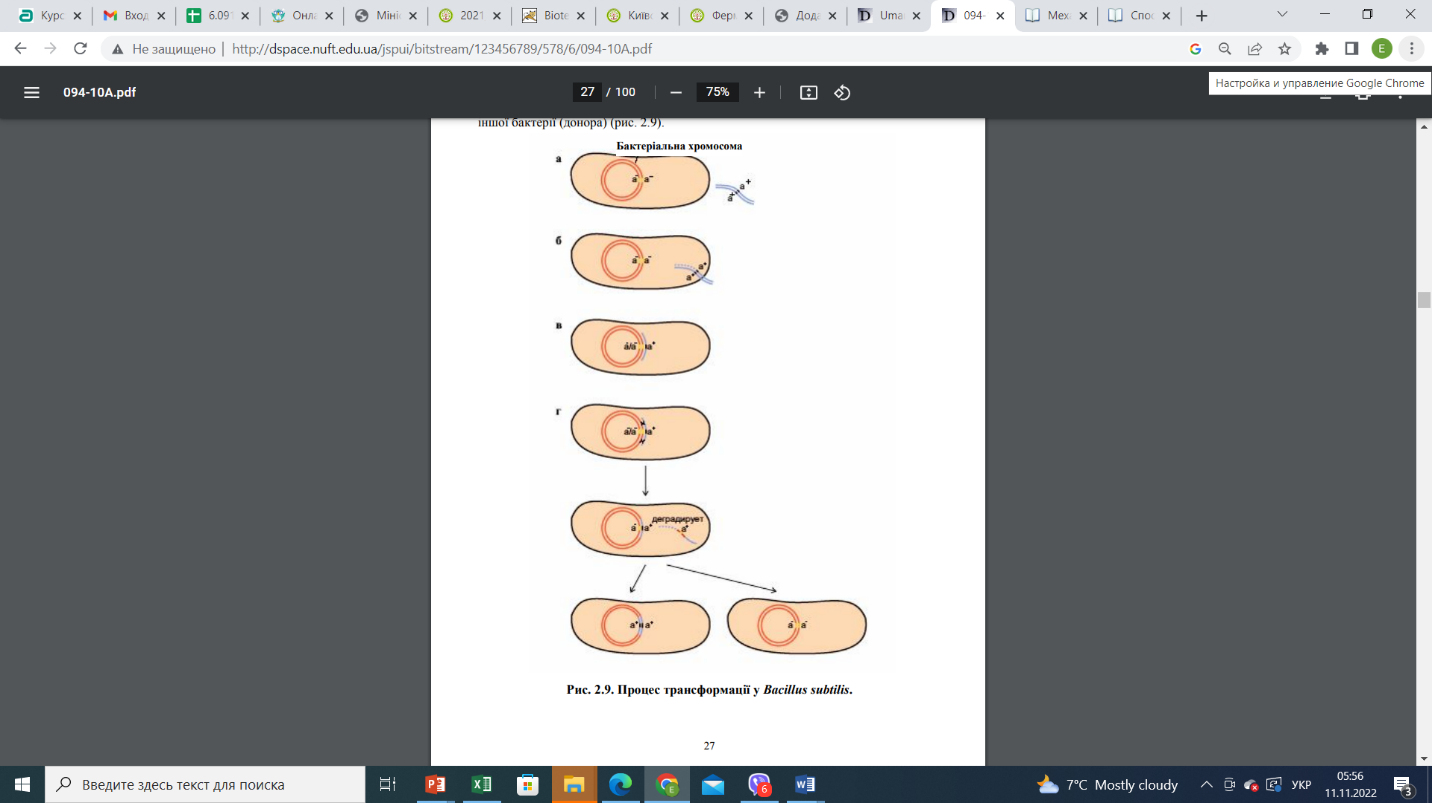
Лекція 7

**ПЕРЕДАЧА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ У БАКТЕРІЙ**

1. **Трансформація бактерій** – процес перенесення ДНК, ізольованої із одних клітин в інші. Трансформація була відкрита Ф. Гріффітсом у 1928 році на дослідах з пневмококами.

Відомі два штама пневмококів – S- і R-форми. Вірулентність бактерії визначається наявністю мукополісахаридної капсули (S-форма), яка захищає її від впливу з сторони організма-хазяїна. В результаті життєдіяльність цих бактерій приводить до смерті тварин. Бактерії S-форми при штучному культивуванні утворюють гладенькі блискучі колонії. Бактерії R-форми не мають капсули і уворюють шоруховаті колонії. R-штам пневмококів непатогенний для мишей. Але, якщо мишам одночасно ввести убиті S-клітини і живі R-клітини, то миші помирають.

У 1944 році О. Евері, К. Маклеод и М. Маккарті доказали, що цей процес пов’язаний з перенесенням ДНК. В природних умовах позаклітинна ДНК утворюється при лізисі прокаріот.

 При трансформації одна бактерія (реципієнт) поглинає ізольовану ДНК іншої бактерії (донора). (рис. Процес трансформації у Bacillus subtilis).

а) Донорна дволанцюгова молекула ДНК має а + алель якогось гена, а реципієнтна бактерія має а- алель гена. Трансформуюча ДНК приєднується до рецепторних сайтів на поверхні клітини-реципієнта та проникає до клітини;

б) Під впливом бактеріальних нуклеаз дволанцюгова донорна ДНК перетворюється на одноланцюгову структуру;

в) Одноланцюгова донорна ДНК спарюється з гомологічним районом хромосоми реципієнта, формуючи трьохланцюгову структуру;

г) Подвійний кросинговер продукує рекомбінантну а + /а- молекулу ДНК – гетеродуплекс (ділянка дволанцюгової ДНК, на якій не у всіх нуклеотидних парах азотисті основи зв’язані водневими зв’язками; тобто один ланцюг власної бактеріальної ДНК + ланцюг донорної ДНК)) і лінійний а - -фрагмент ДНК, який руйнується. Після поділу такої клітини одна частина потомків будуть а+ - трансформантами, а інша половина матиме батьківський а- -генотип.

Здатність клітини до трансформації можлива при особливому стані, який називають компетентністю. У компетентних клітин змінюється склад клітинної стінки і плазмолеми: стінка стає пористою, а плазмолема утворює багаточисельні впячування, на зовнішній поверхні клітинної стінки з’являються особливі антигени – фактори компетентності (зокрема, специфічні білки з низькою молекулярною масою). Збільшити компетентність клітини можна деякими хімічними агентами або дією сильного електричного поля.

