**7 ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ**

* 1. **Общие понятия о наследственности и изменчивости**

**Генотипом** называют совокупность всех генов, присущих данному организму, т.е. его генетическую конституцию. Под **фенотипом** понимают совокупность признаков, присущих данному организму в определенной среде обитания. При одной и тойже генетической конституции микроорганизм может иметь несколько фенеотипов, что зависит от характера питания, аэрации, температуры и других внешних факторов.

**Изменчивость** микроорганизмов – это способность клеток изменять видовые признаки и свойства.

Смена фенотипов может происходить без участия наследственного аппарата (генотипа) или являться следствием его повреждения. Все наблюдаемые изменения можно разделить на две группы:

– **ненаследственная, фенотипическая или модификационная изменчивость** – это изменения в фенотипе, которые, как правило, проявляются у большинства особей в популяции при изменении внешних условий;

– **наследственная,** **генотипическая изменчивость** – это изменения обусловленные изменениями в генотипе, которые у прокариот происходят в виде мутаций и рекомбинаций генетического материала.

По диапазону различают внутривидовую и видообразующую изменчивость. **Внутривидовая изменчивость** включает процессы, возникающие при модификациях, изменениях чувствительности микроорганизмов к лекарственным веществам и другие, при которых сохраняются основные таксономические (видовые) признаки микробов. **Видообразующая изменчивость** связана с глубокой реорганизацией наследственных структур микроба и познается при изучении жизненно важных процессов обмена, онтогенеза и филогенеза родственных групп микроорганизмов. Внутривидовая форма изменчивости встречается часто, видообразующая - чрезвычайно редко.

* 1. Модификационная изменчивость

Модификационная изменчивость (ненаследственная, фенотипическая изменчивость) рассматривается как ответ на изменение условий окружающей среды и наблюдается до тех пор, пока действует фактор, вызывающий эти изменения. Модификации возникают под воздействием сильных и слабых химических (глицерин, хлорид кальция, железо), физических (температура, влажность, действие ультрофиолетовых лучей), биологических (антитела, антибиотики) факторов.

Модификационная изменчивость проявляется на уровне фенотипа и не затрагивает генотип, наблюдается при смене условий или старении в однородной генетически культуре и происходит у подавляющего большинства особей в популяции, в то время как при мутационной изменчивости изменение генотипа происходит только у единичных клеток**.** Эта форма изменчивости рано или поздно утрачивается, и бактерия вновь приобретает фенотип исходной культуры, поэтому считают, что модификационная изменчивость не играет существенной роли в эволюции микроорганизмов.

Изменчивость биологических свойств, возникающая при модификации, возникает в рамках имеющегося генотипа вида, поэтому спектр, выраженность, длительность фенотипических проявлений у разных видов неодинаковы. Модификации бывают лабильными (кратковременными) и стабильными (длительными).

Существует несколько проявлений модификационных изменений. Наиболее известны адаптивные модификации, т.е. ненаследственные изменения, полезные для организма и способствующие его выживанию. Их примером может служить адаптация клеток бактерий *Escherichia соli* к лактозе как новому субстрату: в этих условиях начинают синтезироваться индуцибельные ферменты, т.е. происходит фенотипическое проявление генов, «молчащих» при отсутствии лактозы в среде.

При стрессовых воздействиях на бактериальную клетку в ней ингибируется синтез обычных белков, но индуцируется синтез небольшой группы белков, функции которых заключаются в противодействии стрессовому воздействию путем защиты важнейших клеточных структур, в первую очередь нуклеоида и мембран. Адаптивные модификации расширяют возможности организма к выживанию и размножению в более широком диапазоне условий внешней среды. Возникающие модификации могут быть относительно стабильными и могут сохраняться в течение нескольких поколений или, наоборот, очень лабильными

* 1. **Мутации**

Мутации – изменения, возникающие в генетическом аппарате бактерий и передающиеся по наследству.

В соответствии с характером изменений в первичной структуре ДНК различают точковые и хромосомные мутации.

Точковые мутации затрагивают только одну пару оснований и приводящие к замене одной пары оснований на другую. Например, пара А-Т может быть заменена Г–Ц или наоборот. Для точковых мутаций характерна высокая частота реверсии. Мутации такого рода могут протекать в виде транзиций и трансверсий.

