

TRANSFORMACE = PŘÍJEM EXOGENNÍ DNA BAKTERIÁLNÍ BUŇKOU

- **1928: Griffith - *Streptococcus pneumoniae* - změny virulence**
- **1944: Avery, MacLeod, McCarty - důkaz transformující aktivity DNA *Streptococcus pneumoniae***

Terminologie

Transformace

- u bakterií: příjem cizorodé exogenní DNA, změna vlastností
- U eukaryot: nádorová transformace

Transfekce

- u bakterií: příjem volné fágové DNA
- U eukaryot: příjem volné DNA, buněčné nebo virové

TABLE 1. Transformable Organisms^a

Genera/species	Natural competence	Artificial competence
<i>Achromobacter</i>	+	N.D.
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	N.D.
<i>Anacystis nidulans</i>	+	N.D.
<i>Bacillus</i>		
<i>subtilis</i>	+	+
<i>subtilis</i> L-form	-	+
<i>stearothermophilus</i>	+	+
<i>thuringiensis</i>	-	+
Various species	-	+
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	-	+
<i>Clostridium</i>	+	N.D.
<i>Deinococcus radiodurans</i>	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Haemophilus</i>		
<i>influenzae</i>	+	+
<i>parainfluenzae</i>	+	+
Various species	+	N.D.
<i>Magnaporthe grisea</i>	-	+
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	+	N.D.
<i>Methylobacterium organophilum</i>	+	N.D.
<i>Moraxella</i>		
<i>osloensis</i>	+	N.D.
<i>urethalis</i>	+	N.D.
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	?	+
<i>Mycoplasma</i>	-	+
<i>Neisseria</i>		
<i>gonorrhoeae</i>	+	N.D.
<i>meningitidis</i>	+	N.D.
<i>Pseudomonas</i>		
<i>aeruginosa</i>	-	+
<i>stutzeri</i>	+	?
Marine species	+	N.D.
<i>Rhizobium meliloti</i>	-	+
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	N.D.
<i>Streptococcus</i>		
<i>faecalis</i>	?	+
<i>pneumoniae</i>	+	N.D.
<i>sanguis</i>	+	N.D.
<i>Streptomyces</i>	-	+
<i>Synechococcus</i>	+	N.D.

N.D., not determined.

^a This listing is illustrative, not exhaustive.

Přirozená transformace

X

umělá transformace

Rozdíl ve schopnosti
přirozeně navodit stav
kompetence

U přirozené transformace
- rozdíly v příjmu
chromozomové
a plazmidové DNA,

TABLE 1 Bacteria active in gene transfer by transformation^a

Species isolated from terrestrial or aquatic habitats	Tf ^b	Phylum based on 16S phylogeny ^c
Protolithotrophic		
<i>Chlorobium limicola</i>	1.0×10^{-5}	Chlorobi
<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	4.3×10^{-4}	Cyanobacteria
<i>Anacystis nidulans</i>	8.0×10^{-4}	Cyanobacteria
<i>Nostoc muscorum</i>	1.2×10^{-3}	Cyanobacteria
<i>Synechocystis</i> sp. strain 6803	5.0×10^{-4}	Cyanobacteria
Chemolithotrophic		
<i>Thiobacillus thioparus</i>	$10^{-7} \times 10^{-2}$	Proteobacteria
Heterotrophic		
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	$10^{-7} \times 10^{-6}$	Actinobacteria
<i>Achromobacter</i> spp.	+ ^d	Proteobacteria
<i>Azotobacter vinelandii</i>	9.5×10^{-2}	Proteobacteria
<i>Bacillus subtilis</i>	3.5×10^{-2}	Proteobacteria
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	7.0×10^{-5}	Proteobacteria
<i>Deinococcus radiodurans</i>	2.1×10^{-2}	Deinococcus-Thermus
<i>Thermus aquaticus</i>	6.4×10^{-4}	Deinococcus-Thermus
Methylotrophic		
<i>Methylobacterium organophilum</i>	5.3×10^{-3}	Proteobacteria
Archaeobacteria		
<i>Methanococcus voltae</i>	8.0×10^{-6}	Euryarchaeota
Clinical isolates of pathogenic species		
<i>Campylobacter jejuni</i>	2.0×10^{-4}	Proteobacteria
<i>Haemophilus influenzae</i>	7.0×10^{-3}	Proteobacteria
<i>Helicobacter pylori</i>	5.0×10^{-4}	Proteobacteria
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.0×10^{-4}	Proteobacteria
<i>Neisseria meningitidis</i>	1.1×10^{-2}	Proteobacteria
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.5×10^{-6}	Firmicutes
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.9×10^{-2}	Firmicutes
<i>Streptococcus sanguis</i>	2.0×10^{-2}	Firmicutes
<i>Streptococcus mutans</i>	7.0×10^{-4}	Firmicutes

^aModified from Day (2002).^bTf, transformation frequency (chromosomal marker transformants/viable cell).^c*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed.^dTransfer recorded but no frequency reported.

OBECNÉ RYSY PŘIROZENÉ TRANSFORMACE

Donorová buňka → transformující DNA (volná)

■ Recipientní buňka ve stavu kompetence

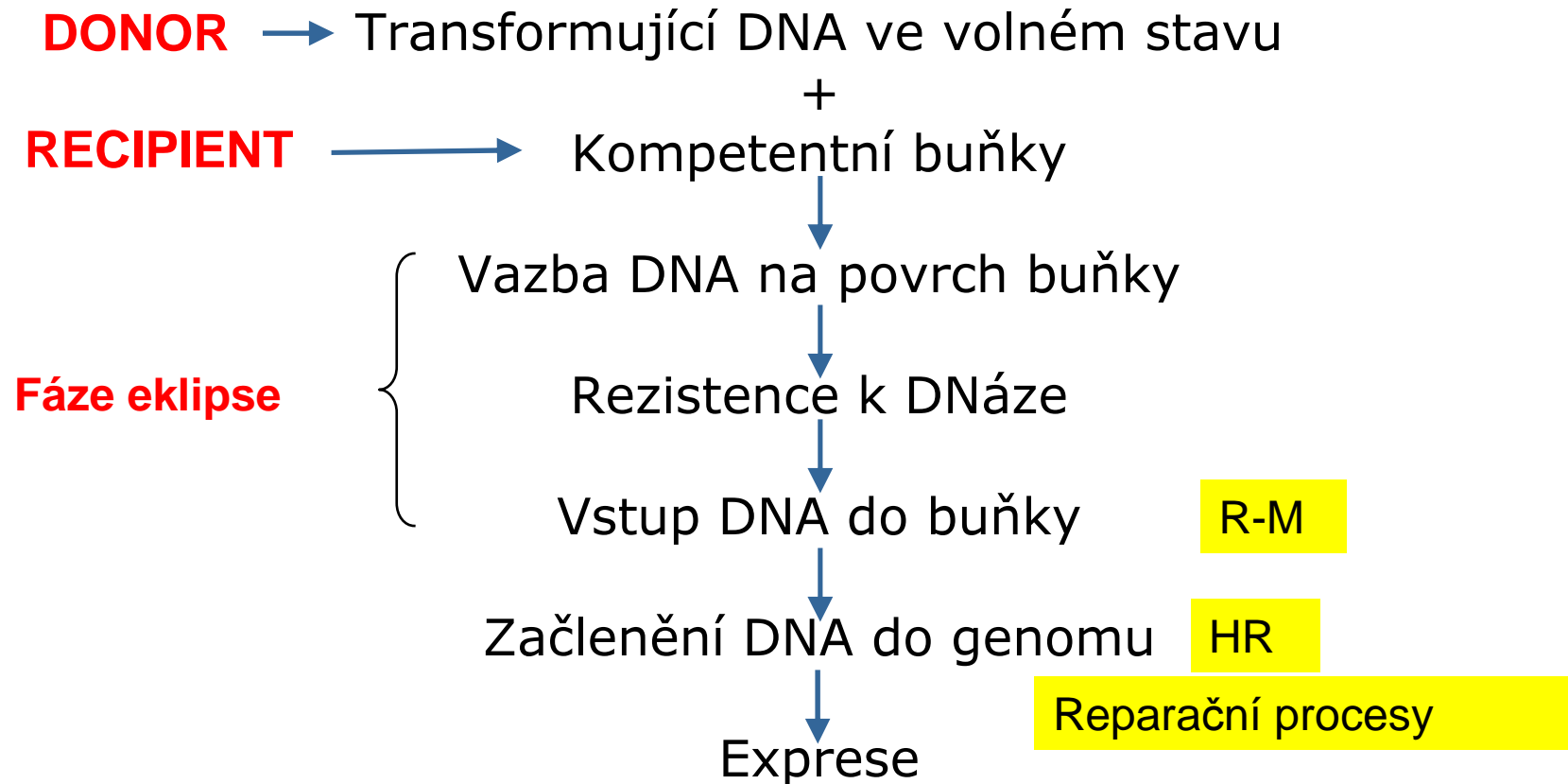
■ příjem DNA a její začlenění do genomu

- 1. Vazba dsDNA na povrch recipientní buňky
- 2. Pohyb DNA přes buněčnou stěnu a membránu
- 3. Degradace jednoho řetězce DNA
- 4. Translokace druhého řetězce DNA do cytoplazmy
- 5. Stabilní začlenění jednořetězcového úseku do chromozomu **homologní rekombinací (RecA+)**

Přenos DNA transformací je citlivý k nukleázám (x transdukce, konjugace)

ZÁKLADNÍ KROKY PŘI TRANSFORMACI

(křížení dvou kmenů)



CHARAKTERISTIKA TRANSFORMUJÍCÍ DNA

DNA : chromozomová, plazmidová, fágová (transfekce)

- velikost: 0,5 kb až několik desítek kbp
(zhruba 5-10 genů)
- dsDNA, nativní stav
- konc. 1-10 mg DNA/ml kompetentních buněk
- ze 100-200 molekul DNA se inkorporuje jen jedna
- u plazmidové a fágové DNA je nutných 10 000 molekul

- Počet receptorů na povrchu buněk pro příjem DNA
S. pneumoniae: 80, *B. subtilis*: 50, *H. influenzae*: 5

