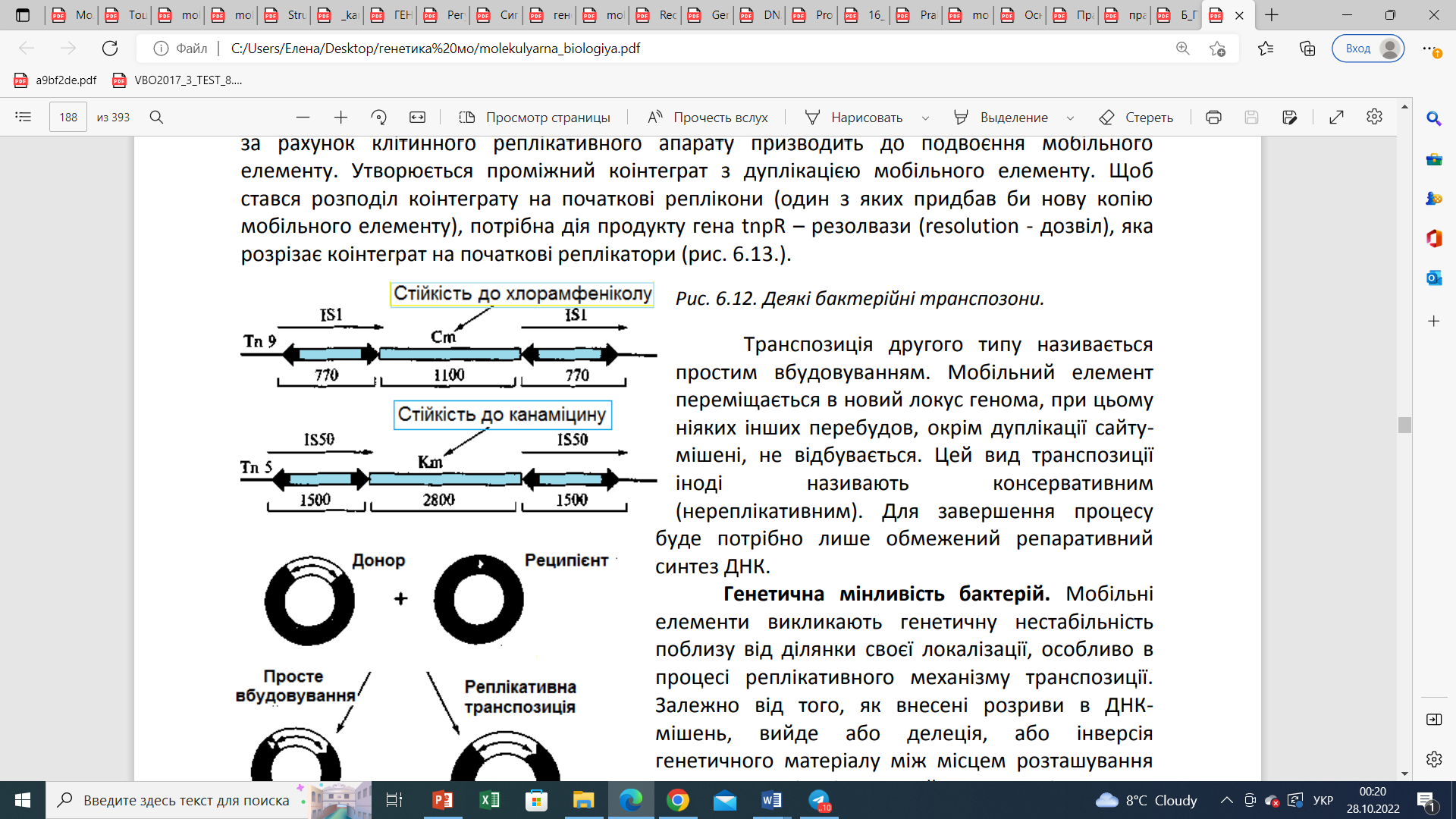
4. Беруть участь у регуляції функцій генів – активації чи репресії, тому що несуть у своєму складі промотори або репресори генів або їх компоненти. Наприклад, формування резистентності до метронідазолу у анаеробних мікроорганізмів пов'язано з активацією тих, що мовчать генів A, B, C, D, E в результаті вбудовування IS-елементів, що несуть промотори цих генів.