**Процес трансформації можна розділити на кілька стадій**:

1. Зворотнє приєднання молекул дволанцюгової донорної ДНК до рецепторних сайтів на поверхні клітини-реципієнта. На цій стадії ДНК донора чутлива до дії ДНКази.

2. Незворотнє поглинання ДНК донора. Ця та наступні стадії нечутливі до дії ДНКази.

3. Перетворення дволанцюгової ДНК донора в одноланцюгові фрагменти під дією клітинних нуклеаз.

4. Ковалентне приєднання одноланцюгової ДНК донора до хромосоми реципієнта і рекомбінація генетичного матеріалу.

5. Фенотипова експресія інтегрованого гена донора у трансформованій клітині.

Таким чином при трансформації відбувається не додавання нових генів, а заміна генів реципієнта на частково гомологічні нуклеотидні послідовності.

Частота трансформації у прокаріот залежить від властивостей трансформуючої ДНК, від її концентрації, від стану клітини-реципієнта, від виду бактерій. Максимальна частота трансформованих клітин не перевищує 1 на 100 клітин.

Трансформація відома також і для еукаріот. Але на поверхні еукаріотичних клітин відсутні рецепторні сайти для приєднання трансформуючої ДНК, тому донорну ДНК штучно вводять у еукаріотичні клітини шляхом мікроін’єкції.

1. **Кон’югація.**

Процес кон’югації у бактерій *Escherihia coli* був відкритий у 1946 р. Дж. Ледербергом і Е. Тейтумом.

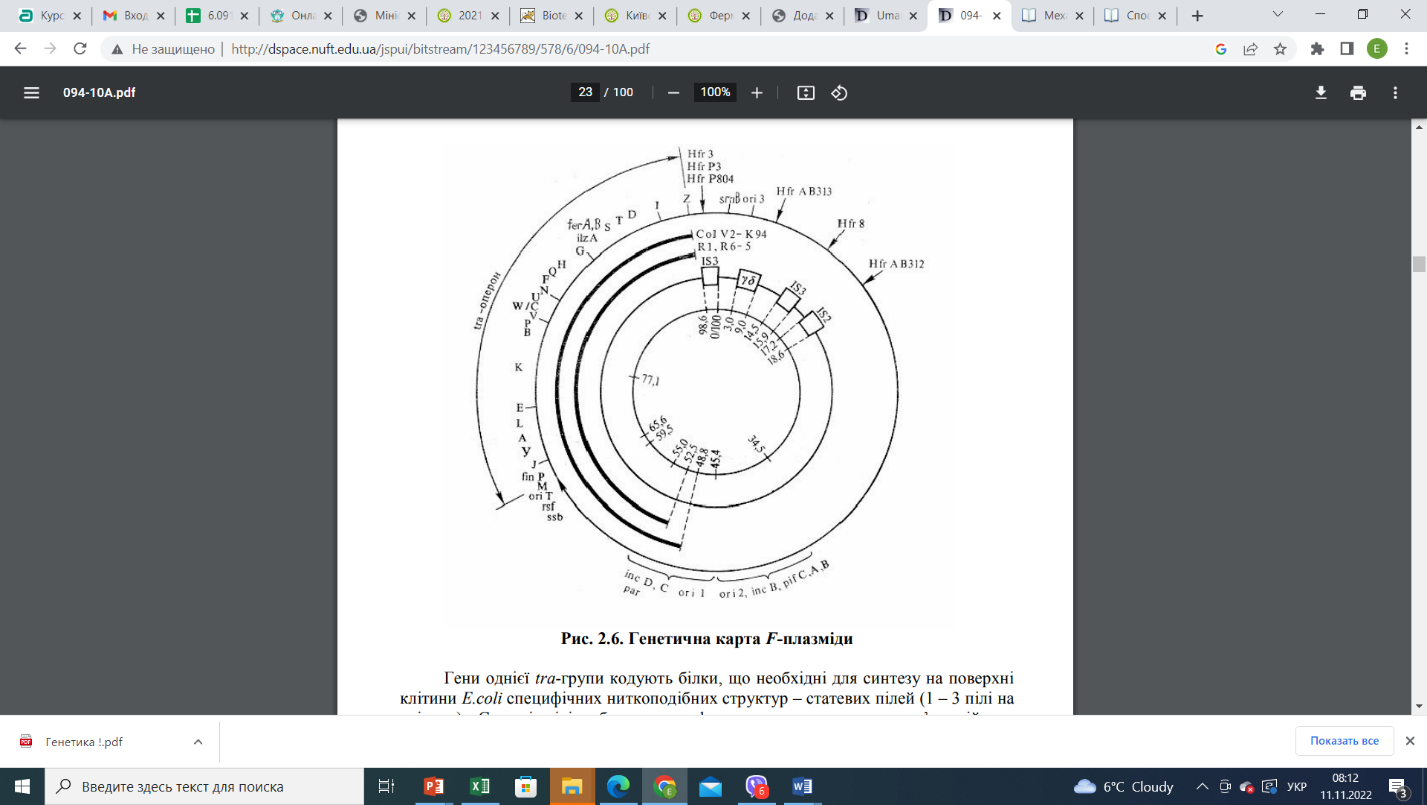
Хоча бактерії розмножуються шляхом клітинного поділу, у них спостерігається також своєрідний "статевий процес" перенесення генетичного матеріалу від однієї клітини до іншої. Таке перенесення відбувається під час **кон'югації** ñ безпосереднього контакту між клітинами. Залежить кон'югація від присутності в одній із клітин особливої плазміди - **F-фактора (фактора фертильності)** - яка, як і багато інших плазмід, може існувати автономно, а може вбудовуватись у бактеріальну хромосому шляхом сайт-специфічної рекомбінації.