STAV KOMPETENCE - ZNAČNÉ ROZDÍLY MEZI JEDNOTLIVÝMI DRUHY

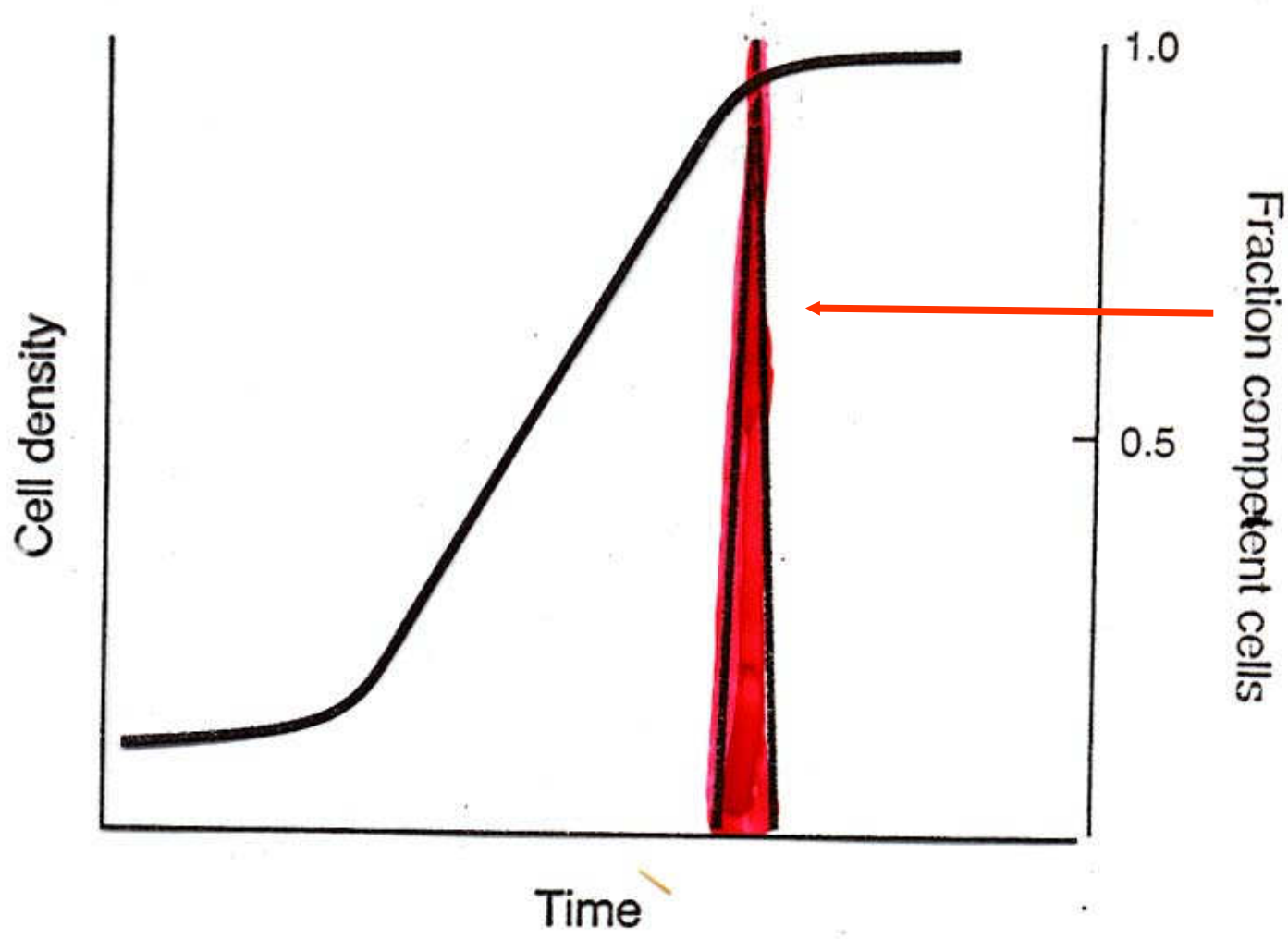
- výsledek změn v buněčné stěně - syntéza specifických proteinů**
- závislost stavu kompetence na fázi růstového cyklu**
- závislost na hustotě buněk v populaci (tvorba feromonů - quorum sensing)**
- fyziologické faktory - ovlivnění složením media, teplotou a pH**

STAV KOMPETENCE - STREPTOKOKY

- vyžadováno kompletní medium
- dochází k syntéze faktorů kompetence - asi 16 proteinů (bazické proteiny, nízká m.h., podobají se fágovým proteinům a reagují s receptory buněčné membrány pro příjem DNA)
- mění se morfologie buněk - dlouhé řetízky
- aktivují se autolyziny - částečná lyze buněčné stěny
- **stav k. trvá jen několik minut, ale šíří se v celé populaci**

(quorum sensing: koordinovaná exprese genů podle aktuálního lokálního množství bakterií produkujících signální molekuly) – využití reportérových genů

INTERVAL KOMPETENCE – *S. PNEUMONIAE*



NAVOZENÍ KOMPETENCE U *B. SUBTILIS*

- pozdní stacionární fáze
 - účast Mg^{++} k aktivaci specifických nukleáz (17 kD endonukleáza)
 - zpomalení syntézy DNA (jedna kopie chromozomu)
 - syntéza nových polypeptidů (analogy proteinů pro sporulaci, stres aj)
 - exprese genů pro reparaci DNA (SOB)
 - změna fyziologie a morfologie buněk (změny v sedimentaci)
 - **stav kompetence trvá několik hodin**
- } využití reportérových genů

STAV KOMPETENCE - *H. INFLUENZAE*

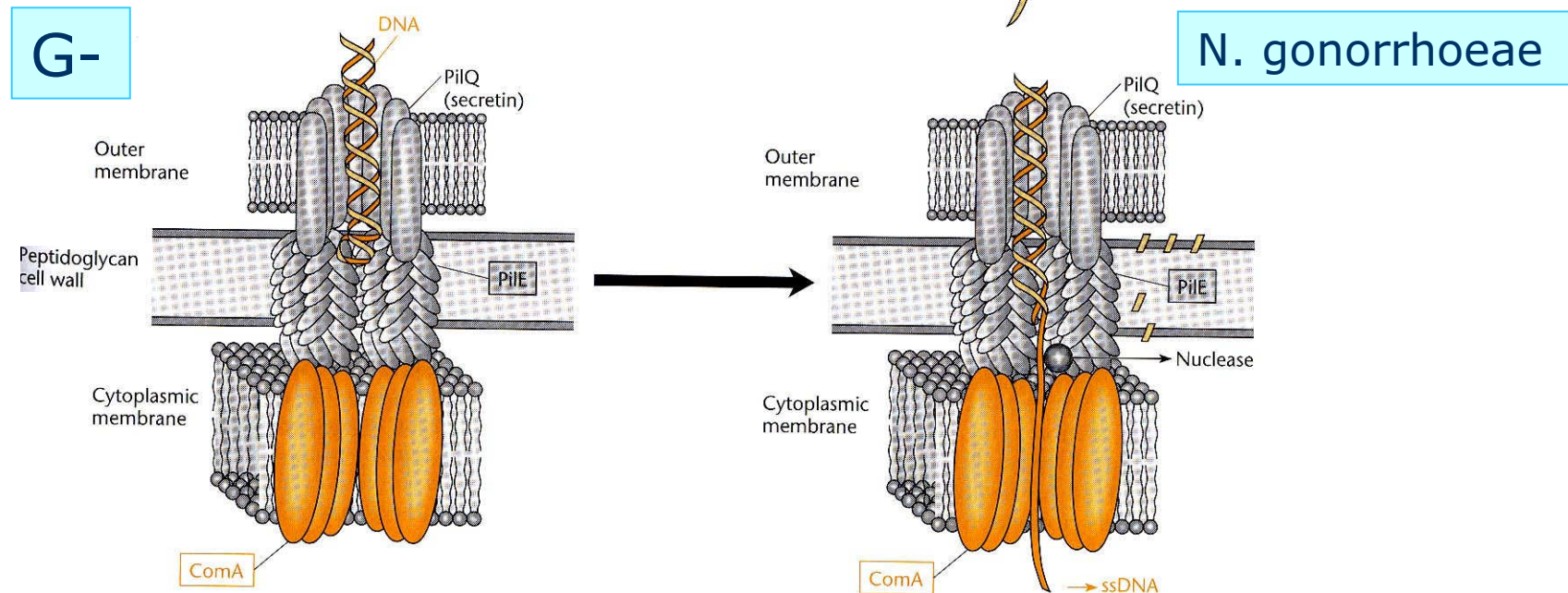
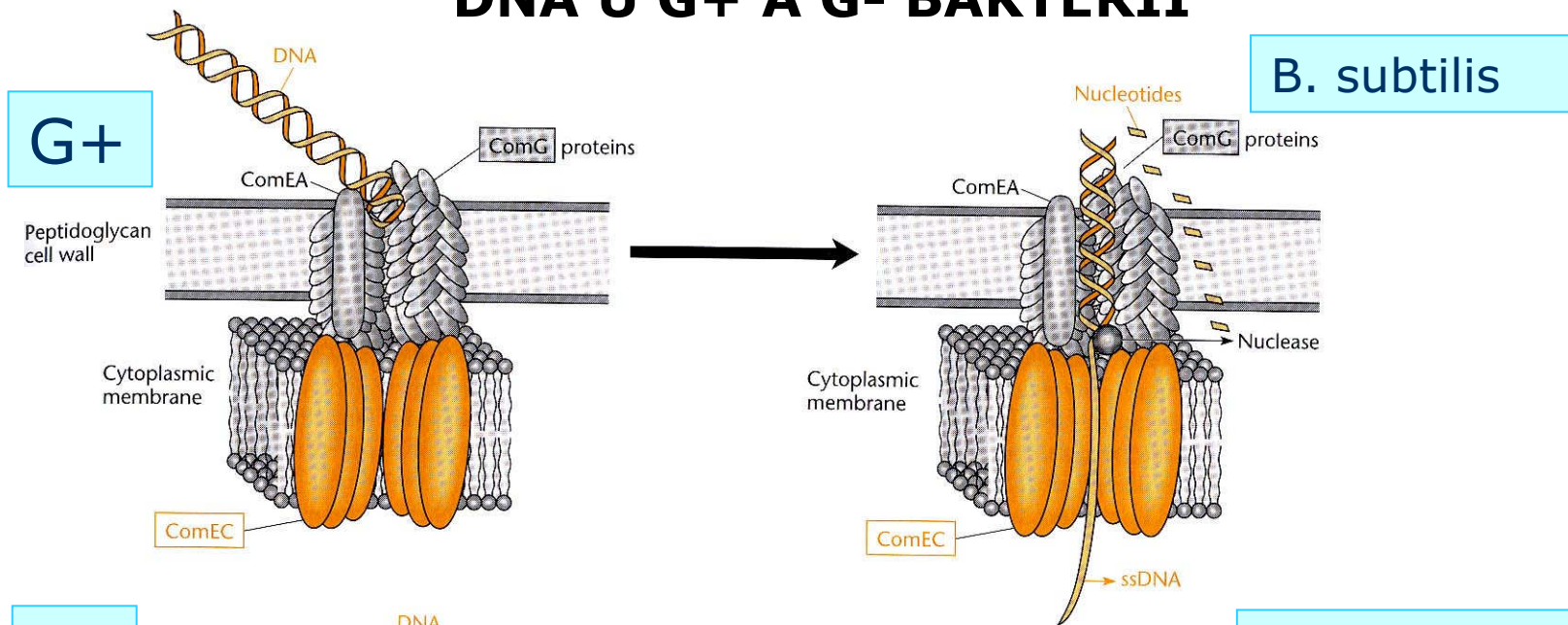
- regulováno interně, ve vhodném mediu až 100% buněk
- blokáda buněčného dělení
- tvorba **transformazomů** a specifických povrchových proteinů