**Транспозони** (Tn-елементи) - сегменти ДНК, які мають такі ж властивості, що і IS елементи та ще один- декілька структурних генів. Ці гени не мають безпосереднього відношення до транспозиції (гени стійкості до антибіотиків, гени токсинів або гени додаткових ферментів клітинного метаболізму).

Транспозони позначають Tn з числовим індексом, наприклад Tn 4556. Їх розмір більший за IS-елементи і становить 2,500–7,000 п.н. На обох кінцях Tn знаходяться прямі або інвертовані повтори, за якими транспозаза розпізнає їх та вирізає. Частоту транспозицій Tn можна порівняти з частотою мутацій.

Залежно від структури виділяють два класи транспозонів:

1. Збірні (Tn 5, 9, 10, 903 та 1681). Складаються з фенотипового модуля (гени резистентності) і двох елементів, що розташовуються по краях IS, орієнтованих в одному або протилежних напрямках. IS-елементи забезпечують переміщення транспозонів, але можуть залишати його та переміщатися самостійно.

Tn10, що має по краях дві копії IS10, піддається перенесення з частотою 10–7. Цей транспозон вбудовується переважно у ділянках з послідовністю GCTNAGC (при вбудовуванні ця ділянка подвоюється), як правило, повністю безпомилково вирізується, але в деяких випадках у процесі ексцизії може захоплювати з бактеріальної хромосоми додатково 50 п.н.

2. Комплексні (Tn 1, 3, 4, 7, 501 та 551). Складаються з фенотипового модуля (декілька генів резистентності) і по краях мають непрямі повтори розміром 30-40 п.н. Функціонують як єдине і неподільне ціле. Частота транспозицій комплексних транспозонів становить 10-4 -10-6. Більшість із них при вбудовуванні виявляють сайт-специфічність: Tn7, наприклад, має лише одну ділянку вбудовування у хромосому *E. coli*. Деякі транспозони (Tn3) забезпечують «імунітет» клітини до вбудовування ідентичних транспозонів.

Бактеріофаг µ, або мутатор, також відноситься до комплексних транспозонів. Цей найскладніше організований транспозон містить 38000 п.н. і на його кінцях знаходяться інвертовані повтори розміром 11 п.н. Він не має певного сайту вбудовування у бактеріальну ДНК, у процесі вирізування з неї зазвичай захоплює ділянку розміром 10% свого розміру.

**Механізми переміщення мобільних елементів бактерій.** Існує два типи транспозицій з одного генома в іншій. В ході транспозиції першого типу **коінтеграційного**, донорний геном, який несе IS-елемент або транспозон, зливається з реципієнтною молекулою ДНК. Реплікація за рахунок клітинного реплікативного апарату призводить до подвоєння мобільного елементу. Утворюється проміжний коінтеграт з дуплікацією мобільного елементу. Щоб стався розподіл коінтеграту на початкові реплікони (один з яких придбав би нову копію мобільного елементу), потрібна дія продукту гена **tnpR** – резолвази (resolution - дозвіл), яка розрізає коінтеграт на початкові реплікатори.

Транспозиція другого типу називається **простим вбудовуванням**. Мобільний елемент переміщається в новий локус генома, при цьому ніяких інших перебудов, окрім дуплікації сайту мішені, не відбувається, але при цьому ділянка ДНК, звідки вирізається транспозон, втрачає свої функції. Цей вид транспозиції іноді називають **консервативним (нереплікативним)**. Для завершення процесу буде потрібно лише обмежений репаративний синтез ДНК.

Функції. Транспозони беруть участь у регуляції активності генів, інактивуючи їх чи активуючи. Здійснюють горизонтальне перенесення генів, наприклад, вірулентності чи резистентності, зумовлюючи розповсюдження стійкості до антибіотиків серед мікроорганізмів. У складі транспозонів між різними геномами можуть мігрувати також гени стійкості до певних лікарських препаратів за схемою: плазміда → геном бактеріофага → геном бактерій → плазміда.

