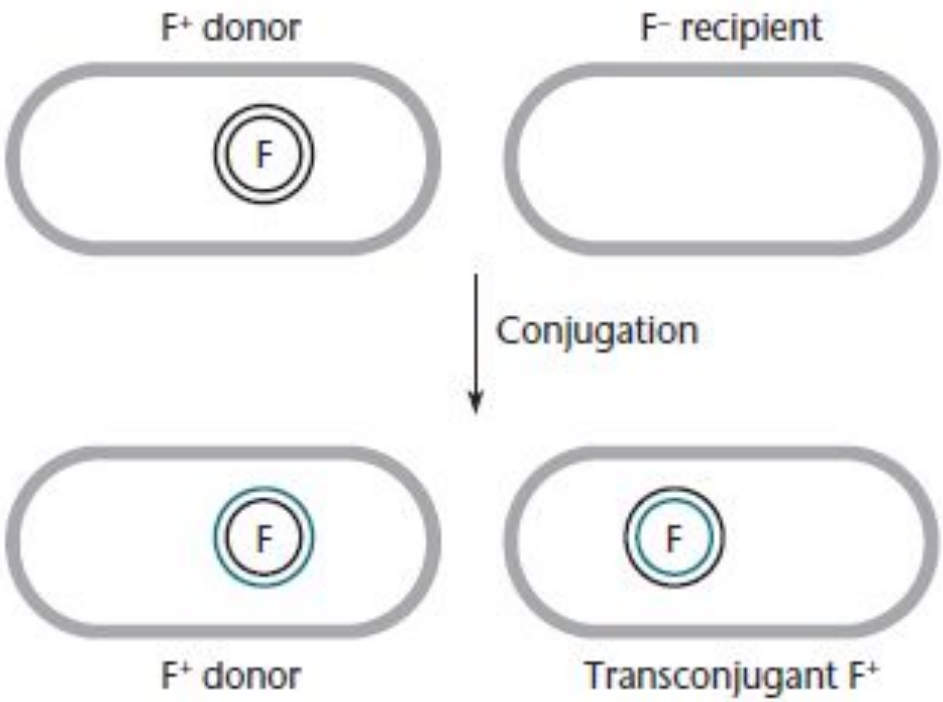
Конъюгация

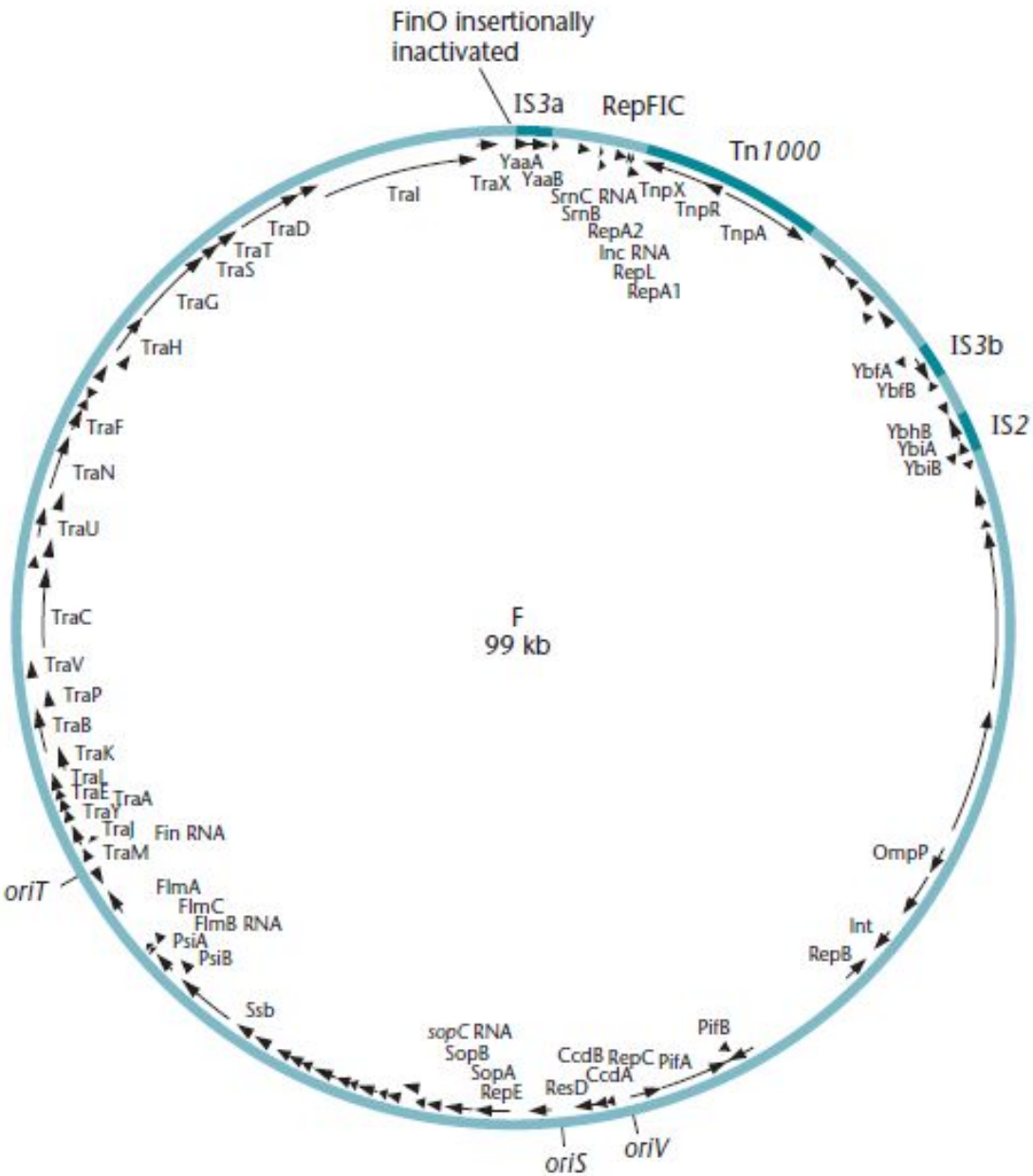
Конъюгацией называется процесс переноса ДНК из одной бактериальной клетки в другую.
Процесс конъюгации был описан в середине XX века, когда плазмиды еще не были известны.
Затем долгое время считалось, что только плазмиды способны к конъюгации.
Однако это оказалось не так: элементы хромосомной ДНК бактерий также умеют конъюнгировать.



В ходе конъюгации в клетку-реципиент переносится одна из двух цепочек ДНК плазмиды из клетки-донора.
Две оцДНК потом достраиваются до двуцепочечных молекул.

Почти все работы по конъюгации <u>у грам-отрицательных бактерий</u> сделаны на F-плазмиде (fertility).
Сейчас мы о ней поговорим.

F-



F-плазмида кодирует все белки, необходимые для конъюгации. Также имеются:

- ориджин для тета-репликации, второй ориджин (слабый) и третий, неактивный, в который внедрился Tn1000,
- система Par,
- системы, убивающие бактериальную клетку, если в ней нет F-плазмиды,
- система, блокирующая развитие бактериофага T7,
- система, блокирующая хозяйскую SOS-репарацию, что сильно облегчает существование плазмиды внутри бактерии.

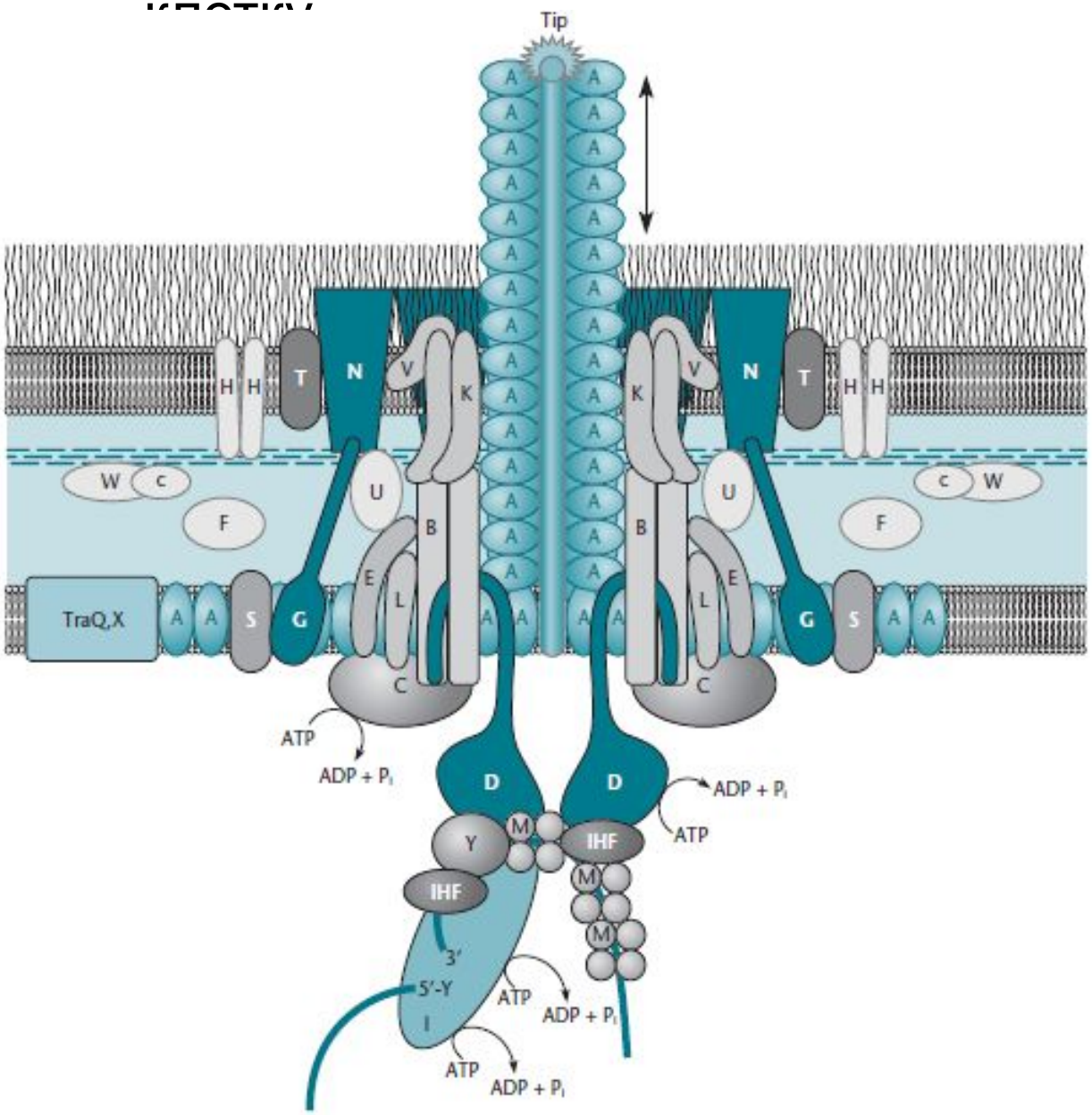
Функции многих генов неизвестны до сих пор.