TRANSPORTNÍ A POMOCNÉ PROTEINY

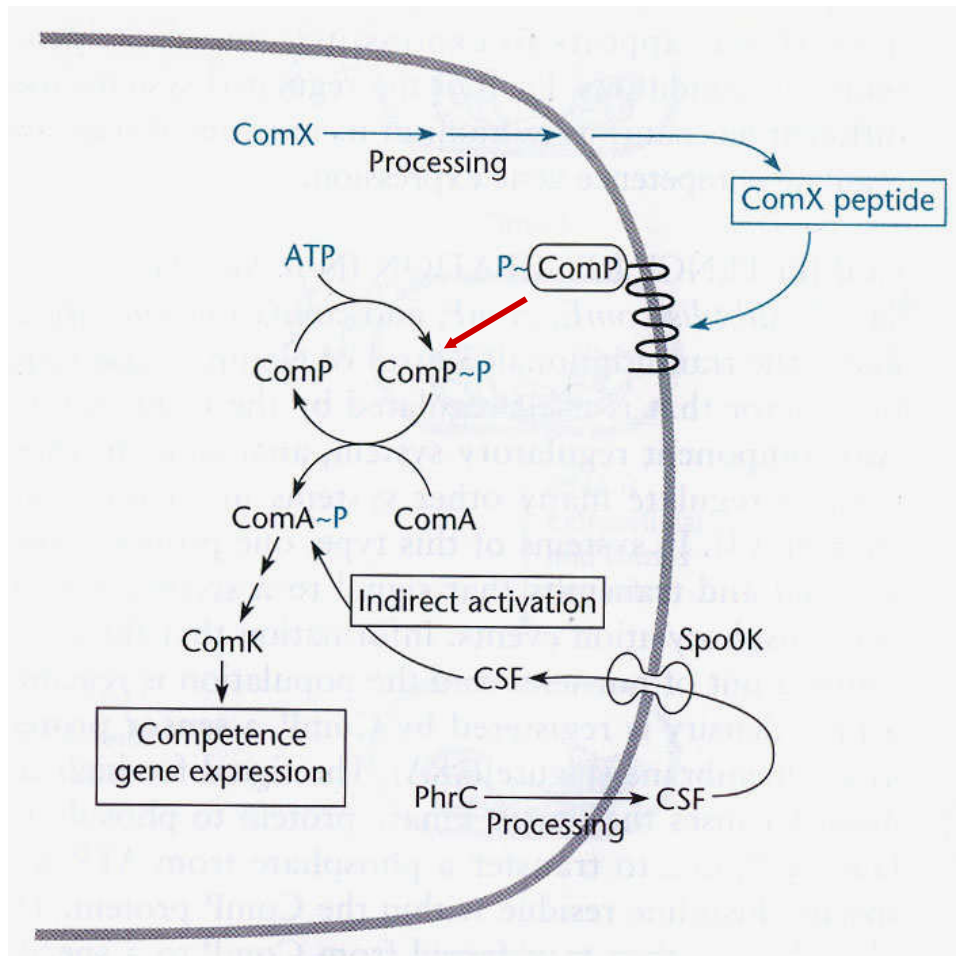
K překonání buněčné stěny (fyzikální a elektrostatická bariera) je vyžadován značný počet proteinů. Několik proteinů má klíčovou úlohu, ostatní jsou pomocné:

- A) **PSCT** proteiny: skupina proteinů úzce spjatá s povrchovými aktivitami: **pilus, sekrece, kompetence a twitching** (trhavý pohyb). Knokaut (**Tn**) těchto genů vede k dramatickému snížení transformovatelnosti.
- B) Další proteiny patří mezi **Com** (Bs) a jsou analogické u různých druhů: ComEA – vazba a transport přes stěnu, ComG zvyšuje porozitu, a řada dalších interagujících proteinů (např. Por (periplazmatický protein u Hi), který je esenciální pro přenos – asi zajišťuje optimální terciární strukturu některého z faktorů kompetence. Další proteiny fungují analogicky jako SSB proteiny.
- C) **Nukleázy** – U Bs a Sp – štěpí navázanou DNA, a nukleáza EndA u Sp štěpí pak jeden řetězec od 5´ konce a ta vstupuje 3´ koncem do cytoplazmy.

SYSTÉMY NAVOZOVÁNÍ KOMPETENCE PRO PŘÍJEM DNA U G+ A G- BAKTERIÍ



Regulace vývoje stavu kompetence pomocí quorum sensing u *B. subtilis*



Protein ComP (senzor) kontroluje koncentraci feromonu ComX, po jeho zachycení se sám fosforyluje a přenáší fosfát na ComA (protein-regulátor zprostředkující odpověď) – fosforylovaný ComA-P působí jako transkripční aktivátor několika genů zodpovědných za kompetenci

Feromony pro kompetenci = malé peptidy sekretované buňkami, jejichž hladina odpovídá koncentraci buněk v populaci.

Jsou vytvářeny jako prekurzory, jako hotové jsou uvolňovány do prostředí a naředovány, takže vysoké koncentrace je dosaženo pouze při vysokém počtu buněk.

Transformazomy u *H. influenzae*

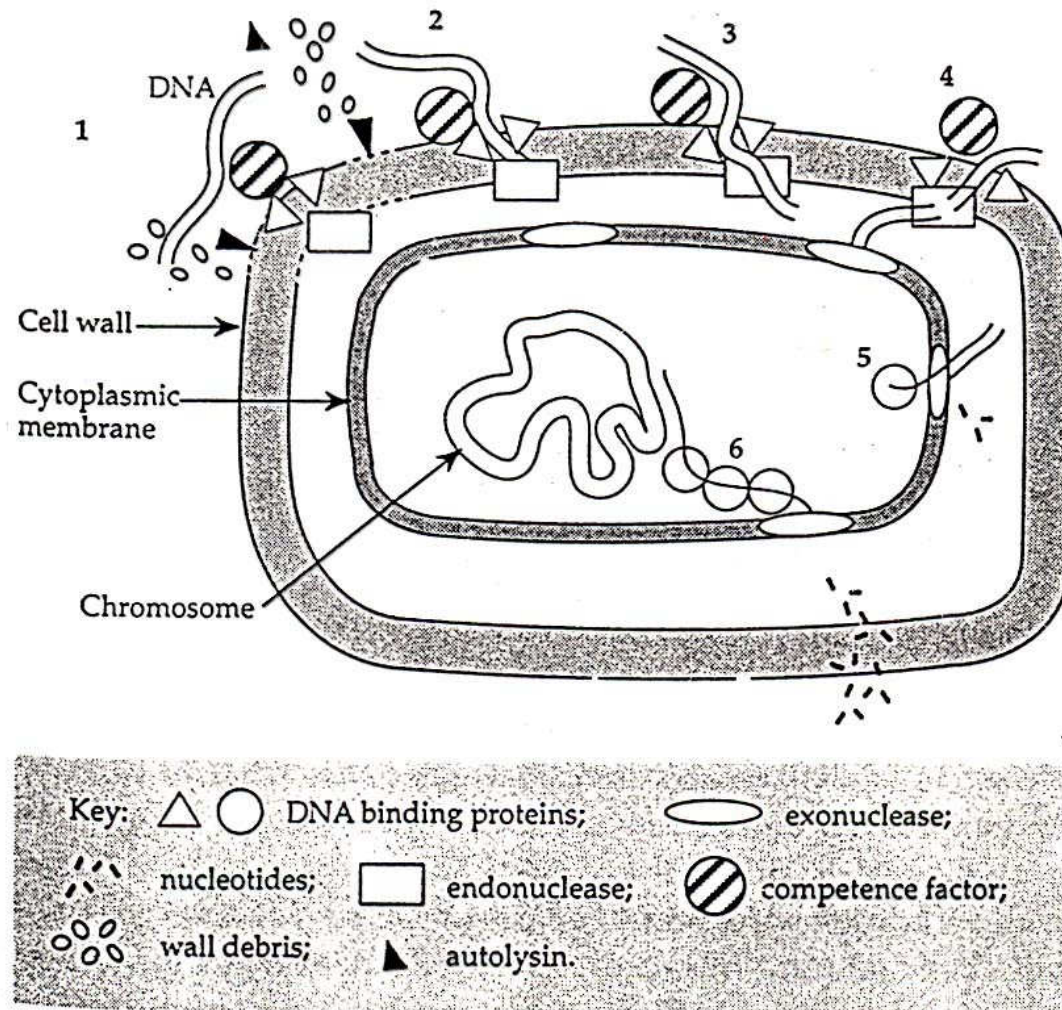


Fig. 10.4 Schematic representation of the steps leading to DNA entry during transformation of a Gram-positive bacterium. Stages 1 to 6 indicate a time sequence.