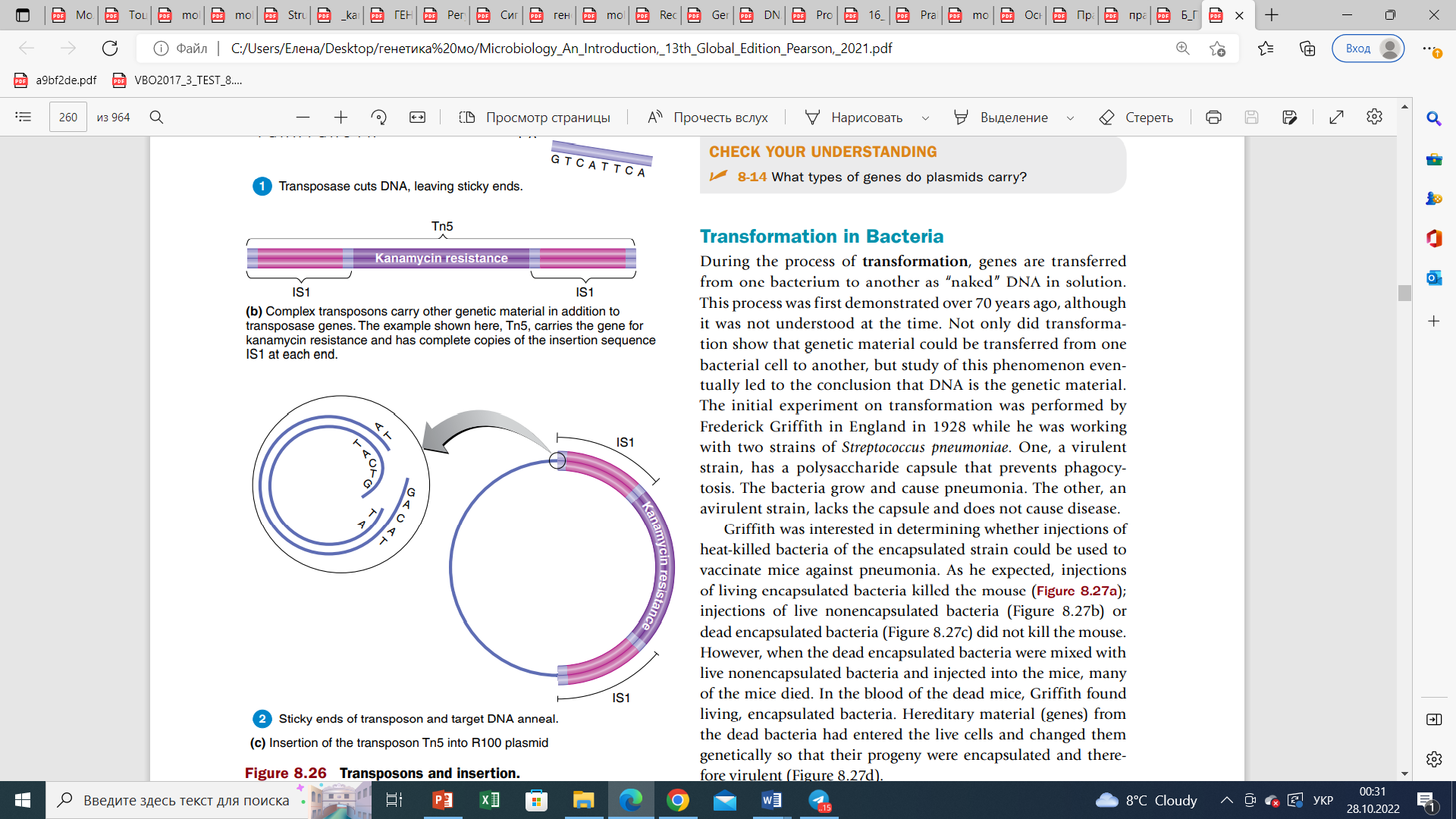
Загалом, до транспонозів відносять ті гени, які є в плазмідах. Нерідко присутність у складі плазміди того або іншого гена обумовлена наявністю в послідовності плазмідної ДНК відповідного транспозона. Він може бути побудований так само, як IS-елемент, але з додатковим геном. Проте важливо відмітити, що часто два IS-елемента, що виявилися поблизу один від одного, здатні переміщатися разом, одночасно переносячи розташований між ними сегмент ДНК. Таким чином, транспозон можуть утворювати два розміщених поруч IS -елемента. Транспозони і IS-елементи відповідальні за цілий ряд генетических явищ у бактерій.

Вбудовування мобільного елементу в будь-який ген може привести до його інактивації. Крім того, деякі IS-елементи і транспозони викликають генетичну нестабільність поблизу від місця своєї локалізації: в околицях елементу помітно підвищується частота делецій і інверсій, причому одна з меж перебудови завжди співпадає з одним із кінців IS-елемента, автономного або у складі транспозона. Мобільні елементи також викликають транслокації.