Гены *tra* F-плазмиды

Dtr-гены, или Dtr-компоненты (*DNA Transfer and Replication*). Необходимы для процессинга плазмиды при подготовке ее к конъюгациии.

Mpf-гены, или Mpf-компоненты (*Mating Pair Formation*). Продукты экспрессии этих генов формируют сложный комплекс, ассоциированный с бактериальными мембранами, способствующий ассоциации двух бактериальных клеток. Через него, собственно, и происходит перенос плазмиды из клетки в клетку.

Аппарат переноса F-плазмиды из клетки в клетку

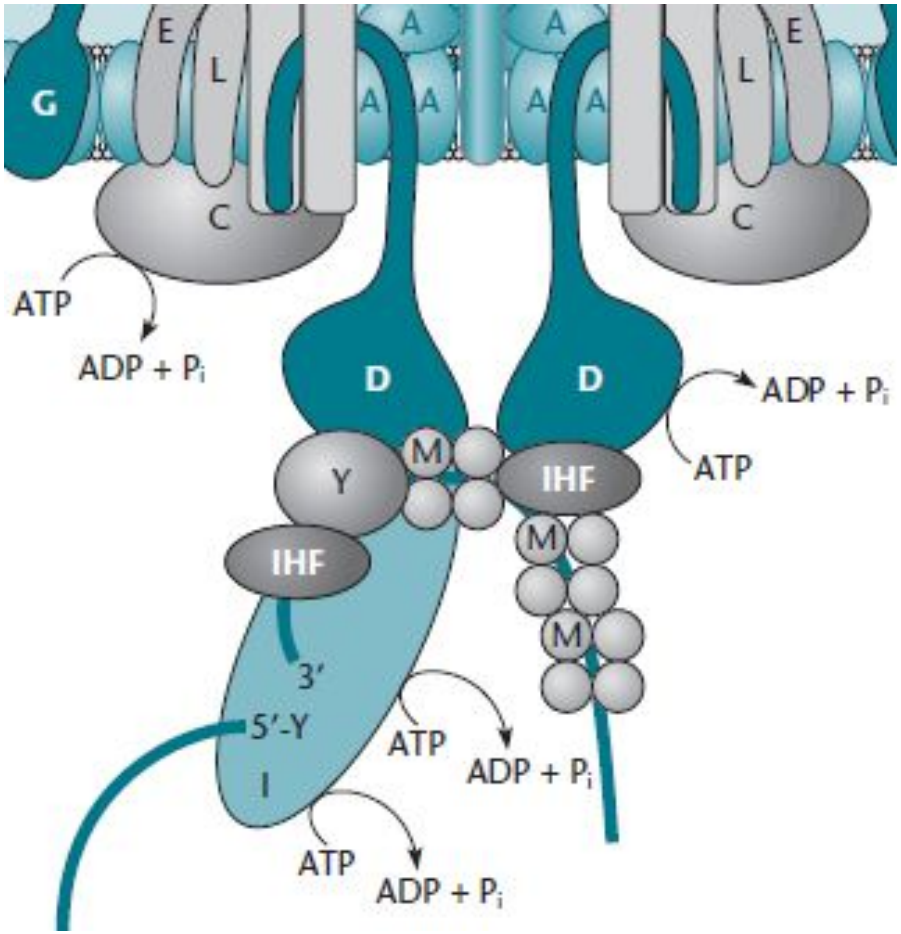


Основной компонент аппарата – пилус, структура, скрепляющая друг с другом клетки донора и акцептора. Пилус состоит из многих молекул белка TraA, или пилина. Он может нарастать (во время поиска реципиента) и сокращаться в длине (для сближения клеток донора и реципиента). Пилин в зрелой форме ковалентно замкнут через N- и C-концы!

К несчастью, времени подробно рассмотреть структуру данной поры у нас нет.

Сцепляющие белки (coupling proteins)

Белки – компоненты Mpf-аппарата, осуществляющие его связь с Dtr-аппаратом и сигнализирующие ему о том, что пора готовить плазмиду к конъюгации.
В случае F-плазмиды сцепляющий белок – это TraD.

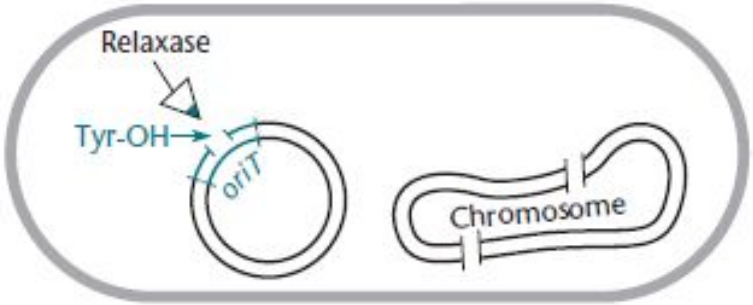


Этот белок закреплен в мембране и помогает молекуле плазмиды войти в канал и пройти его, достигая клетки-реципиента.

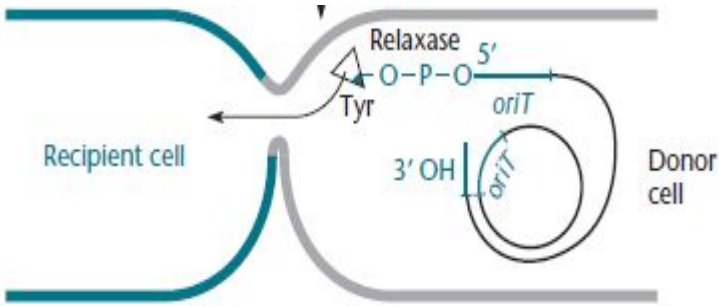
Dtr-аппарат

Состоит из нескольких белков, осуществляющих разные функции.

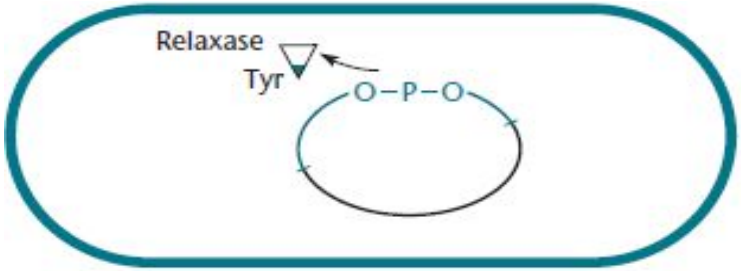
Релаксаза (TraI в случае F-плазмиды) является частью большого белкового комплекса – релаксосомы, в который еще входят вспомогательные Tra-белки.



Релаксаза связывается в районе oriT и делает одноцепочечный разрыв (ник). 5'-концевой фосфат переносится на тирозин белка.

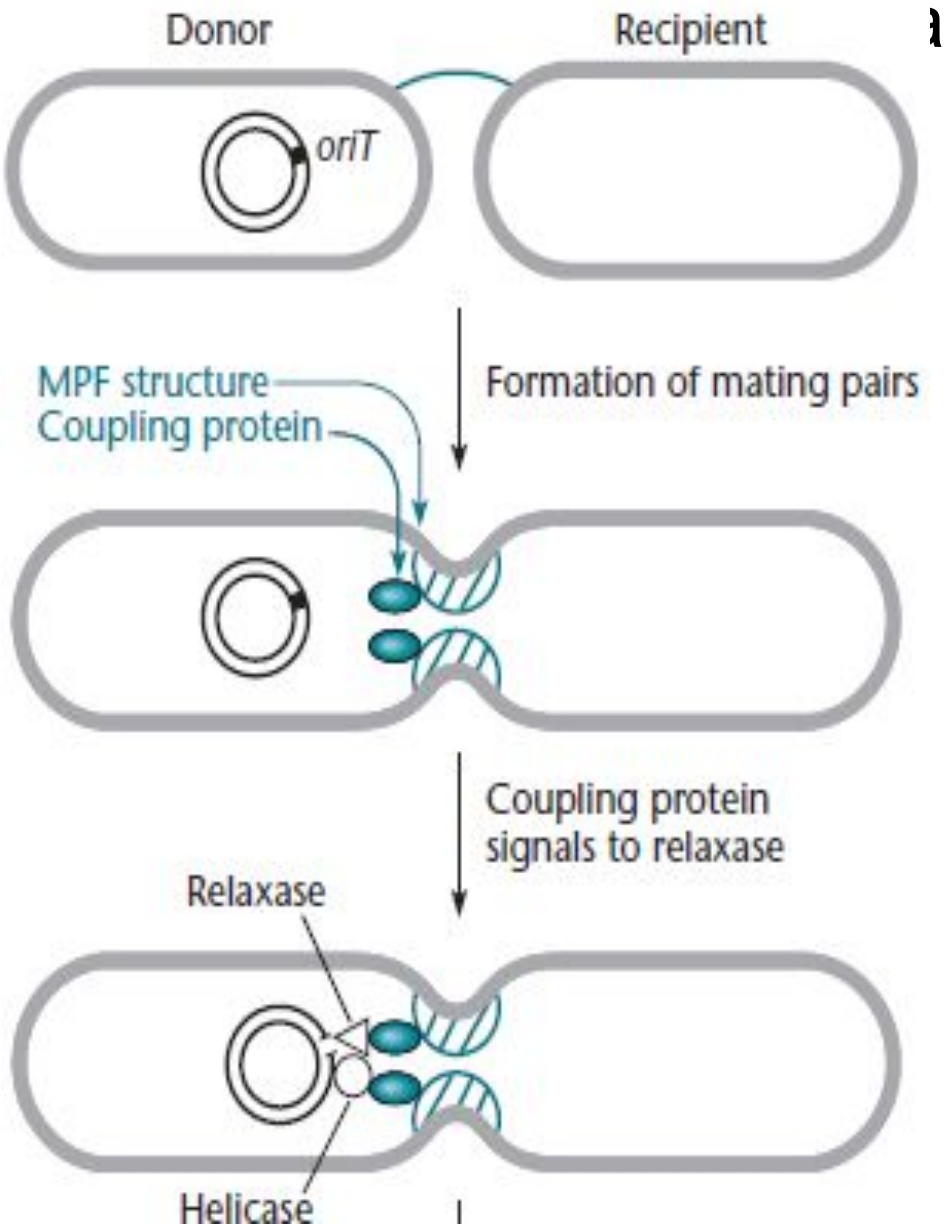


Плазмида расплетается, и никированная цепочка вместе с релаксазой проникает в клетку-реципиент при помощи Mpf-аппарата.