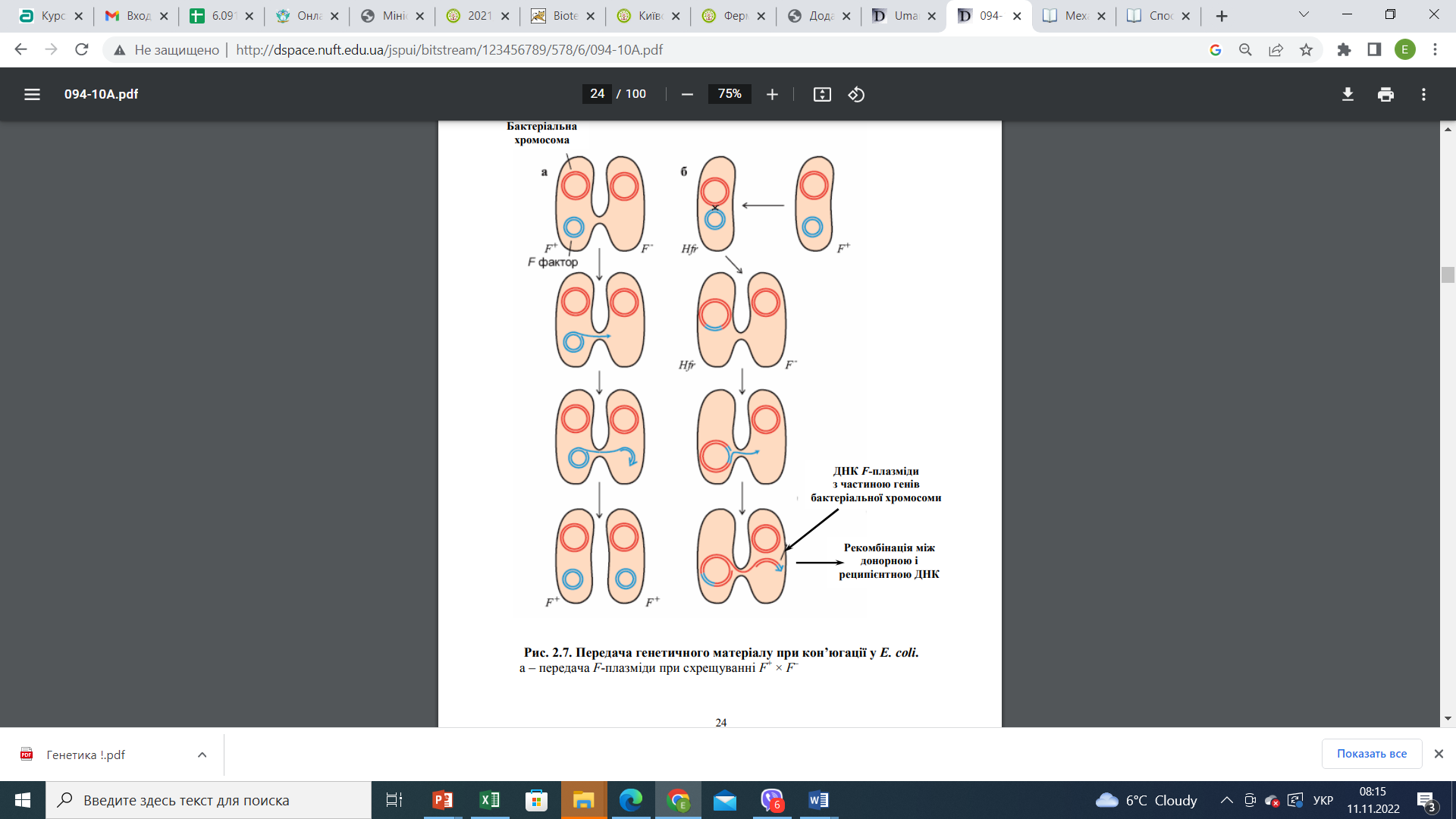
В *E. c*oli існує два "статеві" типи клітин, що позначаються як F+ і F-, кон'югація супроводжується перенесенням ДНК від клітини F+ до F-. У бактерій E. coli клітина-донор (чоловіча клітина) має продовгувату форму, а клітина-реципієнт (жіноча клітина) – заокруглену. Клітина-донор утворює статеві ворсинки (пілі), які притягують її до клітини-реципієнта і створюють цитоплазматичний канал, через який ДНК із клітини-донора переходить у клітину-реципієнт.

F–плазміда має довжину біля 100 т.п.н. На даний момент вивчено більше 60 генів F–плазміди, зокрема таких, які відповідають за її автономну реплікацію (гени *rep*), здатність забезпечувати перенесення генетичного матеріалу в процесі кон’югації (гени *rep)*, несумісність з іншими плазмідами (гени *inc*) та ін.

Одна із основних властивостей F-плазміди полягає у тому, що вона забезпечує бактеріальні клітини здатністю бути донорами генетичного матеріалу (кон’югативність), тобто можливість вступати у кон’югацію з безплазмідними (реципієнтними) клітинами і передавати їм певну генетичну інформацію. Ця властивість F-плазміди детермінується генетичною областю *tra* (від англійського transfer – перенесення), яка містить більше 20 tra-генів. В залежності від контролюємих ними функцій tra-гени F-плазміди класифікують на кілька груп.

Гени однієї tra-групи кодують білки, що необхідні для синтезу на поверхні клітини E.coli специфічних ниткоподібних структур – статевих пілей (1 – 3 пілі на клітину). Статеві пілі забезпечують формування первинного кон’югаційного контакта клітини-донора і клітини-реципієнта. Подальше скорочення пілей призводить до зближення кон’югуючих клітин і утворенню між ними поверхневого контакта (кон’югаційного містка), який необхідний для одностороннього перенесення генетичного матеріалу від донора до реципієнта.

 Інші гени tra-області детермінують синтез білків, що забезпечують метаболізм самого процесу кон’югації і переносу ДНК. До них відносяться ферменти ендонуклеази, які розрізають кільцеву молекулу плазмідної ДНК, перетворюючи її у лінійну структуру, що є обов’язковою умовою для перенесення такої молекули із клітини-донора до реципієнтної клітини. Отже, специфічна нуклеаза робить одноланцюговий розріз у ДНК F-фактора, інтактний ланцюг слугує матрицею для добудови 3'-кінця, що залишився в місці розрізу, - відбувається реплікація кільцевої ДНК F-фактора за так званим типом кільця, що котиться (такий механізм реплікації використовується також для копіювання ДНК багатьох бактеріофагів). Процес добудови 3'-кінця виштовхує 5'-кінцеву одноланцюгову ділянку, яка проникає у клітину F-, де використовується як матриця для синтезу другого ланцюга ДНК. У результаті клітина F- перетворюється на F+.