**Генетична мінливість бактерій.** Мобільні елементи викликають генетичну нестабільність поблизу від ділянки своєї локалізації, особливо в процесі реплікативного механізму транспозиції. Залежно від того, як внесені розриви в ДНК-мішень, вийде або делеція, або інверсія генетичного матеріалу між місцем розташування транспозона і мішенню його переміщення. У зв'язку з цим цікаво відмітити, що хромосоми споріднених видів бактерій відрізняються одна від одної багаточисельними перебудовами такого типу.

Мобільні елементи відіграли істотну роль у дивергенції і видоутворенні бактерій. Вбудовування IS-елементів поблизу гена, що «мовчить», може призводити до його активації за рахунок транскрипції з промотора IS-елемента, що змінює регуляцію бактеріального гена. Дуже важливо, що мобільні елементи служать рухливими ділянками гомології, рекомбінація між якими може призводити до дуплікації генів. Вважається, що дуплікація – один з основних шляхів еволюційного виникнення нових функцій. "Зайва" копія гена виходить з під тиску природного добору і має можливість накопичувати зміни. Найчастіше це приводить до втрати певної функції, але іноді може з’явитися ген з новими функціями.

Не можна забувати і той факт, що клітина може отримати селективну перевагу за рахунок придбання у складі транспозона гена, який сам по собі здатний виявитися вигідним для бактерії в певних умовах. Дійсно, на транспозонах "мандрують" гени стійкості до різних бактеріальних отрут, у тому числі до важких металів і антибіотиків, гени додаткових метаболічних шляхів, що дозволяють використовувати незвичайне джерело вуглецю, нарешті, гени деяких токсинів, бактерій, що робить їх патогенними і дозволяє тим самим істотно змінити спосіб життя. Сказане в рівній мірі відноситься і до плазмід, оскільки більшість корисних для клітини-хазяїна плазмідних генів знаходиться у складі транспозонів



**Інтегрони.** Відповідають за сайт-специфичну рекомбінацію.

Інтегрони - дрібні генетичні елементи, що містять **промотор** і ген тирозинової рекомбінази - **int**, який розпізнає і забезпечує вбудовування в сайт **att I** бактерійної хромосоми. Не містять гени, що відповідають за транспозицію. Здатні з'єднуватися з касетами генів, що кодують резистентність і інші ознаки, при цьому генетичні касети повинні містити гени, що забезпечують рухливість, і елемент розміром 59 п.н.

