Лекція 6

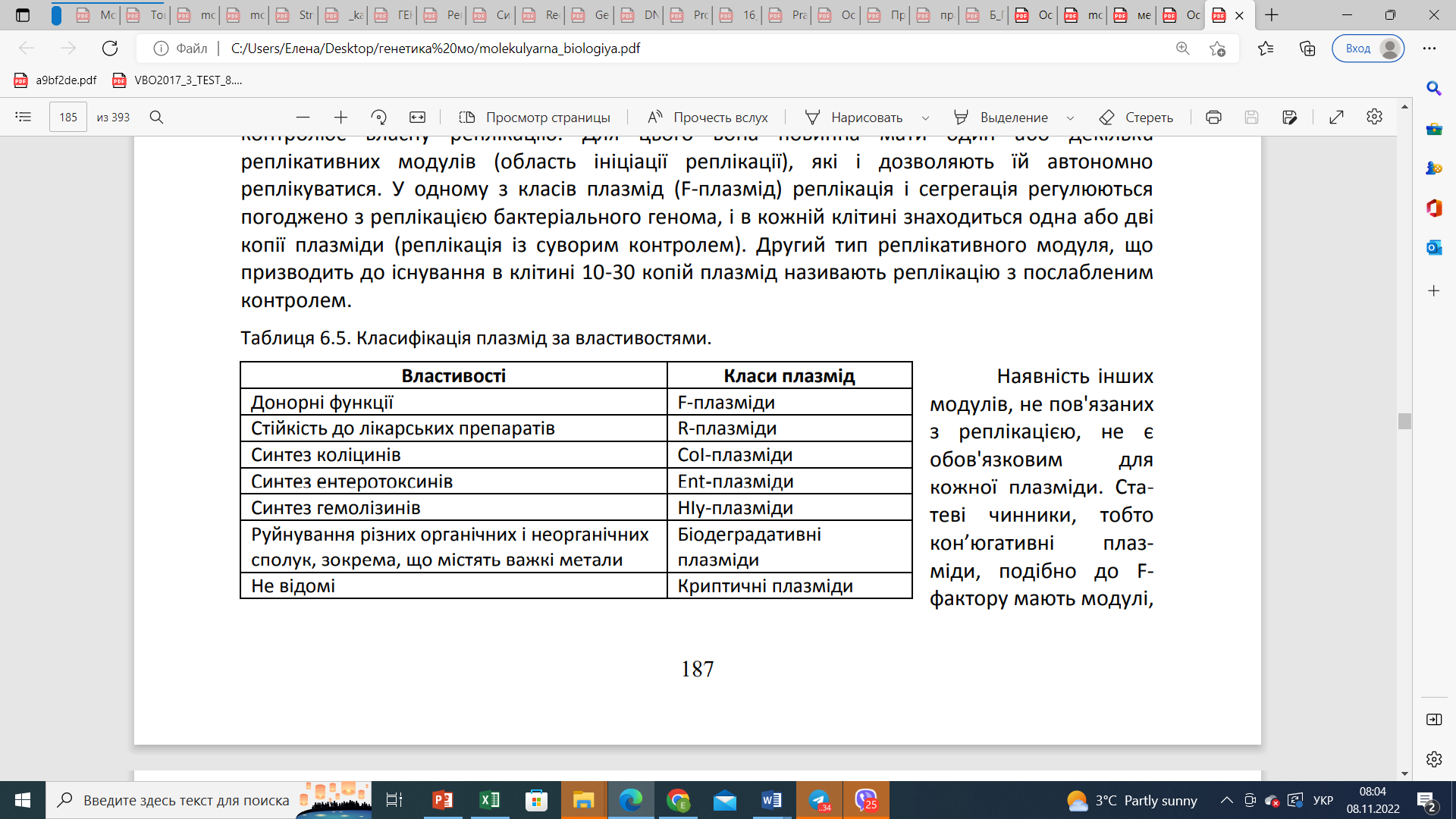
**Цитоплазматичні генетичні структури геному прокаріот (плазміди та епісоми)**

Геном бактерій, крім геномної ДНК, включає також цитоплазматичні ДНК-вмісні структури, здатні до автономної реплікації – плазміди. Це дволанцюгові кільцеві ДНК розміром від 0,1 до 5% розміру хромосоми. В одній клітині може бути кілька плазмід, сукупність яких називають плазмотипом. Наприклад, *Borrelia burgdorferi* B31 містить 17 плазмід загальним розміром порівнянним з геномним - 0,53 х 106 п.н. (Проти 0,91 х 106 п.н. у геномі).