Частота кон'югації та подвоєння і перенесення F-фактора є невисокою (~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*). У бактеріальній хромосомі є біля 20 сайтів інтеграції F-плазміди.

При кон'югації клітин F- і Hfr вбудований F-фактор ініціює реплікацію за типом кільця, що котиться, цілої бактеріальної хромосоми: у клітині Hfr хромосома відновлюється, у клітину F- переноситься її копія. Насправді ж ціла хромосома потрапляє до клітини F- дуже рідко - як правило, відбувається порушення кон'югаційної трубки й розрив хромосоми, котра переноситься, ( це не порушує вихідну хромосому у клітині Hfr - там завжди є інтактний ланцюг ДНК, який може бути використаний у ролі матриці для відновлення цілісності дволанцюгової молекули). Оскільки на початку процесу в клітину F- потрапляє лише частина F-фактора, а щоб він опинився там повністю, вихідна хромосома має зробити повний "оберт", як правило, клітина F- не перетворюється на F+ при кон'югації з клітиною Hfr.

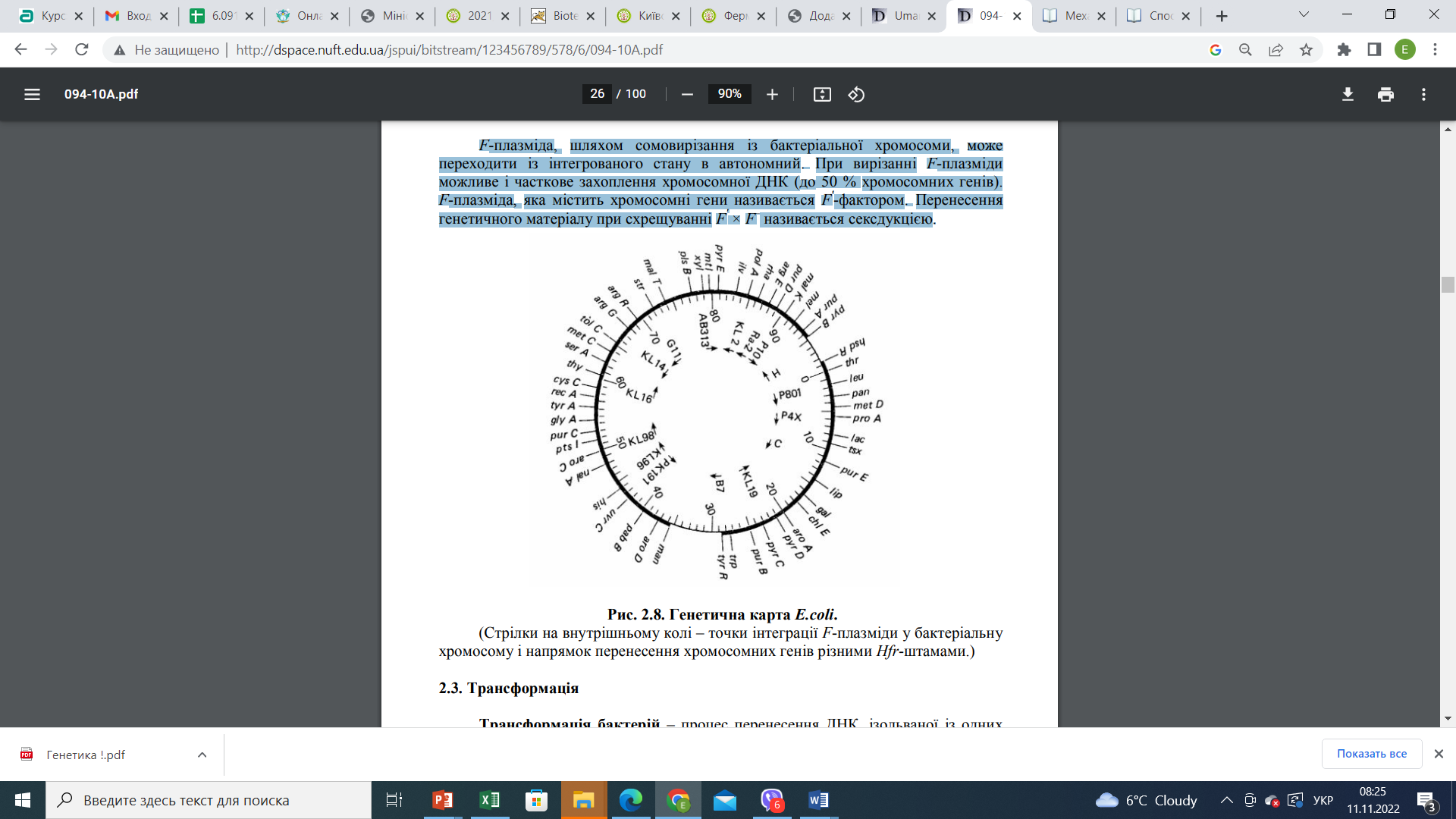
Отже, генетичний матеріал переноситься від донора до реципієнта однонаправлено і у строгій лінійній послідовності. Якщо різко струснути кон’югуючі бактерії (у спеціальному апараті-блендері), то вони роз’єднаються. В залежності від тривалості кон’югації до струшування у F – -клітину буде перенесена більша чи менша частина плазмідної ДНК. За 1 хвилину передається приблизно 40 т.п.н. , тобто близько 1 % бактеріальної хромосоми. Відповідно на перенесення усієї хромосомної ДНК E.coli необхідно приблизно 100 хв.

Чим більша тривалість кон’югації, тим більша вірогідність перенесення даного гена. Це дає можливість скласти генетичну карту бактірії у хвилинах кон’югації. Тобто одиницею карти є хвилина кон’югації – кількість ДНК, що передається Hfr-клітиною за 1 хвилину. Відлік часу починається в точці 0, де знаходиться оперон, що складається з трьох генів, які контролюють біосинтез треоніну (thr). Відповідно, якщо Fплазмідна ДНК буде інтегрована в цьому місці хромосомної ДНК, то при кон’югації в першу чергу до клітини-реципієнта будуть перенесені thr-гени. Гени lac перенесуться через 8 хвилин, гени recE – через 30 хвилин, гени argR – через 70 хвилин і т.д.

