

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ

В. В. СЛИЗЕНЬ, Л. П. ТИТОВ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Учебно-методическое пособие



Минск 2007

УДК 577.2 (075.8)
ББК 28.070 я 73
С 47

Утверждено Научно-методическим советом университета в качестве
учебно-методического пособия 18.10.2006 г., протокол № 2

Р е ц е н з е н т ы: доц. А. М. Близнюк; доц. В. Э. Бутвиловский

Слизень, В. В.

С 47 Молекулярная биология бактерий : учеб.-метод. пособие / В. В. Слизень,
Л. П. Титов. – Минск: БГМУ, 2007. – 48 с.

ISBN 978–985–462–623–9.

Посвящено одному из самых перспективных направлений биологии и медицины — молекулярной биологии бактерий. В пособии проанализирована структура генетического аппарата бактерий, генетические механизмы изменчивости микроорганизмов, молекулярная структура некоторых факторов патогенности и их генетический контроль, а также даны принципы методов современного молекулярно-генетического анализа: ПЦР, клонирование, секвенирование ДНК, биочипы, филогенетический анализ.

Предназначено для студентов всех факультетов.

УДК 577.2 (075.8)
ББК 28.070 я 73

Учебное издание

Слизень Вероника Вячеславовна
Титов Леонид Петрович

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск В. В. Слизень
Редактор А. И. Кизик
Корректор Ю. В. Киселёва
Компьютерная верстка Н. М. Федорцовой

Подписано в печать 23.10.06. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».

Печать офсетная. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,74. Тираж 250 экз. Заказ 216.

Издатель и полиграфическое исполнение —

Белорусский государственный медицинский университет.

ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.

220030, г. Минск, Ленинградская, 6.

ISBN 978–985–462–623–9

© Оформление. Белорусский государственный
медицинский университет, 2007

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A — аденин

BTCC — второй тип секреторной системы

G — гуанин

дНТФ — дезоксинуклеотдитрифосфаты

о. — основания

п.о. — пар оснований

ОВП — окислительно-восстановительный потенциал

ОП — островок патогенности

ОП2 — островок патогенности № 2

PTCC — первый тип секреторной системы

ССПТ — секреторная система пятого типа

TTCC — третий тип секреторной системы

T — тимин

т.п.о. — тысяча пар оснований

УФ — ультрафиолетовое излучение

Ц — цитозин

ЧТСС — четвертый тип секреторной системы

Cyr3 — флюоресцентный краситель сайбор грин

IS — инсерционные элементы

ORF — открытая рамка считывания

RTF — фактор переноса резистентности

SSR — простые повторяющиеся последовательности

Tn — транспозоны

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА БАКТЕРИЙ

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА

Генетический аппарат бактерий представлен бактериальной хромосомой, внехромосомными факторами наследственности — плазмидами, а также входящими в их состав мобильными генетическими элементами (схема 1).



Схема 1. Устройство генетического аппарата бактерий

Жизненно важная генетическая информация бактерий сосредоточена в располагающейся непосредственно в цитоплазме единственной хромосоме, что позволяет отнести бактерии к гаплоидным организмам. Возможны некоторые исключения, например, *Vibrio cholerae* содержит две кольцевидные хромосомы размером $2,69$ и $1,07 \times 10^6$ п.о.

ДНК в хромосоме суперспирализована, ее размер в раскрученном состоянии может достигать 1 мм. ДНК состоит из двух комплементарных друг другу цепочек: аденин одной цепочки спарен с тиминем другой цепочки, гуанин — с цитозином. Цепи антипараллельны и располагаются во взаимно противоположных направлениях: одна в ориентации $5' \rightarrow 3'$, дру-

гая — 3' → 5'. На 5' конце ДНК находится фосфатная группа, прикрепленная к 5-му углеродному атому дезоксирибозы. 3' конец оканчивается ОН-группой, присоединяющейся к 3-му углеродному атому дезоксирибозы.

В геноме разных видов бактерий содержание нуклеотидов варьируется от $5,8 \times 10^5$ до 13×10^6 п.о., что соответствует приблизительно 10^3 генов (1 ген на 1000 п.о.) (табл. 1). Это в 100 раз больше, чем у вирусов, и в 1000 раз меньше, чем в среднем у эукариот. Например, размер генома вирусов составляет 10^3 – 10^4 о., дрозофил — $1,75 \times 10^6$, дрожжей — $1,3 \times 10^7$, простейших (*Plasmodium falciparum*) — $2,5 \times 10^7$, гельминтов (нематоды) — 1×10^8 , риса — $4,41 \times 10^8$, бананов — $8,73 \times 10^8$, табака — $4,434 \times 10^9$, человека — 3×10^9 п.о. Несмотря на весьма значительную разницу в сложности организации фенотипа прокариотических и эукариотических организмов, различие в количестве генов не велико. Для объяснения этого феномена в последнее время получила развитие концепция сетевых взаимодействий: дело не в различном количестве генов, а в сложности генетических сетевых взаимодействий. Многоклеточные организмы, чей геном всего лишь в 5–10 раз больше, чем у микроорганизмов, имеют более сложные регуляторные системы, которые могут контролировать одновременную экспрессию большого числа различных групп генов. Как правило, микроорганизмы, обитающие во внешней среде, имеют больший размер генома, чем патогены человека и животных, что связано с адаптацией патогенов к одной экологической нише — организму человека. Самый маленький геном среди бактериальных патогенов имеют *Mycoplasma genitalium* ($0,58 \times 10^6$ п.о.), содержащие минимальный набор генов, необходимых для выживания.

Ранее сходство микроорганизмов и их принадлежность к одному роду оценивали по содержанию Г + Ц (%), которое может варьировать от 29 % у *Borrelia burgdorferi* до 65 % у *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* или 67 % у *Pseudomonas aeruginosa*. В настоящее время расшифровка последовательности нуклеотидов в геноме большинства патогенов позволяет использовать первичную структуру ДНК для оценки родства различных видов микроорганизмов. Как правило, бактерии одного рода и семейства проявляют сходство 70–80 % генетической информации, и только 20–30 % объема генома приходится на уникальную для вида или варианта генетическую информацию. Например, условно-патогенные *E. coli* K12, обитающие в кишечнике человека, и *E. coli* 0157:H7, вызывающие гемолитико-уремический синдром, имеют идентичную генетическую информацию объемом $4,1 \times 10^6$ п.о. В геноме *E. coli* 0157:H7 дополнительно содержится видоспецифическая информация размером $1,34 \times 10^6$ п.о. (приблизительно 1387 генов), а в геноме *E. coli* K12 — $0,53 \times 10^6$ п.о. (приблизительно 528 генов). *Listeria monocytogenes*, вызывающие листериоз, имеют 270 генов, отвечающих за патогенность и не встречающихся у непатогенных *Listeria in-*

nocua. *Yersinia pestis* — возбудители чумы — в отличие от *Yersinia pseudotuberculosis* характеризуются присутствием большого количества IS-элементов, встроенных в состав приблизительно 100 генов.

Таблица 1

Размер геномов медицински значимых микроорганизмов

Виды микроорганизмов	Размер генома, × 10 ⁶ п.о.	Количество ORFs, × 10 ³	Содержание G + C, %
<i>Bacillus anthracis</i>	5,1	5,311	35,4
<i>Bacillus subtilis</i>	4,2	4,112	43,5
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	6,26	4,778	42,8
<i>Bifidobacterium longum</i>	2,26	1,729	60,1
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0,9	1,638	28,2
<i>Brucella melitensis</i>	3,3	3,198	57,2
<i>Brucella suis</i>	3,28	3,264	57,3
<i>Campylobacter jejuni</i>	1,64	1,634	30,5
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,05	895	41,3
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> AR39	1,23	1,112	40,6
<i>Clostridium perfringens</i>	3,1	2,723	28,5
<i>Clostridium tetani</i>	2,8	2,373	28,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,35	3,113	37,5
<i>Escherichia coli</i> K12	4,6	4,279	50,8
<i>Escherichia coli</i> 0157:H	5,5	5,361	50,5
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2,17	2,067	27,2
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,83	1,714	38,2
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	1,66	1,576	38,9
<i>Helicobacter pylori</i> J99	1,64	1,491	39,2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,31	3,009	44,5
<i>Leptospira interrogans</i>	4,69	4,727	35,0
<i>Listeria innocua</i>	3,01	3,043	37,4
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,94	2,846	38,0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	4,40	3,989	65,0
<i>Mycoplasma genitalium</i> G-37	0,58	0,477	31,0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129	0,81	0,689	40,0
<i>Neisseria meningitidis</i> A Z2491	2,18	2,065	51,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2192	6,83	6,157	66,0
<i>Rickettsia prowazekii</i> Madrid E	1,10	0,835	29,0
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC	2,82	2,89	32,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1	1,85	1,697	38,0
<i>Treponema pallidum</i> Nichols	1,14	1,036	52,0
<i>Vibrio cholerae</i> N16961 — 1 хромосома	2,96	2,742	47,0
2 хромосома	1,07	1,093	46,0

КЛАССИФИКАЦИЯ ГЕНОВ

Основной единицей наследственности, ответственной за формирование какого-либо элементарного признака, являются гены, совокупность которых формирует генотип. В соответствии с международной номенклатурой, названия генов происходят от кодируемых ими признаков, и их сокращают тремя малыми буквами латинского алфавита. Аналогичные гены, присутствующие у разных видов микроорганизмов, обозначают путем добавления к названию заглавной буквы латинского алфавита (гены, контролирующие разложение лактозы у разных видов бактерий — *lac Z*, *lac Y*), аллельные варианты генов, встречающиеся у представителей одного вида микроорганизмов, обозначают добавлением цифрового индекса, соответствующего порядковому номеру измененного нуклеотида (*lac Z* 195). Гены подразделяются на структурные и функциональные в зависимости от их роли в клетке. Структурные гены детерминируют первичную структуру белков бактерий и могут быть классифицированы на две большие группы:

1. Гены «домашнего хозяйства»:

а) отвечающие за биохимические процессы в клетке (метаболизм аминокислот, углеводов, энергии, липидов, кофакторов и витаминов, сложных углеводов и липидов, нуклеотидов);

б) отвечающие за биологические процессы клетки (подвижность клеток, обработку информации из внешней среды, транспорт веществ через мембраны, сигнальную трансдукцию, обработку генетической информации, репликацию и репарацию, развитие и деградацию, транскрипцию, трансляцию).

2. Гены добавочных/вспомогательных функций:

а) вирулентности;

б) устойчивости к антибиотикам;

в) деградации редких субстратов (углеводородов нефти, пластификаторов, хлорфенолов и т. д.).

В составе первичной структуры ДНК микроорганизмов могут находиться следующие компоненты:

1. **Простые повторяющиеся последовательности (SSR)** состоят из 2–6 нуклеотидов, которые могут много раз в тандеме повторяться, например, ЦАТ ЦАТ ЦАТ.

2. **СрG-островки** — последовательности нуклеотидов, богатые гуанином и цитозином. Чаще встречаются в начале гена. Распознаются Toll-like-рецепторами клеток иммунной системы. СрG-островки обладают стимулирующим действием на В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, и опосредованно влияют на естественные киллеры. В геноме человека также встречаются СрG-мотивы, но в метилированном состоянии, в результате чего они не обладают иммуностимулирующим эффектом.

В последнее время расшифрована первичная структура ДНК многих микроорганизмов, что требует дальнейшего анализа информации, закоди-

рованной в ней. Описание структурных компонентов генома и их функций получило название **аннотирование генома**, которое включает: определение границ, расположения, функций генов и механизмов их регуляции, положение промоторов, содержание Г + Ц, положение CpG-островков, геномных повторов, определение плотности генов, положения транспозонов, IS-элементов, тРНК и рРНК генов.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КАРТЫ

Геном микроорганизмов отображают графически в виде концентрических колец. Такое графическое изображение генома получило название **генетической карты**. Два наружных кольца изображения определяют положение на двух цепочках ДНК открытых рамок считывания, которые соответствуют старту синтеза белка, или началу гена. Рамки считывания обозначены разными цветами в соответствии с функциями генов. Плотность рамок считывания выше в начале репликона. Третье кольцо отражает отклонение в процентном содержании Г + Ц от средней величины — 37,6 %: красный цвет — в большую сторону, голубой — в меньшую. Четвертое кольцо отражает содержание Г + Ц на основной цепи к общему содержанию Г + Ц в ДНК. На этом кольце видна асимметрия в содержании Г + Ц в начале и конце репликона. Пятое кольцо отражает положение повторов, окрашенных в соответствии с размерами. Кольца 6 и 7 отражают положение тРНК и рРНК генов (рис. 1).

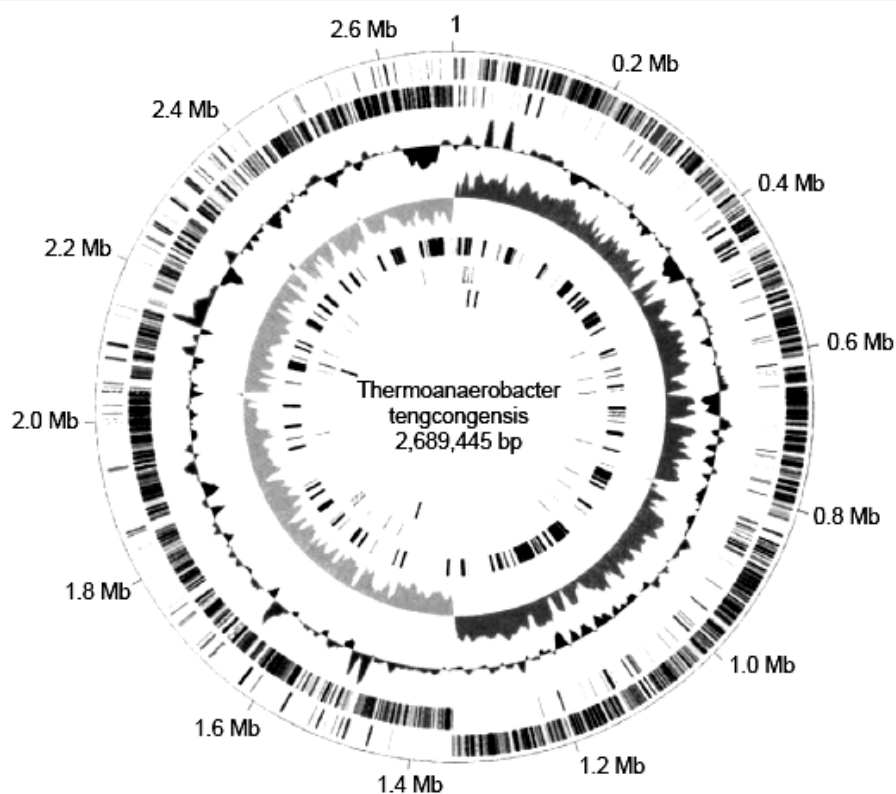


Рис 1. Генетические карты генома *Thermoanaerobacter tengcongensis*

ПЛАЗМИДЫ

Генетические признаки микроорганизмов могут кодироваться не только бактериальной хромосомой, но и плазмидами. **Плазмиды** — это *внехромосомные факторы наследственности, представляющие собой небольшие кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, располагающиеся в цитоплазме и способные к автономной репликации*. В плазмидах закодирована информация, необходимая для их репликации в бактериях, а также информация о дополнительных признаках, сообщающих бактериям преимущества в тех или иных условиях обитания и в стрессовых ситуациях. В одной клетке может быть несколько плазмид, совокупность которых называют **плазмотипом**. Например, *Borrelia burgdorferi* B31 содержит 17 плазмид общим размером, сравнимым с геномным — $0,53 \times 10^6$ п.о. (против $0,91 \times 10^6$ п.о. в геноме). Плазмиды могут интегрировать в бактериальную хромосому, тогда их называют **эписомами**. Репликация плазмид начинается со связывания с итероном — белком, инициирующим репликацию.