В результате транзиций происходит замена пурина на другой пурин или же пиримидина на другой пиримидин (простая замена). Например, пара Г–Ц может быть заменена на пару А–Т, или наоборот. При **т**рансверсии происходит замена пурина пиримидином, и наоборот (сложная замена), т.е. вместо пары А–Т появляется пара Т–А или Г–Ц.

Хромосомные **мутации** затрагивают множество пар нуклеотидов и деляться на дупликации, делеции, инсерции, инверсии, транслокации.

Дупликации – это мутации, приводящие к возникновению в данной нуклеотидной последовательности одного или, чаще, нескольких повторов. Делеции – это мутации, сопровождающиеся утратой двух или нескольких пар оснований. Инверсии – мутации, ведущие к изменению порядка нуклеотидов в ДНК на обратный по отношению к ориентации в штаммах дикого типа, возникающее обычно в результате рекомбинации с переворотом. Транслокации – это мутации, переносящие фрагмент ДНК в новое положение.

В зависимости от причины мутации разделяют на спонтанные и индуцированные. Спонтанные **мутации** возникают в популяции бактерий без целенаправленного экспериментального вмешательства. Как правило, спонтанные мутации можно объяснить случайными ошибками при репликации ДНК. Например, тимин, который обычно спаривается с аденином, может перейти в енольную форму и образовать водородные связи с гуанином. В результате во вновь синтезированной молекуле ДНК вместо пары Т–А появляется пара Г–Ц. Возникают такие мутации довольно редко. В среднем частота спонтанных мутаций составляет 10-4–10-10, т.е. измененной оказывается одна клетка на 104–1010 клеток в популяции.

Индуцированные мутации возникают с помощью воздействия тех или иных факторов - мутагенных агентов, которые существенно повышают частоту возникновения мутаций. Мутагенами могут быть химические (азотистая кислота, аналоги азотистых оснований, некоторые антибиотики, акридиновые красители, сернистый иприт), физические (УФ-лучи, ионизирующее излучение) и биологические агенты, действующие на генетический аппарат бактерий. Мутагенные агенты характеризуются неспецифичностью действия, т.е. используя какой-то мутаген, нельзя надеяться на выделение клеток с определенным типом или характером мутаций. Мутагены способны только повышать частоту возникновения мутаций.

Как **мутагенные факторы биологической природы** рассматривают мигрирующиегенетические элементы бактерий – дискретные сегменты ДНК, способные к самостоятельному перемещению из одного участка в другой в пределах репликона, а также к перемещению из одного репликона (хромосомного, плазмидного или фагового) в другой. К таким элементам относятся простые вставочные последовательности (*IS*-элементы), транспозоны (*Tn*-элементы) и фаги-транспозоны (фаг *Mu*). Интеграция их в репликоны осуществляется независимо от системы общей рекомбинации клеток, которая требует гомологии у рекомбинирующих структур.

*IS*-элементы представляют собой линейные фрагменты двухцепочечной ДНК длиной от 200 до 2000 п.н. Они содержат только гены tnp, кодирующие синтез фермента транспозазы, необходимого для их перемещения, или транспозиции. *IS*-элементы являются нормальными компонентами бактериальных хромосом и плазмид. *IS*-элементы могут перемещаться из одного участка генома в другой, в частности из бактериальной хромосомы в плазмиду и, наоборот, от плазмиды к плазмиде, включаясь в различные участки генома. При перемещениях они могут встраиваться в пределах одного гена и инактивировать его или изменять его регуляцию.

Транспозоны – сложные перемещающиеся элементы. От *IS*-элементов они отличаются тем, что кроме генов, ответственных за транспозицию, содержат структурные гены, отвечающие за проявление какого-либо фенотипа. Транспозоны могут контролировать резистентность к антибиотикам и ионам тяжелых металлов, способность к катаболизму лактозы, деградации толуола, синтезу энтеротоксинов и т. п., поэтому их легче обнаружить, чем *IS*-элементы. Длина транспозонов свыше 2000 п.н. Как и *IS*-элементы, транспозоны имеют концевые повторы, которыми часто служат *IS*-элементы.