Коли в клітині F- опиняється частина гомологічної ДНК іншої бактерії, починається гомологічна рекомбінація - обмін ділянками між донорною ДНК і ДНК клітини-реципієнта. Результуюча клітина-реципієнт залишається гаплоїдною -"зайва" ДНК, що не потрапила до хазяйської хромосоми, піддається деградації нуклеазами, оскільки вона не є кільцевою. Таким чином, між двома бактеріальними штамами відбувається своєрідне часткове схрещування, яке можна досліджувати за допомогою звичайних методів генетичного аналізу. Розглянемо, наприклад, схрещування Hfr-штаму дикого типу за генами *thr+* та *leu+* (визначають здатність синтезувати відповідні амінокислоти), який містить також ген чутливості до стрептоміцину *StrS*, із шт-, що має ген стійкості до стрептоміцину *StrR* і мутантні гени *thr-* та *leu-* (ауксотрофний штам, який потребує присутності відповідних амінокислот у поживному середовищі):

Hfr*, thr+ leu+ StrS* × F-, *thr- leu- StrR*.

З певною частотою в такому схрещуванні утворюються рекомбінантні бактерії дикого типу F-, *thr+ leu+ StrR*, які можна відібрати, вирощуючи культуру на середовищі зі стрептоміцином.

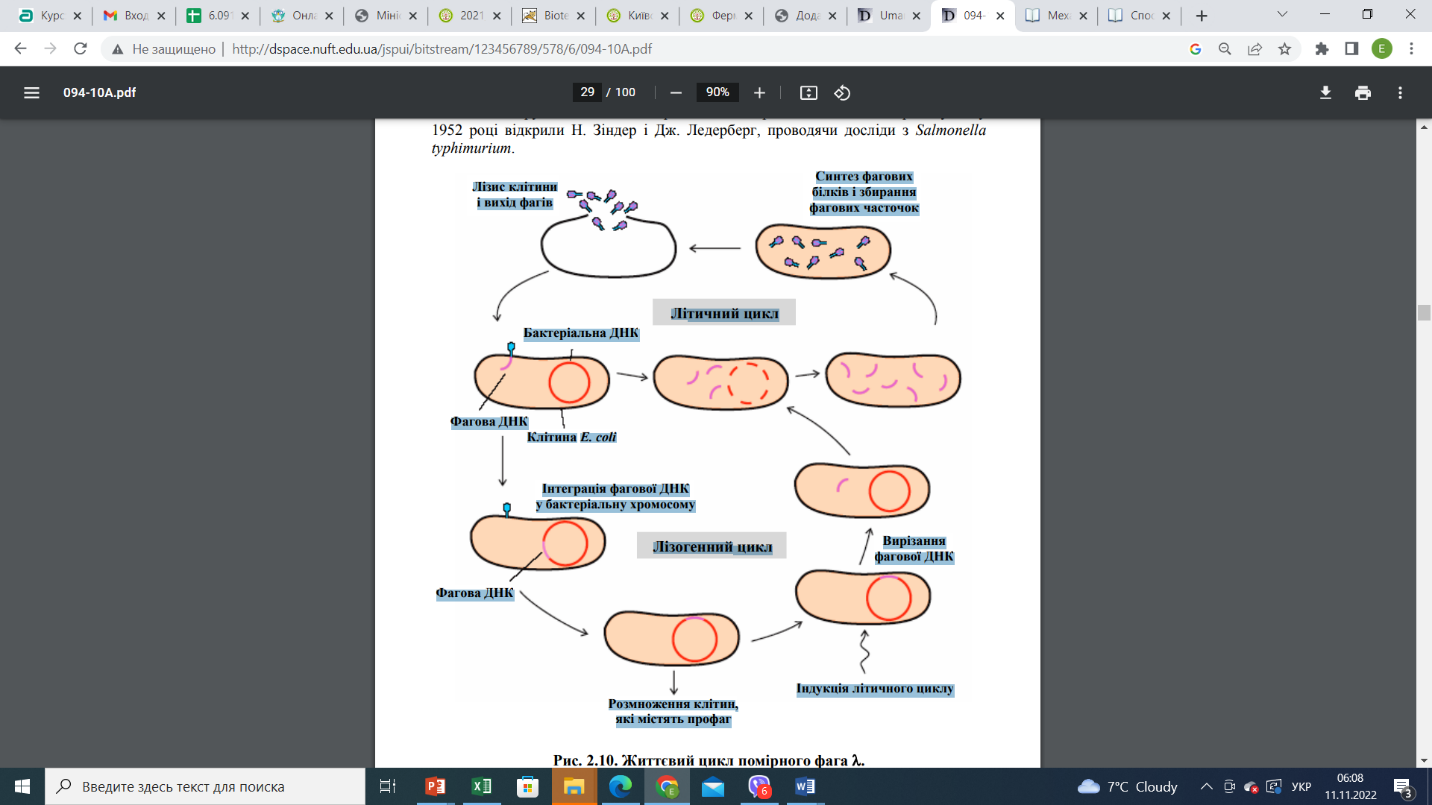
Оскільки перенесення генів із клітини Hfr у F- відбувається послідовно, починаючи із сайта інтеграції F-фактора, можна картувати розміщення генів у бактеріальній хромосомі (у порядку потрапляння їх до клітини F-). Для цього кон'югацію (після змішування клітин двох типів у рідкому середовищі) зупиняють шляхом струшування пробірки через певні проміжки часу. Це дозволило свого часу отримати детальні генетичні карти бактеріальної хромосоми (відстані на таких картах вимірюють у хвилинах) і довести її циркулярність.