Плазміди містять власні гени, які є необов’язковими для бактерій, а також гени, необхідні лише при існуванні їх за певних умов чи в певному середовищі. Геном багатьох плазмід містить гени, організовані у специфічні модулі: кон’югації, реплікації, стійкості до певних антибіотиків та інші. Типи плазмід різняться між собою за структурою та специфічними функціями, наявністю певних модулів, а також особливостями реплікації і транслокації – перенесення від клітин донора до клітин реципієнта.

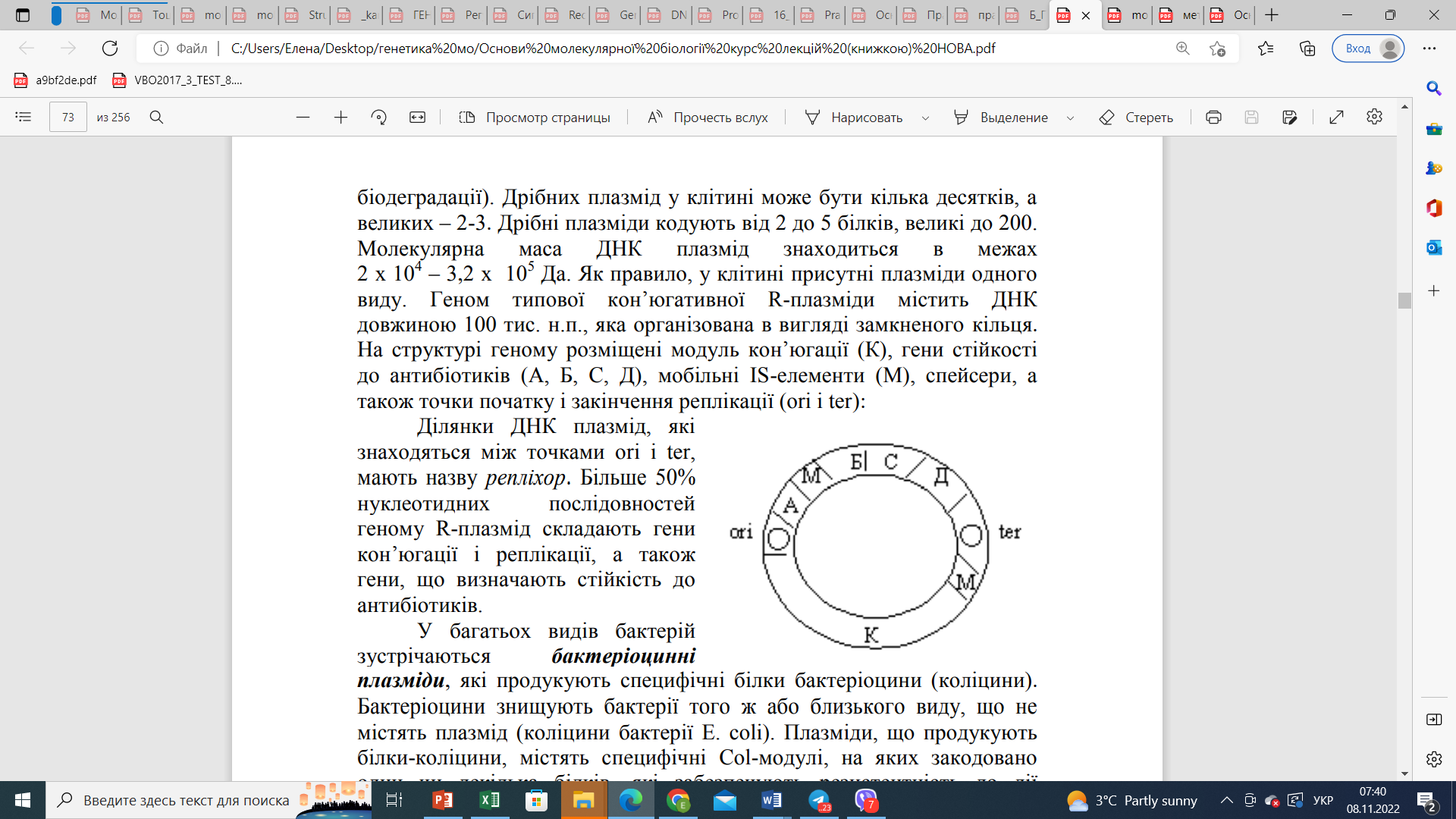
Зокрема, поширеними є плазміди, які містять модулі, що зумовлюють стійкість бактерій до одного чи кількох антибіотиків (так звані, фактори резистентності або R-фактори). Модулі цього типу містять гени, білкові продукти яких (н., β-лактамаза) інактивують антибіотики. Плазміди, які мають такі модулі, часто називають **R-плазмідами** (resistance - стійкість). Одна плазміда забезпечує стійкість до декількох антибіотиків, при цьому усі або декілька генів резистентності різного типу можуть бути згруповані в одному модулі. Ці плазміди порівняно великих розмірів і можуть стимулювати кон’югацію бактерій та поширюватися в бактеріальних популяціях.