В реципиенте релаксаза осуществляет обратную реакцию, замыкая одноцепочечную ДНК в кольцо. После этого

Работа Dtr-

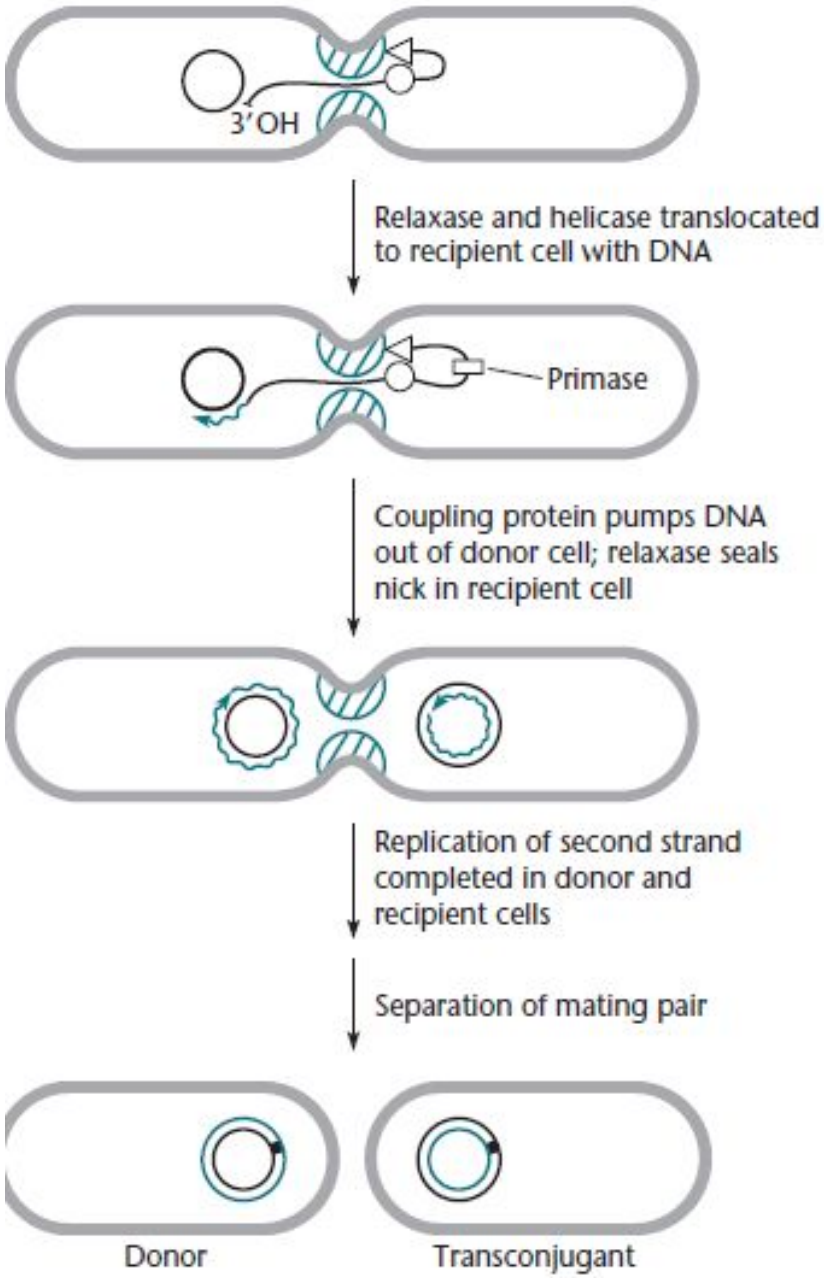


Клетка-донор и клетка-реципиент находятся неподалеку друг от друга.

Собирается Mpf-структура, образуется пара «брачующихся» клеток.

Сцепляющие белки привлекают релаксазу, вносящую ник, и хеликазу.

Работа Dtr-оата



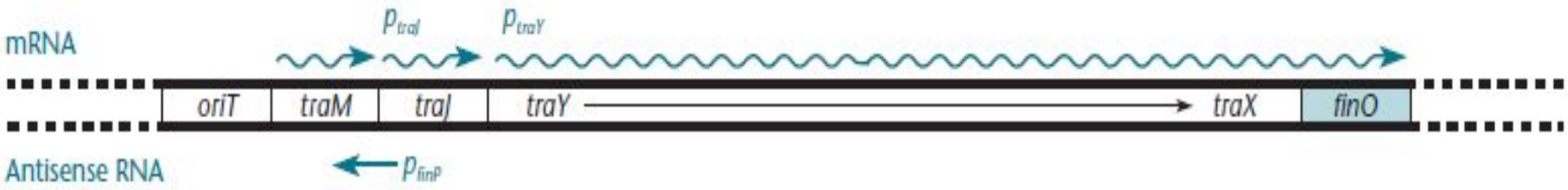
Релаксаза и хеликаза в комплексе с одной из цепочек плазмиды проникают в клетку-реципиент.

Релаксаза восстанавливает целостность цепочки ДНК в реципиенте. В дело вступает праймаза (либо закодирована в плазмиде и проникает в реципиента вместе с ДНК, либо закодирована в хозяйской клетке), создающая затравку для репликации в реципиенте. В качестве затравки для репликации в доноре часто выступает 3'-конец никированной цепочки, который все еще находится в доноре.

По завершении репликации в обеих клетках содержатся по двуцепочечной плазмиде. «Брачующаяся» пара распадается. Дело сделано!

Регуляция конъюгации

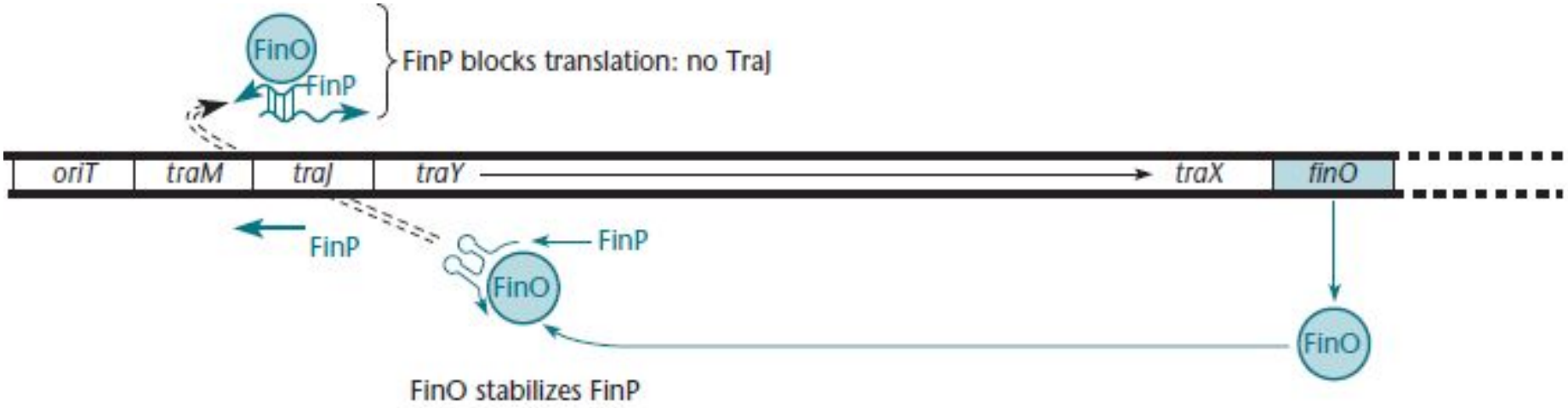
Процесс конъюгации обычно эффективен только в первое время после того, как плазмида попала в клетку-донор. Это связано с тем, что большую часть времени экспрессия большинства генов Tra подавлена. Механизмов подавления много, мы рассмотрим только нашу любимую F-плазмиду.



Практически сразу после *oriT* в плазмидной ДНК начинаются гены Tra. Как только плазмида попала в клетку и достроилась, все экспрессируется. В том числе, и ген *traJ*, кодирующий транскрипционный активатор промотора PtraY, с которого экспрессируются все гены, необходимые для формирования пилуса. Причем эта экспрессия возможна даже пока еще плазмида находится в одноцепочечной форме

Регуляция конъюгации

Итак, пилус сформировался, следующий акт конъюгации возможен. Однако же тем временем вновь попавшая в клетку плазмида стала двуцепочечной! Это позволяет начать работать промотору PfinP, с которого синтезируется короткая РНК FinP. Она комплементарна инициаторному участку мРНК TraJ, связывается с этим участком и блокирует ее трансляцию. TraJ не синтезируется, экспрессия остальных Tra-генов подавляется. А еще есть белок FinO, стабилизирующий РНК FinP и помогающий ее формировать стабильный дуплекс с мРНК TraJ.



Впервые описанная F-плазмида содержала мутантный ген *finO* со встроенным транспозоном. Белок FinO был неактивен, в результате чего вышеописанная система не работала, и бактериальные клетки с такой плазмидой почти всегда имели пилус и были готовы к конъюгации. На самом деле, только благодаря этому ее и открыли!