F-плазміда, шляхом сомовирізання із бактеріальної хромосоми, може переходити із інтегрованого стану в автономний. При вирізанні F-плазміди можливе і часткове захоплення хромосомної ДНК (до 50 % хромосомних генів). F-плазміда, яка містить хромосомні гени називається F ′ -фактором. Перенесення генетичного матеріалу при схрещуванні F ′ × F – називається **сексдукцією.**

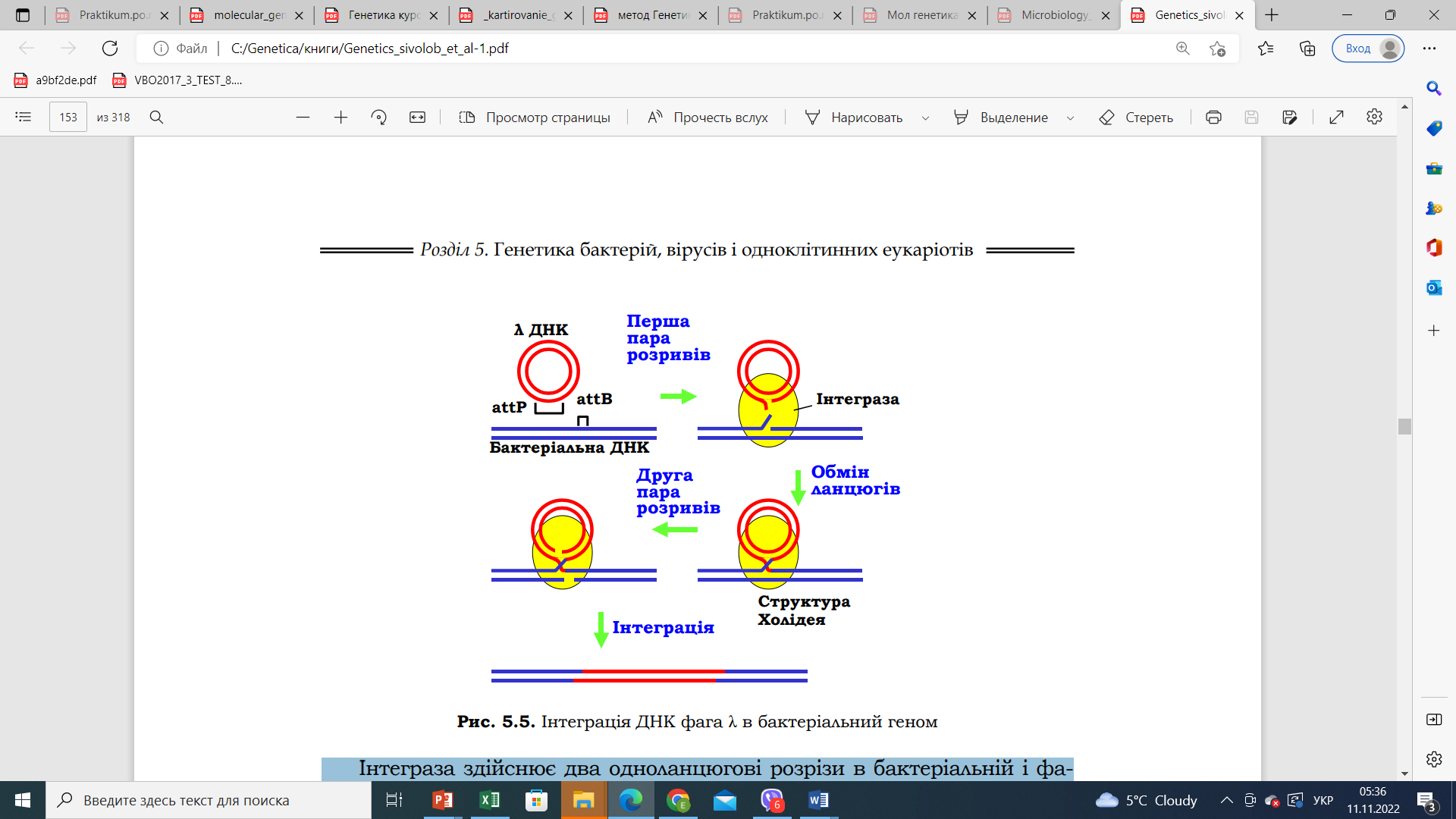
Після такого перенесення можна отримати частково диплоїдні клітини ñ за генами, що перебувають у складі F'-фактора. Між останнім і хромосомою клітини-реципієнта можлива гомологічна рекомбінація, що приводить або до утворення Hfr-клітин і дуплікації генів (одиночний кросинговер ñ вбудовування F'-фактора у хромосому), або до обміну ділянками між хромосомою та F'-фактором (подвійний кросинговер).

1. **Трансдукція**

Бактеріофаги (бактеріальні віруси) поділяють на два типи: вірулентні, які проникають у клітину, розмножуються та зумовлюють руйнування клітини (літичний шлях), і помірні ñ такі, що можуть використовувати або літичний шлях, або шлях лізогенії, коли ДНК фага за допомогою сайт-специфічної рекомбінації вбудовується в бактеріальний геном (фаг перетворюється на профаг). В останньому випадку за несприятливих для бактерії умов може відбуватися індукція бактеріофага - перехід до літичного шляху.

Процес перенесення генетичного матеріалу між бактеріальними клітинами за рахунок активності бактеріофагів називають **трансдукцією.** Здійснюють її зазвичай помірні бактеріофаги: після практично необмеженого існування фагової ДНК у бактеріальному геномі, індукція іноді зумовлює вирізання фагової ДНК разом із бактеріальними ділянками. Далі відбувається реплікація цієї ДНК, синтез білків оболонки бактеріофага (закодованих у генах фагової ДНК) і збирання фагових частинок. Фагові частинки потім інфікують інші клітини, і якщо реалізується шлях лізогенії, вбудовуються в ДНК клітини-хазяїна разом із захопленими раніше бактеріальними генами. Вірусна ДНК інтегрує у бактеріальну хромосому, а, принесена з вірусною, ДНК чужорідної бактеріальної клітини рекомбінує з ДНК бактеріальної хромосоми інфікованої клітини. В результаті цього близько 50 % клітин виявляються трансформованими.