Інші плазміди (**плазміди вірулентності**) визначають патогенність бактерій (збудників чуми, правця), кодуючи продукцію етеротоксинів і фімбрій або забезпечують їх здатність використовувати для росту і розвитку нетрадиційні джерела Карбону – вуглеводні нафти, камфору, саліцилову кислоту (**плазміди біодеградації**).



Дрібних плазмід у клітині може бути кілька десятків, а великих – 2-3. Дрібні плазміди кодують від 2 до 5 білків, великі до 200. Молекулярна маса ДНК плазмід знаходиться в межах 2 х 104 – 3,2 х 105 Да.

В одній клітині може міститися одночасно кілька типів плазмід (наприклад, статевий фактор і фактор бактеріоциногенії). Родинні плазміди, як правило, не можуть існувати в одній бактеріальній клітині. Це явище отримало назву несумісності і стало одним із факторів при класифікації плазмід. Несумісність плазмід зумовлена блокуванням процесу реплікації однієї з них, а також блокуванням розподілу дочірніх молекул ДНК між клітинами.

Геном типової кон’югативної R-плазміди містить ДНК довжиною 100 тис. н.п., яка організована в вигляді замкненого кільця. На структурі геному розміщені модуль кон’югації (К), гени стійкості до антибіотиків (А, Б, С, Д), мобільні IS-елементи (М), спейсери, а також точки початку і закінчення реплікації (оrі і ter).

Ділянки ДНК плазмід, які знаходяться між точками оrі і ter, мають назву **репліхор**. Для своєї реплікації плазміди використовують реплікативний апарат клітини-хазяїна, проте реплікація плазмід відбувається незалежно від хромосоми. Кожна плазміда є самостійним репліконом, сама контролює власну реплікацію.

Більше 50% нуклеотидних послідовностей геному R-плазмід складають гени кон’югації і реплікації, а також гени, що визначають стійкість до антибіотиків.

У багатьох видів бактерій зустрічаються **бактеріоцинні плазміди**, які продукують специфічні білки бактеріоцини (**коліцини**). Бактеріоцини знищують бактерії того ж або близького виду, що не містять плазмід (коліцини бактерії *Е. соlі*). Плазміди, що продукують білки-коліцини, містять специфічні Соl-модулі, на яких закодовано один чи декілька білків, які забезпечують резистентність, імунність до цього колицину і тим самим захищають клітину-продуцент від ушкоджень, які може викликати її власний засіб захисту. Зустрічаються у представників нормальної мікрофлори людини з частотою 1:1000 клітин. У клітині може бути більше 20 різних коліциногенів одночасно. Коліцин виробляється бактерією-носієм не завжди, а тільки у випадку певної індукції, під час якої активуються гени коліциногена. Індукція часто самовільна, іноді можна викликати індукцію штучно, наприклад опромінюючи ультрафіолетом чи діючи алкілуючими сполуками.