TRANSFORMAZOMY U *H. INFLUENZAE*

Specifická rozpoznávací sekvence na DNA
AAGTGCGGTCA (USS = uptake signal sequence;
DUS = DNA uptake sequence)

(u *N. gonorrhoeae*: **GCCGTCTCAA**)

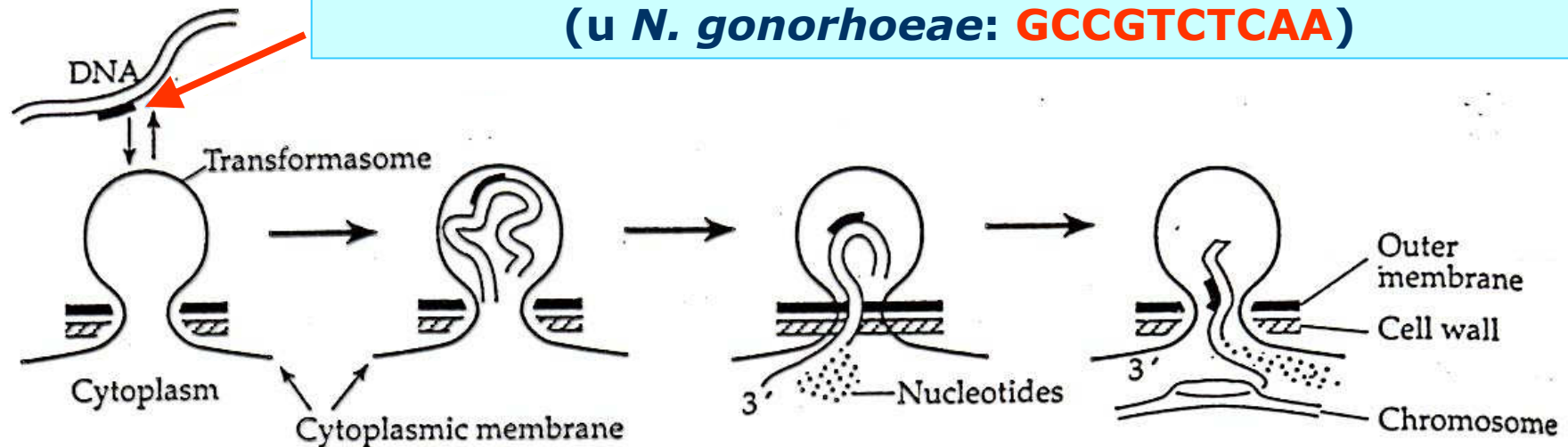


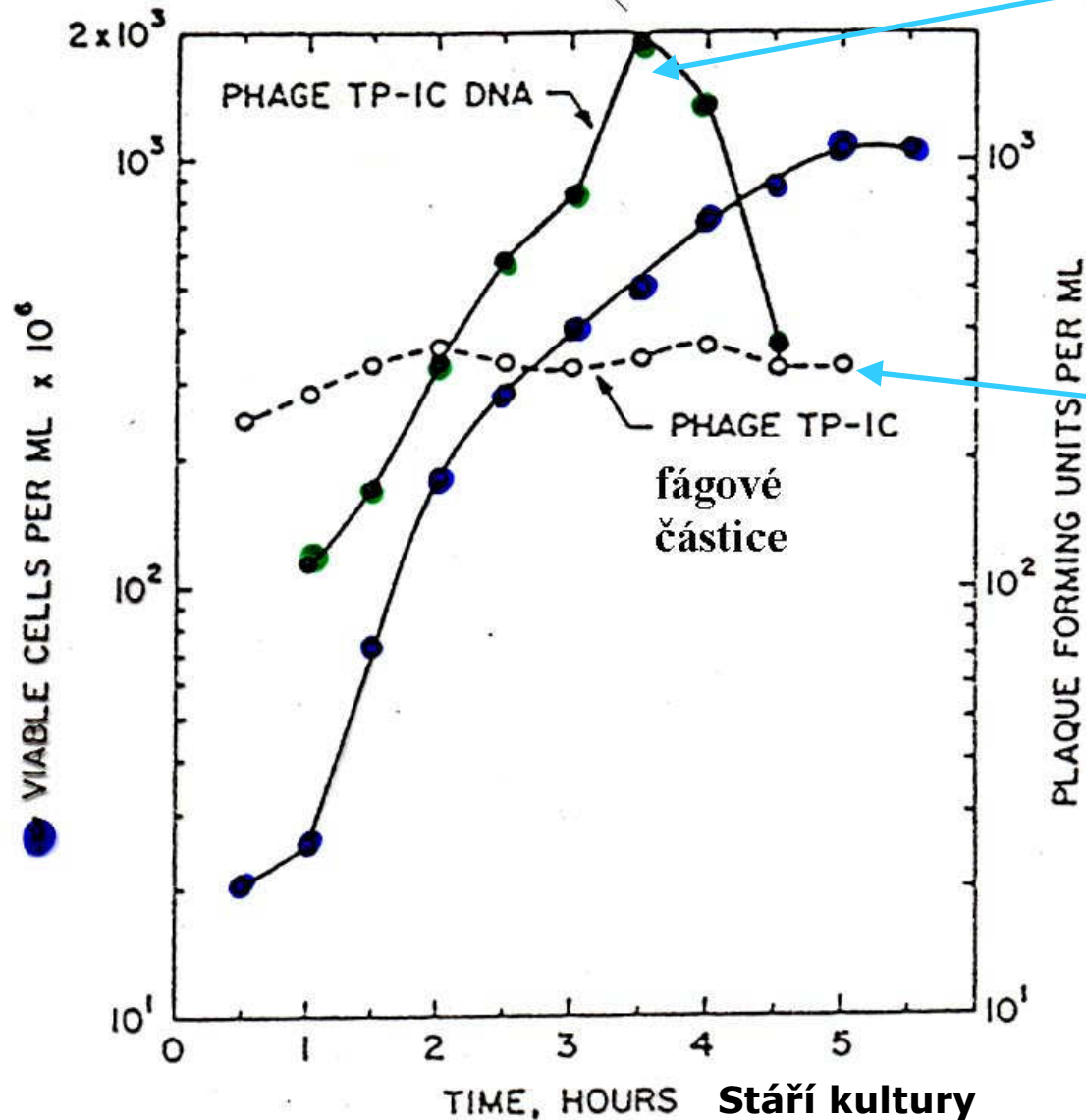
Fig. 10.3 Uptake and entry of transforming DNA in the Gram-negative bacterium *H. influenzae*. The heavy line on the DNA molecule indicates the specific recognition sequence.

Počet sekvencí na chromozomu = 734+ a 731-;

H. influenzae má 62% AT, takže by se statisticky očekávalo jen 8 míst, a ne 1465 (sekvence je bohatá na GC).

61% těchto sekvencí se nachází v ORF, každá zhruba na 1 248 bp.

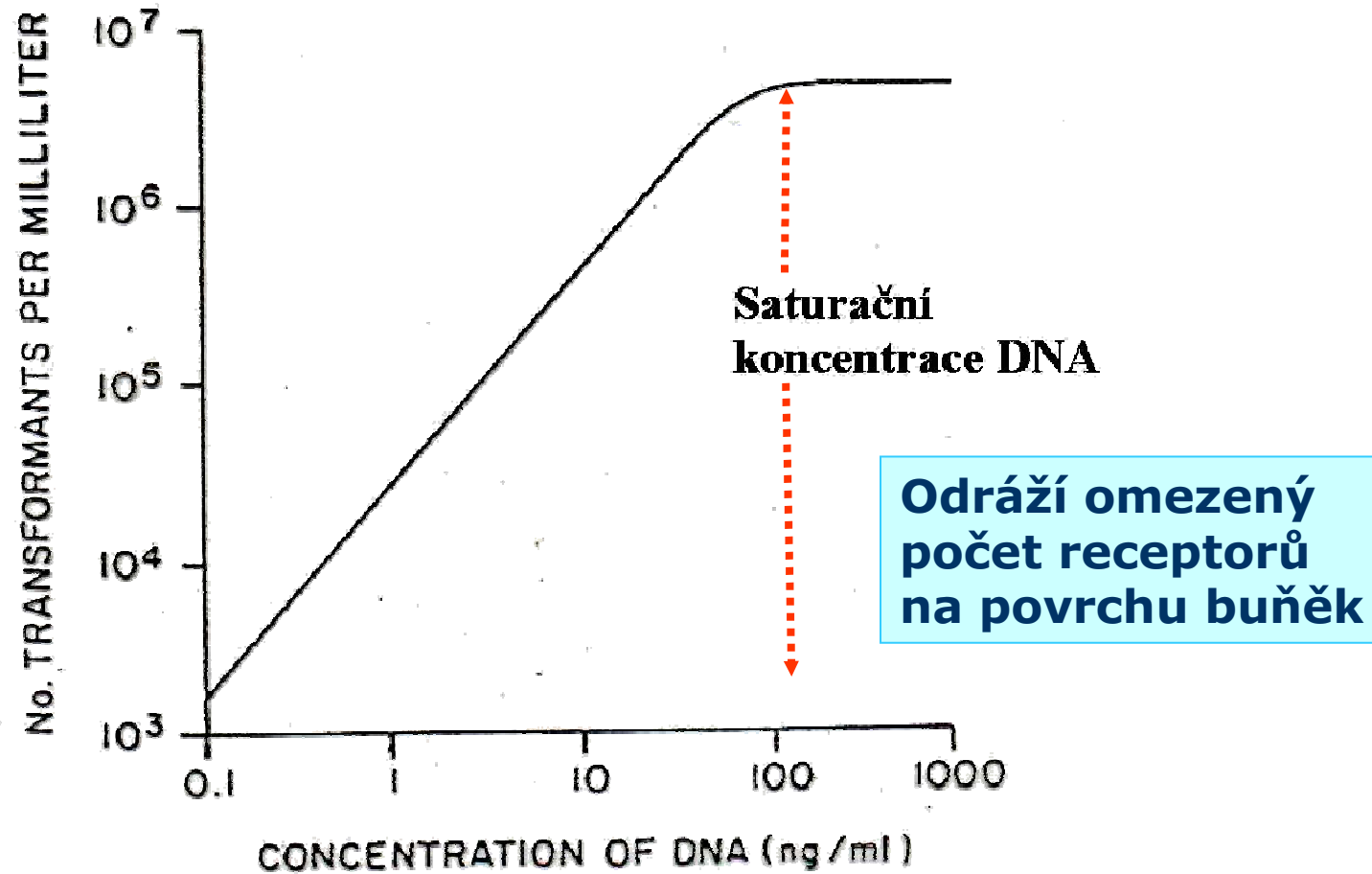
Detekce optimálního stavu kompetence



Zvyšování počtu plak při stejné koncentraci fágové DNA indikuje stav kompetence.