Интеграция транспозонов или *IS*-элементов способна индуцировать образование мутаций. Включаясь в разные участки генома, они могут нарушать нуклеотидную последовательность гена, вызывать делеции, инверсии. В результате может синтезироваться функционально неполноценный белок или же его синтеза не происходит, в результате возникают соответственно делеционные или инверсионные мутанты. Наряду с плазмидами и фагами транспозоны или *IS*-элементы могут обеспечивать перенос генов между различными видами бактерий, иногда весьма отдаленными, и, следовательно, играют важную роль в эволюции микроорганизмов и используются в генетической инженерии.

* 1. **Плазмиды**

Наряду с хромосомой в бактериальной клетке могут присутствовать **плазмиды** – стабильно наследуемые внехромосомные генетические элементы, способные к автономной репликации. Молекулярная масса плазмид составляет около 20 % молекулярной массы хромосомы этих бактерий.

Плазмиды бактерий представляют собой двухцепочечные суперскрученные ковалентнозамкнутые кольцевые молекулы ДНК. Благодаря такой структуре они не подвергаются действию клеточных нуклеаз. Существуют также линейные плазмиды, на которые нуклеазы не действуют, поскольку их концевые участки защищены специфическими белками.

Плазмиды не являются жизненно важными наследственными структурами бактериальной клетки. При элиминации плазмид с помощью УФ-облучения, митомицина *С*, акридиновых красителей и других агентов жизнеспособность бактерий сохраняется.

Важнейшим свойством плазмид являются:

1. Способость к автономной репликации.

2. Трансмиссивность – способность передаваться из клетки в клетку при конъюгации. В зависимости от этого плазмиды подразделяют на конъюгативные (или трансмиссивные) и неконъюгативные (или нетрансмиссивные). Конъюгативные плазмиды способны передаваться из одной клетки в другую, их молекулярная масса обычно превышает 25 МД и они имеют гены, ответственные за перенос и детерминируют синтез половых пилей для образования конъюгативных пар, перенос ДНК и постконъюгативный синтез ДНК, придающий клетке донорные свойства.

Неконъюгативные плазмиды не содержат генов, придающих бактериальным клеткам свойства генетических доноров, и поэтому они неспособны самостоятельно передаваться от одних клеток к другим. Неконъюгативные плазмиды мелкие, с молекулярной массой менее 25 МД. Однако неконъюгативные плазмиды могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид. Перенос неконъюгативных плазмид с помощью конъюгативных называется *мобилизацией*. При этом неконъюгативная плазмида является мобилизуемой, а конъюгативная – мобилизующей. Мобилизация может осуществляться из-за наличия в плазмидах *IS*-элементов и транспозонов, которые обеспечивают объединение двух плазмид друг с другом – образование коинтегратов.

3. **И***нтеграция в бактериальную хромосому* осуществляется с помощью IS-элементов и транспозонов, которые имеются в хромосоме и в плазмиде. *П*лазмиды, которые могут находиться как в автономном, так и в интегрированном состоянии по отношению к хромосоме клетки-хозяина называют *эписомами.*

*4. Несовместимость. Родственные плазмиды не могут существовать в одной клетке, что* обусловливается или блокированием репликации ДНК родственной плазмиды или блокированием распределения дочерних молекул ДНК по клеткам.

5. Поверхностное исключение. Если в клетке уже имеется плазмида, контролирующая соответствующий признак, то при конъюгации плазмидная ДНК другой клетки проходит через клеточную стенку с трудом. Частота переноса плазмид при этом падает в 10–100 раз по сравнению с таковой в бесплазмидные клетки. Плазмиды, преодолевшие поверхностное исключение, стабильно сосуществуют с плазмидой реципиентной клетки, если они, конечно, совместимы.

Плазмиды придают клеткам различные *фенотипические признаки:*

*–* устойчивость к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, мутагенам (*R*-плазмиды);

– способность вызывать биодеградацию камфоры, ксилола, нафталина, салицилата, толуола и других неприродных и природных соединений (ксенобиотиков) (плазмиды биодеградации или *D*-плазмиды);

– способность синтезировать антибиотики, бактериоцины, пигменты, инсектициды, гемолизины, токсины, фибринолизины, сероводород, поверхностные антигены (*Col*-плазмиды);

– способность использовать в качестве источника углерода различные углеводы и необычные аминокислоты;

– способность вызывать образование опухолей у растений (*Ti*-плазмиды);

– способность конъюгировать с реципиентными штаммами бактерий или донорные свойства

– способность конъюгировать с реципиентными штаммами бактерий (*F-*плазмида) и др.

