

Бактериална трансформация

При прокариотните клетки преносът на генетична информация се осъществява по три основни начина – трансформация, трансдукция и конюгация. При трите явления се наблюдава предаване на генетична информация (ДНК) от една клетка – донор, в друга клетка – реципиент. Обикновено ДНК фрагмента сегрегират или се интегрират в хромозомата. Интегрирането на ДНК става чрез рекомбинация.

Трансформация

За пръв път това явление е описано от Ф.Грифит при неговите изследвания върху *Diplococcus pneumoniae*. Установени са два щамове пневмококи. Единият от тях щамът S е патогенен – предизвиква болестта пневмония в мишките, има полизахаридна капсула и образува гладки колонии. Другият щам R не е патогенен, няма полизахаридна капсула и образува грапави колонии.

Ф.Грифит убивал чрез нагряване бактерии от патогенния щам и заедно с живи бактерии от щам R ги инжектирал на мишки. Въпреки че патогенните бактерии били убити, мишките заболявали от пневмония и умирали. От умрелите мишки били изолирани живи бактерии, които имали полизахаридна капсула. Оказало се, че по някакъв начин белезите патогенност и образуване на полизахаридна капсула от убитите бактерии от щам S се прехвърлили в живите бактерии от щам R. При по-нататъшното размножаване тези бактерии от щам R предавали в потомството си придобитите белези непроменени.. Следователно белезите патогенност и образуване на полизахаридна капсула са наследствени. Тогава трябва да се предполага, че или част от наследствената информация на убитите чрез загряване бактерии от щам S се е пренесла в живите клетки на щам R, т.е. че се е осъществила своеобразна хибридизация между мъртви и живи клетки, или че бактериите от щам R са мутирили в посока от щам S.

→

→

екстракта. По този начин недвусмислено беше доказано, че наследствената информация се пренася от мъртвите на живите бактерии чрез ДНК, т.е. че ДНК е молекулният носител на наследствеността.

По-късно трансформиращата роля на ДНК била установена още с редица опити. По аналогичен начин била предадена устойчивостта спрямо стрептомицина от един щам бактерии (*Sm^r*) на друг, чувствителен щам (*Sm^s*). Открито беше, че могат да се трансформират различни белези, но едновременно могат да се трансформират 1-2, максимум до 3, и то тясно скачени гени. Това показва, че при трансформацията преминават къси участъци ДНК (не повече от 1 % от общата ѝ дължина). Обикновено трансформацията е възможна между различни щамове от един и същи вид, но макар и рядко, се осъществява и междувидова трансформация.

Трансформацията е природен процес, който се осъществява при различни видове бактерии (*Bacillus*, *Neisseria*, *Coccus*, *Enterobacteria*) и всъщност показва значението на процеса като общ феномен в еволюцията.

Трансформацията може да се осъществи при наличие на някои предпоставки. Така донорната ДНК трябва да има сравнително голяма молекулна маса; да бъде двуверижна, тъй като еднуверижните ДНК молекули нямат трансформираща активност. Важна роля играе и наличието на хомология между донорната и реципиентната ДНК. Най-много трансформанти се получават между близкородствени щамове, имащи значителна хомология в ДНК.

Реципиентната клетка е другият съществен елемент в трансформацията. Даже в щам, който дава висока честота на трансформация, не всички клетки са в състояние да поглъщат донорна ДНК. Клетките, които притежават тази способност, се наричат *компетентни*.

Взаимодействието на донорната ДНК с реципиентната клетка става на няколко етапа. Първият етап се състои от свързване на ДНК с клетката. Извършва се в около 50 места на една клетка и е неспецифично – клетките свързват еднакво добре хомоложна и хетероложна ДНК. Свързването е обратимо и ДНК може да се отстрани чрез промиване на клетките. Във втория етап ДНК преминава през стената, което е улеснено от увеличената ѝ порьозност. Наличието на K , Ca^{2+} и Mg^{2+} йони, както и на ендонуклеаза са необходими условия за осъществяване на този етап. Ендонуклеазата разгражда

двуверижната високомолекулна донорна ДНК на фрагменти. След това от веригите на фрагментите от ДНК се хидролизират и така получената еднOVERижна ДНК преминава през мембраната.

К. Марков и негови сътрудници доказаха ролята на особени мембранни структури, наречени мезозоми. Те представляват вгъвания на клетъчната мембрана, през които се осъществява транспорта на донорната ДНК в клетката. Мезозоми, изолирани от компетентни клетки, свързват по-добре ДНК, отколкото мезозомите от некомпетентни клетки.