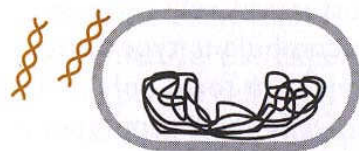
Počet plak po infekci buněk fágovými částicemi se během růstu kultury výrazně nemění

Stanovení saturační koncentrace DNA

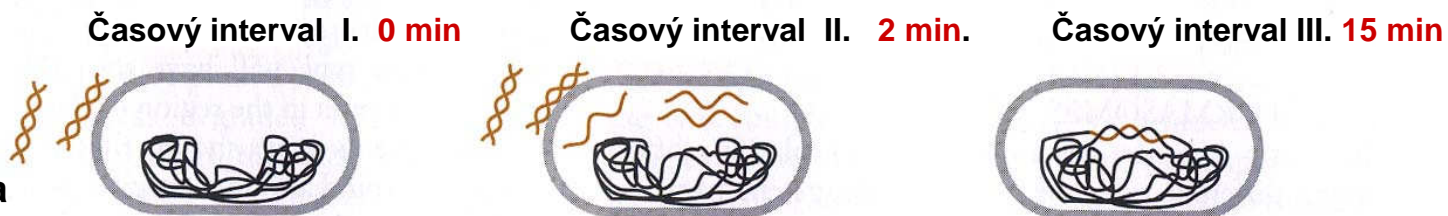


Genetický test pro ověření stavu DNA při transformaci

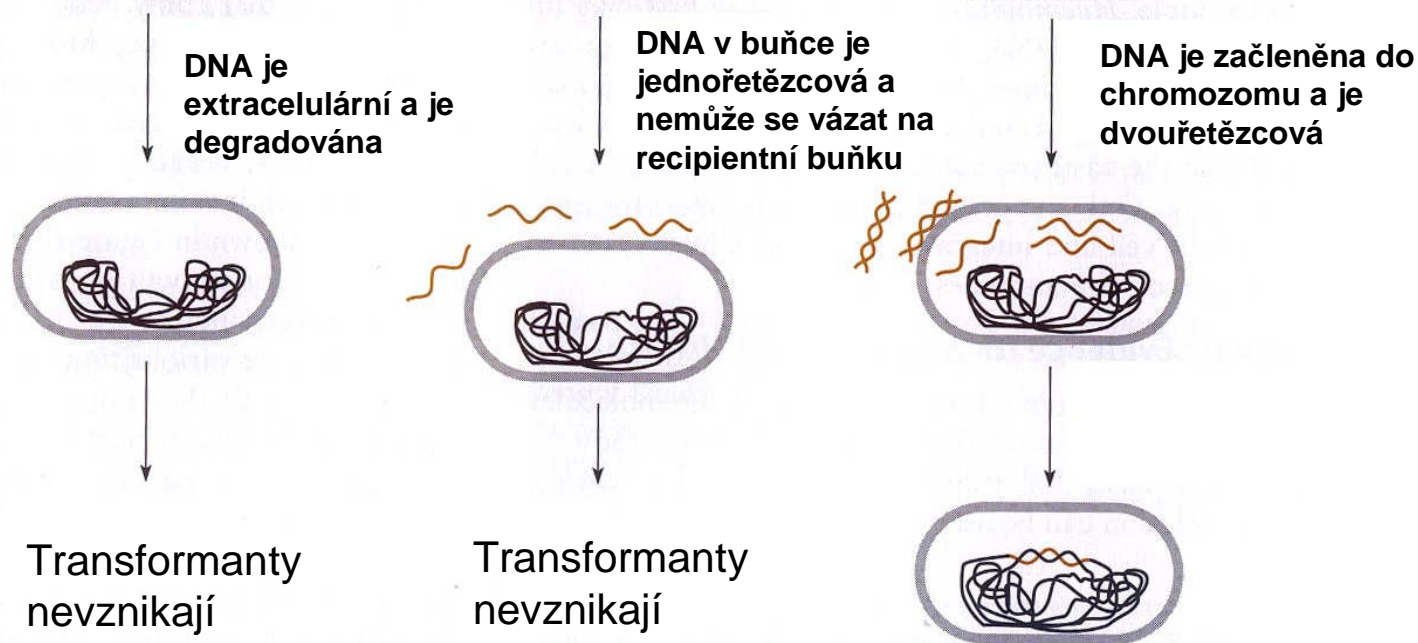
1. DNA Arg+ je přidána k recipientním buňkám Arg-



2. V různých časových intervalech je přidána DNAáza



3. Extrakce DNA a její přidání k buňkám Arg-



Transformanty nevznikají

Transformanty nevznikají

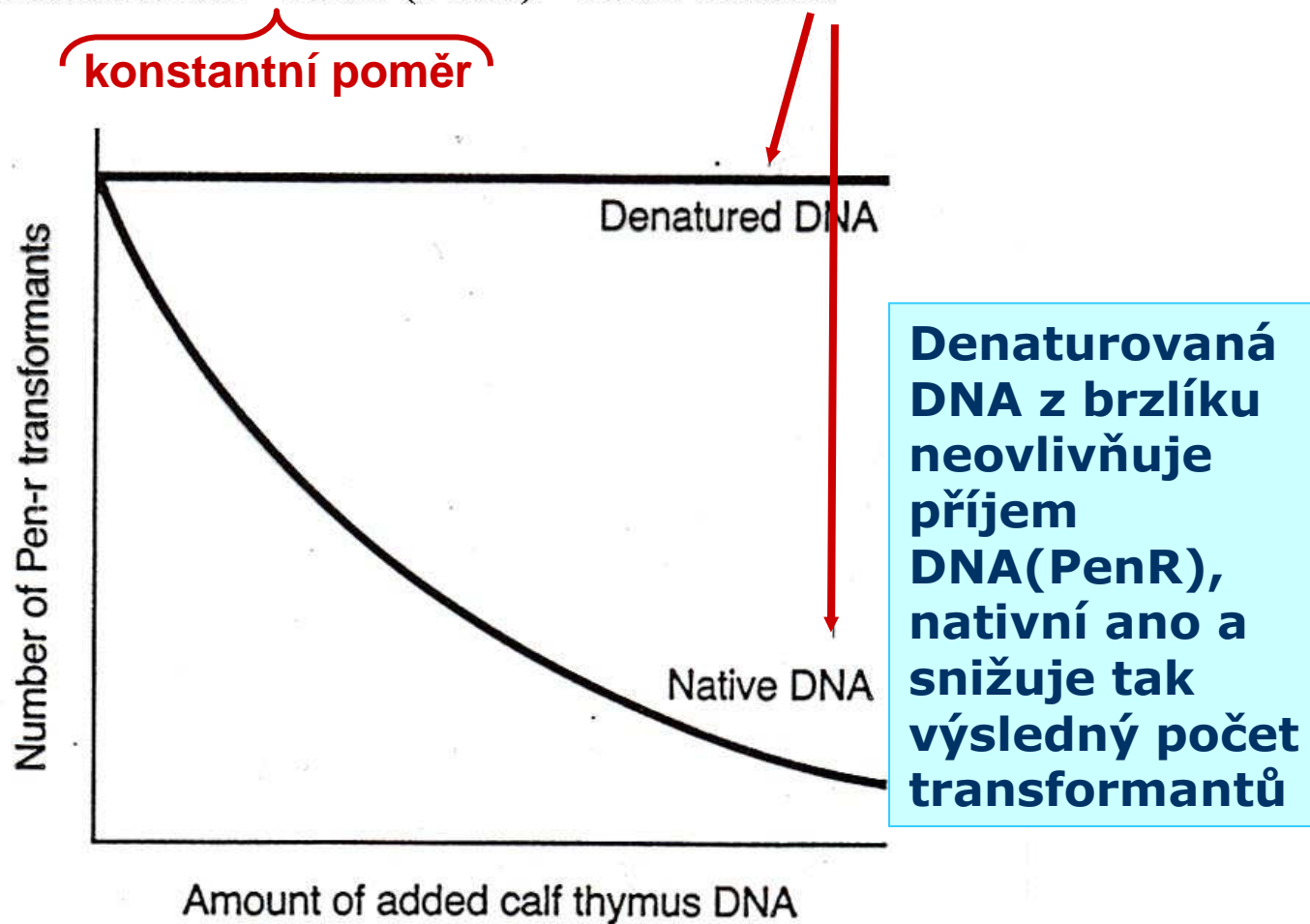
Transformanty Arg+ vznikají

Fáze eklipse = časový interval, kdy nelze DNA z povrchu buněk odmyt ani ji v buňkách prokázat