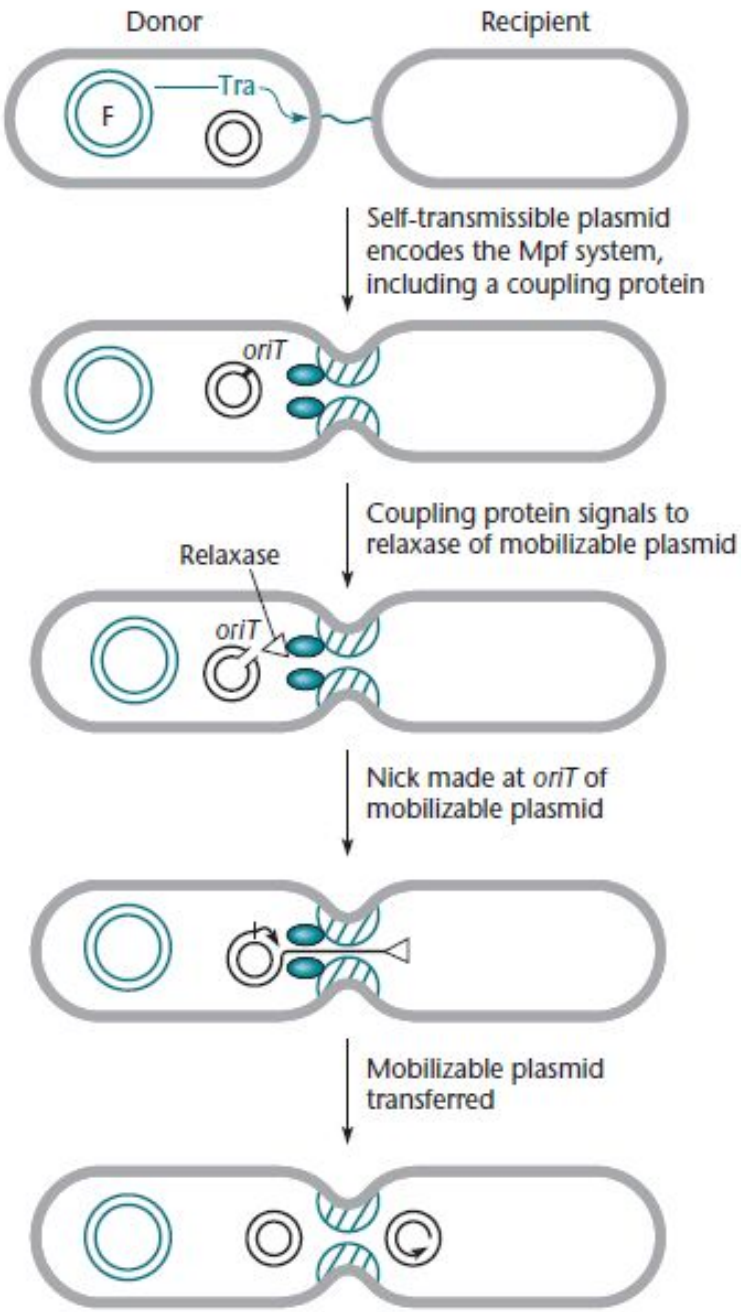
Бактериальный промискуитет

Перенос плазмиды из бактерию в бактерию другого вида – рядовое событие.

Существует класс плазмид, которые называются плазмидами промискуитета. Они в норме присутствуют в клетках *E.coli* и могут легко переноситься в любые грам-отрицательные бактерии, а с невысокой частотой – в цианобактерии, грам-положительные бактерии и даже в клетки высших растений!

Обыкновенная F-плазмида при определенных условиях может перейти из клетки *E.coli* в клетку пекарских дрожжей.

Плазмиды промискуитета играют важную роль в эволюции, а также являются одной из основных причин быстрого распространения устойчивости к антибиотикам среди бактерий.



Мобилизуемые плазмиды

Это такие плазмиды, которые могут перенестись из клетки в клетку только при помощи другой плазмиды, а сами по себе не могут.

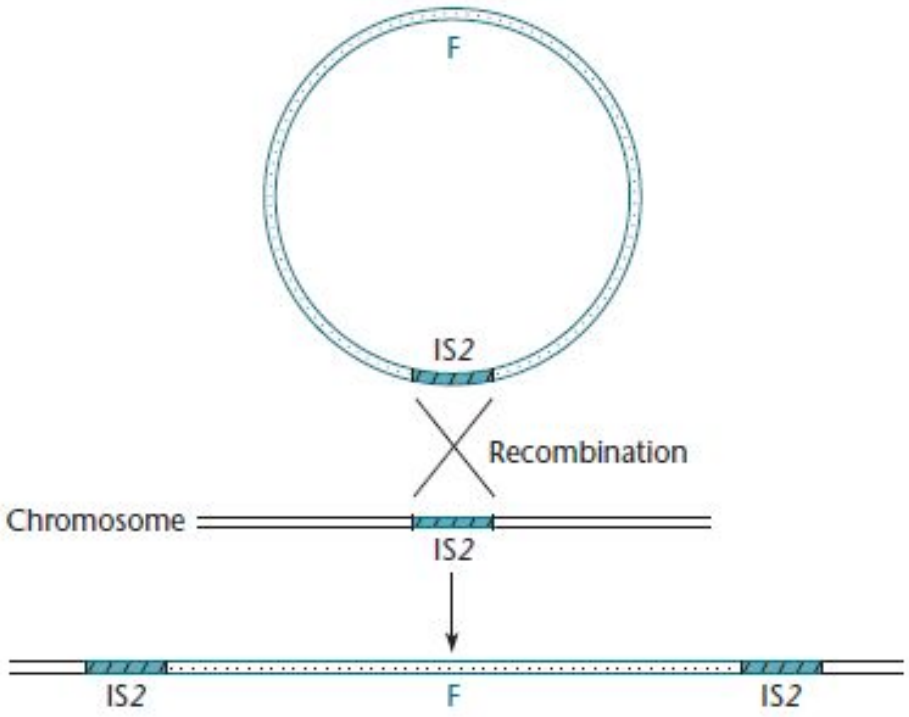
Мобилизуемые плазмиды должны содержать oriT и ген релаксазы, а вот сцепляющих белков они не кодируют.

В процессе мобилизации Dtr- и Mpf-системы мобилизующей плазмиды работают в двойственном режиме: *in cis* и *in trans*.

Чаще всего при конъюгации из клетки в клетку переходит только одна плазмида, другая не успевает. В случае, показанном на рисунке, это с равной вероятностью может быть либо мобилизующая, либо мобилизуемая плазмида. Таким образом, мы имеем дело с отличным примером молекулярно-генетического альтруизма со стороны мобилизующей плазмиды.

Плазмидный перенос хромосом

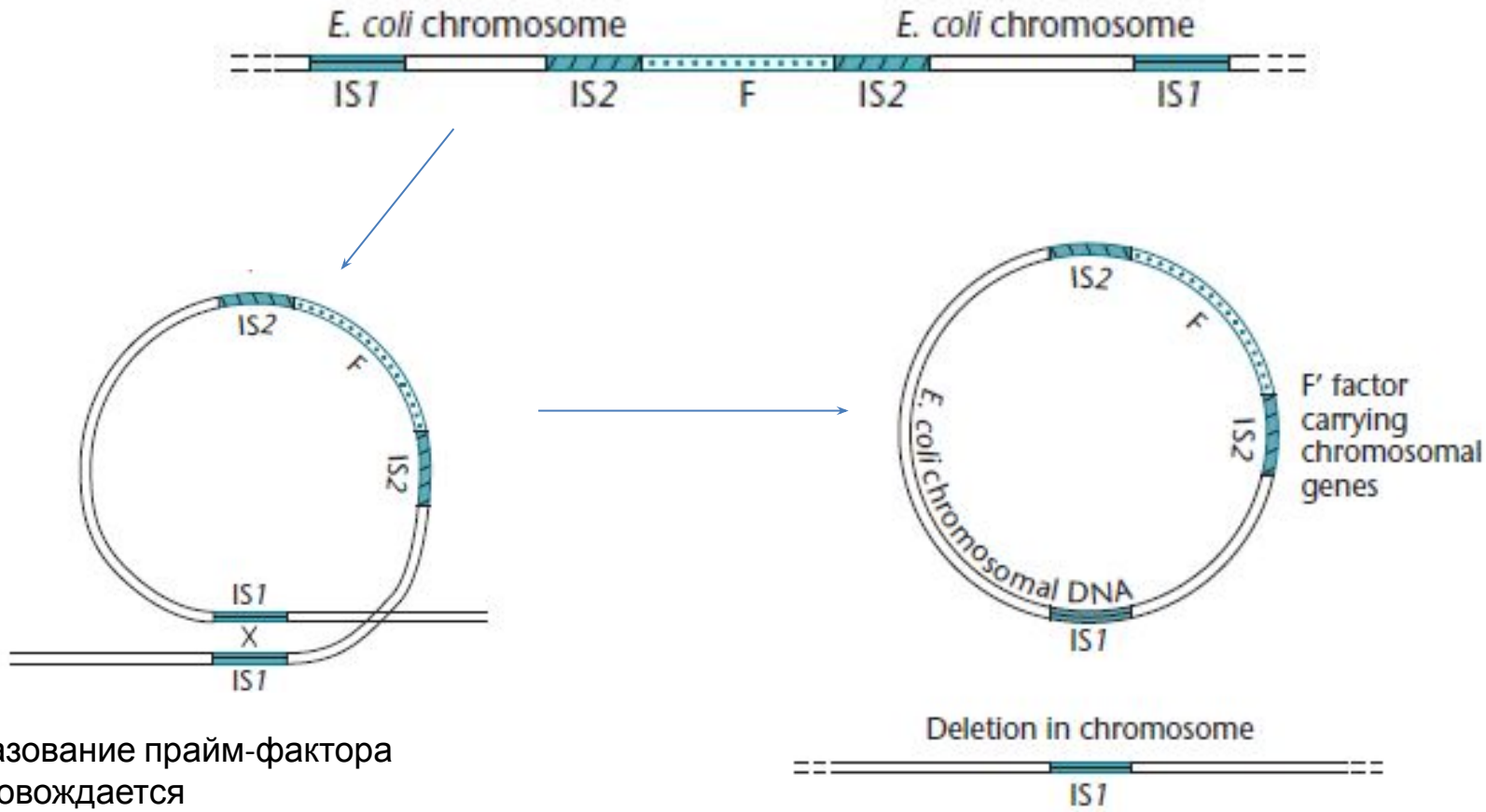
Этот процесс происходит в тех случаях, когда самопереносящаяся пладмида интегрируется в геном бактерии. При переходе в другую клетку такая плазмида забирает хромосому с собой.



Интеграция чаще всего происходит при помощи гомологичной рекомбинации. Например, наша любимая F-плазмида часто содержит короткие вставочные элементы (IS2), которые встречаются и в хромосомной ДНК. Тогда между ними может произойти рекомбинация. Штаммы со встроенной в хромосому плазмидой называются Hfr (High Frequency Recombination).