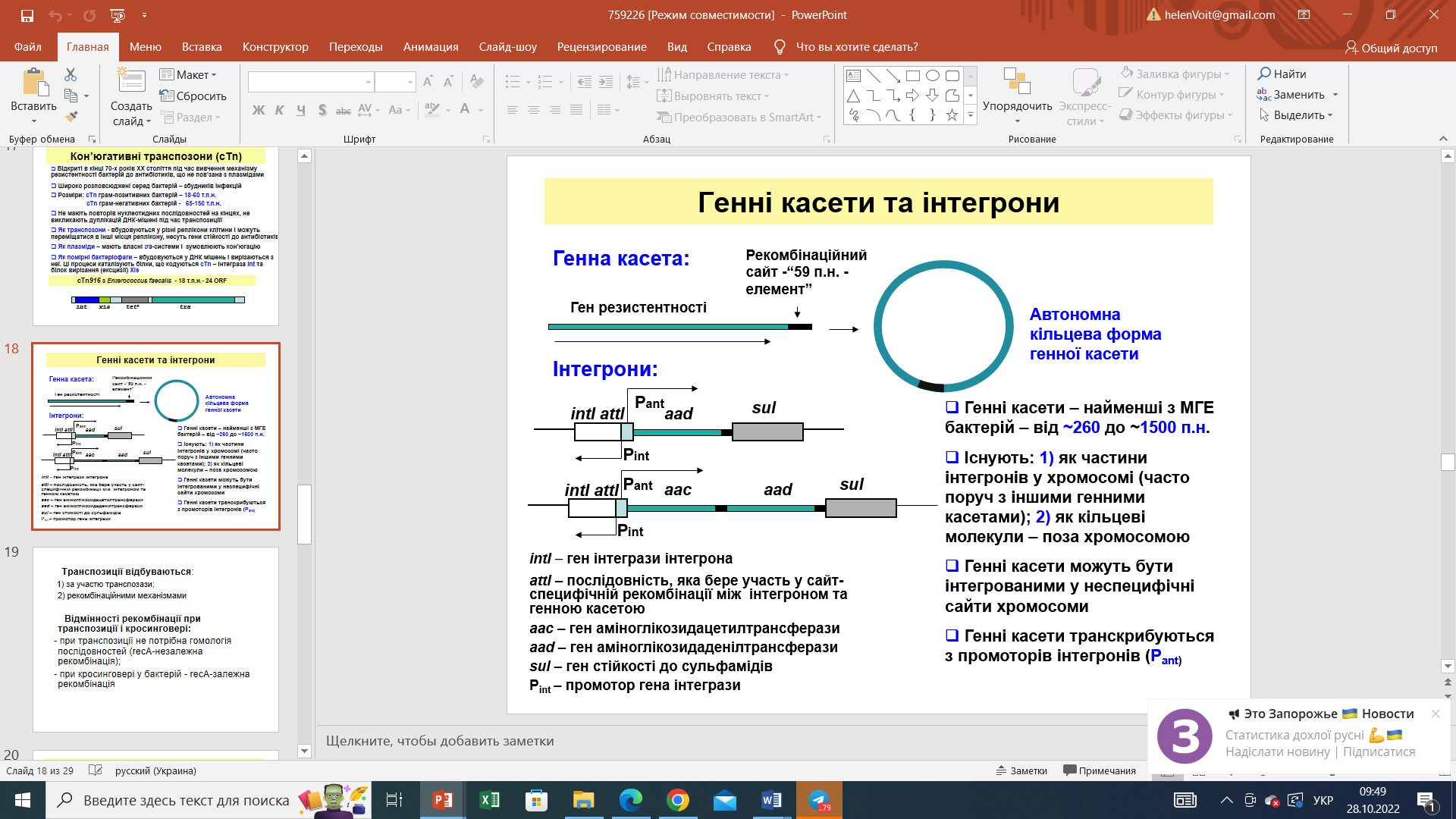
Найпростіше побудований інтегрон має такі основні компоненти, які забезпечують основну функцію інтеграції/видалення генів та спрямування їхньої експресії:

1) ген **intl,** що кодує сайт-специфічну рекомбіназу — інтегразу (IntI);

2) **att l** ділянку для інсерції генетичної касети (ГК);

3) промотор Рс , під який забудовується безпромоторна відкрита рамка зчитування (ВРЗ) **ГК** – **генетичної касети**. Такий модуль локалізований на 5'-кінці інтегрону.

Відомі на сьогодні ГК складаються з однієї або багатьох ВРЗ та асоційованих з ними рекомбінаційних ділянок, які мають центральну послідовність розміром 59 п. н., та звуться **59 п. н. або attC** елементами. Кільцева касета вбудовується в attl ділянку інтегрона або в рекомбінаційний attC сайт захопленої раніше касети через сайт-специфічну рекомбінацію, опосередковану інтегразою IntI .



Побудова attl І сайта у різних інтегронів є різною, за винятком однієї спільної ознаки: ці ділянки мають таку ж консенсусну послідовність ДНК, як і attC сайт ГК.

Такі численні події можуть призвести до багатьох забудов і утворення структури, яка може вбирати в себе велику кількість касет. В інтегронах кожен ген межує з attC елементом і, таким чином, у будь який час може бути видаленим з його контексту. Отже, ГК формують варіабельну частину інтегрона, стабільність якої залежить від умов існування організму.

Білки, які кодуються ГК, практично не представлені ферментами основних біохімічних схем, отже, вони не є життєво необхідними. Проте ці гени можуть кодувати додаткові функції, які надаватимуть бактеріям переваги у пристосуванні до нових умов довкілля.

інтегрони, за рідкісним винятком, не можуть самостійно мігрувати між бактеріями. Проте перебуваючи у складі МГЕ, вони знаходять все більше нових хазяїв. Деякі з них є частиною складних транспозонів і локалізуються на трансмісивних плазмідах, що дає їм змогу швидко розповсюджувати ГК та адаптувати бактерійні популяції до умов довкілля. Гени, які переміщуються серед прокаріотів разом з некодуючими послідовностями ДНК, формують метагеном популяції або пластичний додаток до основного геному. У деяких бактерій він складає до 1/5 геному