Розрізняють плазміди зі строгим контролем реплікації, що властиво великим плазмідам, і з ослабленим - для малих. У перших реплікація відбувається синхронно з подвоєнням бактеріальної хромосоми, вона забезпечується тими ж ферментами (ДНК-полімераза III), які здійснюють реплікацію хромосомної ДНК. Процес реплікації малих плазмід каталізується ДНК-полімеразою I. Характер реплікації плазмідної ДНК залежить не лише від типу плазміди, а і від бактерії-хазяїна. **Плазміди під сильним контролем бактеріальної хромосоми** – існують у вигляді 1 або 2 копій у цитоплазмі. **Плазміди під слабким контролем бактеріальної хромосоми** – існують у вигляді сотень (більше 200) копій у цитоплазмі.

За способом розмноження розрізняють кон’югативні і некон’югативні плазміди. **Кон’югативні або самотрансмісивні плазміди** мають кон’югативні модулі, структурні гени і регуляторні ділянки, необхідні для перенесення плазмід з однієї клітини до іншої. Трансмісивні плазміди кодують спеціальні ворсинки, *статеві пілі,* які з'являються на поверхні клітин, які містять плазміди, і здатні специфічно зв'язуватися з поверхнею безплазмідних клітин. Скорочення піля притягує клітини один до одного, і між ними утворюється місток, через який плазмідна ДНК може передаватися в нову клітину. Здатність передаватися в нові клітини - корисна властивість для плазмід, але лише великі плазміди можуть кодувати складну систему поверхневих змін клітини, що забезпечують кон'югацію.

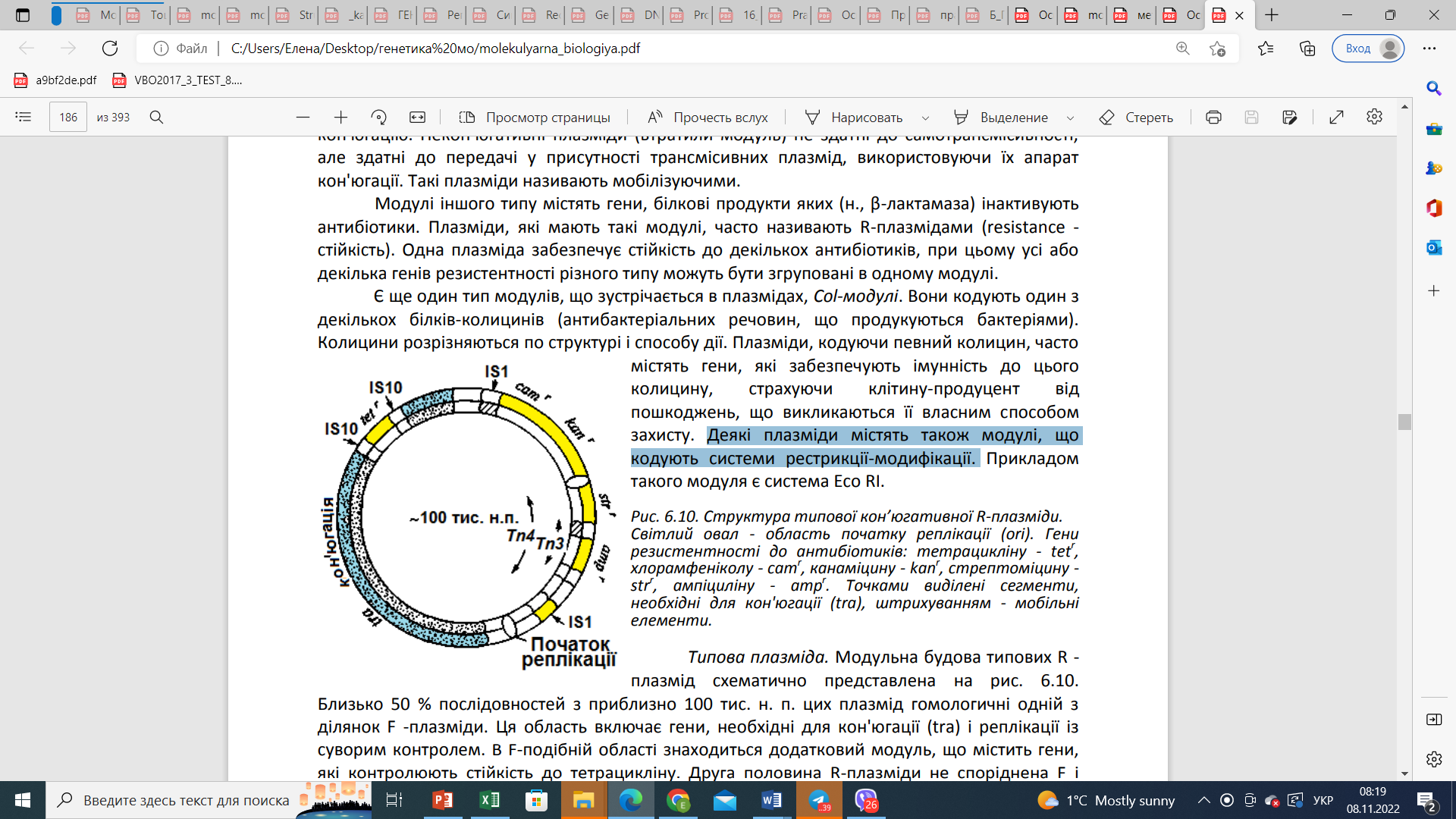
Для кон'югативних плазмід характерне явище поверхневого виключення, коли проходження плазмідної ДНК через клітинну стінку ускладнене, якщо в ній уже є плазміда з аналогічною детермінантою. Частота перенесення плазмід при цьому знижується в 10-100 разів.