Плазмиды бактерий широко применяются в генетической инженерии. С их помощью можно получить рекомбинантные молекулы ДНК, вероятность образования которых в природе крайне низка или возникновение их вообще невозможно. Плазмиды играют значительную роль в эволюции бактерий и представляют большую ценность как материал для исследования структуры и функционирования генетического аппарата бактериальной клетки. Плазмиды важны с учетом фенотипов, которые они детерминируют.

* 1. **Способы генетического обмена у бактерий**

У бактерий существует горизонтальный перенос генов, при котором из клетки-донора в клетку-реципиента передается часть генетического материала (хромосомы), в результате образуется неполная зигота, или *мерозигота*. Затем переданный фрагмент хромосомы донора спаривается с хромосомой реципиента с последующей рекомбинацией. За рекомбинацией следует процесс репликации ДНК и деления клетки, в результате чего возникают клетки, содержащие только рекомбинантную хромосому, которые называются *рекомбинантами*.

Существуют три основных способа обмена генетической информацией, или горизонтального переноса генов: конъюгация, трансформация и трансдукция. Эти процессы отличаются друг от друга способом транспортировки ДНК.

*Конъюгация* *–* генетический обмен, сопровождающийся переносом генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при их непосредственном контакте. Конъюгация у бактерий была открыта в 1946 г. Э. Тейтумом и Д. Ледербергом на примере двух штаммов *Escherichia соl*i*, неспособные расти на минимальной питательной среде. Первый штамм был ауксотрофен по биотину и метионину, другой – по треонину, лейцину и тиамину. После смешения указанных штаммов и последующего посева на плотную питательную среду, появились колонии бактерий способные самостоятельно синтезировать все пять названных факторов роста. Возникновение прототрофных клеток, размножающихся на минимальной питательной среде, произошло благодаря рекомбинации двух генотипов родительских ауксотрофных штаммов.*

*Конъюгация описана у бактерий из родов Escherichia, Shigella*, *Salmonella, Pseudomonas, Nokardia.*

При конъюгации перенос генетического материала обеспечивается конъюгативными плазмидами (*F*-плазмида, *F*-фактор или половой фактор), ответственные за перенос генетического материала, синтез половых пилей, за перенос самой плазмиды или мобилизацию переноса хромосомной ДНК из клетки в клетку. В зависимости от состояния *F*-фактора различают три типа клеток-доноров: *F*+ клетки содержат его в виде свободной плазмиды; у *Hfr*-клеток он встроен хромосому; *F′*клетки имеют модифицированный половой фактор в виде автономной частицы, несущей несколько новых генов. Клетки-реципиенты (*F*- клетки) *F*-фактор не содержат.

*F*+ клетки и *F*- клетки сближаются и между ними образуется конъюгационный мостик, в образовании которого участвуют *F*-пили. Передача плазмиды или хромосомы начинается с однонитевого разрыва в области плазмиды, которая называется точкой начала передачи. Для того чтобы произошла передача хромосомных генов, плазмида *F* должна интегрироваться в хромосому. Разорванная ДНК разматывается на этом участке, и однонитевая ДНК, начиная с 5'-конца, переносится в реципиентную клетку. Одновременно на обеих нитях плазмидной и хромосомной ДНК – синтезируются комплементарные им нити. Благодаря этому в клетке-доноре восстанавливается целостность хромосомы и *F*-плазмиды.

Процесс переноса хромосомных генов при конъюгации может осуществляться также при участии содержащихся в хромосоме конъюгативных транспозонов.

*Трансформация* *–* перенос генетической информации в форме свободной ДНК от разрушенной клетки в клетку-реципиент. Явление было открыто в 1928 г. Ф. Гриффитсом, который обнаружил, что при одновременном введении в организм убитых нагреванием капсульные пневмококков и живых бескаапсульных штаммов этих же микроорганизмов, то последние приобретают способность образовать капсулы. Трансформация установлена у *Diplococcus, Bacillus, Rhizobium, Streptococcus.*

Трансформация может осуществляться в лабораторных условиях и за счет ДНК, спонтанно выделившейся из клетки без участия экспериментатора. При спонтанной, или естественной, трансформации выход ДНК из клетки обусловлен автолизом и бактерия-донор ДНК при этом обязательно погибает. Естественная трансформация является одним из способов горизонтального переноса генов в природных условиях.