Příjem DNA buňkou

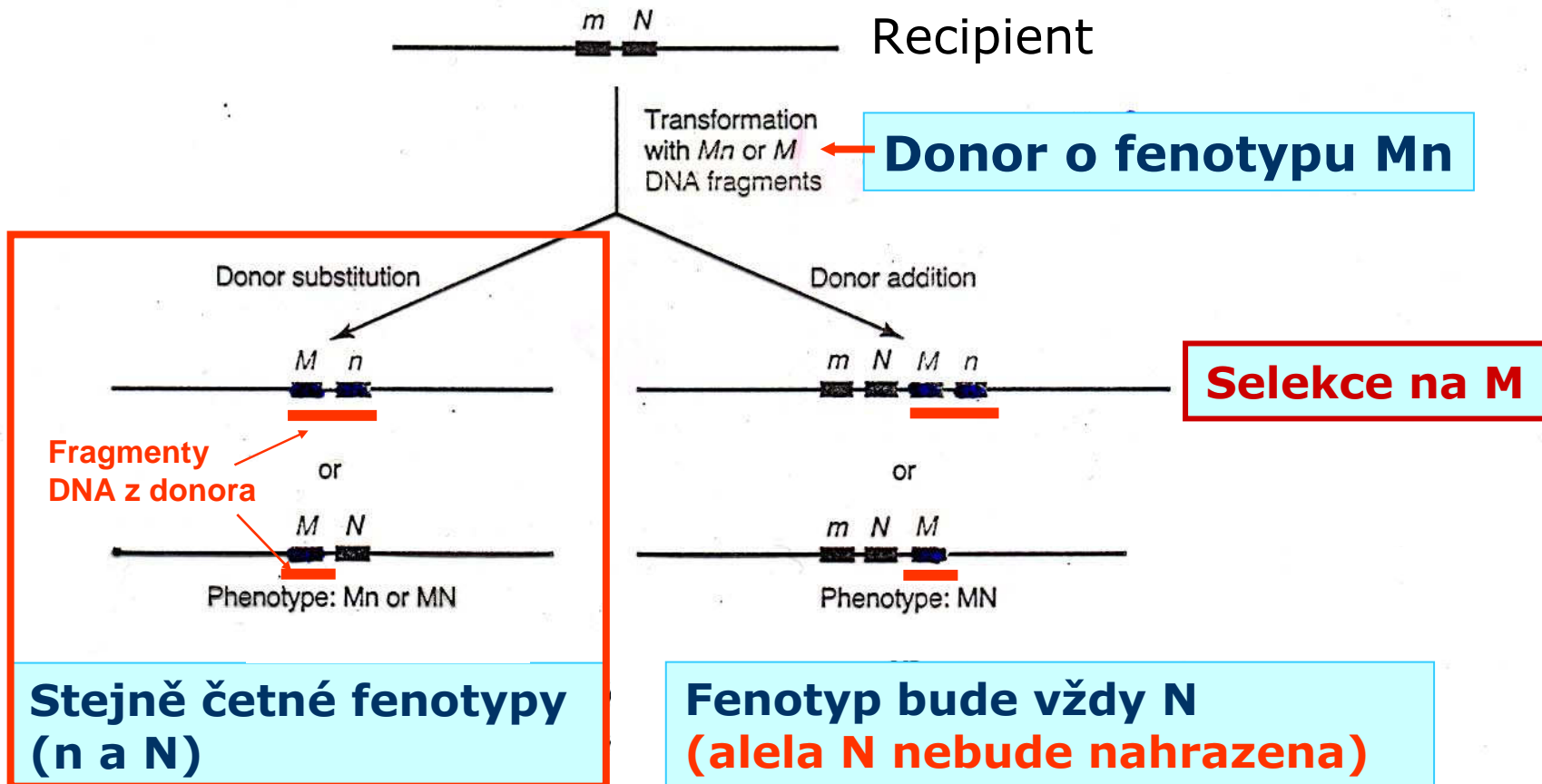
vzájemná kompetice mezi molekulami exogenní DNA

Buňka PenS + DNA (PenR) + DNA brzlíku



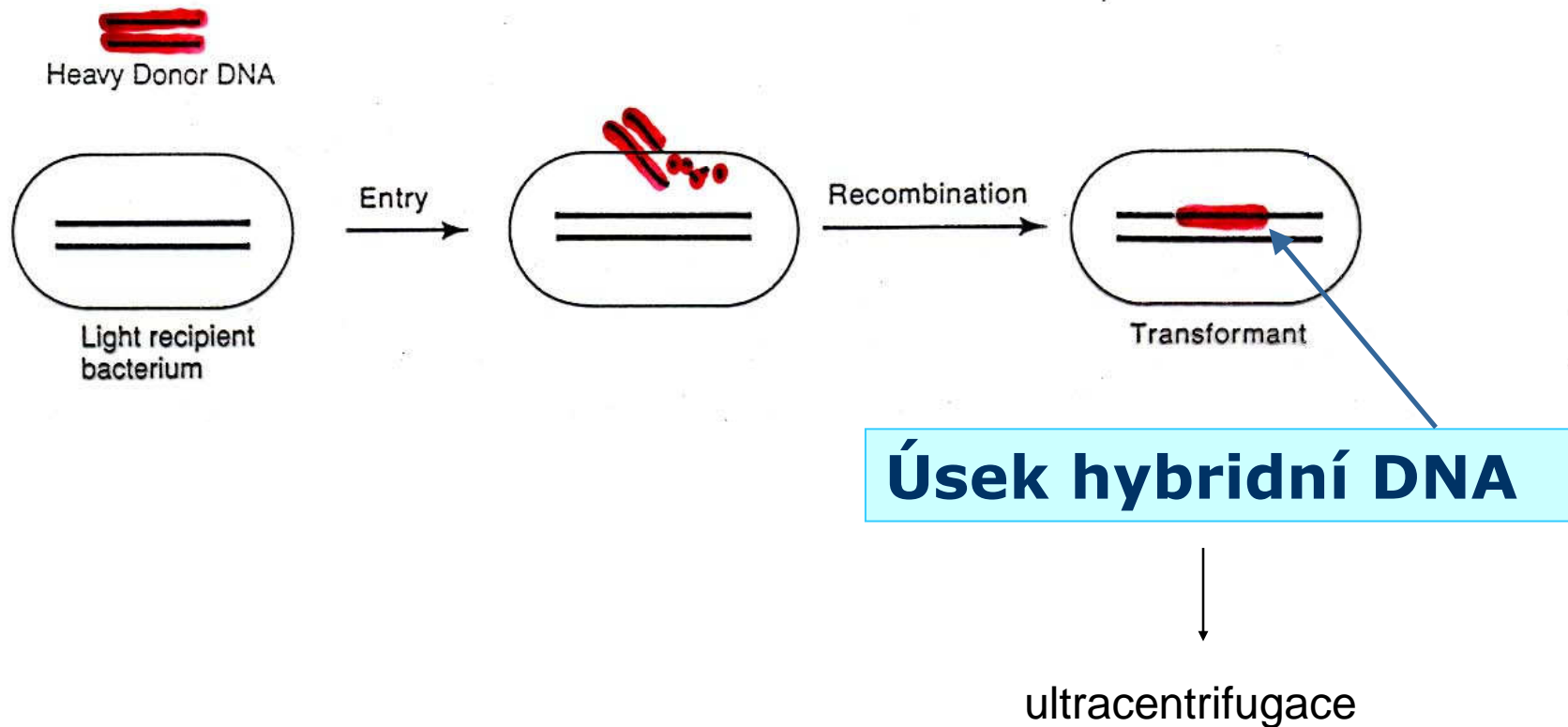
Experimentální stanovení způsobu začlenění exogenní DNA do genomu recipientní buňky

Těsně vázané markery **M** a **N**
m, n = citlivost k antibiotiku
M, N = rezistence k antibiotiku



Experimentální důkaz začlenění jednořetězcového úseku donorové DNA do chromozomu recipientní buňky

BACTERIAL TRANSFORMATION



Sekvence s vysokým stupněm homologie

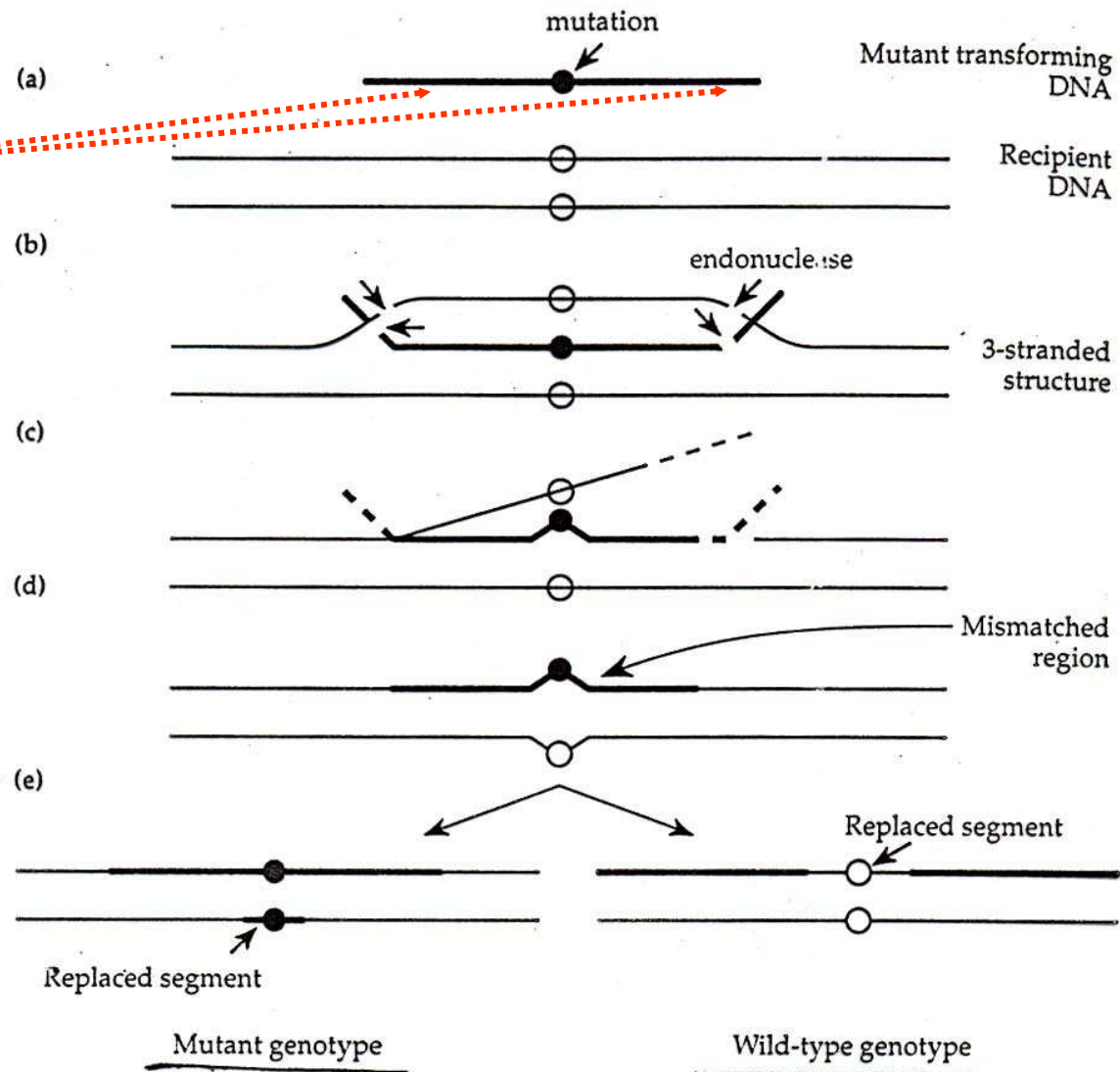
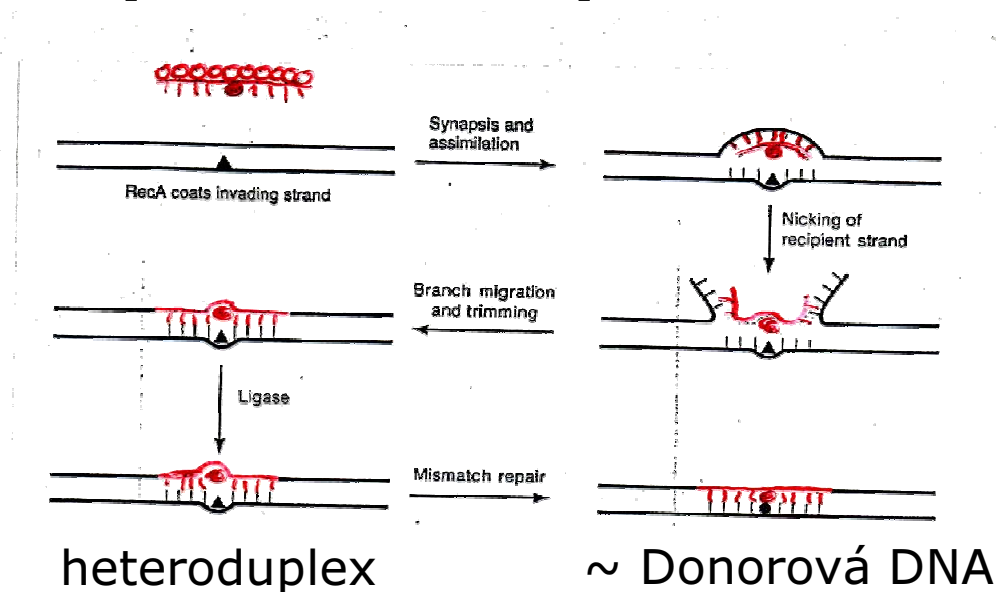