Плазмиды классифицируют на несколько групп в зависимости:

1) от **размера**: большие, средние, малые (космиды);

2) **способности вызывать конъюгацию бактерий**: а) конъюгативные, которые имеют относительно большие размеры и содержат информацию, необходимую для автономной репликации и переноса ДНК реципиенту; б) неконъюгативные, которые не способны запускать конъюгацию; они могут передаваться реципиенту при наличии в клетке конъюгативных плазмид;

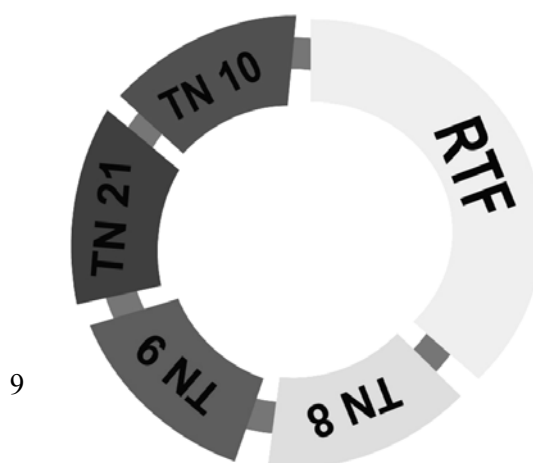
3) **способности к репликации в одной клетке**: совместимые и несовместимые;

4) от **кодируемого фенотипического эффекта**:

а) фертильности — F-плазмиды;

б) бактериоциногении — Col-плазмиды (ColE1, ColE2). Кодируют продукцию бактериоцинов — антибиотикоподобных веществ, обладающих бактерицидным действием в отношении близкородственных видов микроорганизмов. Встречаются у представителей нормальной микрофлоры человека с частотой 1:1000 клеток;

в) резистентности — R-плазмиды (рис. 2). Обуславливают устойчивость или множественную устойчивость к антибиотикам, солям тяжелых металлов, УФ-излучению (плазмиды R100, RP 4). Как правило, являются конъюгативными. Состоят из двух участ-



9

Рис 2. Структура плазмиды множественной резистентности

ков: 1) фактора переноса устойчивости, или RTF, содержащего гены репликации, и переноса в клетку реципиента; 2) R-детерминанты, содержащей гены или транспозоны резистентности;

г) вирулентности (плазмиды LT2, K88). Кодировать продукцию энтеротоксинов, фимбрий;

д) биodeградации (D-плазмиды). Обеспечивают расщепление сложных субстратов (углеводородов нефти и т. д.);

е) криптические. Фенотипический эффект не установлен.

Плазмиды участвуют в генетических перестройках, обеспечивают горизонтальный перенос генов внутри- и межвидовой, используются в качестве векторов в генной инженерии.

МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Мобильные генетические элементы (прыгающие гены) — участки ДНК, способные к транспозиции, или случайному перемещению, из одного места в другое: в пределах одной молекулы ДНК, из одной ДНК в другую. Не способны к самостоятельной репликации. Размножаются в составе бактериальной хромосомы или плазмид. К подвижным генетическим элементам относятся IS элементы, транспозоны, интегроны (рис. 3).

Транспозиция обеспечивается ферментом — транспозазой. Ген, кодирующий этот фермент, входит в состав всех мобильных генетических элементов. Транспозаза обладает эндонуклеазной и лигазной функцией: она разрезает ДНК по краям мобильного генетического элемента (эндонуклеазная функция) и сшивает его с разрывом ДНК в новом месте (лигазная функция). В некоторых случаях транспозиция сопровождается удвоением мобильных генетических элементов и перемещением копии в другое место.

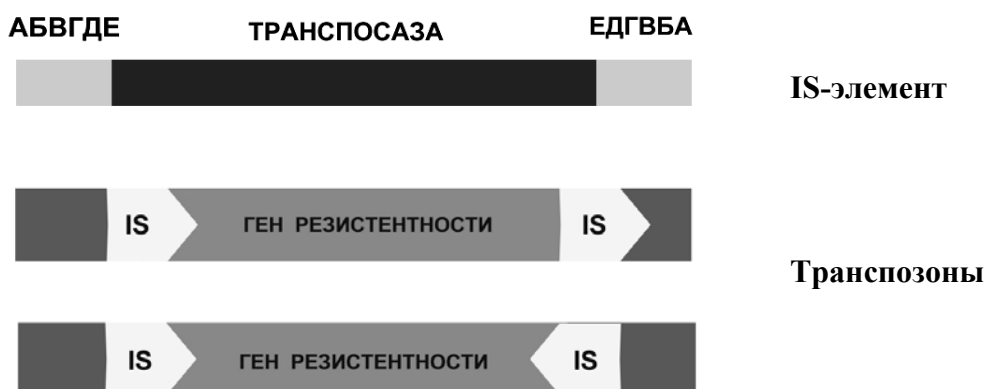


Рис. 3. Структура IS-элементов и транспозонов

ИНСЕРЦИОННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, или IS-ЭЛЕМЕНТЫ

Это разновидность мобильных генетических элементов, которые не несут в своем составе структурные гены, а только гены, отвечающие за перемещение. Многообразие IS-элементов обозначают цифровыми индексами: IS 1, IS 6010. Их размер меньше, чем транспозонов и составляет от 700 до 1800 п.о., но описаны IS-элементы более крупных и мелких размеров — 5700 и 200 п.о. Центральную часть IS-элемента занимает ген, кодирующий транспозазу; некоторые IS-элементы несут промоторы или репрессоры генов, или их части. На обоих концах IS-элемента находятся повторяющиеся последовательности, или палиндромы, размером 10–40 п.о., по которым транспозаза распознает его и вырезает. В геноме бактерий присутствует, как правило, небольшое количество их копий: в геноме *E. coli* IS 1 встречается в 6–10 копиях, а IS 2 — 5 копиях. Транспозиция происходит двумя путями: 1) консервативным: покидая один участок, IS-элемент встраивается в другой; 2) репликативным: синтезируется копия, которая встраивается в другой участок генома. Встраивание, как правило, осуществляется в участках, богатых А/Т.

Значение IS-элементов:

1. Участвуют в мутационной изменчивости микроорганизмов — инсерциях и делециях. Инсерция IS-элементов в бактериальную ДНК приводит к синтезу неполноценного белка. При встраивании некоторых IS-элементов по обоим их концам происходит удвоение небольшого участка хромосомы размером 5–9 п.о. С меньшей частотой (10^{-3} – 10^{-4}) IS-элементы приводят к делециям в прилегающих генах: покидая ДНК, IS 4 вырезает участки хромосомальной ДНК по обоим своим концам.

2. Являются генетическими маркерами вида или рода бактерий. Некоторые IS-последовательности специфичны для определенных видов микроорганизмов, что позволяет по их наличию осуществлять видовую идентификацию бактерий.

3. Являются местом распознавания и встраивания плазмид и генно-инженерных векторов. Плазмиды и генно-инженерные векторы встраиваются в бактериальную хромосому в области IS-последовательностей.

4. Участвуют в регуляции функций генов — активации или репрессии, т. к. несут в своем составе промоторы или репрессоры генов или их компоненты. Например, формирование резистентности к метронидазолу у анаэробных микроорганизмов связано с активацией молчащих *nim* A, B, C, D, E генов в результате встраивания IS-элементов, несущих промоторы этих генов.

ТРАНСПОЗОНЫ

Это разновидность мобильных генетических элементов, которые содержат в своем составе один или несколько структурных генов и гены, ответственные за перемещение. Транспозоны обозначают как Tn с числовым индексом, например, Tn 4556. Их размер больше IS-элементов и составляет 2 500–7 000 п.о. На обоих концах Tn находятся прямые или инвертированные повторы, по которым транспозаза распознает их и вырезает. В зависимости от структуры выделяют два класса транспозонов:

1. Сборные (Tn 5, 9, 10, 903 и 1681). Состоят из фенотипического модуля (гены резистентности) и двух располагающихся по краям IS-элементов, ориентированных в одном или противоположных направлениях. IS-элементы обеспечивают перемещение транспозонов, но могут покидать его и перемещаться самостоятельно.

Tn 10, имеющий по краям две копии IS 10, подвергается переносу с частотой 10^{-7} . Этот транспозон встраивается, преимущественно, в участках с последовательностью ГЦТНАГЦ (при встраивании этот участок удваивается) и, как правило, полностью безошибочно вырезается, но в некоторых случаях в процессе эксцизии может захватывать из бактериальной хромосомы дополнительно 50 п.о.

2. Комплексные (Tn 1, 3, 4, 7, 501 и 551). Состоят из фенотипического модуля (гены резистентности) и располагающихся по краям не прямых повторов размером 30–40 п.о. Функционируют как единое и неделимое целое. Частота транспозиций комплексных транспозонов составляет 10^{-4} – 10^{-6} . Большинство из них при встраивании проявляют сайтспецифичность: Tn 7, например, имеет только один участок встраивания в хромосому *E. coli*. Некоторые транспозоны (Tn 3) обеспечивают «иммунитет» клетки к встраиванию идентичных транспозонов.

Бактериофаг μ , или мутатор, также относится к комплексным транспозонам. Этот самый сложно организованный транспозон содержит 38 000 п.о., и на его концах находятся инвертированные повторы размером 11 п.о. Он не имеет определенного сайта встраивания в бактериальную ДНК, в процессе вырезания из нее обычно захватывает участок, равный 10 % своего размера. Бактериофаг μ часто используют в генетических исследованиях, т. к. в естественных условиях он не входит в состав бактериальных геномов и потому легко проводить его детекцию.

Перенос транспозонов осуществляется консервативным или репликативным механизмом. Консервативный перенос происходит путем вырезания транспозона из одного участка и транспозицией в другой без увеличения количества копий, при этом участок ДНК, откуда вырезается транспозон, утрачивает свои функции. При репликативном способе переноса синтезированная копия транспозона перемещается в новое место, при этом механизме увеличивается количество копий.

Функции. Транспозоны участвуют в регуляции активности генов, инактивируя или активируя их. Осуществляют горизонтальный перенос генов, например, вирулентности или резистентности, обуславливая распространение устойчивости к антибиотикам среди микроорганизмов.

ИНТЕГРОНЫ

Отвечают за сайтспецифическую рекомбинацию. Интегроны — мелкие генетические элементы, содержащие промотор и ген тирозиновой рекомбиназы — *int*. Рекомбиназа распознает в бактериальной хромосоме сайт *att I* и обеспечивает встраивание в него. Не содержат гены, отвечающие за транспозицию. Способны соединяться с кассетами генов, кодирующими резистентность и другие признаки, при этом генетические кассеты должны содержать обеспечивающие подвижность гены и элемент размером 59 п.о.

ОБМЕН ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИЕЙ

Геном бактерий характеризуется пластичностью, или способностью изменяться. В зависимости от механизмов формирования генетического разнообразия бактерий выделяют: 1) **клональные штаммы**, генетическое разнообразие которых формируется только благодаря мутациям (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spp.*); 2) **панмиктические штаммы**, генетическое разнообразие которых формируется благодаря мутациям и горизонтальному переносу генов (*Neisseria gonorrhoeae*). **Горизонтальный перенос генов** — обмен генетической информацией между различными эволюционными группами. Горизонтальный перенос генов представляет собой мощный фактор эволюции, приводящий: 1) к формированию видов; 2) многообразию видов; 3) к дивергенции микроорганизмов. Горизонтальный перенос генов происходит у микроорганизмов, обитающих в схожих условиях среды, и возможен даже между отдаленными систематическими группами; позволяет быстро приобретать новые свойства. Кроме того, он приводит к стиранию границ между группами микроорганизмов, относящихся к разным таксономическим уровням. До 30 % генома бактерий может приобретаться за счет горизонтального переноса генов. Например, у *E. coli* 18 % генов приобретены таким образом.

В основе горизонтального переноса генов лежат **генетические рекомбинации**. Генетические рекомбинации сопровождаются переносом ДНК в одном направлении — от донора к реципиенту, при этом передается

не вся молекула, а лишь небольшой ее участок, что приводит к формированию частичной зиготы, или мерозиготы. Клетку, в которой произошла рекомбинация, называют рекомбинантом. У бактерий известны **три варианта рекомбинаций**, отличающиеся способом переноса ДНК: **конъюгация, трансдукция и трансформация**.

ТРАНСФОРМАЦИЯ

Трансформация — разновидность рекомбинативной изменчивости микроорганизмов, сопровождающаяся переносом ДНК от донора к реципиенту **через окружающую среду**. В процессе трансформации ДНК-фрагмент погибшей и разрушенной бактерии встраивается в ДНК реципиента, находящегося в состоянии компетентности. Впервые продемонстрирована в 1928 г. Фредериком Гриффитом. Описана как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий родов *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Escherichia*, *Pneumococcus*. Для осуществления трансформации необходимы следующие условия:

1. Наличие небольшого (до 20 генов) фрагмента двухцепочечной ДНК донорской клетки. Одноцепочечные или меньшего размера ДНК быстро разрушаются нуклеазами окружающей среды.

2. Наличие реципиента, находящегося в состоянии компетентности. В естественных условиях захват ДНК клеткой-реципиентом осуществляется в фазу логарифмического роста, когда продуцируются специфические ДНК-связывающие белки, кодируемые *com*-генами. Состояние проницаемости бактериальных мембран для ДНК называют компетентией. В лабораторных условиях компетентия достигается путем обработки химическими веществами, например, добавлением CaCl_2 в культуру.

Стадии трансформации. На **первой стадии трансформации** происходит захват ДНК клеткой-реципиентом. У **грамотрицательных микроорганизмов** (например, *N. gonorrhoeae*) ДНК присоединяется к поверхности бактерии и поступает в ее цитоплазму по каналу, пронизывающему наружную мембрану, пептидогликан, периплазматическое пространство и цитоплазматическую мембрану. В области наружной мембраны канал состоит из белка-пиллина Pil Q, в пептидогликане и периплазматическом пространстве — из Pil E и ДНК-связывающего белка Com E, в цитоплазматической мембране — из белка Com A (рис. 4). Перед поступлением в канал, состоящий из белка Com A, одна из двух нитей ДНК разрушается нуклеазой. У **грамположительных микроорганизмов** (например, *B. subtilis*) нет наружной мембраны, и поэтому транспорт происходит только через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану. В клеточной стенке для прохождения ДНК формируется канал из белка Com GC и ДНК-связывающего протеина Com EA. На уровне цитоплазматической мембраны

одна из нитей ДНК разрушается нуклеазой, а вторая транслоказой Com FA транспортируется по каналу из белка Com EC в цитоплазму.

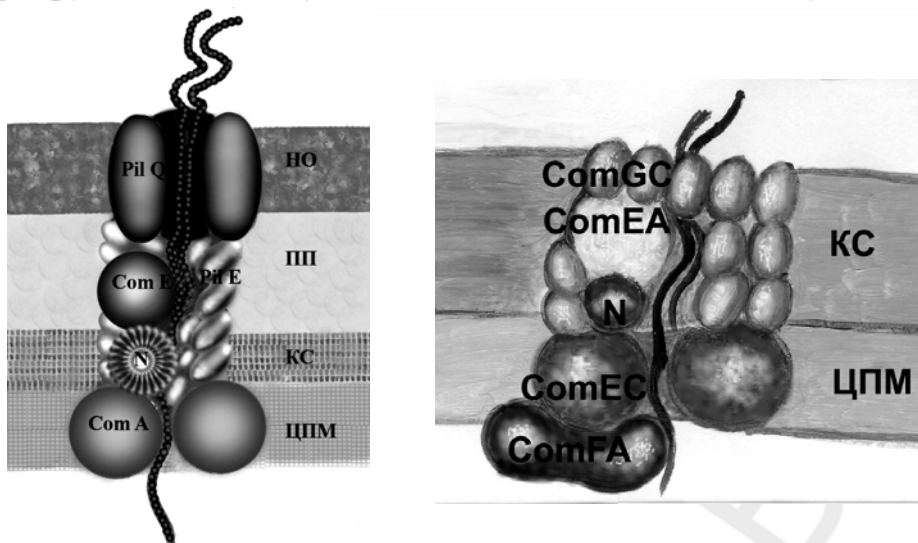


Рис. 4. Каналы для поступления ДНК в процессе трансформации: НО — наружная оболочка; ПП — периплазматическое пространство; КС — клеточная стенка; ЦПМ — цитоплазматическая мембрана

На **второй стадии трансформации** происходит реципрокный обмен между донорской и реципиентной ДНК, называемый гомологичной рекомбинацией. Рекомбинация требует сходства между генетической информацией донора и реципиента и наличия генов бактериальной рекомбинации — *recA*, *B* и *C*. В редких случаях возможна рекомбинация между отдаленными видами.