Трансформация на генетични маркери

Всички мутантни маркери (белези, признаци) на реципиентните клетки могат да бъдат трансформирани. Преносимият фрагмент ДНК може да съдържа много гени, но той рядко носи повече от един генетичен признак. Най-често се използват такива маркери като устойчивост към антибиотици или други инхибитори.

Дължината на трансформиращата ДНК зависи от методите, с които се получава. При най-внимателно изолиране фрагментите ДНК рядко превишават мол. маса $1 \cdot 10^{10}$ Da. Такъв фрагмент съответства на около 0,3 % от бактериалната хромозома или около 15 гена. В опитите за трансформация на клетките при отделните видове се използват ограничен брой маркери, така че в един фрагмент ДНК рядко могат да присъстват два маркера. При лошо очистени препарати трансформиращата ДНК, при която хидродинамичната и ензимна деградация при изолиране е сведена до минимум, може да се получи трансформация по много маркери. С такива ДНК препарати могат да се пренесат фрагменти с големина до $1/3$ от хромозомата.

По принцип трансформацията става обикновено с относително ниска честота. За да се

изучат количествените аспекти на трансформацията се използват често селективни маркери (Str^r и Str^s) т.е. реципиентни Str^r клетки (чувствителни към стрептомицин) и донорни Str^s (резистентни към стрептомицин). Например, за да се определи числото на реципиентните Str^r клетки трансформирани с ДНК е достатъчно да се посеят реципиентни култури на агар, съдържащ стрептомицин, на който могат да растат само Str^r трансформанти.

Селективен маркер може да бъде също и ауксотрофността (от лат. *auxillium* – помощ и гр. *trophe* – хранене) към дадено вещество. Много микроби зависят от растежни фактори, като аминокиселини, витамини, азотни бази или други съединения. Например, ако реципиентната бактерия е ауксотрофна по отношение на аргинин (за растежа ѝ е необходим аргинин), а донорната култура не зависи от аргинина, трансформанти могат да се открият при посевка на популациите реципиентни бактерии, обработени с донорна ДНК на среда без аргинин.

Компетентност

Ограничаващият фактор за образуването на трансформанти обикновено е компетентността на реципиентните клетки, т.е. тяхната способност да приемат трансформираща ДНК. Състоянието на компетентност е особено физиологично състояние на клетките, което се проявява на определен стадий от цикъла на делене. Само част от микробната популация има тези свойства, и то в даден момент от време. Компетентните клетки носят на повърхността си нов антиген, наречен фактор на компетентността. Този фактор е частично пречистен и изследван при трансформация на различни видове бактерии. Той има белтъчна природа и ниска молекулна маса. Предполага се, че това е белтък от мембраната, който катализира проникването на ДНК или ензим, разграждащ компоненти на повърхността на клетките. По този начин се откриват рецепторни участъци, с които се свързва ДНК.

Подобни изследвания са направени с пневмококи. В първия етап двуверижната ДНК се свързва с участъци на повърхността на компетентните клетки. Това се съпровожда с постоянно включване на холин в мембранните фосфолипиди, в екваториалната област на бактерията, мястото на образуване на бактериалната стена. По всяка вероятност ДНК прониква в бактерията само през тази област (Р. Стайниер и сътр., 1976). През втория етап ДНК се разгражда ензимно в места, разположени случайно, като се образуват фрагменти със средна мол. маса 4-5.10⁶ Da. През този стадий се използва енергия от АТФ, и ДНК фрагментите проникват в бактерията, като една от веригите на ДНК се разгражда. Образува се вътреклетъчен едноверижен фрагмент. Съществено условие

за свързване на ДНК към компетентните клетки е нейната двуверижна структура и размери. Едноверижна ДНК също може да се присъедини към клетките, но тя се характеризира с много ниска трансформираща способност, вследствие на своята чувствителност към действието на клетъчните нуклеази. В тази връзка фрагменти ДНК с мол. маса от 5.10 Да, атакувани от ДНК-аза, нямат трансформираща активност.

Процесът на поглъщане на ДНК е проучен също така при *Haemophilus influenzae*. В сравнение с грамположителните пневмококи в някои отношения има различия. *H. influenzae* приема само хомоложна ДНК. Друго отличие е превръщането на ДНК в едноверижна молекула, което става паралелно с интеграцията, тъй като едноверижен фрагмент не се открива в клетката-реципиент.

Както в пневмококите, така и в клетки на *Haemophilus* компетентността може да се изменя. Открито е, че в появата на компетентността играе роля цикличният АМФ. Прибавянето на този нуклеотид в средата може да увеличи това състояние на реципиентните клетки в популацията 10 000 пъти.