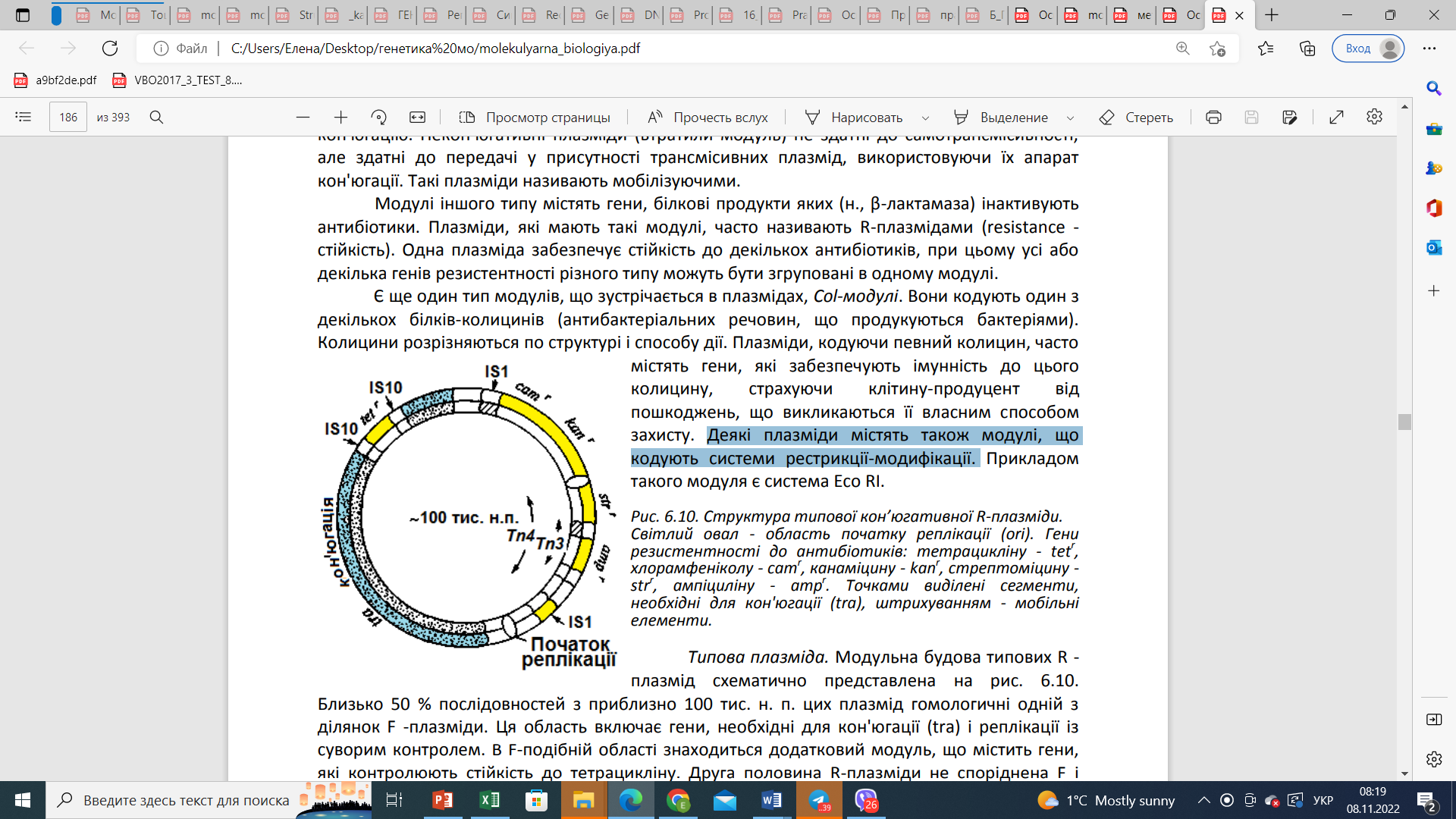
Класичними коньюгативними плазмідами є F-плазміди.