Значение. В естественных условиях трансформация приводит к усилению вирулентности. Используется в микробиологии для конструирования генетически модифицированных микроорганизмов, изучения функций генов.

ТРАНСДУКЦИЯ

Трансдукция — разновидность рекомбинативной изменчивости микроорганизмов, сопровождающаяся переносом генетической информации от донора к реципиенту *с помощью бактериофага*. Перенос участков бактериальной хромосомы фагами был открыт в 1951 г. Ледербергом и Циндером у *Salmonella typhimurium*, впоследствии описана у многих родов бактерий: *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*. Капсидная оболочка бактериофага защищает ДНК от действия нуклеаз, поэтому трансдукция, в отличие от трансформации, не чувствительна к нуклеазам. Трансдукцию осуществляют **умеренные фаги**. Они переносят лишь небольшой фрагмент генома клетки хозяина, и, как правило, среди особей одного вида, но

возможен и межвидовой перенос генетической информации, если бактериофаг имеет широкий спектр хозяев.

В зависимости от исхода взаимодействия фага с бактерией выделяют литические и умеренные фаги.

Литические (вирулентные) фаги впрыскивают нуклеиновую кислоту в клетку и репродуцируются в ней, после чего покидают клетку путем лизиса.

Лизогенные, или умеренные, фаги, инъецировав свою ДНК в клетку, могут вести себя двояко: 1) начать цикл репродукции и покинуть клетку путем лизиса; 2) интегрировать свою генетическую информацию в геном бактерии и в его составе передаваться дочерним клеткам. Фаги, встроенные в геном бактерий, называют **профагами**, а бактерии со встроенными в геном фагами — лизогенными. В результате действия факторов, прерывающих лизогению (УФ, ионизирующая радиация, химические мутагены), вновь синтезируются вирусные частицы, которые покидают клетку. Примером умеренного фага является фаг λ , поражающий *E. coli*. Этапы его трансдукции:

1. Адсорбция фага к рецепторам на поверхности *E. coli*.
2. Проникновение хвостовой части фага через клеточную стенку и инъекция ДНК в клетку-хозяина.
3. Рекомбинация кольцевой молекулы ДНК фага с ДНК хозяина и установление лизогении (фаговая ДНК находится в интегрированном состоянии).
4. Передача профага дочерним клеткам в процессе размножения *E. coli*. Чем больше делений, тем большее количество клеток содержит бактериофаг.
5. Окончание лизогении. ДНК бактериофага вырезается из бактериальной хромосомы. Происходит синтез вирусных белков и репликация ДНК фага, сопровождающиеся созреванием вирусных частиц и их выходом из клетки путем ее лизиса. Во время вырезания бактериофаг может захватывать близлежащие бактериальные гены, которые в последующем попадают в клетку реципиента.
6. Встраивание генома бактериофага, несущего бактериальные гены, в ДНК бактерии-реципиента.

В зависимости от места встраивания бактериофага выделяют следующие виды трансдукции:

а) **неспецифическую (общую)**. Бактериофаг может встраиваться в любом месте генома бактерии и поэтому способен переносить любой фрагмент ДНК хозяина;

б) **специфическую**. Бактериофаг встраивается в строго определенные места генома бактерии, а поэтому переносит лишь строго определенные фрагменты ДНК;

в) **абортивную**. Участок бактериальной хромосомы донора, перенесенный бактериофагом, не вступает в рекомбинацию с хромосомой реципиента, а остается вне хромосомы. Происходит транскрипция перенесенной ДНК (на это указывает синтез соответствующего генного продукта), но не репликация. В процессе деления клетки донорский фрагмент переходит только в одну из дочерних клеток и со временем утрачивается.

Конъюгация

Конъюгация — разновидность рекомбинативной изменчивости микроорганизмов, сопровождающаяся переносом генетической информации от донора к реципиенту **через непосредственный контакт** (конъюгационный мостик). В естественных условиях происходит с частотой $1:10^6$. Ее существование доказано в 1946 г. Ледербергом и Татумом.

Для грамотрицательных микроорганизмов конъюгация — основной механизм горизонтальной передачи генов. Может осуществляться как среди особей одного вида, так и разных видов и способствует передаче таких признаков, как множественная антибиотикорезистентность. Грамположительные микроорганизмы также могут путем конъюгации передавать признаки, однако основной механизм у них — трансдукция. У грамположительных микроорганизмов клетки-доноры продуцируют адгезивный материал, который способствует агрегации с реципиентом и передаче генетического материала. Для осуществления конъюгации необходимо выполнение следующих условий:

1. **Наличие донора.** Донор отличается от реципиента присутствием полового фактора F (от *fertility* — плодовитость), представляющего автономно реплицирующуюся плазмиду (кольцевая двухцепочечная молекула ДНК с массой 45×10^6 Да), содержащую около 25 генов, которые детерминируют: 1) процесс независимого от генома удвоения (репликации); 2) особые структуры клеточной поверхности — половые пили, или **F-пили**, которые служат для взаимного узнавания при контакте донора и реципиента и образуют конъюгационный мостик.

2. **Наличие реципиента.** Не имеет плазмиды F.

Исход конъюгации и частота передачи хромосомных признаков зависят от физиологического состояния F-фактора.

Физиологические состояния F-плазмиды (рис. 5):

1. **Автономное F⁺.** F-фактор находится в цитоплазме в свободном состоянии, не интегрирован в бактериальную хромосому и не несет в своем составе хромосомные гены.

2. **Интегрированное, или Hfr.** F-фактор может интегрироваться в определенных местах в бактериальную хромосому и в таком состоянии носит название эписомы. Донорские клетки с интегрированным фактором F

обеспечивают высокую частоту переноса хромосомной ДНК; они получили название клеток *Hfr* (от англ. high frequency of recombinants).

3. **Автономное F'.** Интегрированная F-плазмида может покидать бактериальную хромосому, захватывая близлежащие гены, таким образом превращаясь в F'-фактор.

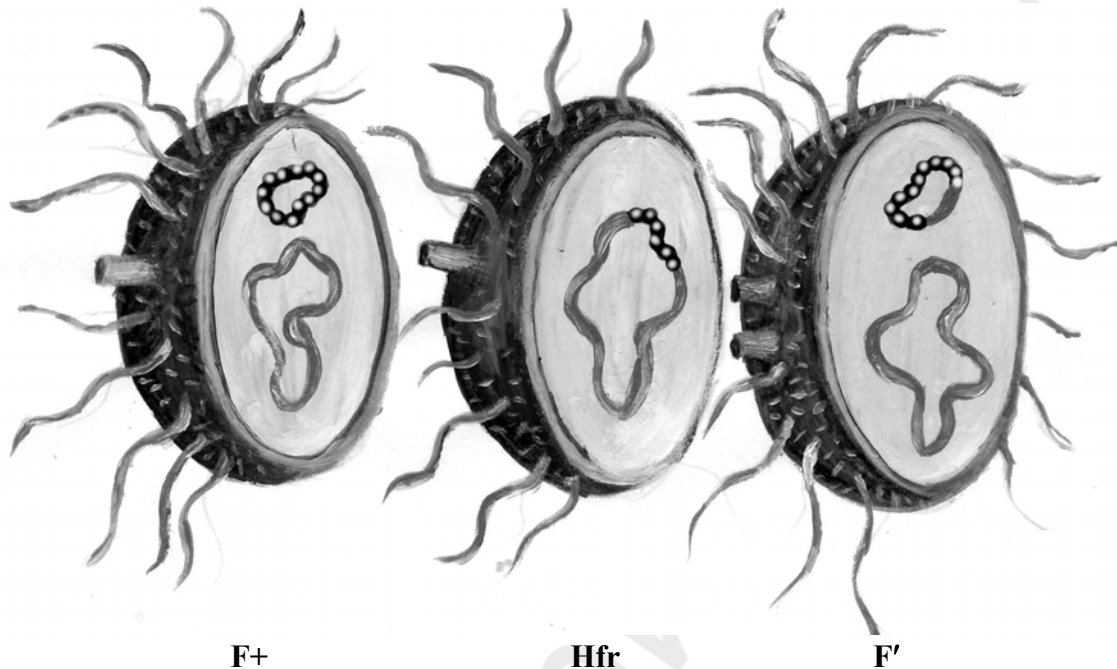


Рис. 5. Физиологические состояния F-плазмиды

Механизм и результаты конъюгации:

1. **Перенос плазмиды F.** Происходит при автономном состоянии F-фактора. От донора к реципиенту передается только плазмида F с частотой, близкой к 100 %. Реципиент превращается в потенциального донора, донор сохраняет фактор F. Хромосомные признаки не передаются. Осуществляется следующим образом:

а) **образование пары.** Столкновение донора и реципиента → прикрепление секс-пилей донора к поверхности реципиента, при этом контакт клеток происходит очень короткое время → образование конъюгационного мостика, защищающего передаваемую ДНК от действия нуклеаз окружающей среды;

б) **перенос ДНК.** Происходит разрыв в определенном месте одной из цепочек F-плазмиды. Разорванная цепь движется по конъюгационному мостику. В цитоплазме реципиента перенесенная цепочка ДНК достраивается второй, концы замыкаются (рис. 6).

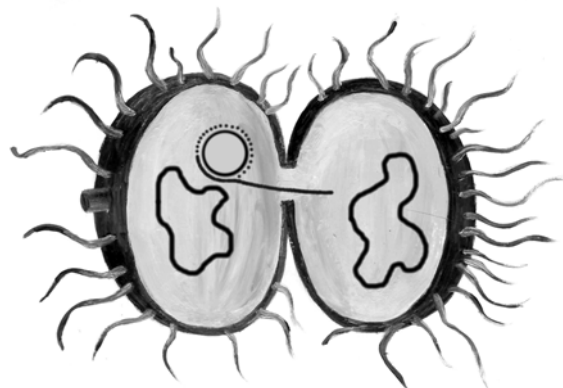


Рис. 6. Перенос плазмиды F

2. **Перенос бактериальной ДНК за счет Hfr-фактора.** Происходит, если F-фактор интегрирован в бактериальную хромосому. В результате такой конъюгации реципиент остается F⁻, донор остается Hfr, а перенос полной хромосомной ДНК донора или ее фрагмента происходит с высокой частотой. Так как перенос всей хромосомы *E. coli* продолжается при 37 °C около 100 мин, а время контакта клеток ограничено, к реципиенту в большинстве случаев переходит не вся донорская ДНК, при этом Hfr-фактор не попадает реципиенту. Механизм конъюгации:

а) **образование пары;**

б) **перенос ДНК.** Разрыв одной из цепочек ДНК перед местом расположения Hfr-фактора с образованием репликативной вилки. Разорванная цепочка движется внутрь клетки-реципиента 5'-концом вперед. В последнюю очередь переносится Hfr-фактор, поэтому он попадает реципиенту только после перехода всей хромосомы (рис. 7);

в) **сайтспецифическая рекомбинация.**

3. **Перенос генов фактором F'.** Интеграция фактора F в бактериальную хромосому обратима. При правильном «вырезании» (эксцизии, выключении) фактора F из бактериальной хромосомы разрыв происходит исключительно по его краям, в редких случаях выключение происходит с захватом соседних участков бактериальной ДНК, что приводит к образованию фактора F'. Так как F⁻ и F'-факторы передаются реципиентам с высокой частотой (100 %), хромосомные гены с высокой частотой переносятся в клетку реципиента. Тот же самый фрагмент ДНК мог бы передаваться Hfr-клеткой штамму F⁻ с максимальной частотой 1 %.

МУТАЦИИ

Термин «мутации», обозначающий «скачкообразное изменение наследственных признаков», ввел Де Фриз, изучавший изменчивость и наследственность у растений. Позднее Беиеринк распространил это понятие на бактерии. Спустя некоторое время экспериментально был доказан спонтанный и ненаправленный характер мутаций.

В настоящее время мута-

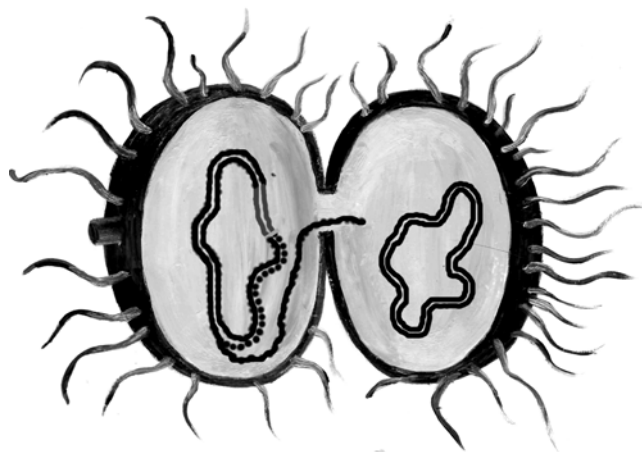


Рис. 7. Перенос ДНК в Hfr-состоянии

ции рассматривают как **любое стабильное наследуемое изменение ДНК**. В популяции бактерий в процессе ошибок репликации постоянно возникают мутации, которые приводят к появлению **аллелей** генов. Если условия микроокружения создают селективное преимущество мутирующему микроорганизму, то благодаря быстрому размножению он становится преобладающим в популяции.

Некоторые штаммы характеризуются повышенной частотой мутаций, связанной с нарушением систем репарации. Такие штаммы получили название **мутаторов**. Впервые они описаны в 1950 г. Мутаторы важны в процессе видообразования микроорганизмов. Однако мутаторы не только с высокой частотой мутируют, но и обмениваются генами, тем самым затормаживают процессы дивергенции микроорганизмов.

Мутации классифицируются в зависимости от ряда факторов: причин возникновения, последствий, направленности, локализации, типов замен нуклеотидов. Выделяют следующие типы мутаций (схема 2):

1. По причинам возникновения: спонтанные и индуцированные.

Спонтанные мутации регулярно возникают в популяции бактерий без экспериментального вмешательства. Их возникновение в естественных условиях происходит с частотой 10^{-6} – 10^{-9} и связано с присутствием низких концентраций мутагенов в окружающей среде. Большинство спонтанных мутаций формируются во время репликации генома вследствие случайных ошибок при включении нуклеотидов в ДНК.

Пример механизма замены. Тимин, обычно находящийся в оксо-форме и взаимодействующий с аденином, при таутомерном перемещении электронов может переходить в енольную форму, в которой он взаимодействует с гуанином. В результате в новой молекуле ДНК на месте пары А–Т появляется пара G–С.

Индукцированные мутации возникают под действием мутагенов; образовавшиеся клетки называют индуцированными мутантами. Мутагенами могут быть **химические агенты** (нитрит, алкилирующие агенты, акридиновые красители, этиленимин, азотистый или серный иприт и т. д.), **физические** (ультрафиолетовые лучи — 260 нм, ионизирующее излучение) или **биологические** (бактериофаги). Под действием мутагена частота мутаций



увеличивается и составляет 10^{-5} – 10^{-3} (одна мутация появляется при репликации 1–100 тыс. генов).