Прайм-факторы

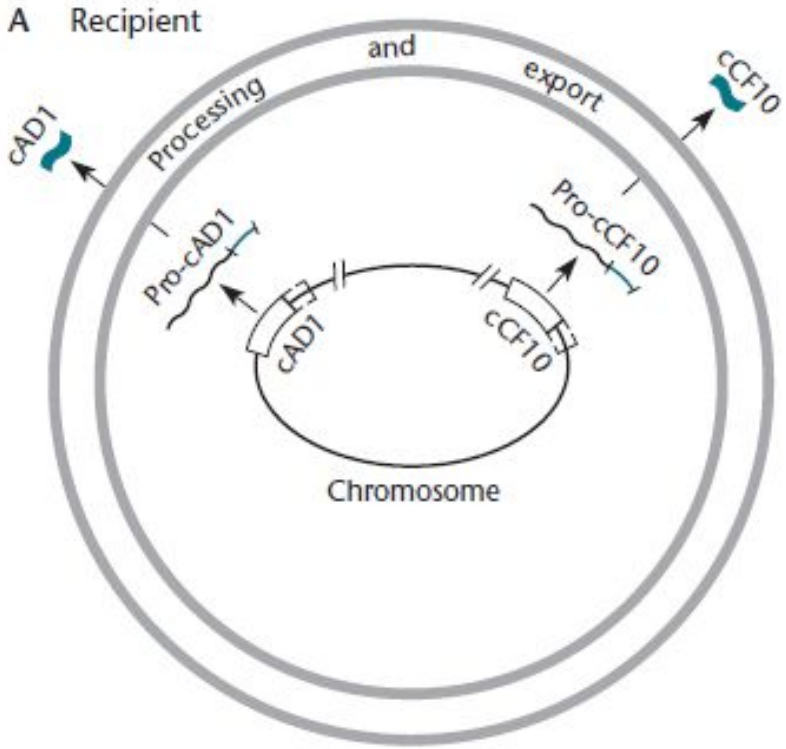
Перенос из клетки в клетку целой хромосомы в виде плазмиды – редкое событие. Чаще случается так, что при рекомбинации в перемещающуюся плазмиду попадает часть хромосомы. Такие плазмиды называют прайм-факторами. F-плазмида, содержащая часть бактериальной хромосомы, обозначается как F' (F-prime).



Образование прайм-фактора сопровождается делециями в хромосомной ДНК бактерии. ВАЖНАЯ ЭВОЛЮЦИОННАЯ РОЛЬ!!!

Конъюгация у грам-положительных бактерий

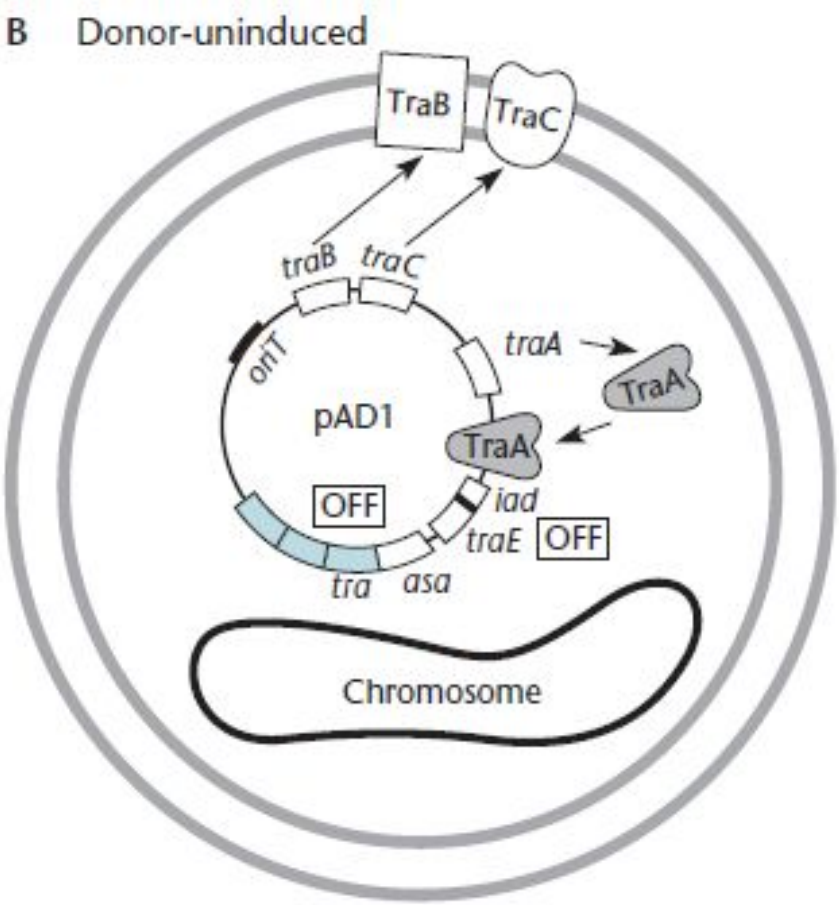
В целом организована так же, как и у грам-отрицательных, однако имеются интересные отличительные черты, а именно использование бактериальных феромонов (рассмотрим на примере энтерококков).



Клетка-реципиент: в хромосомной ДНК закодировано несколько олигопептидов, напоминающих феромоны (для примера показаны cAD1 и cCF10). После процессинга они экспортируются во внеклеточное пространство.

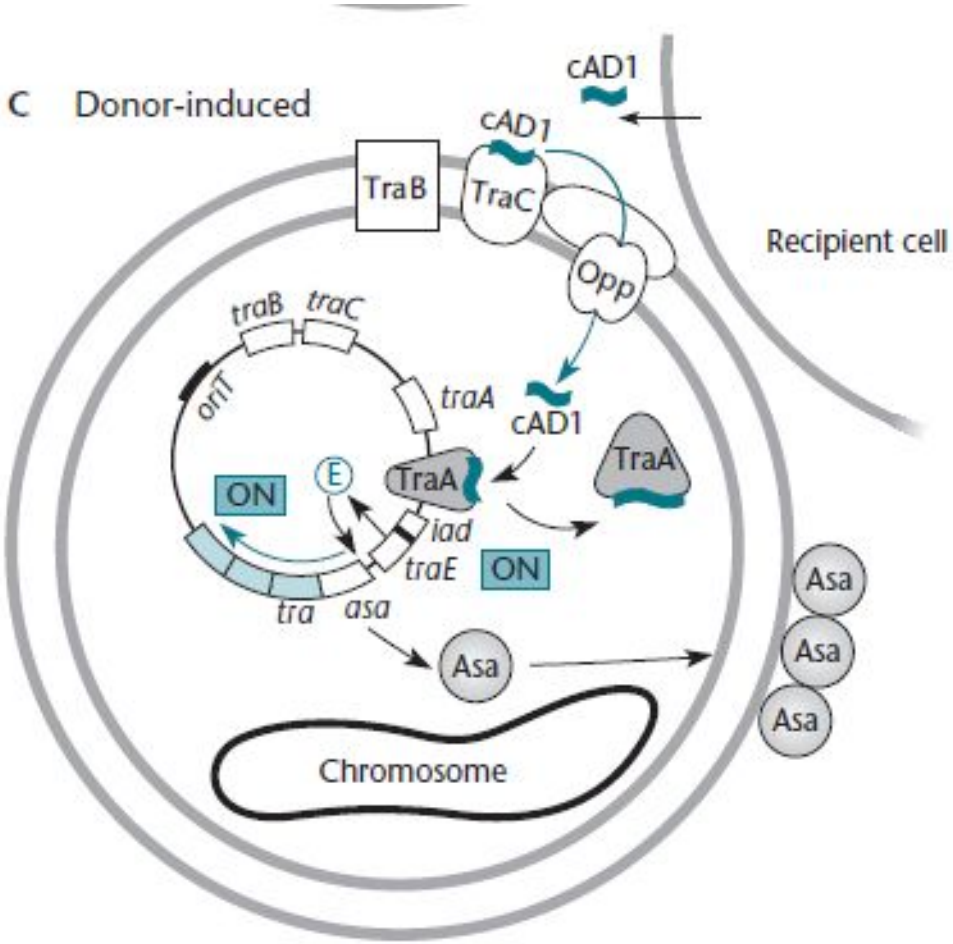
Конъюгация у грам-положительных бактерий

Клетка-донор содержит плазмиду pAD1, с которой синтезируется белок TraA – транскрипционный репрессор, подавляющий экспрессию остальных генов Tra и некоторых других. Экспрессируются только гены *traB* и *traC*, кодирущие ингибиторный белок (о нем ниже) и рецептор для феромона cAD1, соответственно.

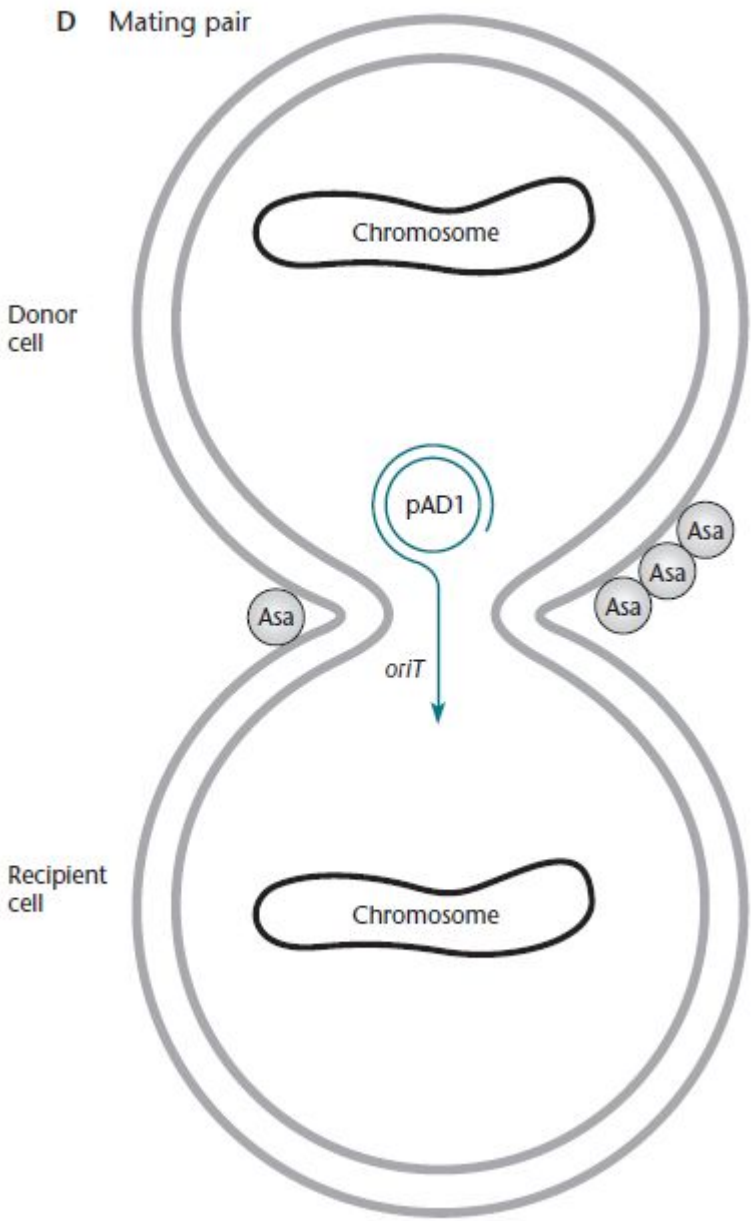


Конъюгация у грам-положительных бактерий

Феромон cAD1 связывается с TraC и проникает внутрь клетки-донора через специальную транспортную систему Opp. В клетке он связывается с белком TraA, который теперь уже не может репрессировать транскрипцию, и та начинается. Синтезируются все Tra-белки, необходимые для конъюгации, а также белок Asa, способствующий агрегации двух клеток.