Начальным этапом генетической трансформации является необратимая адсорбция ДНК на поверхности клетки и ее поглощение. К необратимой адсорбции и поглощению ДНК способны лишь клетки бактерий, находящиеся в состоянии компетентности. Последующие этапы, как и при других парасексуальных процессах, связаны с рекомбинацией трансформирующей хромосомной ДНК донора с хромосомой реципиента и пострекомбинационными событиями. Получаемые при этом способе генетического обмена рекомбинанты называются трансформантами. Генетическая трансформация у бактерий может осуществляться не только хромосомной, но и плазмидной ДНК.

**Трансдукция** – вид рекомбинации, при которой перенос генетического материала от клетки-донора к клетке-реципиенту осуществляют умеренные фаги или их мутанты. При трансдукции фрагменты хромосомы или плазмиды должны упаковаться в головку бактериофага; выйти в составе этой фаговой частицы из клетки-донора в результате ее лизиса и попасть в другую клетку (клетку-реципиент) при новом акте заражения. Белковый капсид фаговой головки предохраняет находящуюся в ней ДНК от разрушения внеклеточными нуклеазами. В этом отношении трансдуцирующая ДНК более «сохранна», чем «голая» ДНК, при трансформации.

Трансдукцию бактерий открыли лауреаты Нобелевской премии Д. Ледерберг и Н. Циндер. Совместно культивируя два не одинаковых по факторам роста ауксотрофа сальмонелл мышиного тифа в разных коленах *U*-образного сосуда, разделенного у основания мелкопористым фильтром, они отметили появление в одной культуре прототрофов. Далее выяснилось, что ауксотроф, на основе которого формировались прототрофы, был лизогенным и его умеренный фаг перенес к нему недостающие гены от другого, нелизогенного ауксотрофа. Установлено, что за трансдукшно ответственны умеренные фаги, потерявшие способность лизогенизировать бактериальные клетки вследствие того, что часть их генома при неправильном отщеплении замещается фрагментом ДНК бактерии-донора. Такие мутанты фагов называют **дефектными**. Они всегда присутствуют в популяции фагов, освобождаемых клетками в среду после индукции или суперинфекции. С помощью трансдуцирующего фага могут передаются как единичные гены, как и сцепленные маркеры, проявляющиеся в фенотипе в виде таких признаков и свойств как способность сбраживать различные углеводы, ситезировать аминокислоты и витамины, резистентность к антибиотикам, вирулентность, токсигенность, жгутики. Образующиеся рекомбинанты называются **трансдуктантами**. Приобретенные в процессе трансдукции признаки стабильны и передаются по наследству. Некоторые трансдуктанты могут оказаться неустойчивыми и, становясь, например, гетерогенотами (клетками с неполным диплоидным набором хромосом), в последующих пересевах теряют трансдуцированные им свойства.

По характеру передачи признаков различают **три вида трансдукции** – генерализованную, ограниченную (специализированную) и абортивную.

**Генерализованную,** или **общую, трансдукцию** осуществляют фаги с множественной локализацией на хромосоме бактерий. К ним, в частности, относится умеренный фаг Ми-l, содержащий линейную двухцепочечную ДНК. Геном этого фага с одинаковой легкостью включается в самые разные участки ДНК клетки, что может приводить к нарушению структуры бактериальных генов и, следовательно, мутациям. Характерной особенностью фага Ми-1, отличающей его от фагов, вызывающих ограниченную трансдукцию, является то, что после включения в хромосому бактерий порядок его собственных генов в профаге сохраняется таким же, как и у внеклеточного вириона.