Схема 2. Классификация мутаций

2. По локализации: хромосомные, плазмидные и генные.

Хромосомные¹ — мутации, приводящие к крупным перестройкам, при этом гены или их группы могут быть утрачены (делеция), перемещены в пределах хромосомы (транспозиция) или «разорваны» путем вставки посторонней ДНК (инсерция), удвоены (дупликация). За некоторым редким исключением, ревертанты не появляются.

Плазмидные. Происходят в плазмидах и по типу перестроек аналогичны хромосомным.

Генные — мутации, приводящие к изменениям в пределах одного гена. К ним относятся:

а) точечные мутации. Сопровождаются заменой одного нуклеотида и являются наиболее распространенной группой мутаций у прокариот. Происходят в процессе репликации генома и нередко приводят к появлению мутантного белка. Характерна высокая частота реверсии. В зависимости от происходящих замен нуклеотидов точечные мутации могут подразделяться на **транзиции** и **трансверзии**. Транзиции сопровождаются заменой пуринового основания на пуриновое, или пиримидинового на пиримидиновое. Трансверзии сопровождаются заменой пуринового основания на пиримидиновое или наоборот (рис. 8).

В зависимости от последствий точечные мутации могут быть **молчащими**, **миссенс**, **нонсенс**. **Молчащие (синонимичные) мутации**, несмотря на замену нуклеотида, не приводят к изменению кодируемой аминокислоты, что связано с вырожденностью (избыточностью) генетического кода, когда одна аминокислота кодируется несколькими триплетами. Молчащие мутации преимущественно происходят в третьем нуклеотиде кодона. **Миссенс (несинонимичные) мутаций** приводит к замене нуклеотида и кодируемой аминокислоты, что, нередко, сопровождается изменением функциональной активности белка — активацией или инактивацией его. **Нонсенс-мутации** сопровождаются формированием стоп-кодона, с после-

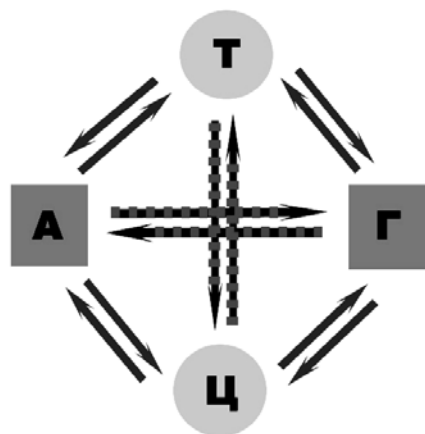


Рис. 8. Транзиции (А↔Г и Т↔Ц) и трансверзии (А↔Т, Г↔Ц, Ц↔А)

¹ Геномные мутации отсутствуют у бактерий в связи с наличием у них только одной хромосомы

дующей терминацией трансляции и появлением неполноценного белка с меньшей последовательностью аминокислот;

б) микроинсерции или микроделеции — генные мутации, сопровождающиеся включением дополнительной пары оснований в ДНК/РНК или их утратой. Последствием вставки или выпадения одного нуклеотида является **сдвиг рамки считывания белков**, что приводит к изменению группировки триплетов, неправильному прочтению триплетов и синтезу пептида с новым составом аминокислот. Ревертанты редки.

3. По направленности: прямые и обратные.

Обратные мутации возникают в ответ на прямые мутации и восстанавливают исходный фенотип.

Истинные обратные мутации — мутации, возникающие в мутированном триплете и точно восстанавливающие исходный генотип. Измененный при первой мутации триплет будет вновь кодировать ту же аминокислоту, что и раньше.

Реверсии (супрессорные) мутации — мутации, восстанавливающие исходный фенотип. Супрессорные мутации могут происходить как в исходном гене, так и в каких-либо других участках хромосомы (*интрагенные* и *экстрагенные* супрессорные мутации).

Для **выделения мутантов** применяют 2 метода:

1. **Позитивная селекция.** Применяют селективную среду, на которой растут только мутантные колонии. Например, для поиска резистентных к пенициллину мутантов используют среду с пенициллином.

2. **Негативная селекция.** Используется для выявления мутантов, утративших признаки (ауксотрофы) по сравнению с родительскими клетками (прототрофными). Ауксотрофные мутанты утрачивают способность синтезировать жизненно важные нутриенты. Для их выявления используют метод реплик и минимальные питательные среды.

ГЕНОМИКА

Термин «геномика» предложен в 1986 г. Томасом Родерикком для обозначения дисциплины, занимающейся секвенированием и анализом геномов, составлением генетических карт организмов. В настоящее время под термином «геномика» понимают новое направление генетики, изучающее геномы и отдельные гены организмов на индивидуальном и популяционных уровнях для установления взаимосвязи организмов и путей их эволюции. Понятие геном следует разграничивать с понятием генотипа.

Генотип — это совокупность генов, детерминирующих фенотипические признаки. Геном — это вся ДНК/РНК организма.

Развитие геномики начинается с началом нового глобального научного проекта «Геном человека» (1990), в рамках которого в 1995 г. впервые секвенирован геном микроорганизма *Haemophilus influenzae*, в 1996 г. — *Saccharomyces cerevisiae*, в 2000 г. — геном человека. В настоящее время проводится секвенирование геномов 200 видов микроорганизмов, 60 из которых уже в стадии завершения.

В геномике выделяют несколько направлений исследований: структурное и функциональное.

Структурная геномика. Определяет первичную структуру генома, границы генов и их организацию, структуру белков и других биомолекул клетки. Описывает организацию генома и протеома в целом у различных организмов. Использует методы картирования, секвенирования, рентгеноструктурного анализа, биоинформатики. **Биоинформатика** — направление биологии, основанное на компьютерном анализе «in silico» первичной, вторичной, третичной структуры молекул ДНК, РНК, белков. В этих целях разработаны компьютерные программы и созданы базы данных по составу геномов, протеомов организмов.

Функциональная геномика. Изучает функции каждого гена, белка и других биомолекул клетки, механизмы регуляции их активности. Оценивает роль одного гена/протеина в сложной клеточной машине. Поскольку в геноме тысячи генов, функциональная геномика изучает сетевые взаимодействия генов/белков. Функции генов могут быть установлены на основании изучения синтезируемых с них мРНК, белков и образуемых метаболитов, поэтому в функциональной геномике выделяют следующие разделы:

- 1) транскриптомика изучает совокупность мРНК клетки и изменения в них в зависимости от среды и стадии развития;
- 2) протеомика изучает совокупность всех белков клетки, их структуру и взаимодействие друг с другом в зависимости от микроокружения и стадии развития;
- 3) метаболомика изучает метаболиты (конечные продукты клеточных процессов) и изменения в их составе в разные фазы жизненного цикла и состояния микроокружения бактерий.

Функциональная геномика использует методы биоинформатики, клонирования, направленного мутагенеза, рентгенологической кристаллографии (или ЯМР).

Геномика может быть классифицирована на фундаментальную и прикладную. Фундаментальная геномика вскрывает основы молекулярной структуры и функции клеток. Прикладная геномика предназначена для решения практических проблем в промышленности, медицине, сельском хозяйстве, охране окружающей среды, токсикологии, фармакологии.

В зависимости от объекта исследований подразделяется на геномику человека, животных, растений, микроорганизмов.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Генная инженерия — *раздел генетики, позволяющий модифицировать генетический состав организма и конструировать организмы с новыми свойствами*. Генетическая инженерия является основой биотехнологии и применяется для получения:

1. Продуктов микробного синтеза (антибиотиков, ферментов, иммунодепрессантов).
2. Рекомбинантных и векторных вакцин («Энджерикс В» — генно-инженерная вакцина против гепатита В).
3. Лекарственных рекомбинантных препаратов (инсулина, паратиреоидного гормона, гормона роста костей, активатора тканевого плазминогена, эритропоэтина, интерлейкинов).
4. Трансгенных животных и растений.
5. Микроорганизмов-деструкторов, разрушающих загрязнители окружающей среды.
6. Проведения генной терапии (введение нормально функционирующего гена).

В основе методов, используемых для создания генетически модифицированных организмов, лежит **метод клонирования**, заключающийся: 1) в выделении определенного гена из большого сложноустроенного генома; 2) переносе этого гена в маленький легко манипулируемый геном-вектор; 3) встраивании вектора в клетку-реципиента; 4) в экспрессии гена в клетке-реципиенте.

Векторы — система доставки генетической информации в клетку реципиента. В состав вектора перед рекомбинантным геном вводят сильный промотор, который: 1) распознается клеткой-реципиентом; 2) имеет высокую аффинность к РНК-полимеразе, благодаря чему ген быстро транслируется в мРНК. В качестве векторов используют плазмиды и бактериофаги.

Плазмидные векторы. Имеют небольшие размеры. Их метят геном антибиотикорезистентности, в который и осуществляют вставку чужеродной генетической информации. По утрате клеткой антибиотикорезистентности судят об успешности инсерции в вектор чужеродной генетической информации. Чем меньше плазмидный вектор, тем больший участок рекомбинантной ДНК может быть введен.

Векторные бактериофаги. У бактериофага λ одна треть генома может быть вырезана и заменена чужеродной ДНК. *In vitro* добавляют клони-

руемую ДНК, и образуется рекомбинантная молекула, которая упаковывается в фаговую частицу. Фаг инфицирует чувствительный к нему микроорганизм и вносит рекомбинантную ДНК. Позволяет клонировать большие фрагменты ДНК.

Этапы клонирования:

1. Изолируют ДНК из микроорганизма-донора и нарезают ее рестриктазами на фрагменты с липкими концами.
2. Разрезают вектор аналогичными рестриктазами, в результате чего образуются линейные молекулы с липкими концами.
3. Смешивают фрагменты клонируемой ДНК с разрезанным клонирующим вектором; благодаря липким концам образуются рекомбинантные молекулы.
4. Проводят **электропорацию** (трансформация под действием высоковольтного электрического разряда) бактерии-реципиента (легко культивируемые микроорганизмы *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*).
5. Проводят скрининг трансформантов. Способность синтезировать рекомбинантный белок трансформантом определяют в серологических реакциях либо по приобретенной клеткой ферментативной активности.

НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ: СЕКРЕТОРНЫЕ СИСТЕМЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

В настоящее время у грамотрицательных микроорганизмов известны 5 систем секреции белков-эффекторов (белков, выполняющих определенную функцию, в т. ч. и вирулентную) во внешнюю среду — I, II, III, IV, V, которые отличаются механизмом доставки белковых молекул во внешнюю среду (рис. 9).

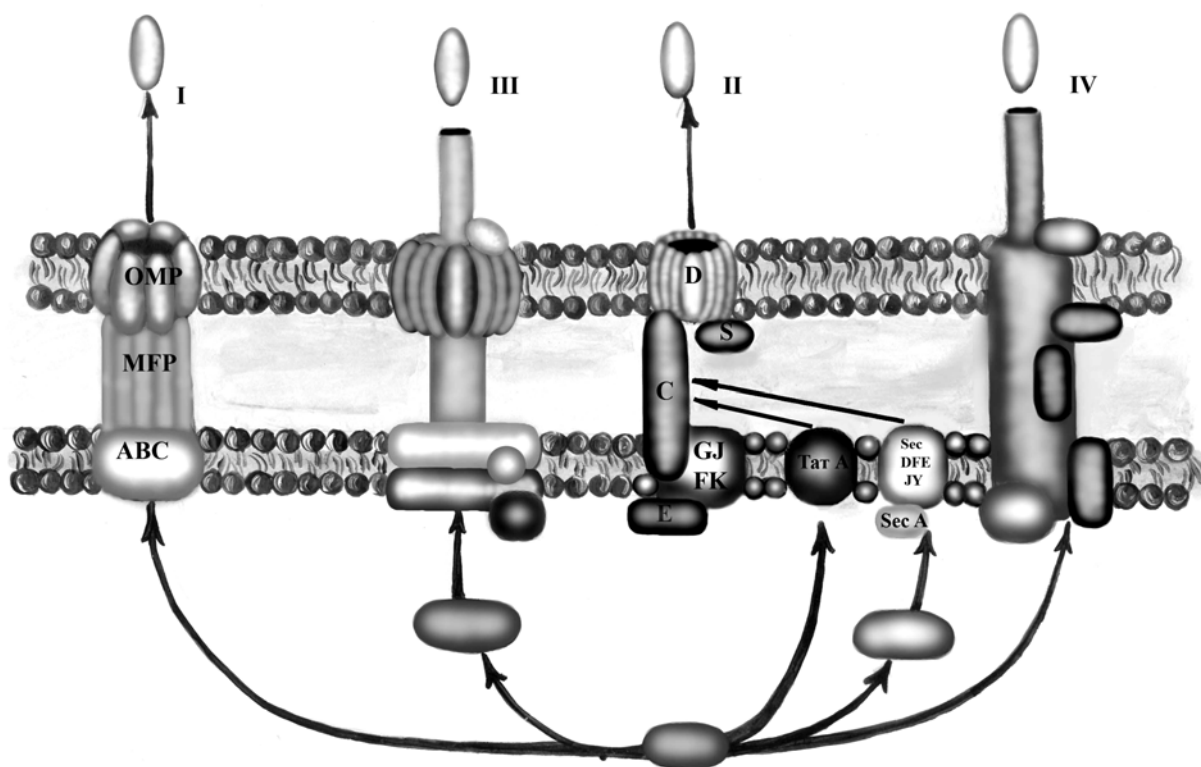


Рис. 9. Секреторные системы I, II, III, IV типов

ПЕРВЫЙ ТИП СЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ

Первый тип секреторной системы (ПТСС) состоит из трех компонентов: белка-порины в наружной мембране (ОМП), белка слияния мембран (MFP — membrane fusion protein), АТФ-связывающей кассеты в цитоплазматической мембране (ABC). Белки ПТСС секретируются во внешнюю среду через канал, насквозь пронизывающий оболочки клетки, и поэтому секретируемые белки не попадают в периплазматическое пространство и не образуют периплазматический интермедиат.

Секретируемая молекула подходит к АТФ-связывающей кассете (ABC) в цитоплазматической мембране, и в ответ на это белок слияния мембран MFP соединяет АТФ-связывающую кассету и белок-порин наружной мембраны, что приводит к образованию непрерывного канала,

диссоциирующего только после прекращения секреции. Взаимодействие 3 компонентов канала осуществляется без участия АТФ, но прохождение белка-эффектора по каналу требует затрат энергии.

Посредством этой системы *E. coli* секретирует α -гемолизин (Hly A), *Erwinia spp.* — металлопротеазу, *Pasteurella haemolytica* — лейкотоксин, *Bordetella pertussis* — аденилатциклазу.

ВТОРОЙ ТИП СЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ

Секреция белков с помощью второго типа секреторной системы (ВТСС) осуществляется в две стадии: сначала белок через цитоплазматическую мембрану попадает в периплазматическое пространство и только из него через наружную мембрану транспортируется во внешнюю среду. Все белки, секретируемые ВТСС, имеют сигнальный пептид на N-конце. На генетическом и структурном уровнях компоненты второй секреторной системы проявляют сходство с фимбриями IV типа.

Располагающийся в цитоплазматической мембране канал ВТСС состоит из АТФ-азы — Sec A, сигнальной пептидазы и нескольких белков Sec D, Sec E, Sec F, Sec G, Sec Y. Цитоплазматический шаперон Sec B транспортирует секретируемый белок к этому каналу. Сигнальная пептидаза отщепляет сигнальную последовательность в секретируемом белке, Sec A расщепляет АТФ, благодаря чему белок поступает в периплазматическое пространство, где под действием некоторых шаперонов претерпевает конформационные перестройки, необходимые для транспорта через наружную мембрану.