Конъюгация у грам-положительных



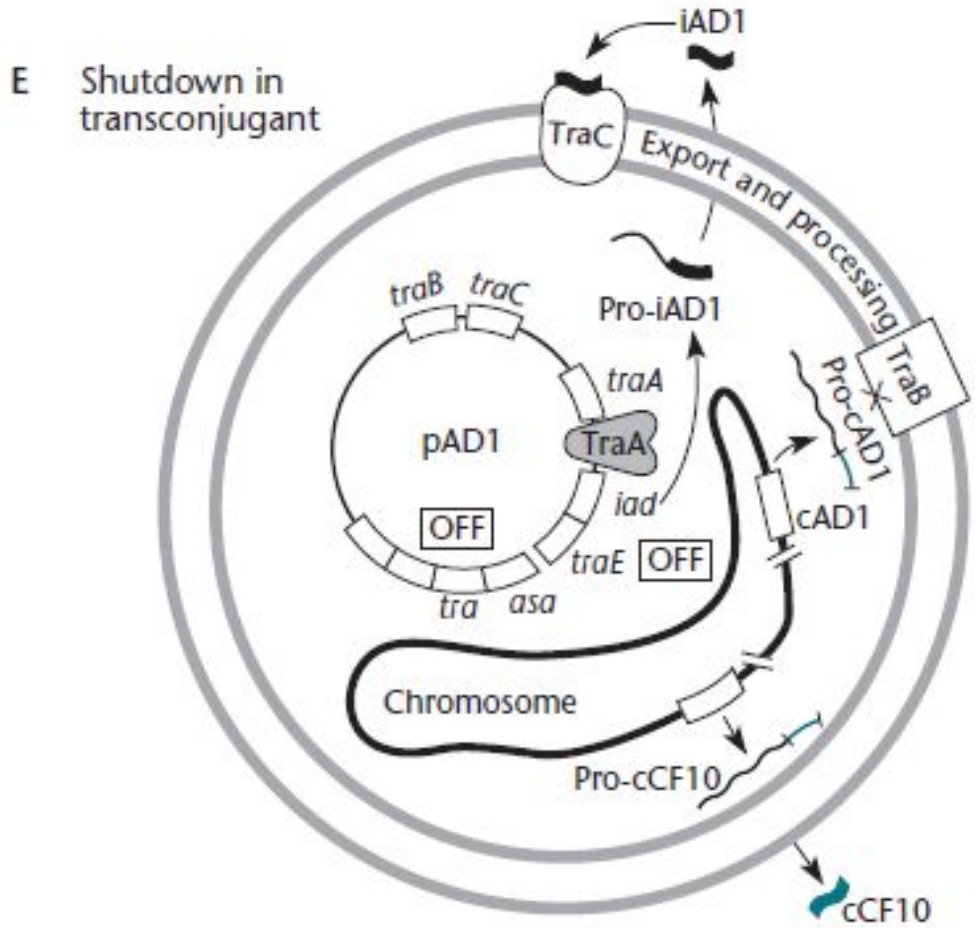
Собственно конъюгация происходит практически так же, как и у грам-отрицательных бактерий. Плазмида pAD1 переходит из донора в реципиента.

Конъюгация у грам-положительных бактерий

Выключение конъюгацию трансконъюгантов происходит по нескольким механизмам.

1. Олигопептид iAD1, закодированный в плазмиде, выходит наружу и связывается с TraC, блокируя его и не давая связаться с феромоном, пришедшим из другой клетки.
2. Тот самый белок TraB связывает феромон cAD1 и не дает ему выйти наружу.

Таким образом, трансконъюгант какое-то время не компетентен в pAD1-конъюгации ни как донор, ни как реципиент. При этом pCF10-конъюгация возможна!



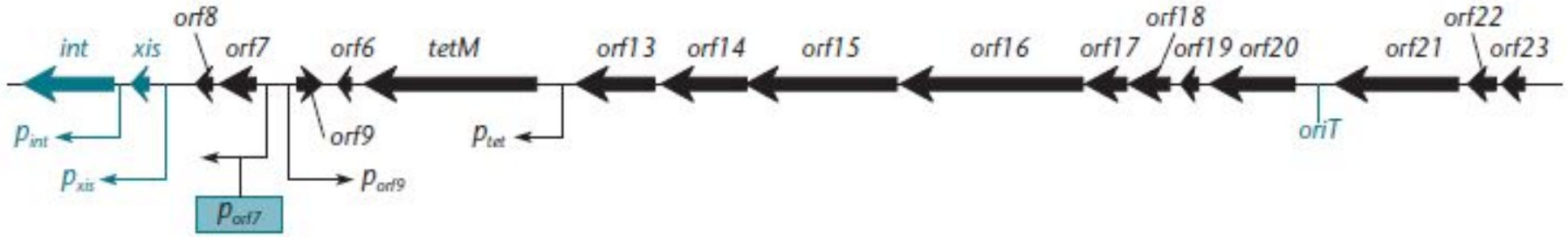
Конъюгация у грам-положительных бактерий: интегративные конъюгирующие элементы (ICE)

ICE не способны к автономной репликации, то есть это не плазмиды. Однако они могут вырезаться из генома одной бактерии и встраиваться в геном другой.

Сразу после их открытия ICE считали большими транспозонами, поэтому многие из них называются Tn… Однако механизм мобильности ICE абсолютно не такой, как механизм мобильности транспозонов.

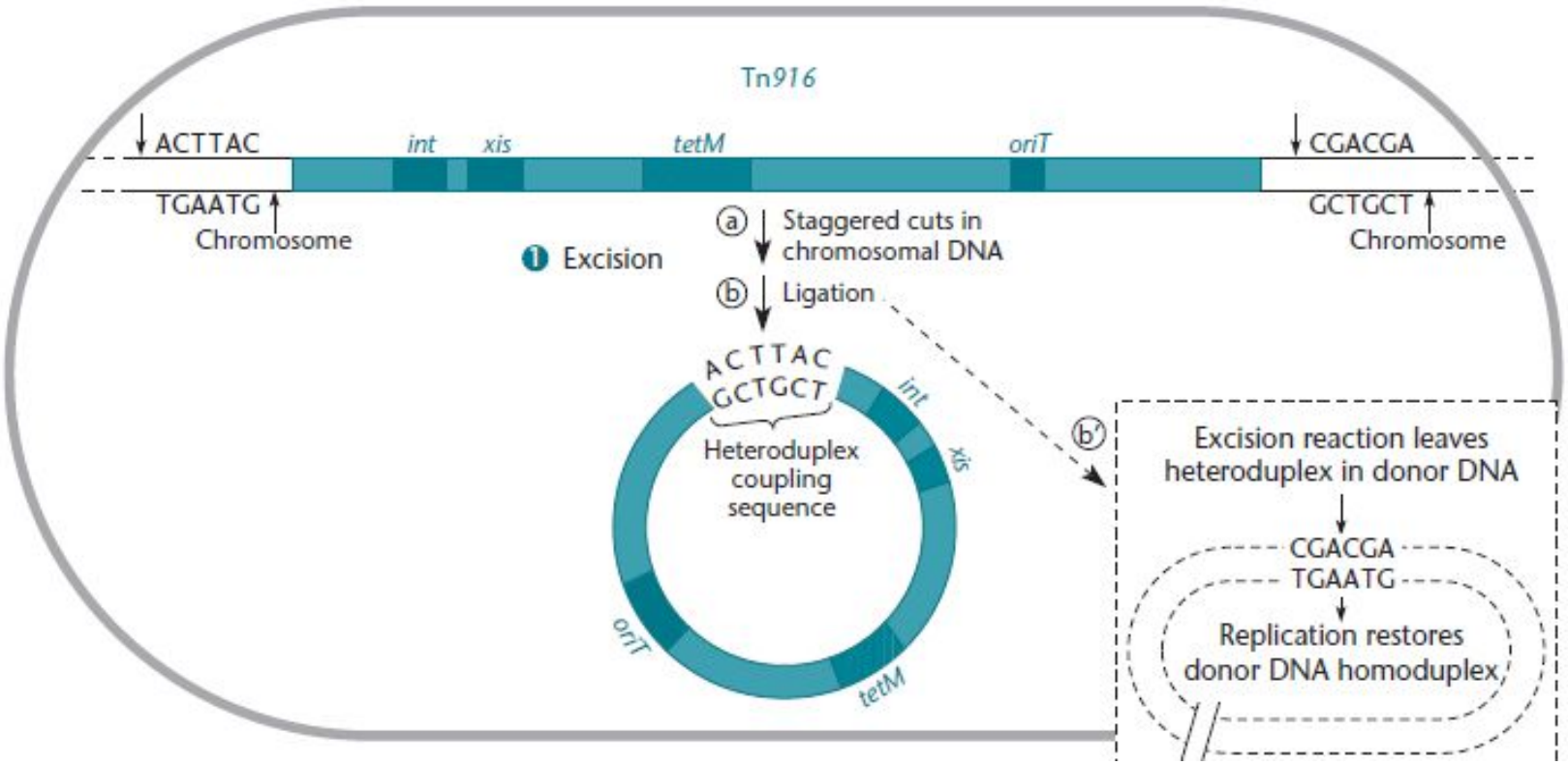
ICE – промискуитетные генетические элементы, способные встраиваться в геномы множества грам+ и некоторых грам- бактерий.

Канонический ICE: энтерококковый Tn*916*.