При отщеплении от различных участков хромосомы фаги, вызывающие генерализованную трансдукцию, могут включать в состав практически любые гены донора и передавать клеткам-реципиентам. Размер поглощаемого сегмента хромосомы-донора определяется размером генома фага, который в сто раз меньше хромосомы бактерии. Вследствие этого при генерализованной трансдукции передаются сравнительно небольшие участки ДНК донора. Обычно трансдуцируются единичные признаки, но возможна и множественная трансдукция, например, несколько маркеров, контролирующих ростовые факторы и утилизацию углеводов. Следует также подчеркнуть, что трансдукция любого гена не зависит от трансдукции других генов, если между ними нет тесного сцепления. Генерализованная трансдукция возникает с низкой частотой – 10-4–10-7 на одну фаговую частицу.

**Ограниченную трансдукцию** связывают с фагами, обладающими избирательной локализацией на хромосоме бактерий и способными переносить ограниченное число генов, прилегающих к специфическим участкам интеграции. Этот вид трансдукции осуществляют умеренные фаги *λ, Р*2*, р*22 и многие другие. Передаются они из клетки в клетку в процессе инфекции или из поколения в поколение, находясь в составе геномов размножающихся лизогенных бактерий. Следует подчеркнуть, что лизогения очень распространена в природе и практически все виды бактерий могут быть лизогенными по одному или нескольким фагам. Так, лизогения у эшерихий *К*-12 по фагам *Х* и *Р*2 и эталонного штамма сальмонелл мышиного тифа по фагу *Р*22 стала известной только через десятки лет их использования в различных экспериментах. Один, другой и третий фаги – ДНК-вирионы. По строению схожи с вирулентными колифагами. В частности, фаг λ имеет сперматозоидную форму с одной нитью на конце отростка.

Проникнув в клетку, все они обычно встраиваются в строго определенном локусе хромосомы естественного хозяина. В частности фаг λ интегрирует с геномом эшерихий в районе галактозного локуса, контролирующего утилизацию галактозы. Естественно, что именно его чаще всего захватывает трансдуцирующий фаг.

**Абортивная трансдукция** отличается от первых двух тем, что перенесенный фагом фрагмент ДНК донора остается в цитоплазме реципиентной клетки в автономном состоянии. Не включаясь в хромосому клетки-реципиента, этот фрагмент ДНК в течение нескольких делений бактерий передается лишь одной клетке, а далее полностью исчезает. В течение указанного времени автономные гены непосредственно или через свои продукты, остающиеся в клетках, детерминируют определение признаки (способность синтезировать вещества, подвижность и пр.). Однако выраженность перенесенных признаков крайне неотчетлива. За абортивную трансдукцию ответственны фаги, участвующие в генерализованной трансдукции. Абортивная трансдукция встречается в 10 раз чаще генерализованиой.

Трансдукция обнаружена у многих видов бактерий: *Escherichia соli*, *Shigella*, *Salmonella, Vibrio cholerae, Proteus,* *Staphylococcus, Enterococcus* и др. Чаще удается внутривидовая трансдукция, т. е. фаговый перенос генетического материала в пределах определенного вида бактерий. Большой интерес представляют данные о межвидовой трансдукции и особенно о возможности этого вида рекомбинаций в природных условиях. Трансдукция служит активным механизмом формирования культур с измененными свойствами и может играть большую роль в эволюции микробов.

1. **РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА БАКТЕРИЙ**

**8.1 Регуляция активности ферментов**

Активность ферментов регулируется как физическими факторами (температура, давление, свет, магнитное поле, электрические импульсы), так и химическими факторами. Действие химических факторов, приводящее к изменению ферментативной активности, может проявляться в таких формах как: связывание с активным центром фермента; взаимодействие со специальными участками на поверхности молекулы определенного типа ферментов, не имеющими непосредственного отношения к центрам каталитической активности; химическая модификация молекулы фермента, путем ковалентного обратимого связывания с ферментом определенной группировки.

**Аллостерические ферменты** – белки с высокой молекулярной мас- сой, состоящие из нескольких субъединиц одного или разного типа. В первом случае каждая субъединица содержит каталитический и регуляторный (аллостерический) центры. Во втором – один субъединицы обладают каталитической активностью, другие выполняют регуляторную функцию. Таким образом, каталитический и регуляторный центры в молекуле аллостерического фермента пространственно разобщены, но функционально они тесно взаимосвязаны. Каталитическая активность аллостерического фермента меняется в результате связывания с его регуляторным центром определенных метаболитов, называемых эффекторами. Эффекторами могут быть субстраты, конечные продукты данного пути или конечные продукты родственных метаболических путей. Если действие эффектора приводит к понижению каталитической активности фермента, такой эффектор называется отрицательным, или ингибитором. Положительным называют эффектор, действие которого повышает каталитическую активность фермента. Положительным эффектором, или активатором, чаще всего бывает субстрат данного регуляторного фермента.