Fig. 10.6 Integration of transforming DNA in the homologous region of the recipient chromosome and the consequence of mismatch repair on maintenance of a transferred allele. (a) Pairing of homologous regions of the two DNA molecules; (b) local unwinding of duplex DNA; (c) exonuclease digestion of duplicate regions, on either molecule; (d) gap-filling by polymerase and nick-sealing by ligase; (e) repair of mismatch on either strand.

Integrace ssDNA z donorového kmene do recipientní DNA při transformaci



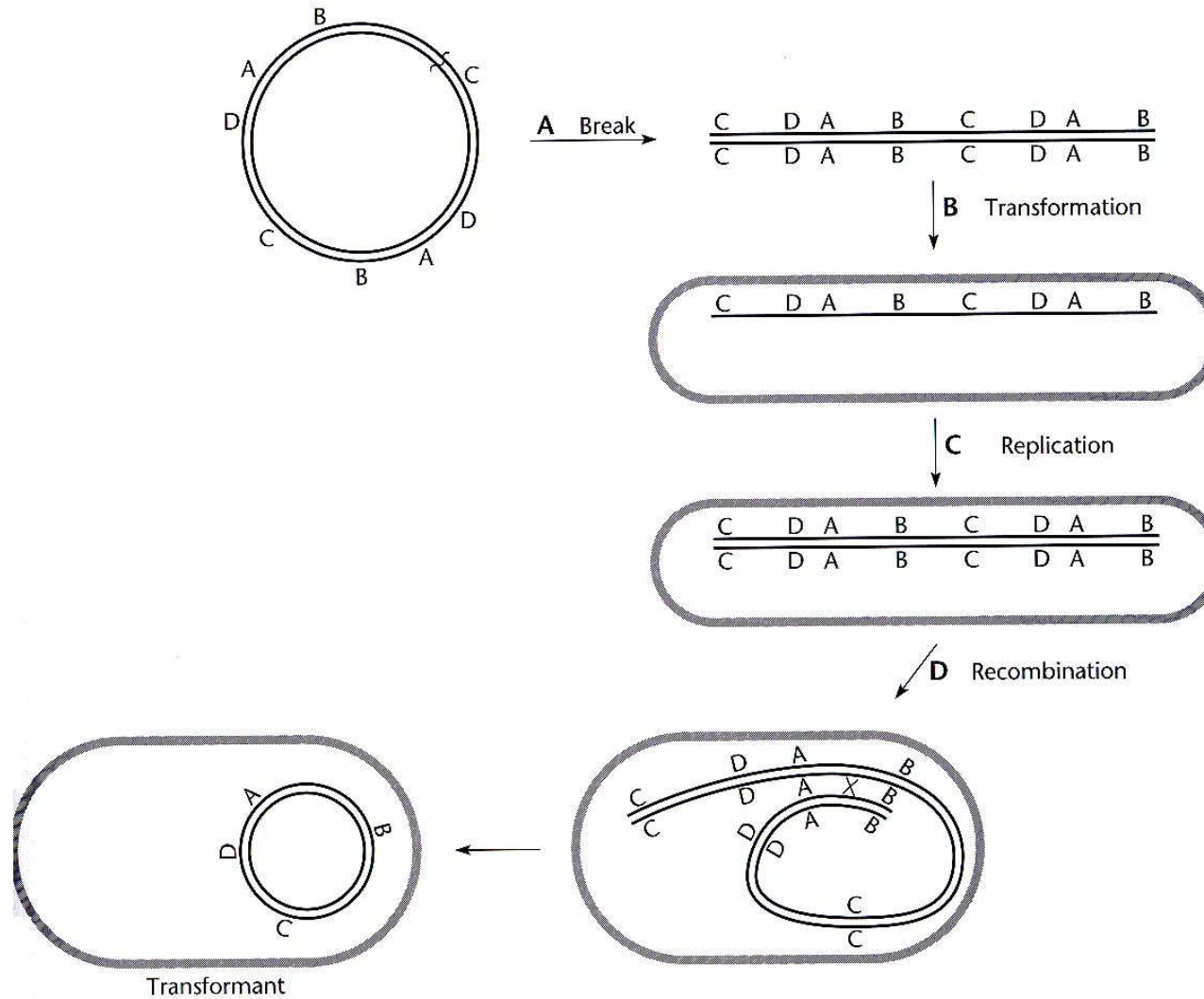
HE-markery - probíhá oprava ve prospěch donora

LE-markery - probíhá oprava proti donorové DNA

HE = high efficiency, LE = low efficiency

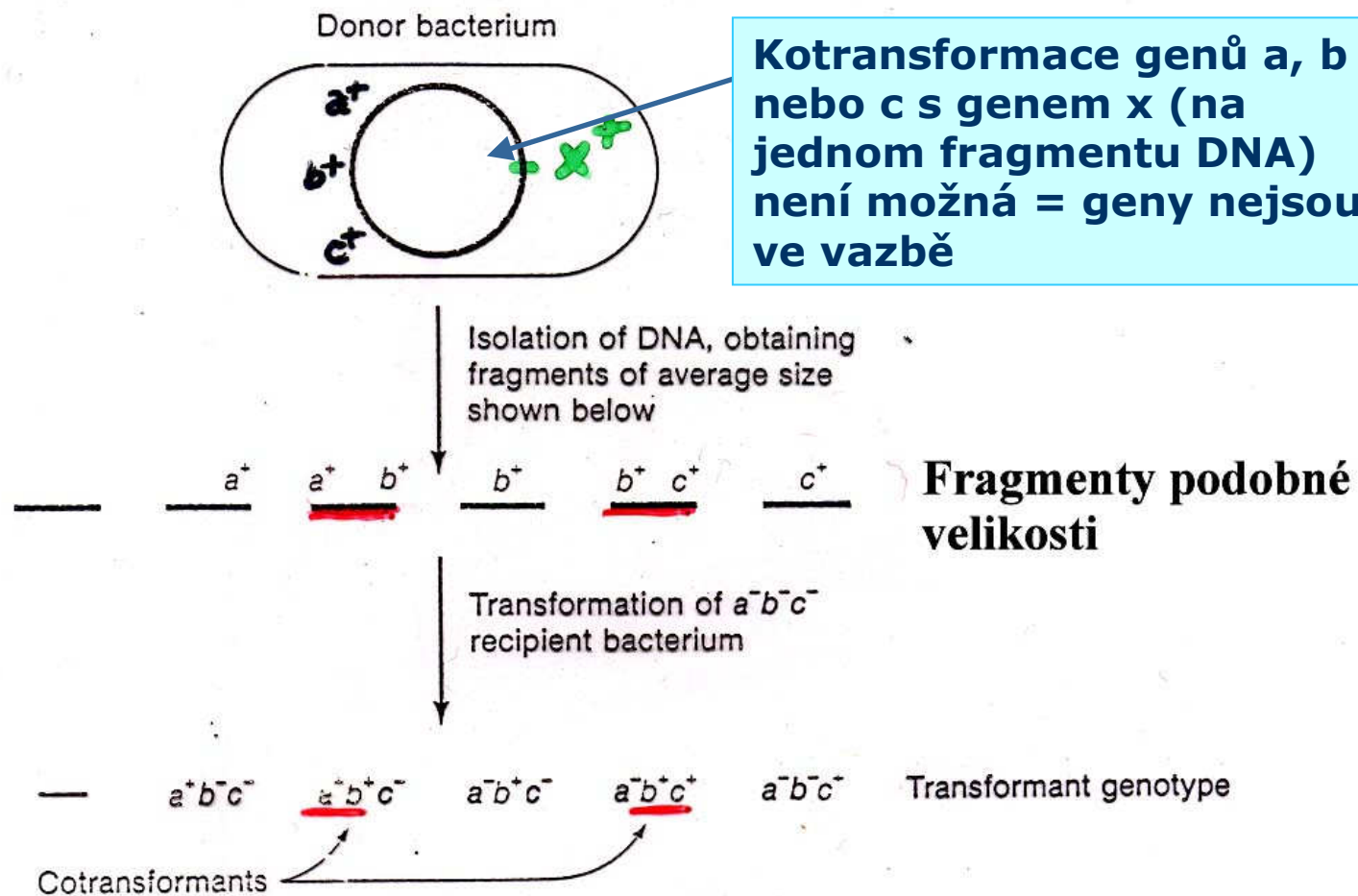
**Hex- mutanty *S. pneumoniae* - defekty v reparaci
- všechny markery se chovají jako HE**