**Некон’югативні плазміди** не здатні до самотрансмісивності, однак за присутності трансмісивних плазмід, можуть використовувати для цього їх кон’югативний апарат. Ці плазміди отримали назву **мобілізуючих**.

Типова плазміда.

Модульна будова типових R - плазмід схематично представлена на рис.





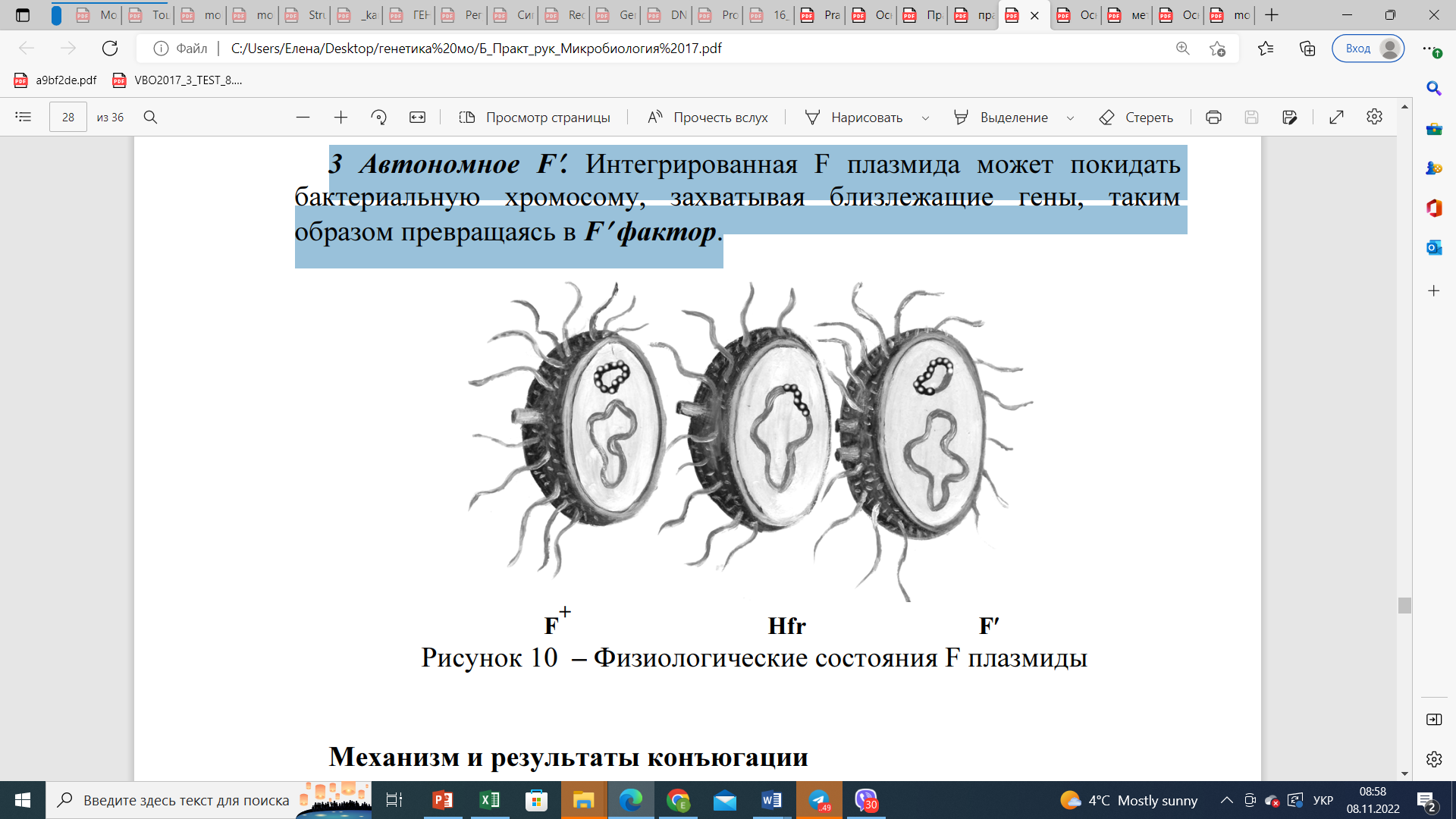
Інколи плазміди можуть включатися до складу хромосом бактерій. В цьому випадку вони мають назву **епісом**. Після вбудовування в геном клітини-реципієнта, епісоми можуть ініціювати генетичну рекомбінацію та зумовлювати зміни в ланцюгу процесів ген → білок → ознака, внаслідок включення чи блокування певних ділянок геному.