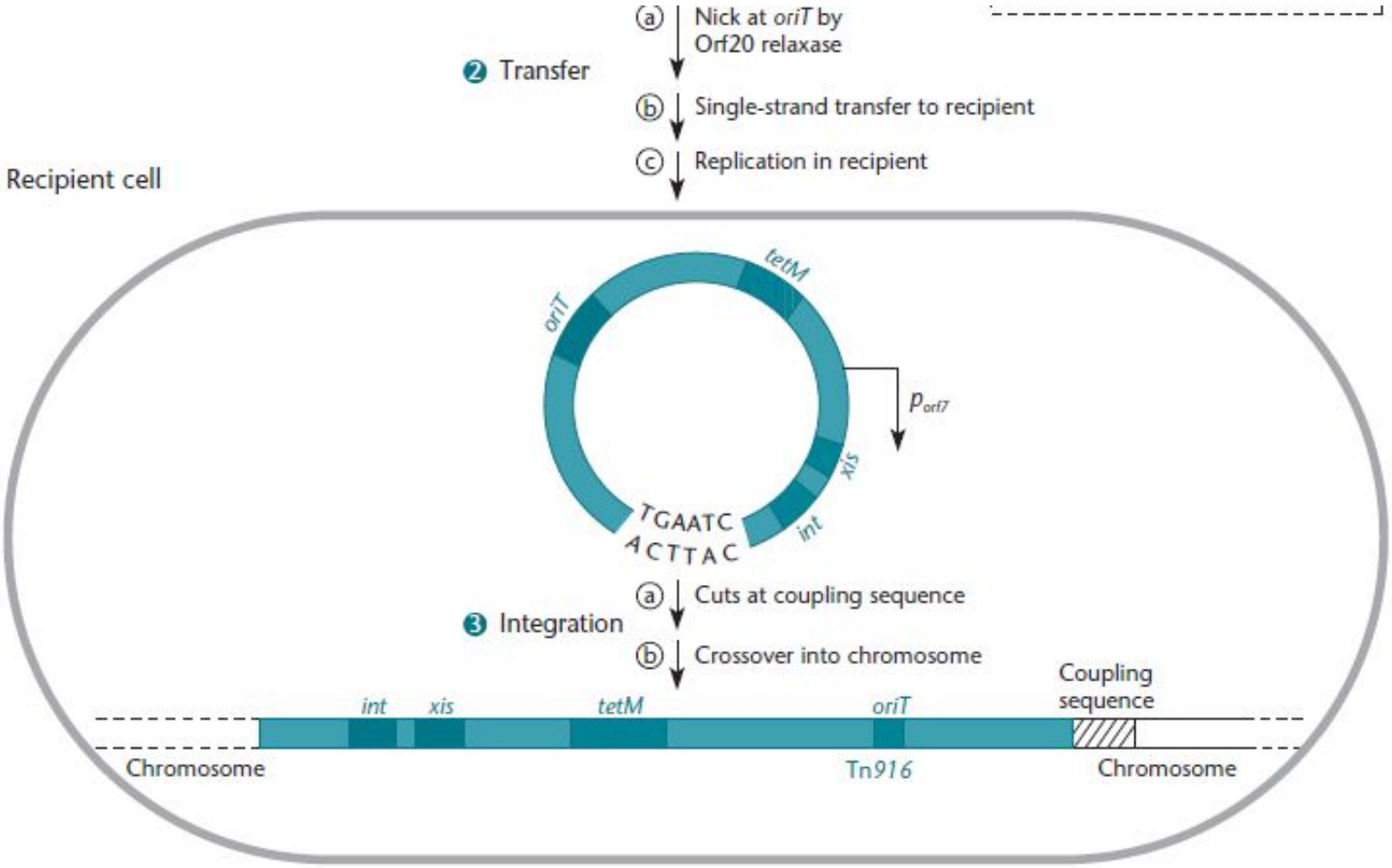
Самовырезание
Tn*916*.

Белки Int и Xis вносят разрывы в хромосому неподалеку от границ ICE. Образуются липкие концы, которые на самом деле не липкие, поскольку не комплементарны друг другу. Однако по неизвестному механизму вырезанный ICE все же сворачивается в кольцо и самолигируется с образованием короткого неспаренного участка. Кольцевая форма не способна к репликации, но зато только с нее могут начать экспрессироваться гены ICE, продукты которых и организуют конъюгацию по механизму, очень напоминающему Tra-механизм плазмид.



Самовстраивание Tn*916*.

Перед конъюгацией кольцевой ICE никируется, и одна цепочка ICE проникает в реципиента. Там на ее матрице достраивается вторая цепочка, и двуцепочечный ICE снова самолигируется.
Наконец, белок Int встраивает ICE в хромосому реципиента по механизму, очень напоминающему таковой у бактериофагов (о нем мы поговорим позднее).



Трансформация

Трансформацией называется процесс поглощения бактериальной клеткой ДНК из внешней среды.

Способность поглощать ДНК из внешней среды называется <u>компетентностью</u>.

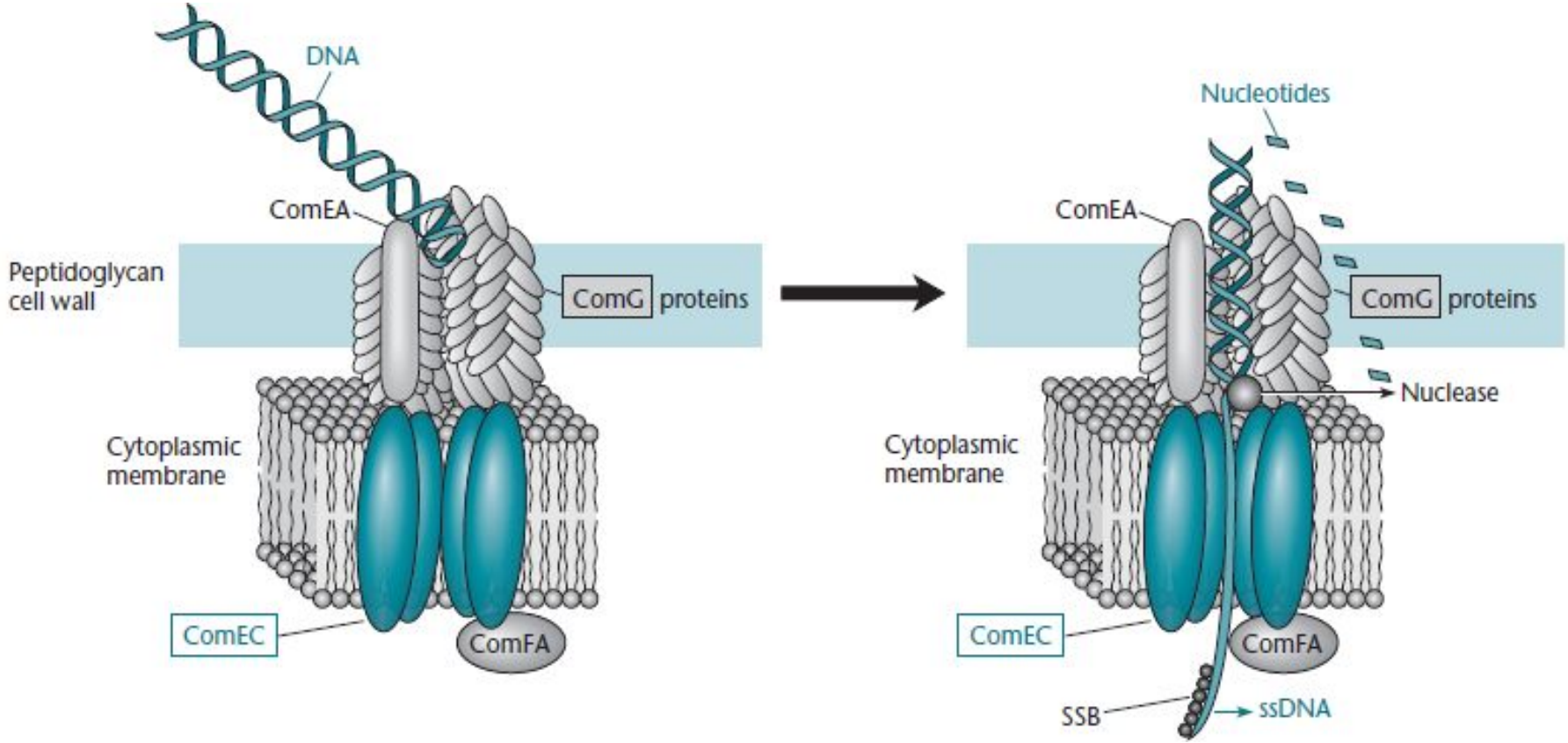
Природная компетентность
Бактерия способна к трансформации сама по себе, без какой-либо дополнительной подготовки (такая компетентность обычно свойственна бактериям только на отдельных этапах жизненного цикла или в определенных условиях).

Индуцированная компетентность
Бактерия становится способна к трансформации после специальной подготовки (обработка раствором солей, электрический разряд…)

Это относится к области генной инженерии, об этом у нас, к сожалению, говорить времени нет.

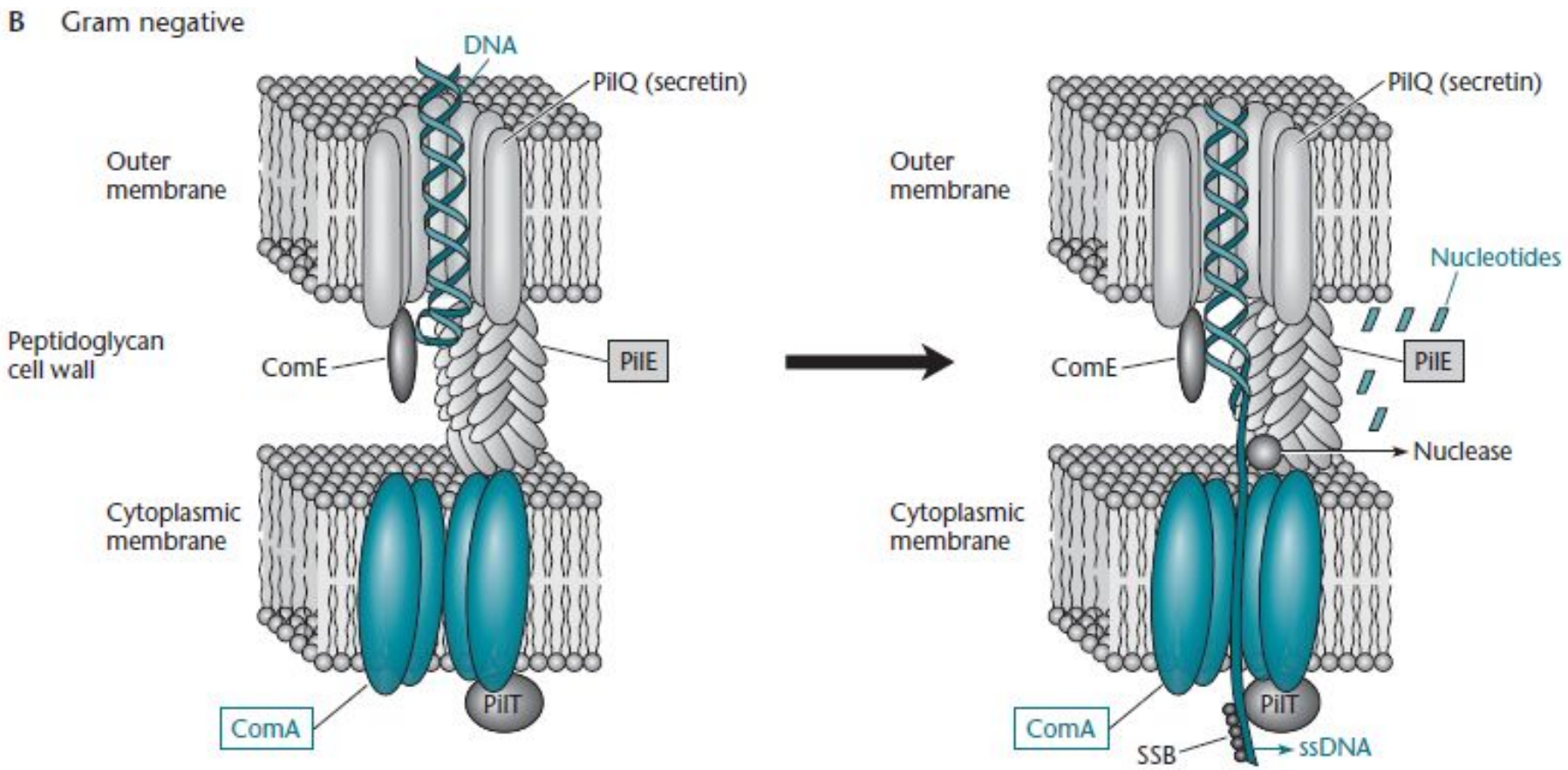
Природная компетентность грам-положительных бактерий (*B. subtilis*)