Транспорт через наружную мембрану требует взаимодействия 12–16 дополнительных белков: мономеры секретина (протеина D) полимеризуются с образованием кольцевидного канала, который стабилизируется липопротеином S. С помощью белка E (киназы) происходит транслокация протеинов G-K и сборка из них поверхностных пилеподобных структур. Протеины G-K имеют N-концевые повторы, которые отщепляются препилиновой пептидазой (протеином O).

Посредством ВТСС *K. oxytoca* секретирует разрушающий крахмал протеин (Pul A), *V. cholerae* — холеротоксин, *P. aeruginosa* — экзотоксин А, другие микроорганизмы — белки, разрушающие клеточные стенки.

ТРЕТИЙ ТИП СЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ

Отличие третьего типа секреторной системы (ТТСС) состоит в следующем: 1) доставляет секретируемые белки прямо в клетку-мишень и поэтому ее называют инжектосомой («injectosome»); 2) активация секреции происходит только при соприкосновении бактерии с клеткой-мишенью, и потому ТТСС относят к контактной секреции (описаны исключения).

Секреция белков-эффекторов происходит через шприцеподобную структуру, состоящую из 20 различных по структуре белков. При контакте с клеткой-мишенью белки полимеризуются и образуют канал, пронизывающий насквозь внутреннюю и наружную мембраны, а на поверхности формируют длинную пилеподобную структуру. Шприцеподобный канал в области наружной мембраны стабилизируется кольцеподобной структурой с большой центральной порой. Когда инъектосома сформирована, секретлируемый белок с сигнальным пептидом (20 аминокислот) на N-конце связывается с цитоплазматическим шапероном, транспортируется по каналу ТТСС и впрыскивается в клетку-мишень.

Кодирующие ТТСС гены способны к одновременной горизонтальной внутривидовой и межвидовой передаче. Посредством ТТСС *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* секретируют белки, играющие ведущую роль в патогенезе вызываемых ими заболеваний (табл. 2).

ЧЕТВЕРТЫЙ ТИП СЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ

Четвертый тип секреторной системы (ЧТСС) отвечает за перенос *вирулентной* ДНК и за секрецию факторов патогенности, проявляет сходство с системой конъюгации бактерий и эволюционно произошел из нее.

ЧТСС *Bordetella pertussis*. Пертуссин относится к семейству А-В токсинов (состоят из двух субъединиц А и В) и секретируется во внешнюю среду в готовом виде в две стадии: 1) 5 субъединиц токсина S1, S2, S3, S4, S5 по отдельности секретируются через цитоплазматическую мембрану в периплазматическое пространство, где из S2, S3, S4, S5 собирается субъединица В, а S1 (субъединица А) фиксируется на внутренней поверхности наружной мембраны; 2) субъединица В присоединяется к фиксированной субъединице А, после чего собирается Pt1-транспортная система и транслоцирует зрелый токсин во внешнюю среду. ЧТСС *A. tumefaciens* имеет более сложное строение.

Посредством ЧТСС *B. pertussis* секретирует пертуссин (Pt1), *Legionella pneumophila* — Dot/Icm. Эта система секреции описана у *Brucella suis*, *Bartonella henselae* (болезнь кошачьих царапин), *Helicobacter pylori*.

ПЯТЫЙ ТИП СЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ

Пятый тип секреторной системы (ПТСС) устроен наиболее просто и включает белки, секретлируемые автотранспортным механизмом (Va). Недавно описаны двухкомпонентная Vb и малоизученная Vc секреторные системы.

Va секреторная система. Секретлируемые белки обладают всем необходимым для транспорта и поэтому получили название автотранспортеров. Автотранспортеры состоят из трех доменов: 1) сигнальной последователь-

ности на N-конце, которая инициирует транспорт через цитоплазматическую мембрану; 2) транслоцируемого эффектора, или α -домена; 3) автотранспортной субъединицы (синонимы: C-домен, β -домен, хелпер), которая необходима для секреции через наружную мембрану. Сигнальная последовательность транспортирует эффектор к цитоплазматической мембране бактерии, откуда белок экспортируется в периплазматическое пространство, далее при помощи автотранспортного домена эффектор транспортируется через наружную мембрану, меняет конформацию и высвобождается от хелпера аутопротеолизом. В результате образуется стабильный белок. Таким образом, белок-эффектор начинает секретироваться в виде предшественника и в процесс транспорта созревает. Предшественник протеазы IgA1 гонококков имеет массу 169 кДа, а зрелая протеаза — 106 кДа.

Посредством ПТСС секретировается протеаза IgA1 гонококков, AlpA — *H. pylori*, SphB1 — *B. pertussis*, AspA/NalP — *N. meningitidis*.

Таблица 2

Сравнительная характеристика наиболее изученных секреторных систем I, II, III типов

Тип секреторной системы		
I	II	III
Использует энергию АТФ-гидролазы	Использует энергию АТФ-гидролазы	Использует энергию АТФ-гидролазы
Непрерывный белковый канал пронизывает насквозь цитоплазматическую мембрану, периплазматическое пространство и клеточную стенку	Белковый канал прерывается в периплазматическом пространстве: одна часть пронизывает цитоплазматическую мембрану, вторая — наружную мембрану	Аналогичен I типу секреторной системы
Состоит из нескольких десятков компонентов, которые в отличие от II и III типов секреторных систем имеют более крупные размеры	Состоит из большого количества белков (>20), которые сходны с III типом секреторной системы по порядку расположения и сборки	Аналогичен II типу секреторной системы
Секретирует белки-эффекторы, не модифицируемые в процессе транспорта	В процессе транспорта секреторируемый протеин модифицируется с отщеплением N-сигнального пептида	Аналогичен I типу секреторной системы
<i>E. coli</i> секретирует α -гемолизин, <i>B. pertussis</i> — аденилатциклазу, <i>Pasteurella haemolytica</i> — лейкоцидин, <i>P. aeruginosa</i> и <i>Erwinia spp.</i> — протеазы	Секретирует ферменты-токсины: <i>Erwinia spp.</i> — целлюлазу, <i>P. aeruginosa</i> — эластазу, экзотоксин А, фосфолипазу С, амилазу, протеазу	<i>Shigella spp.</i> секретирует белки IpaB, IpaC, IpaD, IpaA, приводящие к перестройке цитоскелета и эндоцитозу шигелл в клетку-мишень. <i>Yersinia pestis</i> секретируют YopB, YopH, препятствующие слиянию фагосом и лизосом, способствующие ускользанию от фагоцитоза и быстрому развитию септицемии

ОСТРОВКИ ПАТОГЕННОСТИ

Острова патогенности — разновидность генетических островков, содержащих от одного до нескольких десятков генов, кодирующих факторы патогенности, и способных к одновременной горизонтальной внутривидовой и межвидовой передаче (рис. 10). Острова патогенности присутствуют только у вирулентных микроорганизмов в составе плазмид или бактериальной хромосомы, и отсутствуют у непатогенных штаммов того же или близкородственных видов. Впервые ОП были описаны в 1980 г. у уropатогенных *E. coli* (UPEC) Йоргом Хакером и его коллегами из Вирцбургского университета (Германия). Они разработали концепцию «мозаичного» строения генома бактериальных патогенов, который включает относительно древние и стабильные участки ДНК и разбросанные среди них островки патогенности, приобретенные путем горизонтальной передачи. С тех пор островки патогенности были найдены не только у *E. coli*, но и у широкого спектра патогенных бактерий. У грамположительных микроорганизмов роль островков патогенности играют генетические кассеты, или кластеры генов.

Основные свойства островков патогенности:

1. Содержат от одного до нескольких десятков генов вирулентности и имеют достаточно большие размеры 10–200 т.п.о. (≈ 10 –200 генов). У уropатогенных *E. coli* ОП2 достигает размера 190 т.п.о. Участки генома, схожие с ОП, но лишенные генов вирулентности, называются геномными островками.
2. Отсутствуют у непатогенных родственных видов.
3. Имеют иное содержание G + C, чем в остальном геноме бактерии, что является следствием горизонтального приобретения этих участков от клеток донора в процессе эволюции.
4. Располагаются вблизи генов, кодирующих тРНК. Поскольку тРНК-гены бактерий сходны, участки донорской ДНК, содержащие гены тРНК, могут успешно встраиваться в клетку реципиента посредством генетических рекомбинаций.
5. В состав входят мобильные элементы (IS-элементы, транспозоны, фаги), а на концах находятся прямые повторы. Прямые повторы распознаются ферментами, вырезающими островки патогенности.
6. Содержат гены «подвижности» (интегразу, транспозазу, участки инициации считывания).
7. Имеют мозаичное строение: их участки приобретены в разное время и от разных хозяев.
8. Непостоянны и могут быть утеряны. Игрют роль в эволюции бактериальных патогенов. Например, кодирующий продукцию токсина токсического шока (TSST-1) островок патогенности у золотистого стафилококка с большой частотой вырезается бактериофагами (рис. 10).

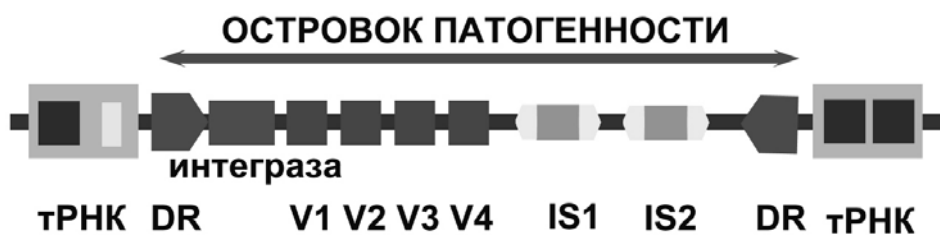


Рис. 10. Строение островка патогенности.

Располагается вблизи генов тРНК. По обоим его концам находятся прямые повторы (DR), в начале — ген, кодирующий интегразу. Далее следуют один или несколько генов вирулентности (V1–V4), IS-элементы

ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ, КОДИРУЕМЫЕ ОП

ОП могут содержать гены, детерминирующие признаки устойчивости к антибиотикам, адгезины, экзо- и эндотоксины, суперантигены, сидерофоры, секреторные системы. Детерминанты вирулентности, кодируемые ОП:

1. Факторы адгезии и колонизации. Энтеропатогенные и энтерогеморрагические *E.coli*, вызывающие острые кишечные инфекции, имеют островок патогенности, кодирующий белок адгезии *Tir*. *Tir*-протеин встраивается в мембрану энтероцитов, взаимодействует с белком-интигином на поверхности энтеропатогенных и энтерогеморрагических *E.coli*, что приводит к адгезии возбудителей на энтероцитах.

2. Факторы инвазии. ОП сальмонелл и шигелл кодируют инвазины, впрыскиваемые в клетку-мишень, в результате чего происходит перестройка цитоскелета с образованием пальцевидных выпячиваний на поверхности кишечного эпителия, которые смыкаются вокруг патогена с формированием эндосомы.

3. Белки секреторных систем. Важной особенностью многих патогенных микроорганизмов является способность целенаправленно доставлять детерминанты вирулентности в клетку-мишень. Грамотрицательные патогены *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Brucella spp.*, *Chlamyophila psittaci*, *Legionella spp.*, *Yersinia pestis* имеют ОП, кодирующие системы секреции факторов патогенности I–V типов.

4. Факторы, способствующие ускользанию от действия иммунной системы и внутриклеточной бактерицидности. Шигеллы и листерии, находясь внутри клетки-хозяина в фагосоме, лизируют фагосомальную мембрану и поступают в цитоплазму, где становятся недоступными разрушению. *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia spp.*, *Legionella pneumophila* продуцируют белки, препятствующие слиянию лизосом с фагосомами, что предотвращает переваривание этих микроорганизмов. Белок SipB, кодируемый ОП1 *Salmonella spp.*, вызывает апоптоз макрофагов.

5. Системы сидерофоров. Способность конкурировать за питательные вещества является существенным аспектом патогенеза. Сидерофоры — белки, связывающие ионы железа и необходимые для его перемещения в бактериальную клетку. Ионы железа важны для проявления вирулентных свойств бактериями. *Yersinia spp.* синтезируют иерсинобактин, *S. flexneri* — аэробактин, *S. typhimurium* — Sit1, *S. pneumoniae* — Pit2.

Аналоги островков патогенности грамположительных бактерий

У грамположительных микроорганизмов гены патогенности располагаются сгруппировано, но в отличие от граммотрицательных бактерий, они не ограничены прямыми повторами или генами tРНК, в связи с чем ОП грамположительных сложно идентифицировать и их называют генетическими кассетами, или кластерами генов (табл. 3).

Таблица 3

ОП и кластеры патогенности грамположительных микроорганизмов

Виды бактерий	ОП/кластер	Детерминанта вирулентности	Свойства, функции
<i>S. aureus</i>	SaPI	Токсин синдрома токсического шока (TSST-1)	Суперантиген, синдром токсического шока
<i>S. aureus</i>	SCCmec	Пенициллин связывающий белок PBP 2a	Устойчивость к метицилину и другим β -лактамам
<i>L. monocytogenes</i>	PrfA кластер	Листерииолизин О, PlcA/B	Лизис фагоцитарной вакуоли
<i>C. difficile</i>	tcdA, tcdB, tcdC, tcdD, tcdE	Актинотропные энтеротоксины	Приводят к антибиотико-ассоциированной диарее и псевдомембранозному колиту
<i>S. pyogenes</i>	Vir-регулон	Белок М, ScpA	Антифагоцитарный белок и суперантиген, С5a пептидаза
<i>S. pneumoniae</i>	ОП 1	Pit2 — ABC транспортный белок	Захват железа

ДВУХКОМПОНЕНТНАЯ СИГНАЛЬНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ

Микроорганизмы способны распознавать, обрабатывать и адекватно отвечать на большое количество сигналов из внешней среды благодаря сигнальной трансдукции. Сигнальная трансдукция заключается в распознавании сигнала, его проведении и активации соответствующих генов. У прокариот сигнальная трансдукция происходит с помощью двухкомпонентных систем, состоящих из **сенсорной гистидиновой киназы** и **активатора транскрипции** (регулятора ответа). Сигналом для активации мо-

жет служить изменение ОВП клетки, ионной концентрации среды, недостаточность фосфата, калия, низкое осмотическое давление, присутствие антибиотика. Действие сигнала на рецептор приводит к взаимодействию клеточного сигнального лиганда и сенсорной киназы — первого компонента сигнальной трансдукции (рис. 11). Распознавание сигнала приводит к образованию из двух мономеров гистидиновой киназы димера, что сопровождается аутофосфорилированием, в процессе которого γ -фосфат с АТФ переносится на остатки гистидина киназы. Фосфорилированная сенсорная киназа взаимодействует с соответствующим ей регулятором ответа, состоящим из двух доменов: регуляторного и ДНК-связывающего. Взаимодействие киназы и регулятора сопровождается переносом фосфатной группы с гистидина на остатки аспартата в составе регулятора ответа, в результате чего происходит активация гена или их группы. В связи с тем, что сенсорная киназа обладает способностью дефосфорилировать регулятор ответа, то уровень экспрессии гена контролируется и приводится в соответствие с уровнем сигнала. Двухкомпонентные сигнальные системы могут находиться друг с другом в сетевых взаимодействиях. Например, один из генов, активированный сигналом А, необходим для продукции сигнала В, таким образом, гены, индуцированные сигналом В, зависят от сигнала А.