Трансформиращата активност е присъща на двуверижните фрагменти ДНК. Протичането на трансформацията по донорен маркер е свидетелство за неговото присъствие в клетката-реципиент в двуверижния ДНК фрагмент. Получените при реекстрахиране на ДНК двойни трансформанти, съответстват на алелни гени, свойствени за реципиента (един ген) и за донора (втори, скачен с първия ген). Това е признак за завършена интеграция на донорния маркер в генома на реципиента. Опити, проведени с използване на изотопен анализ, позволяват да се установи съхраняването на целостта, деградацията и интеграцията на донора ДНК в реципиентната ДНК. От тези експерименти са установени следващите стадии на трансформиращия период.

Проникналата в реципиентните клетки донорна ДНК първоначално се съхранява в двуверижна структура. Проведената в това време реекстракция на ДНК от клетките на реципиента позволява да се възстанови трансформиращата активност на ДНК, постъпваща в реципиентните бактерии. Това потвърждава нейното двуверижно състояние. След това следва еклипсна фаза (от англ. *eclipse* – затъмнение, скрит). През този период ДНК преминава в едноверижна форма, тъй като трансформиращата ДНК при екстрахиране от клетките-реципиенти загубва трансформиращата си активност.

Минималната дължина на ДНК фрагментите, способни да се интегрират в

реципиентната хромозома, представляват около 500 нуклеотида. Обикновено в рекомбинацията участва донорна ДНК с дължина 200 000 нуклеотида, или 1/200 част от бактериалната хромозома. Тази величина дава възможност за картиране на гени с помощта на трансформацията. Както се вижда, в хромозомата на реципиента се вгражда сравнително неголям фрагмент донорна ДНК. Крайният резултат от взаимодействието между трансформиращата ДНК молекула и компетентна реципиентна клетка е появата в нейното потомство на трансформантни клонове, носещи един или повече от донорните белези. За успешността на трансформацията обикновено се съди по честотата, с която се пренася изследваният маркер, т.е. по отношението на броя на клетките, придобили и финотипно изявили маркера към общия брой на клетките, участвали в трансформационната смес (реципиентни клетки – ДНК).

Анализът на данните от трансформацията може да се използва за *генетично картиране*. Това става, като трансформантите се селектират по отношение на един генетичен маркер, наречен селективен, и се изследва честотата на котрансформация на други, неселективни маркери. От един експеримент по трансформация се получават данни относно общи брой живи реципиентни клетки, количеството на донорната ДНК, броя на получените трансформанти и честота, с която се получават трансформанти с неселективни маркери.

Възможностите за генетично картиране чрез трансформация са ограничени, защото фрагментът донорна ДНК е сравнително малък и носи информация само за няколко гена. Ограниченията се увеличават и от факта, че осъществяването на трансформация с някои видове бактерии не е лесно.

Трансформацията има голямо значение за съвременната биотехнология. В този случай като донор се използва плазмидна ДНК. За нуждите на биотехнологията се конструират плаزمиди, съдържащи гени, чиито продукти имат стопанско значение. Експресията на тези гени води до синтеза на продукта в реципиентната клетка, откъдето той се извлича. Засега като реципиенти в биотехнологията се използват *E.coli* и *Saccharomyces cerevisiae*. Дрождите са еукариотни клетки и тяхната трансформация се отличава съществено от тази на прокариотните клетки. В табл. 1 са представени някои характерни разлики при трансформацията на *E.coli* и дрождите-захаромицети.

E.coli

Saccharomyces cerevisiae

Компетентност за трансформация се придобива като нормално физиологично състояние през

Някои щамове са компетентни, други – не. Компетентността се определя от множество гени.

Контактът с ДНК става в присъствие на Ca^{2+} , които унищожават положителните заряди на кл

Контактът с ДНК не води до трансформация, защото стената е непрониклива за ДНК. Транс

Поглъщането на донорната ДНК е активен процес, състоящ се от няколко етапа.

Поглъщането на ДНК става чрез сливане на два протопласта, между които случайно е попадн

Получаването на трансформант става чрез рекомбинация на донорната ДНК с ДНК на реципи

В зависимост от плазмидата става (интегриращ се плазмид) или не (автономно реплициращ се п

табл. 1- особености на трансформация при бактерии и дрожди

Процесът трансформация при естествени условия

Освободената ДНК в средата при лизис на стареещи бактеријни култури обладава трансформиращата активност. Това значи, че трансформацията се явява един от природните механизми за обмен на генетичен материал у бактериите, осигуряващ възможност за наследствена изменчивост. От проведени опити със смесени култури на генетично маркирани пневмококи се установява, че в много клетки се лизират и освобождават ДНК. Такава ДНК може да проникне и в други клетки, в резултат на което да се появят рекомбинанти. Тъй като рекомбинацията увеличава значително набора от гени, с които действа естествения отбор, този процес в природата очевидно играе важна роля в еволюцията на бактериите.