Com-аппарат состоит из белков ComG (формирует пилус), ComEA (рецептор для сиквенс-неспецифического связывания ДНК), ComEC и ComFA (формируют канал в мембране). Двуцепочечная ДНК связывается с ComEA, после чего в дело вступает внеклеточная нуклеаза (которая, кстати, идентифицирована далеко не у всех природно-компетентных грам+ бактерий) и съедает одну из цепочек ДНК. Оставшаяся одноцепочечная ДНК проникает в клетку, где с ней связывается белок SSB. В дальнейшем ДНК может (1) интегрироваться в геном при помощи рекомбинации, (2) превратиться в двуцепочечную плазмиду, (3) деградировать.

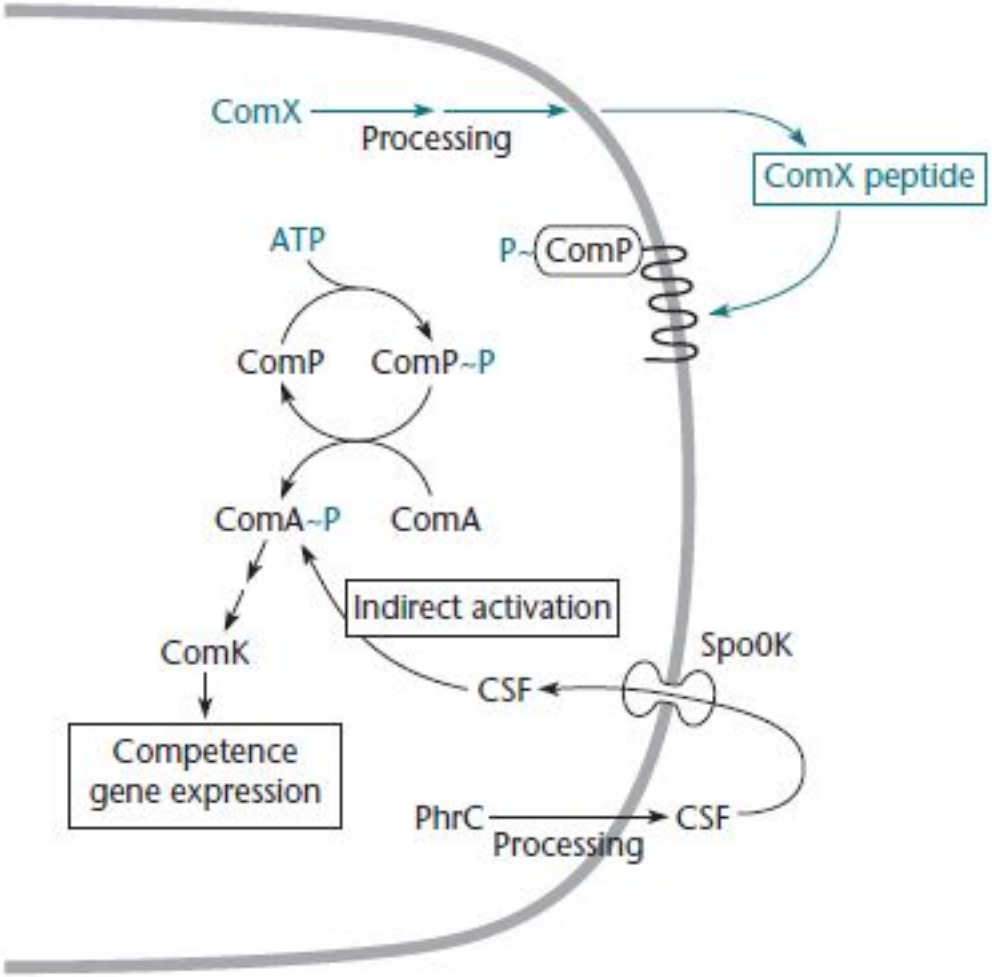


Природная компетентность грам-отрицательных бактерий (*N. gonorrhoeae*)

Все примерно то же самое, только для транспорта через внешнюю мембрану используется система секреции с основным компонентом – белком секретином.



Регуляция компетентности у *B. subtilis*

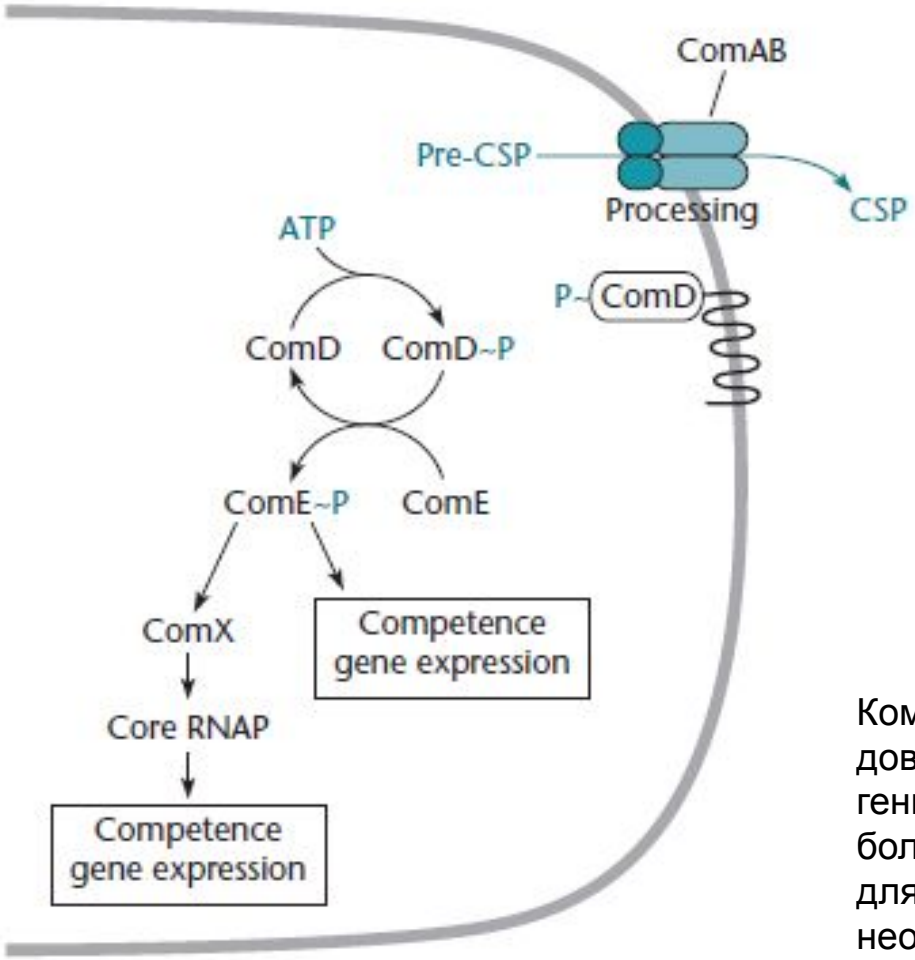


Компетентность у этой бактерии проявляется в момент истощения ресурсов. Истощение сопровождается накоплением пептида ComX во внешней среде. Это чувствует белок ComP, который в связи с этим самофосфорилируется. Фосфат передается на белок ComA, что позволяет последнему активировать транскрипцию гена *comK*. Белок ComK, в свою очередь, активирует транскрипцию остальных Com-генов, что приводит к наведению компетентности. Параллельно с этим, снаружи накапливается пептид CSF, который, когда его много, способен проникать обратно в клетку и служить косвенным активатором белка ComA, поскольку он инактивирует некую клеточную фосфатазу, которая иначе с удовольствием дефосфорилировала бы белок ComA.

В поздней культуре *B. subtilis* всего около 10% клеток компетентны. Эти клетки как бы ждут, пока погибнут остальные 90%, чтобы захватить их ДНК. Это, в свою, очередь, даст им дополнительные возможности выжить в условиях недостатка питания.

Регуляция компетентности у *S. pneumoniae*

В общем-то, все то же самое, только в результате цепочки событий синтезируется белок ComX, который является альтернативной сигма-субъединицей РНК-полимеразы. Связываясь с кор-ферментом, ComX фокусирует всю транскрипцию на других Com-генах, в результате чего клетка становится компетентной.



Функциональная важность природной компетенции ясна не до конца. Имеются гипотезы о том, что поглощаемая ДНК может служить в качестве источника азота и углерода, а также участвовать в рекомбинации (последнее показано экспериментально: ДНК погибшего соседа используется для репарации тиминовых димеров после облучения посредством рекомбинации).

Компетентность экспериментально показана у довольно малого числа видов бактерий. Однако же гены компетентности идентифицированы у гораздо большего их числа. Скорее всего, это означает, что для очень многих бактерий мы просто пока не знаем необходимых условий формирования компетентности.