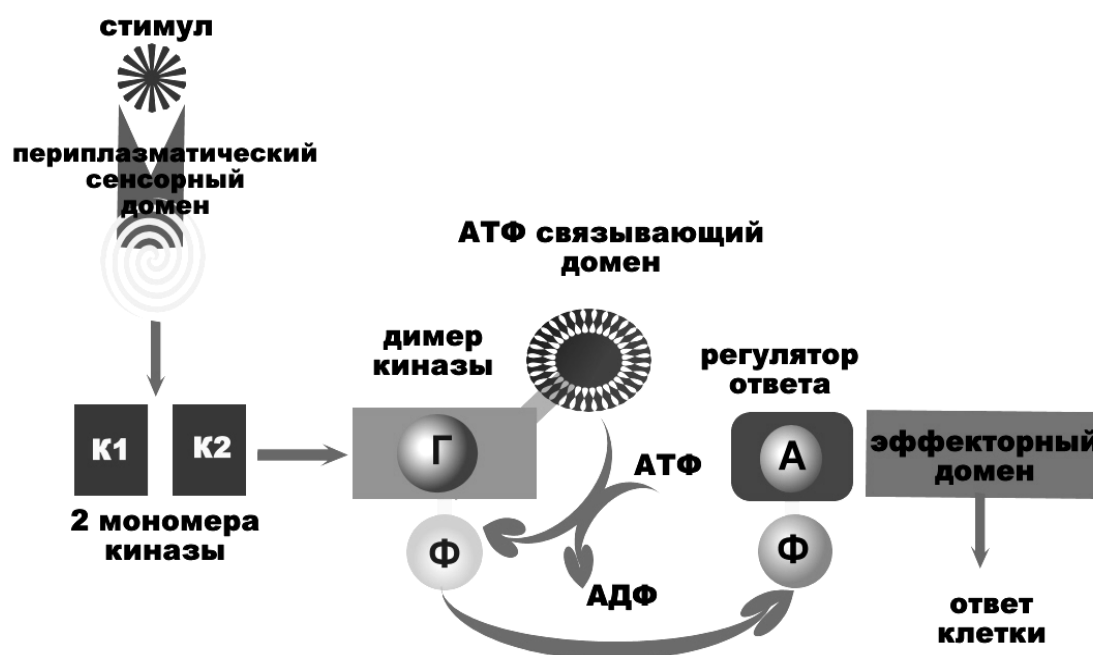


Рис. 11. Схема устройства двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции прокариот

Двухкомпонентная сигнальная система у патогенных микроорганизмов может приводить к инициации паразитического образа жизни и развитию инфекционного заболевания, а также формированию антибиотикорезистентности. Резистентность энтерококков типа VanA и VanB к ванкомицину

регулируется сенсорной киназой VanS и регулятором ответа VanR, активирующих транскрипцию генов, ответственных за синтез депсипептид — d-аланил-d-лактата, который инкорпорируется в пептидогликан и приводит к увеличению уровня резистентности к ванкомицину. У *Streptococcus pneumoniae* двухкомпонентная сигнальная трансдукция *ciaH* – *ciaR* активирует синтез пенициллин-связывающего белка, обеспечивающего высокие уровни резистентности к пенициллину.

КВОРУМ СЕНСИНЫ

Микроорганизмы могут осуществлять межклеточные взаимодействия, координировать совместную активность и тем самым проявлять примитивные формы коллективного поведения, которые играют значимую роль в патогенезе заболеваний или в симбиотических отношениях с организмом хозяина. Благодаря выработке сигнальных молекул, называемых кворум сенсинами, микроорганизмы получают информацию о достижении критической плотности популяции в занимаемой экологической нише, в ответ на это происходит активация генов, необходимых для успешного выживания популяции. Кворум сенсины контролируют биолуминесценцию, вирулентность, продукцию антибиотиков и пигментов, формирование **био пленок** (в биопленках активность применяемых антибиотиков снижается в 10–100 раз).

Процесс выработки и действия кворум сенсинов наиболее изучен у *P. aeruginosa*, являющихся возбудителями гнойно-септических инфекций. Продукция этими микроорганизмами таких факторов патогенности, как экзопроtease, сидерофоры, экзотоксины, липазы, регулируется кворум сенсинами. *P. aeruginosa* выделяет во внешнюю среду факторы патогенности лишь при достижении высокой плотности популяции, что приводит к продукции факторов патогенности в высокой концентрации и повреждению организма-хозяина. У *P. aeruginosa* описаны две системы кворум сенсинов: *LasR-I* и *RhlR-I*. Когда плотность популяции низка *LasI*-ген синтезирует базальное количество кворум сенсина. По мере увеличения плотности популяции концентрация продуцируемого кворум сенсина растет и достигает уровня, необходимого для его взаимодействия с *LasR*. *LasR* в комплексе с кворум сенсином *LasI* активирует транскрипцию генов *lasB*, *toxA*, *rhlR*, участвующих в патогенезе заболеваний.

Процесс формирования биопленок находится под контролем кворум сенсинов, которые обеспечивают созревание биопленки и коллективные взаимоотношения между микроорганизмами в ней. Биопленка — совокуп-

ность микроорганизмов разных видов, прикрепленных к твердой поверхности посредством выделяемого ими полимерного матрикса (рис. 12).

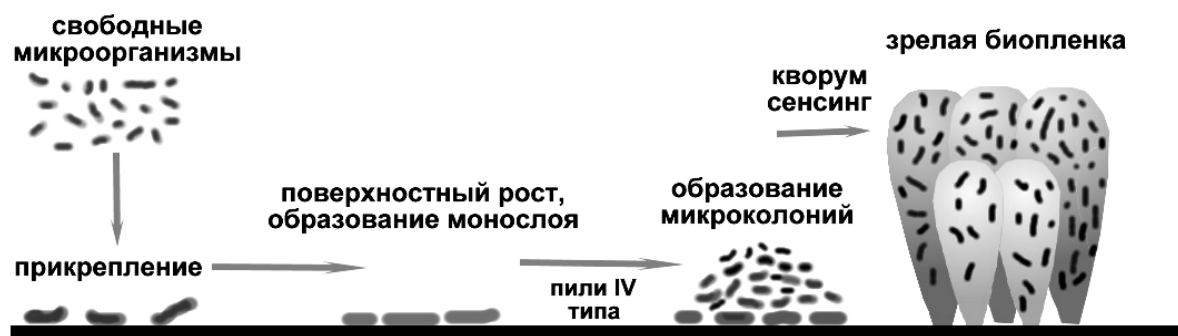


Рис. 12. Механизм образования биопленки, приводящей к развитию хронических и персистирующих инфекций

Механизм образования биопленки следующий: после прикрепления микроорганизмы размножаются и образуют слой на твердой поверхности. Благодаря пилим IV типа микроорганизмы передвигаются по поверхности, образуя небольшие группы, или микроколонии. Микроколонии дифференцируются в зрелые и приобретают башне- или грибоподобную форму. Клетки в зрелой биопленке погружены в полисахаридный матрикс, в котором есть каналы для поступления нутриентов, кислорода и выведения продуктов метаболизма. Быстро растущие микроорганизмы находятся на периферии, где выше концентрация нутриентов и кислорода, медленно растущие — глубже. Бактерии в составе биопленки устойчивы к микробицидным агентам, в том числе и антибиотикам. Формирование биопленки приводит к развитию хронических и персистирующих инфекций. Кворум сенсины являются мишенью для разработки новых противомикробных средств, не влияющих на жизнеспособность микроорганизмов, но нарушающих их способность вызывать заболевания.

МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Использование молекулярных методов привело к увеличению специфичности, чувствительности диагностики инфекционной и неинфекционной патологии. Применение молекулярных методов незаменимо в случае: 1) отрицательных результатов диагностики классическими методами; 2) использования для диагностики образцов, взятых после антибиотикотерапии или на поздних стадиях болезни; 3) необходимости получения срочного диагностического результата; 4) диагностики инфекций, вызываемых некультивируемыми или «привередливыми» микроорганизмами. В основу

молекулярно-генетических методов идентификации и типирования микроорганизмов положены:

1. Прямое изучение различий нуклеиновых кислот:

а) **анализ плазмидного профиля.** Используют для определения распространенности плазмид резистентности среди микроорганизмов в различных медицинских центрах;

б) **макрорестрикционный анализ.** Используют для выявления видовых и подвидовых различий микроорганизмов. Позволяет определять разницу в рестрикционных профилях геномной ДНК микроорганизмов разных видов. Рестрикционные нуклеазы нарезают геномную ДНК на фрагменты размером 10–800 т.п.о. Фрагменты разделяют гель-электрофорезом в пульсирующем поле (PFGE).

2. ДНК-гибридизация:

а) **риботипирование.** Используют для типирования микроорганизмов. Исследуемую ДНК нарезают рестриктазами на фрагменты, которые разделяют электрофорезом и переносят на мембрану. К фиксированным ДНК-фрагментам добавляют ДНК-зонды — 16S или (и) 23S рРНК опероны изучаемого вида микроорганизмов, меченые хемоколориметрической или хемилюминесцентной системой; в результате образуются легко выявляемые комплексы;

б) **ДНК-гибридизация.** Используют для идентификации и типирования микроорганизмов. Меченые синтетические олигонуклеотидные зонды известной специфичности вступают в гибридизацию с изучаемой ДНК с образованием флюоресцирующих дуплексов;

в) **гибридизационные биочипы.**

3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР):

В настоящее время существует огромное множество модификаций классической ПЦР, которые расширяют ее диагностические возможности:

а) **ПЦР с обратной транскрипцией.** Используют для изучения РНК-содержащих вирусов. При помощи обратной транскриптазы на РНК синтезируется копия ДНК — кДНК, которую амплифицируют в стандартной ПЦР;

б) **гнездовая ПЦР.** Разработана для увеличения чувствительности, специфичности реакции, позволяет определять нуклеиновые кислоты, присутствующие в очень низкой концентрации. ПЦР проводят последовательно с двумя разными парами праймеров. ДНК продукты, образуемые в первой ПЦР, способны взаимодействовать со второй парой праймеров;

г) **мультипраймерная ПЦР.** Одновременное использование нескольких пар праймеров позволяет приводить амплификацию нескольких генетических детерминант в одной пробирке, что сокращает время и расход реактивов;

д) **ПЦР в реальном времени.** Используют для определения точечных мутаций в ДНК и количественного содержания ДНК в пробе, а также изучения экспрессии генов. Существует два подхода:

– *Taq-man-методология*. Основана на регистрации в процессе проведения ПЦР усиливающегося флуоресцентного сигнала вследствие высвобождения флуоресцирующего вещества. Особенностью этой реакции является использование олигонуклеотидного зонда с присоединенными к разным концам молекулами сигнализатора и стабилизатора сигнала. Такой зонд, связавшись с комплементарным участком ДНК, разрушается ДНК-полимеразой (проявляет экзонуклеазную активность), что приводит к высвобождению сигнализатора из-под действия стабилизатора сигнала, что сопровождается флуоресценцией;

– *SYBR green-методология*. Регистрирует увеличение флуоресценции в результате присоединения флюорофора SYBR green к образуемым дуплексам ДНК с последующей его эмиссией;

ж) **широкодиапазонная ПЦР**. Используется для определения присутствия микроорганизмов, в том числе неизвестных и некультивируемых, в клиническом материале от больного. Для этого применяют универсальные праймеры, которые взаимодействуют с высококонсервативными участками ДНК, встречающимися у многих микроорганизмов (гены 16S рРНК);

з) **RAPD-анализ (анализ полиморфизма случайно амплифицированной ДНК)**. Используют праймеры, способные связываться с разными участками ДНК, в результате чего образуются многочисленные фрагменты разной длины, по количеству и размерам которых судят о групповой или видовой принадлежности;

и) **асимметричная ПЦР**. Один из праймеров используется в концентрации в 10 раз большей, чем другой, что приводит к преобладанию среди продуктов реакции одноцепочечных ДНК над дуплексами (важно для секвенирования).

4. Анализ различий продуктов амплификации:

а) **секвенирование продуктов амплификации;**

б) **конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК (SSCP)**. Используют для выявления точечных мутаций в ДНК. Единичные мутации приводят к изменению конформации одноцепочечной ДНК и изменению ее электрофоретической подвижности, выявляемой электрофорезом в полиакриламидном геле;

в) **полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ)**.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Принцип ПЦР был описан в 1986 г. Сущность ПЦР заключается в амплификации, или образовании множественных копий, интересующих участков ДНК/РНК, как правило, размером до 5 т.п.о. (увеличение размера приводит к снижению эффективности реакции). В качестве амплифицируемых участков ДНК могут выступать гены патогенности, жизненно важ-

ных функций, устойчивости к противомикробным препаратам, видо- и родоспецифические гены (для идентификации нередко используют 16S рРНК-гены), гены с неустановленными функциями.

Объектом исследования с использованием молекулярно-биологических методов выступает ДНК/РНК, поэтому на первой стадии ПЦР всегда осуществляется **выделение ДНК/РНК из клеток**, параллельно на этом этапе удаляются и клеточные ингибиторы ПЦР. В дальнейшем на выделенной ДНК-матрице происходит синтез множественных копий, поэтому важным условием проведения ПЦР является присутствие строительного материала ДНК — нуклеотидов (дНТФ) и фермента, осуществляющего их полимеризацию — Таq-полимеразы, уникальность которого связана с отсутствием денатурации при нагревании до 96 °С, т. к. выделяют его из термофильных микроорганизмов *Thermophilus aquaticus*, обитающих в гейзерах. Как и любой другой фермент, Таq требует определенных условий — pH, концентрации солей, что достигается внесением в реакционную смесь буфера для Таq и MgCl₂. В связи с тем, что проводят амплификацию не всей бактериальной ДНК, а лишь фрагмент до 5000 п.о., специфический участок ДНК ограничивают с двух сторон праймерами (прямым и обратным) — цепочками нуклеотидов (до 15–30 оснований), связывающимися с комплементарными структурами исследуемой ДНК. Используемые в ПЦР праймеры должны соответствовать ряду требований: 1) содержание цитозина (С) и гуанина (G) не должно превышать 40–60 %; 2) С и G должны распределяться равномерно по всей длине праймера; 3) температура плавления праймеров из используемой пары не должна отличаться более чем на 5 °С; 4) во избежание неспецифического связывания и образования димеров, используемые в реакции праймеры на 3'-конце не должны иметь более трех остатков G/C и не должны быть комплементарны друг другу; 5) состав праймера должен соответствовать идентифицируемому генетическому участку.

Таким образом, являясь в своей сущности биохимической реакцией, ПЦР требует приготовления реакционной смеси, содержащей следующие реагенты (табл. 4).

Таблица 4

Ингредиенты ПЦР

Реактив	Комментарии*
Праймеры прямой и обратный	Концентрация каждого вносимого праймера должна составлять 10–25 пкмоль/реакцию
Буфер для Таq	Вносят в однократной концентрации
Смесь дНТФ	Концентрация смеси каждого дНТФ в реакции должна составлять 200 мкМ
MgCl ₂	Концентрация может варьировать в пределах 1–4 мМ/реакцию, предпочтительно использовать 1,5 ± 0,25 мМ
Таq-полимераза	Вносят в количестве 1 или 1,25 Ед/реакцию
ДНК микроорганизма	Вносят в количестве 5–15 мкл

* Для студентов, занимающихся в кружке по микробиологии

Полимеразная цепная реакция происходит в несколько этапов: 1) **денатурация** — образование из двуцепочечной ДНК одноцепочечной молекулы; 2) **отжиг** — ограничение амплифицируемого фрагмента путем присоединения прямого и обратного праймеров; 3) **элонгация** — полимеризация дочерних цепочек на ДНК-матрице. Каждая из этих стадий протекает при определенной температуре. Реакцию амплификации повторяют 20–45 раз, предваряя ее дополнительной денатурацией и заканчивая дополнительной элонгацией.

Температурно-временные режимы ПЦР:

1. Первоначальная денатурация. Выполняется 1–3 мин при 95 °С. На этой стадии из дуплексов исходной геномной ДНК образуются одноцепочечные молекулы ДНК.

2. ПЦР-цикл. Количество циклов зависит от количества исходного материала ДНК. Если количество исходных ДНК-копий менее 10, необходимо проводить 40–45 циклов, если более — 25–35 циклов.