**Фізіологічні стани F плазміди:**

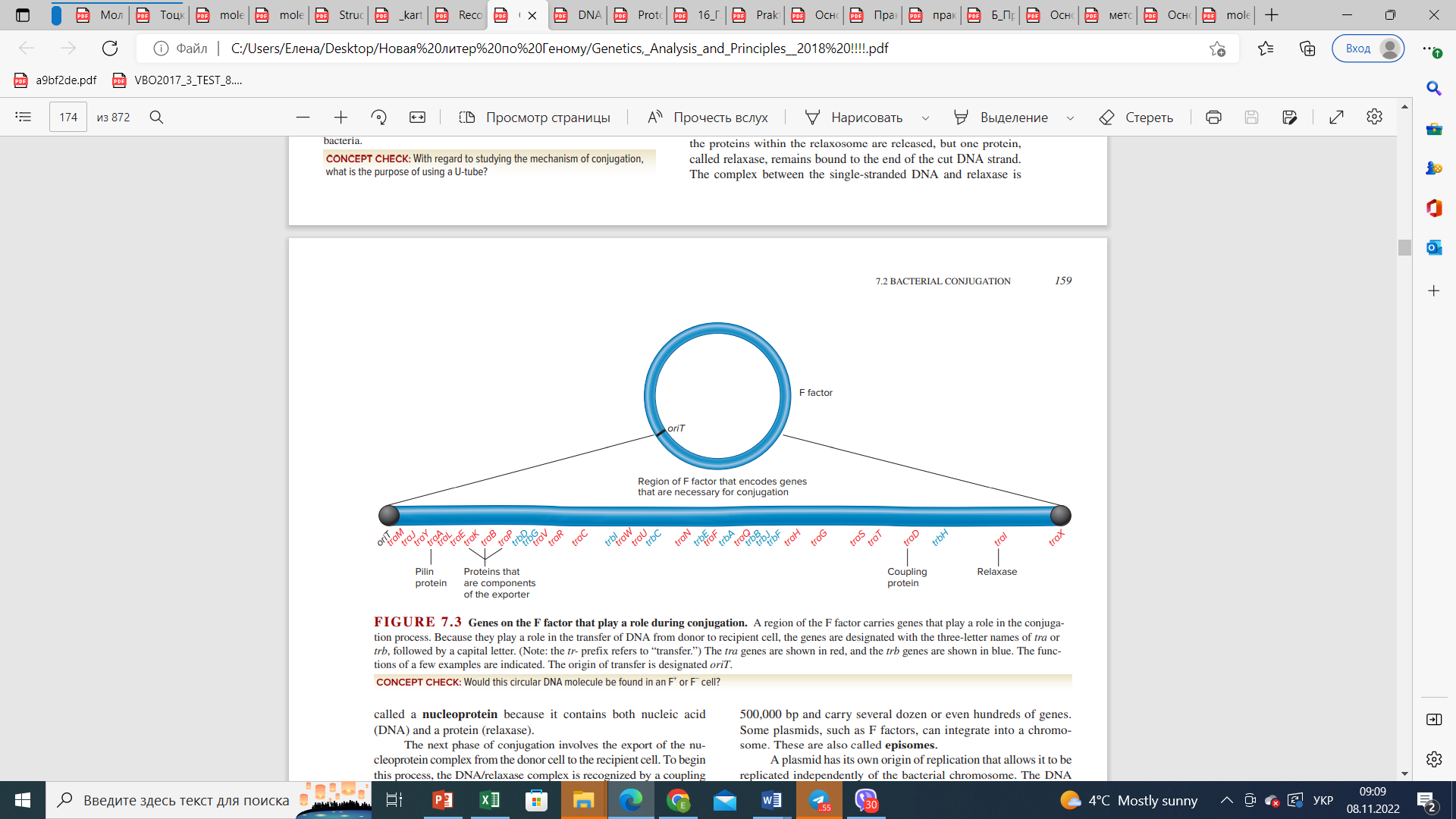
1 Автономне F+. F фактор знаходиться в цитоплазмі у вільному стані, не інтегрований в бактеріальну хромосому і не несе в в своєму складі хромосомні гени.