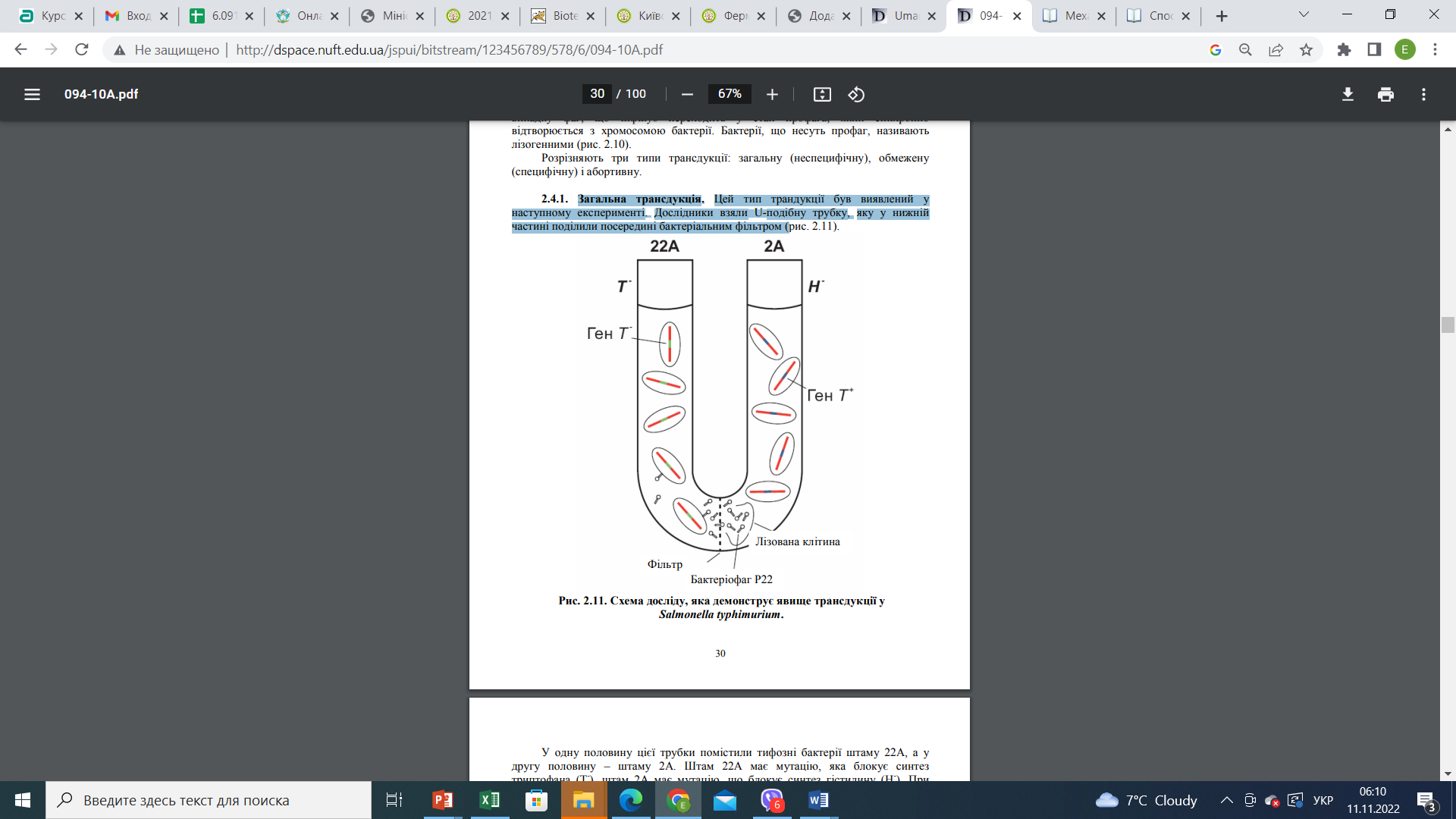
До помірних фагів належать, зокрема, фаги Р1, Р22, λ. ДНК помірних фагів може розглядатися як частина бактеріального геному, яка іноді виходить з під контролю: гени бактеріофага жодним чином не відрізняються від бактеріальних, тобто перебувають під контролем промоторів, що впізнаються бактеріальною РНК-полімеразою клітини-хазяїна.

Приклад сайт-специфічної рекомбінації - інсерція (інтеграція) ДНК бактеріофага λ в бактеріальну хромосому. У складі фагової ДНК є сайт *attP* - ділянка довжиною 270 пар основ, у складі бактеріальної ДНК сайт attВ (23 пари основ). Обидва сайти мають ділянку спільної (або гомологічної) послідовності довжиною 15 пар основ. Два білки - бактеріальний IHF (Integration Host Factor) і продукт одного з генів бактеріофага *інтеграза* зв'язуються з цими сайтами.

Інтеграза здійснює два одноланцюгові розрізи в бактеріальній і фаговій ДНК, після чого відновлює фосфодіефірний зв'язок, але з відповідним кінцем іншого дуплекса - відбувається обмін ланцюгами. На цьому етапі утворюється конфігурація чотирьох ланцюгів. Після цього здійснюється друга пара розривів і обмінів ланцюгами, що й зумовлює інтеграцію.

Розрізняють три типи трансдукції: загальну (неспецифічну), обмежену (специфічну) і абортивну.

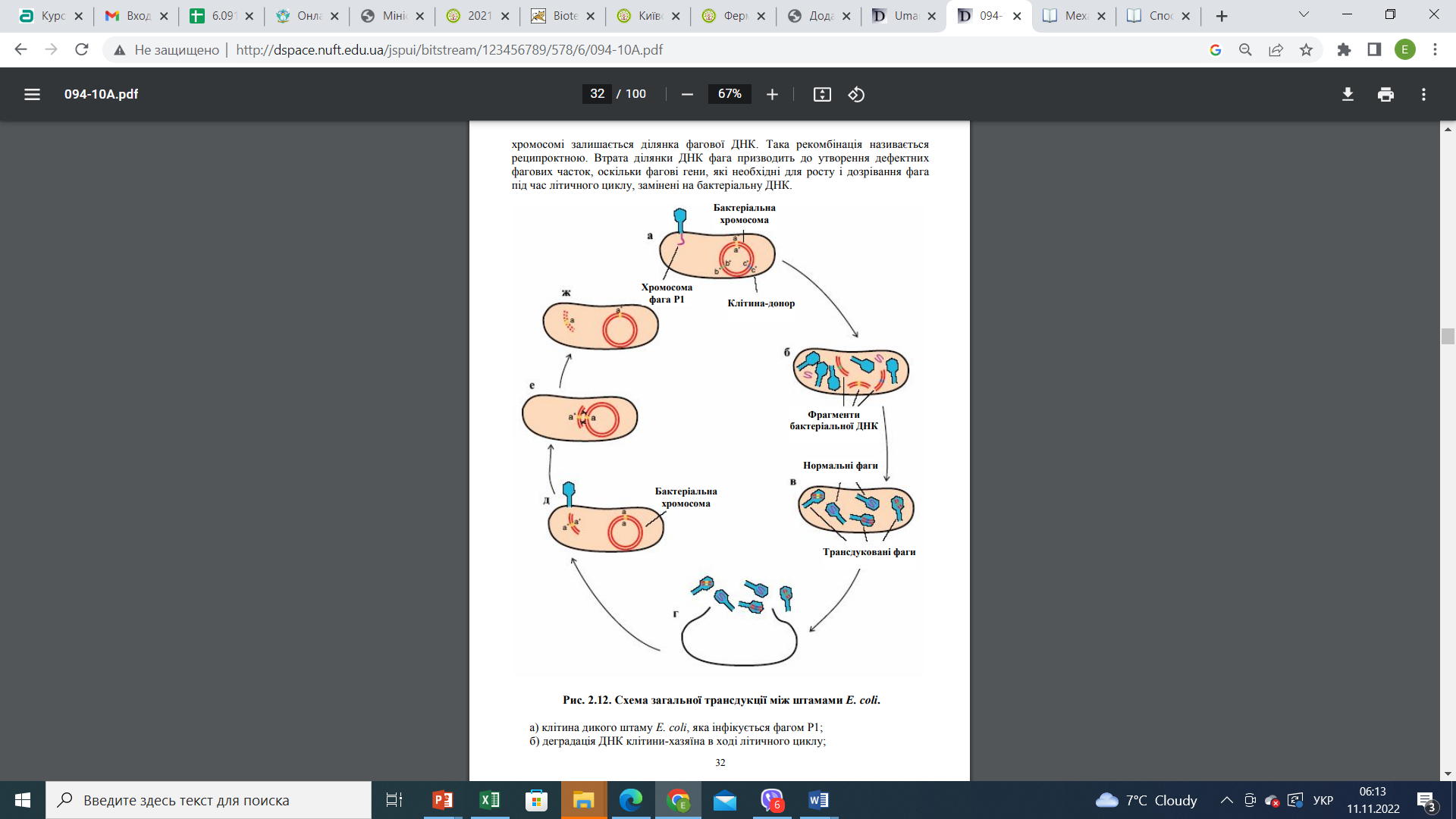
**Загальна трансдукція**. Цей тип трандукції був виявлений у наступному експерименті. Дослідники взяли U-подібну трубку, яку у нижній частині поділили посередині бактеріальним фільтром.