а) стадия денатурации. Осуществляется при 94–95 °С в течение 0,5–2 мин. На этой стадии из дуплексов амплифицированной ДНК образуются одноцепочечные молекулы. Уменьшение времени реакции по сравнению со стадией первоначальной денатурации обусловлено тем, что синтезируемые в процессе ПЦР продукты короче, чем исходная цельная ДНК;

б) отжиг праймеров. На этой стадии праймеры присоединяются к комплементарным участкам ДНК и ограничивают фрагмент для амплификации. Для отжига достаточно 0,5–2 мин. Температура для этой стадии рассчитывается по формуле:

$$T_m = 4(G + Ц) + 2(A + T) - 5,$$

где Г, Ц, А, Т — количество соответствующих оснований в праймере.

в) стадия элонгации. На этой стадии Taq-полимераза присоединяется к 3'-концу праймера и синтезирует на ДНК-матрице копию, после чего из одноцепочечных фрагментов ДНК образуются дуплексы. Осуществляется при 70–75 °С в течение 1 мин.

3. Финальная стадия элонгации. После последнего проведенного цикла образцы инкубируются при 72 °С в течение 5–15 мин для образования дуплексов.

В результате ПЦР происходит экспоненциальное увеличение копий ДНК (амплификонов), описываемое формулой 2^n , где n — число циклов амплификации. Образование огромного количества копий (10^8) позволяет выявлять их путем электрофореза в агарозном или акриламидном геле с последующей окраской ДНК-красителем — этидием-бромидом, флюоресцирующим в УФ-свете (290 нм) трансиллюминатора. В процесс электро-

фореза фрагменты ДНК передвигаются в зависимости от молекулярной массы и полярности и образуют видимую в УФ-свете полосу.

Достоинства метода: 1) высокочувствителен (позволяет обнаружить микроорганизмы в материале в концентрации 1–10 клеток); 2) высокоспецифичен (позволяет идентифицировать большинство существующих микроорганизмов). Недостатки: требует дорогостоящего оборудования.

Биочипы

Метод биочипов, или микроээррей, — метод, основанный на одновременном проведении большого количества (25–50 тыс.) молекулярно-биологических реакций на микроносителях (чипах). Биочип — это миниатюризированные подложки из стекла, нейлоновых и других материалов, на которых иммобилизованы десятки тысяч проб (ДНК, олигонуклеотидов, пептидов, клеток), при этом размер одной нанесенной пробы не превышает 200–300 микрон. Метод используют для диагностики заболеваний, идентификации генов и изучения их экспрессии, сравнительного анализа геномов и протеомов. Метод позволяет идентифицировать: 1) *нуклеиновые кислоты* (эукариотическую и прокариотическую ДНК, продукты полимеразной цепной реакции, РНК, мРНК); 2) *белки* (антитела/антигены, цитокины, ферменты, внутриклеточные белковые молекулы); 3) *целые клетки* (опухолевые).

Этапы постановки микроээррей-эксперимента:

1. **Приготовление биочипов.** Осуществляется с использованием печатающего робота, или принтера для микроээррей-слайдов, который наносит до 50 тыс. проб¹ известных ДНК/олигонуклеотидов или пептидов на подложку.

2. **Приготовление изучаемых образцов для проведения гибридизации.** Изучаемые образцы ДНК или белки от двух сравниваемых клеток (различных или в разных физиологических состояниях) метят при помощи флуоресцентных красителей Cy3 и Cy5.

3. **Гибридизация проб на слайдах.** Происходит в очень малых объемах, что требует специальных гибридизационных камер. Меченые молекулы изучаемого образца-мишени гибридизируют с известными пробами, распределенными на биочипе, после чего проводят отмывку неспецифически гибридизированных молекул.

4. **Сканирование и анализ.** Регистрацию сигналов гибридизации проводят с помощью сканера, который воспринимает интенсивность

¹ Пробой в микроээррей исследованиях называют известные ДНК, пептиды; образцом, или мишенью называют изучаемую ДНК

флюоресценции гибридизированных дуплексов. Затем происходит обработка изображений с помощью компьютера. Противопоставление изображений, окрашенных в красный или зеленый цвет, позволяет наглядно выявить различия в содержании тех или иных молекул в тестовом или стандартных (контрольных) пулах ДНК (протеинов).

СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Секвенирование — определение последовательности нуклеотидов в ДНК/РНК. Существуют два принципиально различающихся метода **секвенирования**: 1) ферментативное секвенирование (метод Сэнджера); 2) химическая деградация меченого фрагмента ДНК (метод Максама–Гилберта).

Первым методом ферментативного секвенирования ДНК стал плюс-минус метод, предложенный Ф. Сэнджером и Д. Коулсоном в 1975 г. В 1977 г. ими был использован усовершенствованный метод, основанный на терминании синтеза цепи ДНК, который широко применяется в настоящее время. В 1976 г. А. Максамом и У. Гилбертом был разработан метод секвенирования с использованием специфической химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца.

1. Метод ферментативного секвенирования (метод Сэнджера) (рис. 13).

В основу ферментативного секвенирования положена ПЦР, отличающаяся от обычной дополнительным присутствием веществ, обрывающих удлинение цепи — ДНК-терминаторов, или **дидезоксинуклеотидтрифосфатов** (ддГТФ, ддАТФ, ддЦТФ, ддТТФ), меченых флюорофором. На изучаемой ДНК, выступающей в качестве матрицы, при помощи секвенызы (разновидность ДНК-полимеразы) синтезируется комплементарная цепочка, в которую в любой момент с начала синтеза может быть встроен, вместо обычного Г, А, Ц, Т, соответствующий терминатор — дидезоксинуклеотидтрифосфат (ддГТФ, ддАТФ, ддЦТФ, ддТТФ). После этого ДНК-полимераза неспособна присоединять следующий нуклеотид и цепь обрывается. В реакции секвенирования концентрации терминаторов (ддГТФ, ддАТФ, ддЦТФ, ддТТФ) и обычного строительного материала ДНК (дГТФ, дАТФ, дЦТФ, дТТФ) подобраны таким образом, чтобы в процессе проведения 25–30 циклов сиквенс-ПЦР образовывалось огромное количество фрагментов, терминированных по всем присутствующим в ДНК нуклеотидам. При проведении электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле, позволяющем разделять фрагменты, различающиеся в один нуклеотид, каждый фрагмент занимает определенное место, соответствующее его размеру. Так как терминаторы мечены флюорофором, фрагменты флюоресцируют, что регистрируется прибором — автосеквенатором, который выдает результаты (последовательность нуклеотидов в цепи)

в графическом и текстовом формате. Могут быть использованы два подхода, чтобы определить, каким нуклеотидом терминирован фрагмент:

1. Если четыре терминатора (ддГТФ, ддАТФ, ддЦТФ, ддТТФ) мечены одним флюорофором, то ставят реакции в четырех разных пробирках по отдельности с каждым из терминаторов. Электрофорез осуществляют также отдельно для каждой из четырех проб. Автоматический анализатор сопоставляет положение фрагментов для каждого из терминаторов и суммирует результат (см. рис. 13).

ЕСЛИ ЧЕТЫРЕ ТЕРМИНАТОРА (ддГТФ, ддАТФ, ддЦТФ, ддТТФ) МЕЧЕНЫ РАЗНЫМИ ФЛЮОРОФОРАМИ, ТО ПРОВОДЯТ ПЦР-РЕАКЦИЮ В ОДНОЙ ПРОБИРКЕ, АВТОСЕКВЕНАТОР РЕГИСТРИРУЕТ РАЗЛИЧНЫЙ ВИД ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ОТ КАЖДОГО ИЗ ТЕРМИНАТОРОВ.

Этапы ферментативного секвенирования

1. **Получение исследуемой ДНК.** В качестве исследуемой ДНК могут выступать:

а) геномная ДНК, выделенная непосредственно из клеток и вирусов (из-за больших размеров геномной ДНК секвенировать ее трудно, и потому ее предварительно нарезают на фрагменты с перекрывающимися концами при помощи ферментов рестрикции, после чего секвенируют, результаты суммируют);

б) плазмидная ДНК;

в) фрагменты ПЦР-ДНК, которые получают в процессе ПЦР и очищают от ингибиторов секвенирования;

г) ДНК, полученную путем обратной транскрипции на вирусной РНК.

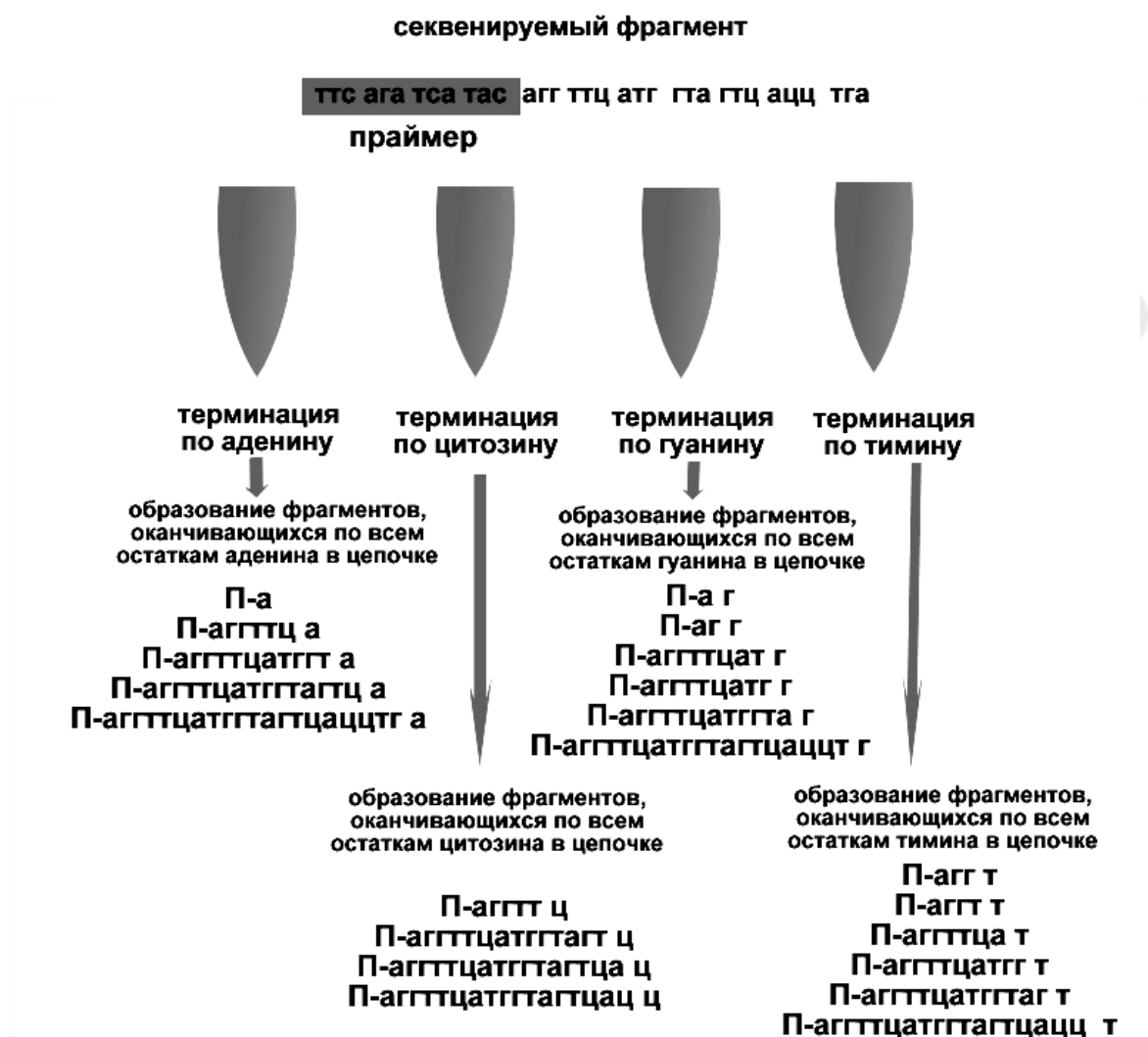


Рис. 13. Секвенирование по Сэнджеру (П — праймер)

2. **Постановка сиквенс-ПЦР.** Реакцию ставят в обычном ПЦР-амплификаторе, используя аналогичные для ПЦР температурные режимы. В реакции участвуют следующие ингредиенты: 1) одноцепочечный фрагмент ДНК, последовательность которого необходимо определить; 2) праймер (затравожная молекула, комплементарная участку изучаемой ДНК; 3) секвеназа (особая ДНК-полимераза); 4) дезоксинуклеотидтрифосфаты (дГТФ, дАТФ, дЦТФ, дТТФ); 5) дидезоксинуклеотидтрифосфаты (ддГТФ, ддАТФ, ддЦТФ, ддТТФ), меченые флюорофором; 6) реакционный буфер.

3. **Проведение секвенирующего электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле.** Позволяет разделить фрагменты, различающиеся размером в один нуклеотид.

4. **Регистрация результатов, их автоматический учет и анализ.**

5. **Анализ информации, заключенной в секвенированном фрагменте ДНК.** Осуществляют с использованием методов биоинформатики, позволяющих определить: 1) первичную структуру кодируемого пептида; 2) точечные мутации, микроделеции и микроинсерции; 3) присутствие

транспозонов, IS-элементов, бактериофагов, CpG-мотивов; 4) границы генов, предсказать их функции по структурной аналогии с генами других микроорганизмов; 5) видовую принадлежность изучаемого микроорганизма или с высокой степенью достоверности открыть новый вид (если расшифрованный фрагмент генома отсутствует в Международном банке геномов)¹; 6) степень родства микроорганизма с другими микроорганизмами, а также происхождение гена и самого микроорганизма, путем построения филогенетического дерева.

2. Метод секвенирования путем химической деградации (по Максому–Гилберту) (рис. 14).

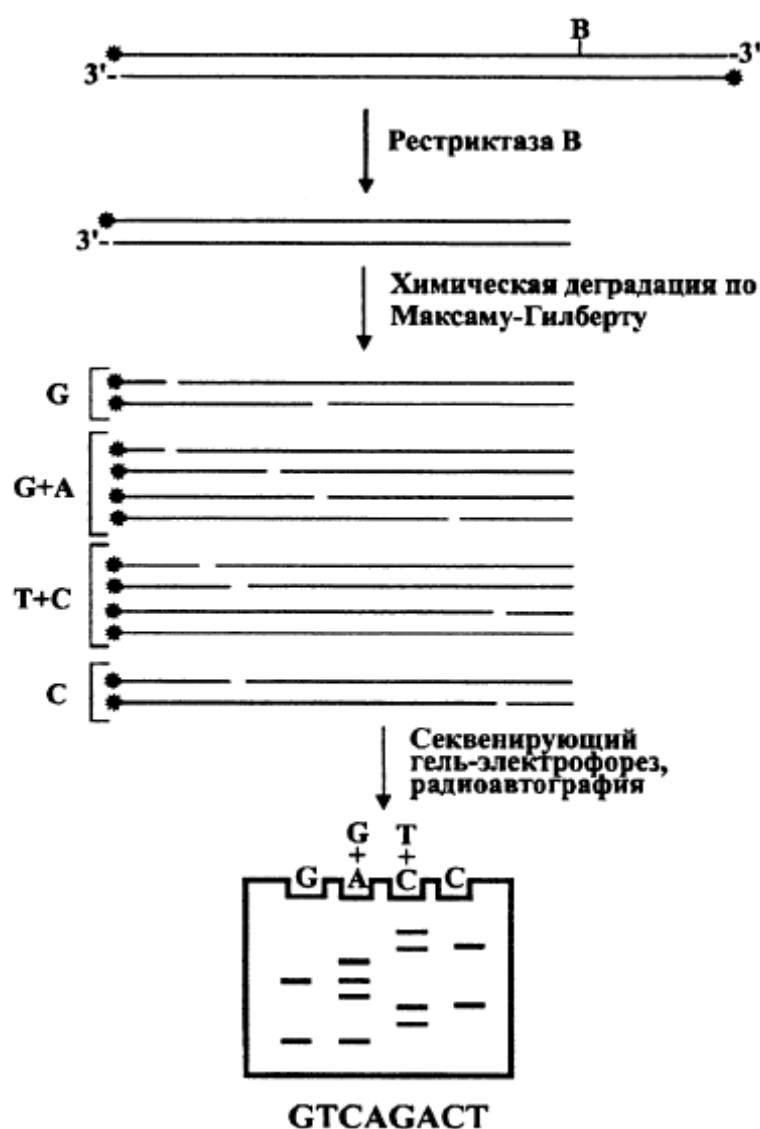


Рис. 14. Принцип секвенирования ДНК методом химической деградации по Максому–Гилберту

¹ Идентификацию секвенированных ДНК-фрагментов проводят путем их сравнения с международным банком геномов (доступ через сервер <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) с использованием программы BLAST

Используя ферментативное секвенирование фрагменты получают путем остановки синтеза ДНК-цепи на разных этапах, при проведении же секвенирования по Максаму–Гилберту фрагменты получают путем ограниченного (только в одном месте по одному основанию) химического разрыва меченых молекул ДНК.