Вещества, действующие на аллостерические ферменты в качестве эффекторов, по своим химическим свойствам часто совершенно не сходны с субстратами, продуктами или кофакторами регулируемых ими ферментативных реакций. Однако на поверхности аллостерических ферментов имеются участки, обладающие сродством к эффекторам: это аллостерические центры. Вероятно, вначале эти белки выполняли только каталитическую функцию. Способность подвергаться регуляции возникла позднее. Нетрудно представить, что это свойство намного увеличило эффективность функционирования таких ферментов.

Наиболее простой случай аллостерической регуляции – регуляция первого фермента неразветвленного биосинтетического пути его конечным продуктом. Если конечный продукт накапливается в избытке, он подавляет активность первого фермента в процессе, называемом **ретроингибированием**, или ингибированием по принципу обратной связи. Примером такого типа регулирования является ингибирование биосинтеза *L*-изолейцина.

Каждый конечный продукт (эффектор) по отдельности, связавшись со «своим» аллостерическим центром, не меняет активности фермента. Для ингибирования ферментативной активности необходимо связывание с аллостерическими центрами всех конечных продуктов. Этот вид ингибирования получил название **мультивалентного ингибирования**. Каждый конечный продукт, связанный со «своим» аллостерическим центром, вызывает частичное ингибирование активности фермента. Одновременное присутствие всех конечных продуктов приводит к возраста**нию ингибирующего эффекта. Таким образом, конечные продукты в этом случае действуют независимо друг от друга. Такое ингибирование получило** название кумулятивного, или аддитивного**. В некоторых разветвленных биосинтетических путях ингибирование первого фермента осуществляется не конечными продуктами каждой из ветвей, а промежуточным продуктом, образующимся непосредственно перед разветвлением. Накопление его в свою очередь контролируется конечными продуктами. Такой вид ингибирования назвали** последовательным.

Регуляция синтеза ферментов у бактерий. Катаболитная репрессия. Диауксия. Механизмы функционирования репрессибельных оперонов. Аттенуация.

**8.2 Регуляция синтеза ферментов**

**Регулирование конечным продуктом активности аллостерического фермента определенного биосинтетического пути обеспечивает мгно­венную реакцию, приводящую к изменению выхода этого продукта. Если последний оказывается ненужным, отпадает надобность и в ферментах, участвующих в его синтезе. Проявлением максимальной экономичности клеточного метаболизма служат выработанные клеткой механизмы, регулирующие ее ферментативный состав. Очевидна целесообразность синтеза только тех ферментов, которые необходимы в данных физиологических условиях. У прокариот в одних условиях фермент может содержаться в количестве не более 1–2 молекул, в других – составлять несколько процентов от клеточной массы.**

**Механизм** репрессии конечным продуктом **на уровне транскрипции стал проясняться с 50-х гг. Большой вклад в это внесли работы Ф. Жакоба и Ж. Моно. Было показано, что наряду со структурными генами, кодирующими синтез ферментов, в бактериальном геноме существуют специальные регуляторные гены. Один из них – ген-регулятор (ген *R*), функция которого заключается в регуляции процесса транскрипции структурного гена (или генов). Ген-регулятор кодирует синтез специфического белка-репрессора. Репрессор – аллостерический белок, имеющий два центра связывания: один центр узнает определенную последовательность нуклеотидов на участке ДНК, называемом оператором** **(ген *О*), другой - взаимодействует с эффектором. Ген-оператор расположен рядом со структурным геном (генами) и служит местом связывания репрессора. В отличие от операторных генов гены-регуляторы расположены на некотором расстоянии от структурных генов (продукты регуляторных генов – репрессоры являются свободно диффундирующими белковыми молекулами.**

**Часто структурные гены, относящиеся к одному биохимическому пути, объединены в группу, составляющую вместе с оператором единицу транскрипции и регуляции –** оперон**. Все структурные гены, объединенные в оперон, имеют один операторный участок, локализованный на краю оперона, и координированно регулируются одним репрессором. Оперон представляет собой весьма рациональную и эффективную систему регуляции метаболического пути.**