У одну половину цієї трубки помістили тифозні бактерії штаму 22А, а у другу половину – штаму 2А. Штам 22А має мутацію, яка блокує синтез триптофана (Т - ), штам 2А має мутацію, що блокує синтез гістидину (Н - ). При цьому бактеріальні клітини не можуть проходити через фільтр.

Після інкубації у трубці, розділеній бактеріальним фільтром, цих різних штамів, був зроблений висів клітин обох штамів. При висіві клітин штаму 22А на середовище без триптофана було виявлено невелику кількість колоній. Тобто деякі клітини набули здатності синтезувати триптофан і змогли дати колонії на середовищі без цієї амінокислоти. Фільтрующимся агентом, який переніс ген Т+ від штаму 2А до штама 22А, виявився бактеріофаг.

При загальній трансдукції фрагменти бактеріальної ДНК донора випадково включаються у дозріваючу фагову часточку разом з фаговою ДНК або, навіть, замість неї.

При загальній трансдукції бактерія-донор через фаг передає лише окремий фрагмент ДНК довжиною 1/50 – 1/100 від усієї бактеріальної хромосоми. Виявлення котрансдукування двох або більше генів вказує на їх зчепленість, а по частоті такої котрансдукції можна говорити про порядок розташування генів на генетичній карті. Наприклад якщо гени a і b, а також b і с котрансдукуються попарно, а гени а і с не котрансдукуються, то відповідно вони локалізуються у хромосомі у порядку а – b – с.

 Величина трансдукованого фрагмента визначається розміром ДНК донора, яка здатна упакуватись в головку фага. Доказано, що у часточках трансдукуючого фага практично вся фагова ДНК замінена на бактеріальну. Оскільки ДНК фага Р1 складається приблизно із 102 т.п.н., а хромосома E. сoli – із приблизно 4´103 т.п.н, то фрагмент бактеріальної хромосомної ДНК, який здатний включитись у трансдукуючіу часточку, складає біля 2,3 % хромосоми E. сoli. Якщо виходити з того, що довжина середнього гена дорівнює 1 т.п.н., то при трансдукції фагом Р1 можливе сумісне перенесення близько 100 генів, а фагом Р22 – близько 40.

**Обмежена трансдукція.** Даний тип трансдукції був описаний у 1956 році Дж. і Е. Ледербергом і М. Морзе.

При обмеженій трансдукції відбувається рекомбінація між фаговою і хромосомною бактеріальною ДНК, тому фагові трансдукуючі часточки обов’язково мають ДНК обох типів.

Трансдукцію сусідніх ділянок ДНК здійснюють тільки фагові часточки, які отримані в результаті індукції лізогенних бактерій (наприклад, шляхом їх УФопромінення) або при спонтанному виході профага із хромосоми, що призводить до лізису клітини. Якщо ж фагові часточки будуть отримані в процесі літичного циклу, який пов’язаний з розмноженням вегетативного фага, то вони не зможуть здійснювати трансдукцію. Це суттєво відокремлює обмежену трансдукцію від загальної. В останньому випадку трансдукуючі часточки помірного фага утворюються в процесі літичного циклу.

Інтеграція ДНК помірного фага з хромосомою, як і наступне спонтанне або індуковане вирізання профага, здійснюється механізмами сайт-специфічної рекомбінації. Але іноді вирізання фагової ДНК відбувається з помилками, тоді фагова ДНК містить і сегмент бактеріальної хромосоми, а у бактеріальній хромосомі залишається ділянка фагової ДНК. Така рекомбінація називається реципроктною. Втрата ділянки ДНК фага призводить до утворення дефектних фагових часток, оскільки фагові гени, які необхідні для росту і дозрівання фага під час літичного циклу, замінені на бактеріальну ДНК.

**Абортивна трансдукція**. При абортивній трансдукції трансдукуємий фагом фрагмент ДНК донора не інтегрується у хромосому клітини-реципієнта, а залишається у її цитоплазмі і у такому вигляді здатний підтримуватись і проявлятись фенотипово. Під час поділу клітини цей фрагмент ДНК передається лише одній із дочірніх клітин, тобто спадкується однолінійно. В кінцевому підсумку він втрачається у потомстві.

За домопогою абортивної трансдукції можна встановити чи відносяться мутації, які контролюють потребу в якій-небуть речовині, до різних генів або до одного і того ж гену.