Сначала проводят четыре реакции модификации оснований: 1) модификацию аденина; 2) модификацию цитозина; 3) модификацию аденина и гуанина; 4) модификацию тимина и цитозина. Проводимая модификация затрагивает в каждой цепочке ДНК из всего множества присутствующих в растворе молекул всего лишь один нуклеотид, благодаря подбору концентраций реагентов и использованию стоп-буферов. После чего по модифицированным основаниям проводят разрыв цепи. Таким образом, в результате четырех типов реакций образуется смесь олигонуклеотидных молекул, различающихся по размеру на один нуклеотид и несущих на одном из концов метку.

Этапы секвенирования путем химической дегградации:

1. Мечение одного конца ДНК.
2. Проведение реакций модификации азотистых оснований и расщепление цепи ДНК по модифицированным основаниям.

Диметилсульфат используют для модификации аденина и гуанина, гидролиз по аденину проводится под действием кислоты, а потом щелочной pH, гидролиз по гуанину происходит под действием пиперидина.

Гидразин используют для модификации цитозина и тимина в бессоле-вой среде, а в солевой среде (2M NaCl) — только цитозина, расщепление модифицированных оснований происходит под действием пиперидина.

3. Секвенирующий электрофорез, радиоавтография, учет результатов.
4. Анализ информации, закодированной в секвенированном фрагменте.

ПОЛИМОРФИЗМ ДЛИНЫ РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ (ПДРФ-АНАЛИЗ)

Различия ДНК близкородственных микроорганизмов с целью идентификации или типирования, а также мутации могут быть выявлены с помощью метода ПЦР–ПДРФ-анализа (рис. 15).

Под действием ферментов рестрикции амплифицированные участки ДНК нарезаются на фрагменты различного размера, которые при гель-электрофорезе образуют профили, идентифицируемые как определенный вид или тип микроорганизмов. Метод включает последовательное проведение: 1) экстракции ДНК; 2) ПЦР амплификации определенных генов, или их фрагментов, в результате чего генерируются мономорфные ДНК фрагменты; 3) рестрикции эндонуклеазами; 5) электрофореза рестрицированных образцов; 6) визуализации и анализа.

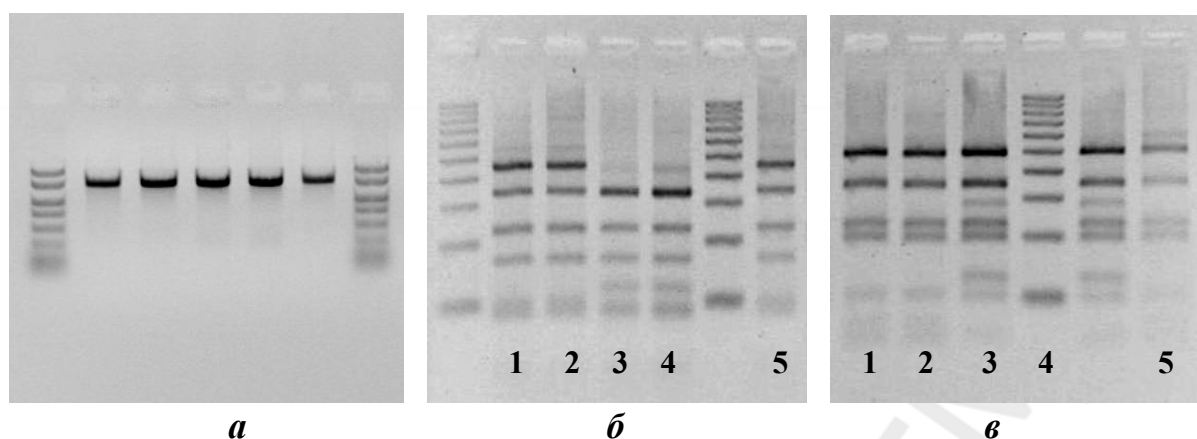


Рис. 15. Результаты ПЦР-ПДРФ анализа 16S рРНК генов для идентификации *Bacteroides spp.*:

а — продукты амплификации 16S рРНК *Bacteroides spp.* (разные виды образуют продукты одного размера — видна одна полоса); б и в — *hpa* II и *taq* I рестрикционные профили *Bacteroides spp.*: треки 1, 2, 5 — *B. thetaiotaomicron* треки 3, 4 — *B. Fragilis*

ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ (ДЕНДРОГРАММЫ)

Благодаря появлению новых методов в поле зрения теории эволюции попали кодирующие молекулы: ДНК, РНК, белки. Анализ их эволюции положил начало молекулярной филогенетике. Молекулярный филогенетический анализ позволяет оценить историю эволюции без наличия фактической информации о прошлом, лишь по состоянию современных видов и молекул. Он базируется на догме «молекулярных часов»: дивергенция геномов происходит благодаря накоплению мутаций в ДНК/РНК, поэтому о длительности периода с момента расхождения геномов от одного предшественника свидетельствует количество измененных нуклеотидов. Чем раньше произошла дивергенция, тем большее количество изменений осуществилось в нуклеотидном составе. Молекулярная филогенетика определяет частоту и характер изменений в первичной структуре ДНК, белков и на основании этого производит реконструкцию эволюции генов и организмов, отображает направление происходящих изменений графически в виде дендрограмм. Существуют следующие разновидности дендрограмм:

1. Кладогаммы и филогаммы.

Кладогамма — древовидная диаграмма, отражающая гипотетическую историю эволюции живого. Примером глобального дерева, охватывающего эволюцию биологического мира, является дерево 16S–18S рРНК.

Филогамма — древовидная диаграмма, отражающая ход изменения признака. Распределяет микроорганизмы в соподчиненные группы и позволяет оценить сходство и различие групп микроорганизмов, определить по длине и топографии ветвей предков и потомков.

2. Корневые и некорневые (рис. 16).

Корневое дерево отражает эволюционный путь от общего предшественника к потомкам и в своем составе обязательно имеет корневой узел, соответствующий общему предшественнику. Некорневые деревья отражают лишь степень взаимосвязи между видами.

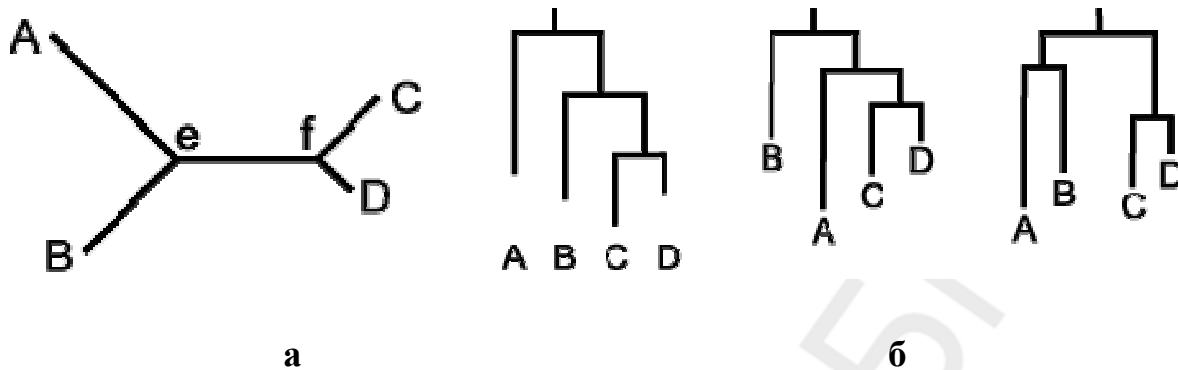


Рис. 16. Примеры некорневых и корневых дендрограмм:

а — некорневая дендрограмма отражает взаимоотношения между гомологичными генами: A, B, C, D. Топология дерева включает 4 наружных узла A, B, C, D и два внутренних f и e, представляющих гены-предшественники; б — корневая дендрограмма отражает возможные варианты эволюционных взаимоотношений генов A, B, C, D

3. Масштабированные и немасштабированные дендрограммы

Ветви масштабированного дерева калибруются для отражения количества произошедших изменений. Ветви немасштабированных деревьев могут содержать цифровую пометку о количестве произошедших изменений.

Компоненты эволюционных деревьев (рис. 17):

Корень соответствует общему предшественнику всех таксонов.

Узел — место соединения ветвей, объединяющее представителей одной таксономической группы (одного вида, однотипные штаммы).

Ветвь — графическое изображение взаимосвязи между таксонами. **Длина ветви** может отражать количество изменений, произошедших в данном ответвлении.

Топология — характер расположения ветвей.

Клады — группа из двух и более таксонов, включающая общего предшественника и все произошедшие от него монофилетические группы

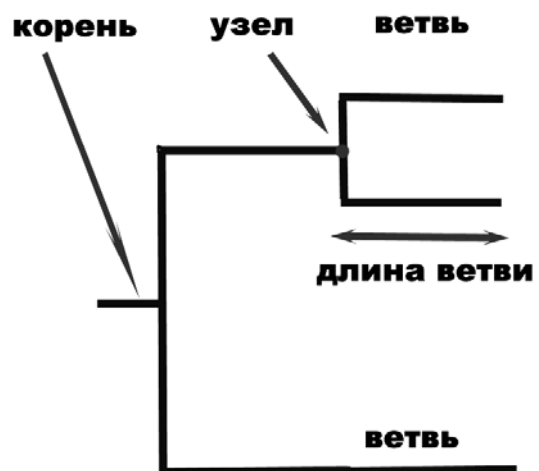


Рис. 17. Компоненты дендрограммы

(все родственные последовательности ДНК, произошедшие от одной общей ДНК-предшественницы).

Изучение эволюции генов и белков требует проведения сравнений между гомологичными последовательностями ДНК/протеинов. Существуют следующие варианты гомологичных генов:

Ортологи — гомологичные гены, произошедшие от общего гена-предшественника в ходе естественного видообразования. Несмотря на некоторые структурные отличия, ортологи имеют сходные функции.

Паралоги — гомологичные гены, произошедшие в результате удвоения гена-предшественника. Удвоившиеся гены одного организма претерпевают независимые изменения, вследствие чего нередко обладают разными функциями.

Ксенологи — гомологичные гены, произошедшие в результате горизонтального переноса генов между организмами. Функции могут быть как идентичными, так и разными.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Методы общей бактериологии* / под ред. Ф. Герхарда и др. ; пер. с англ. М.: Мир. 1984. 472 с.
2. *Молекулярная клиническая диагностика. Методы* / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. ; пер. с англ. М. 1999. 558 с.
3. *Шлегель, Г. Общая микробиология* / Г. Шлегель ; пер. с нем. М.: Мир. 1987. 567 с.
4. *Barrett, J. F.* Two-Component Signal Transduction as a Target for Microbial Anti-Infective Therapy / J. F. Barrett, J. A. Hoch // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. Vol. 42. № 7. P. 1529–1536.
5. *Claverys, J. P.* Bacterial “competence” genes: signatures of active transformation, or only remnants? / J. P. Claverys, B. Martin // *Trends Microbiol.* 2003. Vol. 11, № 4. P. 161–165.
6. *Fabret, C.* Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world / C. Fabret, V. A. Feher, J. A. Hoch // *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181. № 7. P. 1975–1983.
7. *Fitzgerald, J. R.* Evolutionary genomics of pathogenic bacteria / J. R. Fitzgerald, J. M. Musser // *TRENDS in Microbiol.* 2001. Vol. 9. № 11. P. 547–553.
8. *Hacker, J.* Pathogenicity islands and the evolution of microbes / J. Hacker, J. B. Kaper // *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. Vol. 54. P. 641–79.
9. *Hueck, C. J.* Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants / C. J. Hueck // *Microbiology and molecular biology reviews.* 1998. Vol. 62. № 2. P. 379–433.
10. *Krawiec, S.* Organization of the bacterial chromosome / S. Krawiec, M. Riley // *Microbiol. Rev.* 1990. Vol. 54. № 4p. P. 502–539.
11. *Miller, M. B.* Quorum sensing in bacteria / M. B. Miller, B. L. Bassler // *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. Vol. 55. P. 165–99.
12. *Ochman, H.* Eyeing bacterial genomes / H. Ochman, S. R. Santos // *Current Opin. Microbiol.* 2003. Vol. 6. P. 109–113.
13. *Parsek, M. R.* Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms / M. R. Parsek, E. P. Greenberg // *PNAS.* 2000. Vol. 97. № 16. P. 8789–8793.
14. *Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes* / A. Belkum [et al.] // *Microbiol. Molec. Boil. Rev.* 1998. Vol. 62. № 2. P. 275–293.
15. *Tang, Y. W.* Molecular diagnostics of infectious diseases / Y. W. Tang, G. W. Procop, D. H. Persing // *Clin. Chemistry.* 1997. Vol. 43. P. 2021–2038.
16. *Toussaint, A.* Mobile Elements as a Combination of Functional Modules / A. Toussaint, C. Merlin // *Plasmid.* 2002. Vol. 47. P. 26–35.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА БАКТЕРИЙ	
(Л. П. Титов, В. В. Слипень)	4
Организация генома	4
Классификация генов	6
Генетические карты.....	8
Плазмиды.....	8
МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ (Л. П. Титов, В. В. Слипень)	10
Инсерционные последовательности, или IS-элементы	10
Транспозоны	11
Интегроны	12
ОБМЕН ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИЕЙ (Л. П. Титов, В. В. Слипень)	13
Трансформация	13
Трансдукция	15
Конъюгация	16
МУТАЦИИ (В. В. Слипень)	19
ГЕНОМИКА (Л. П. Титов)	22
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ.....	23
НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА	
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ: СЕКРЕТОРНЫЕ СИСТЕМЫ	
МИКРООРГАНИЗМОВ (В. В. Слипень)	24
Первый тип секреторной системы	25
Второй тип секреторной системы.....	25
Третий тип секреторной системы	26
Четвертый тип секреторной системы	27
Пятый тип секреторной системы	27
ОСТРОВКИ ПАТОГЕННОСТИ (Л. П. Титов).....	28
Детерминанты вирулентности, кодируемые ОП.....	30
ДВУХКОМПОНЕНТНАЯ СИГНАЛЬНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ (В. В. Слипень).....	31
КВОРУМ СЕНСИНЫ (В. В. Слипень)	32
МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ (В. В. Слипень)	34
Полимеразная цепная реакция	36
Биочипы.....	38
Секвенирование	39
Полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ-анализ)	43
Эволюционный анализ (дендрограммы).....	44
ЛИТЕРАТУРА	47