**Процесс транскрипции начинается с прикрепления РНК-полимеразы, катализирующей синтез иРНК, к определенному участку ДНК, называемому промотором (*Р*). Когда молекула репрессора «садится» на операторный участок, она «закрывает» промотор, тем самым препятствуя связыванию с ним РНК-полимеразы и началу транскрипции.**

**У прокариот пять генов, кодирующих синтез ферментов триптофанового пути, образуют оперон. Ген-регулятор обеспечивает синтез аллостерического белка – триптофанового репрессора, неактивного в свободном состоянии. Последний в таком виде не связывается с операторным участком и не может, таким образом, препятствовать началу транскрипции. Когда конечный продукт метаболического пути – триптофан накапливается выше определенного уровня, он взаимодействует с репрессором и активирует его. Активированный репрессор присоединяется к операторному участку и подавляет транскрипцию триптофанового оперона. Таким образом, триптофан является корепрессором.**

**Гены, кодирующие синтез структурных ферментов одного метаболического пути, могут быть локализованы в разных местах бактериальной хромосомы. В этом случае синтез этих ферментов может регулироваться разными репрессорами, т.е. у каждого структурного гена будет «свой» ген-регулятор, продукт которого и будет взаимодействовать с продуктом метаболического пути, служащим корепрессором. Возможно также, что, несмотря на «разбросанность» по хромосоме структурных генов, кодирующих ферменты одного метаболического пути, эти гены регулируются одним репрессором. Для обозначения такого типа организации генов предложен термин** регулон**. Примером могут служить гены, кодирующие у** *Escherichia соli* **ферменты биосинтеза аргинина. Хотя они локализованы в разных местах хромосомы, их репрессия осуществляется одним и тем же репрессором, активируемым аргинином.**

**Исходный субстрат *А* служит индуктором всех ферментов данного пути, следствием чего будет одновременное и координированное увеличение скорости их синтеза. Такой механизм индукции называется координированным.**

**Индуктор (субстрат *А*) вызывает индукцию первого фермента и как результат этого происходит быстрое накопление продукта первой реакции (вещества *Б*). Промежуточный метаболит *Б* индуцирует синтез фермента Фг, что приводит к накоплению вещества В и последующей индукции фермента Ф3**. **В этом случае имеет место последовательное индуцирование синтеза ферментов метаболического пути продуктом предшествующей реакции. Подобный механизм индукции называется** последовательной индукцией. **Таким образом, синтез всех ферментов метаболического пути при координированной индукции находится под контролем одного индуктора; в последовательной индукции участвует несколько индукторов**

Принцип катаболитной репрессиизаключающейся в том, что быстро используемые клеткой источники энергии способны подавлять синтез ферментов других путей катаболизма, участвующих в метаболизировании сравнительно медленно используемых источников энергии. Катаболитную репрессию можно рассматривать как приспособление клетки к использова­нию в первую очередь наиболее легкодоступных источников энергии. В присутствии такого источника энергии потребление других субстратов, менее «удобных» для клетки, временно приостанавливается, и пути катаболизирования этих субстратов временно выключаются.

Основные механизмы, регулирующие катаболические пути – индукция синтеза ферментов и катаболитная репрессия. Катаболические пути, в которых функционируют конститутивные ферменты, регулируются большей частью посредством аллостерических воздействий на активность ферментов. Одна из задач катаболических путей – обеспечение клетки энергией. У большинства прокариот возможности генерации энергии намного превышают потребности в ней клетки. Количество АТФ, которое можно синтезировать с помощью имеющихся в клетках аэробных прокариот ферментов гликолитического и дыхательного путей, значительно больше количества АТФ, необходимого для процессов биосинтеза и поддержания жизнедеятельности. Поэтому клетки должны контролировать потребление энергосодержащих субстратов и выработку клеточной энергии.

*Вопросы для самоконтроля:*

1. *Что такое аллостерические ферменты?*
2. *Перечислите основные способы ингибирования активности ферментов.*
3. *Объясните оперонный принцип организации бактериальных хромосом и механизмы функционирования индуцибельных оперонов.*
4. *В чем заключается принцип катаболитной репрессии синтеза ферментов?*