2 Інтегрований, або Hfr. F фактор може інтегруватися в певних місцях у бактеріальну хромосому, і в такому стані зветься епісоми. Донорські клітини з інтегрованим фактором F забезпечують високу частоту перенесення хромосомної ДНК, вони отримали назву клітин Hfr (від англ. High frequency of recombinants).

3 Автономне F′. Інтегрована F плазміда може залишати бактеріальну хромосому, захоплюючи довколишні гени, таким чином перетворюючись на F′ фактор.



Отже, фізична карта F-фактора F-фактор являє собою епісому розміром 94,5 kb. F-фактор містить гени tra – гени, що забезпечують кон’югаційний перенос, гени автономної реплікації ДНК і 0-пункт кон’югаційного переносу; інсерційні елементи IS3, γδ, IS2 - за допомогою яких F-фактор вбудовується у хромосому бактерій і перетворюється у Hfr; послідовності, що забезпечують гомологію між епісомою F і F-подібними плазмідами R1, R100, R6, ColV; послідовності генів резистентності щодо фагів Т3, Т7, φ11



Таким чином, для плазмід характерні специфічні спільні риси:

1 - автономна реплікація та стабільне успадкування;

2 - несумісність (дві, навіть близько споріднені плазміди, не можуть існувати в одній клітині);

3- здатність до кон’югації та переходу в реципієнтні клітини (функція перенесення);

4 - здатність надавати реципієнтним клітинам певних специфічних ознак: стійкості до дії одного чи кількох антибіотиків (тетрацикліну, пеніціліну, стрептоміцину) та використовувати для росту нетрадиційні джерела Карбону.

Присутність плазмід у клітинах бактерій надає їм певних переваг: забезпечує пристосування до зміни умов середовища, впливає на прояви патогенності бактерій тощо. Зокрема, на геномі плазмід може бути закодована інформація про структуру ентеротоксинів, гемолізинів, антигенів, розміщених на поверхні бактеріальних клітин.

Плазміди, виділені з різних бактеріальних клітин, можуть містити подібні модулі, тому є припущення, що між геномами плазмід постійно проходить обмін ними в вигляді інтактних фрагментів ДНК. Цим пояснюється значне поширення плазмід, які зумовлюють резистентність бактеріальних клітин до антибіотиків. Вивчення цих особливостей плазмід стало передумовою для ідентифікації мобільних генетичних елементів, які поширюються не лише між плазмідами, але і плазмідами та клітинними геномами, а також у межах бактеріальних геномів – IS -елементів, транспоонів, інтегронів. Ці послідовності завжди вбудовуються в інші молекули ДНК і ніколи не знаходяться у вільному стані, вони не можуть ініціювати власну реплікацію, а реплікуються разом з молекулою ДНК, в яку вони інтегровані. І саме плазміди часто є місцем їх локалізації.

Плазміди розповсюджуються між бактеріями по вертикалі - шляхом передачі від батьківської клітини дочірнім клітинам у процесі клітинного поділу або шляхом горизонтального перенесення між клітинами в популяціях бактерій незалежно від поділу.