TRANSFORMACE DIMERNÍMI MOLEKULAMI PLAZMIDOVÉ DNA



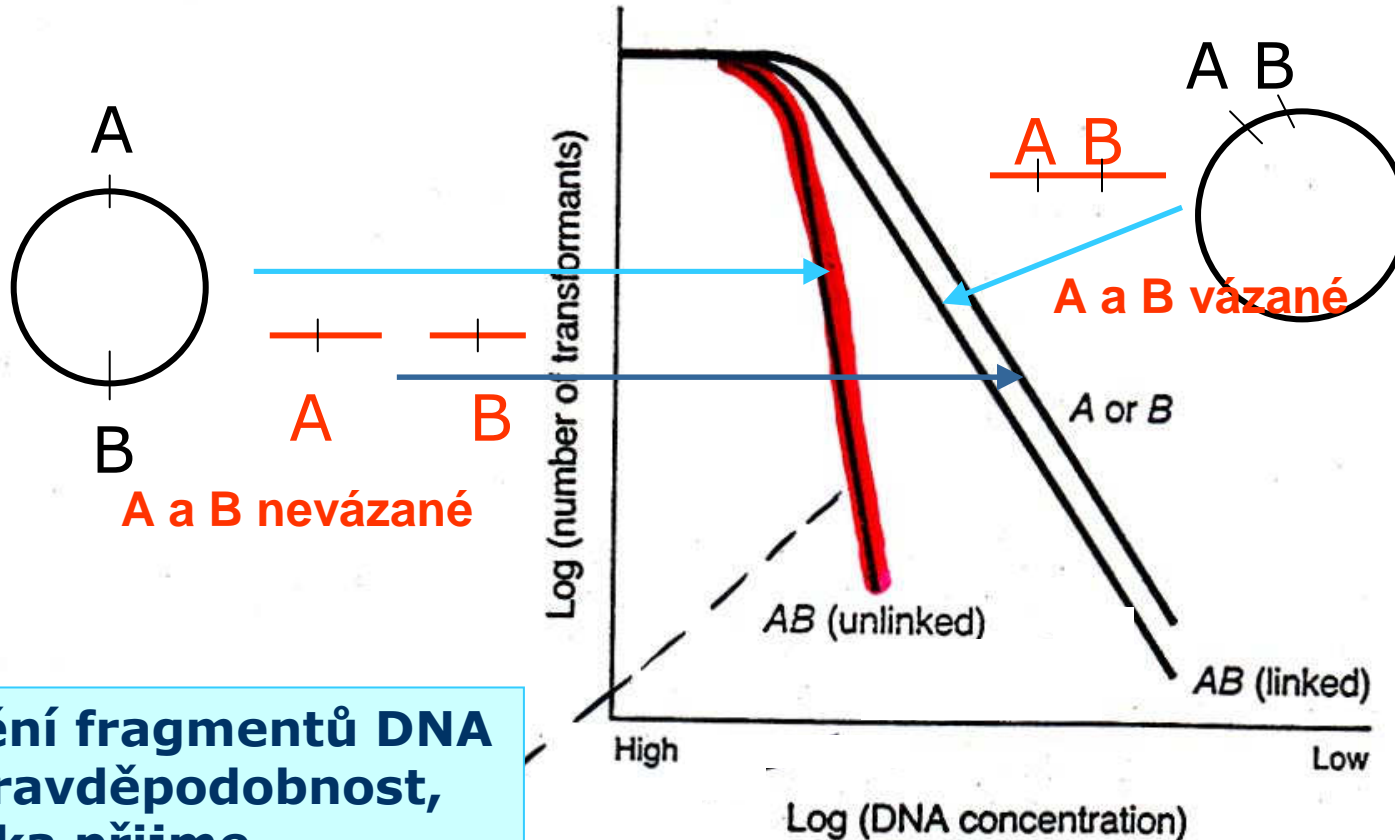
Mapování genů pomocí transformace

Dva geny se budou přenášet společně, pokud jsou tak blízko sebe, že mohou být na stejném fragmentu DNA = **kotransformace**



Kotransformanty $a^+b^+c^+$ nebo $a^+b^-c^+$ nevznikají

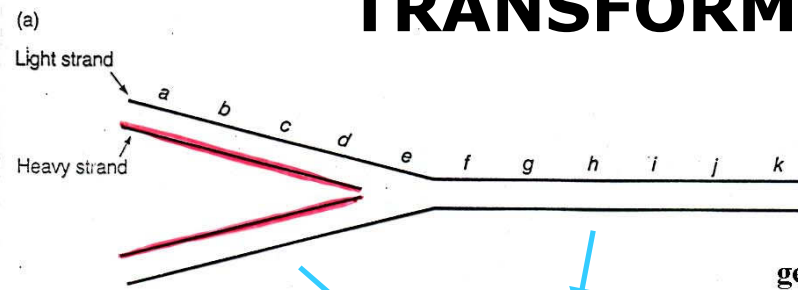
ZŘEĎOVACÍ TEST NA KOTRANSFORMACI



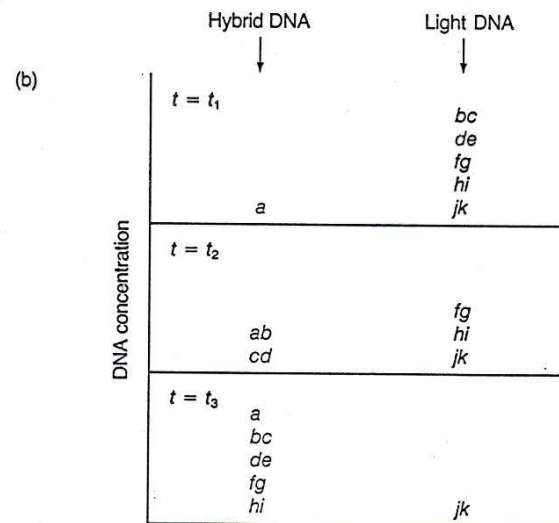
Nařadí fragmentů DNA sniží pravděpodobnost, že buňka přijme současně fragment A i B

Pokles frekvence kotransformace znaků A a B je v obou případech odlišný

MAPOVÁNÍ GENŮ U *B. SUBTILIS* S VYUŽITÍM TRANSFORMACE



germinace spor
v prostředí s
těžkou vodou



**Separace DNA ultracentrifugací
v CsCl**

- replikovaná DNA je hybridní
- posun markeru z lehké DNA
na hybridní DNA odpovídá jeho
vzdálenosti od ori

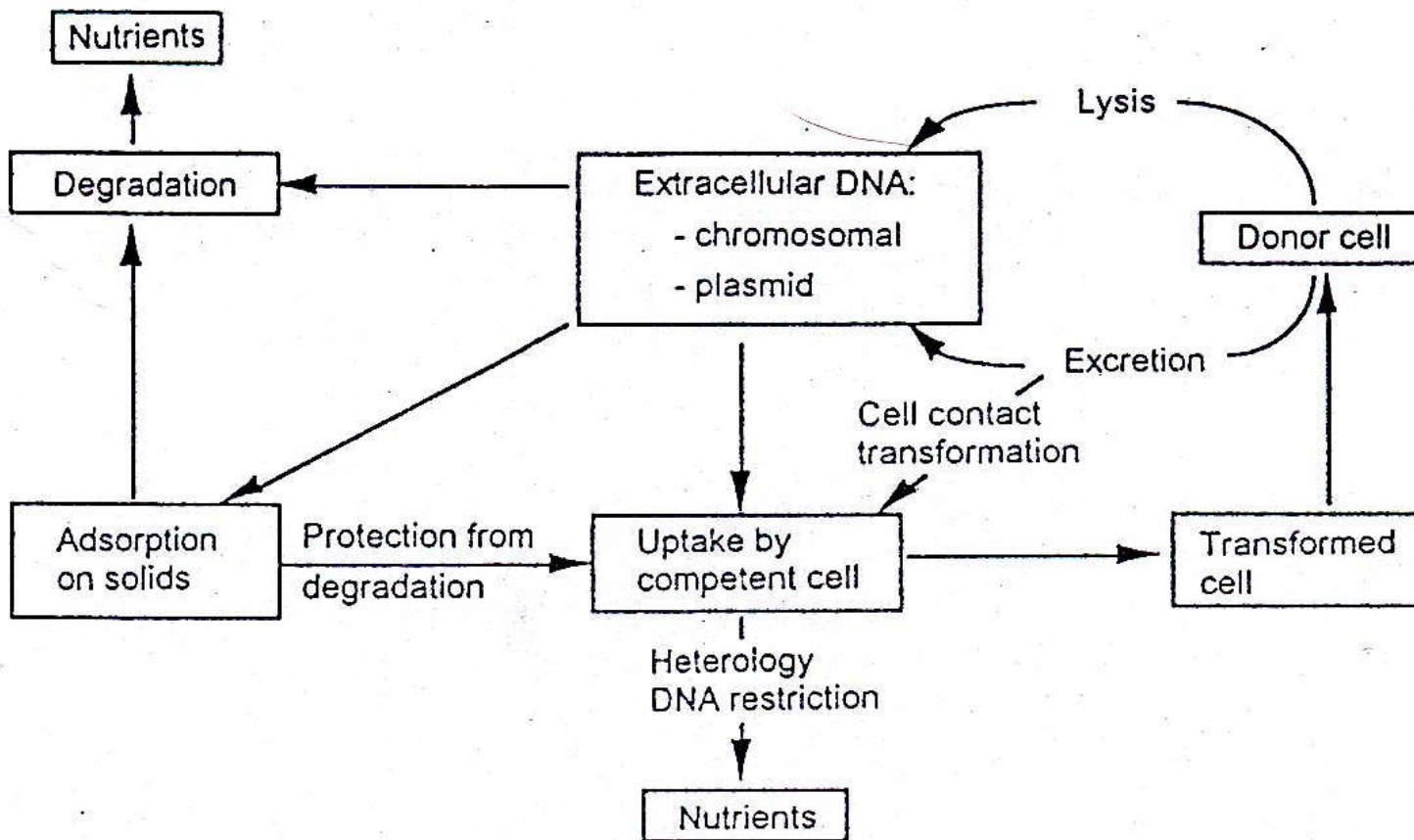
markery z
dříve se
replikující
oblasti

DNA použita
k transformaci

markery z
později se
replikující
oblasti

Stanovení markerů
u transformantů

SCHÉMA PŘENOSU GENŮ VOLNOU DNA VE VODNÉM PROSTŘEDÍ A V PŮDĚ



- DNA v prostředí: mořská voda, sedimenty, půda - z buňky uvolňována při sporulaci nebo při lýzi buněk, ale i při běžné kultivaci
- Množství vysokomolekulární DNA: mikrogramy na 1 gram sedimentů
- Osud DNA: hydrolýza, avšak na nosičích (křemen, jíly, huminové kyseliny) je chráněna před nukleázami

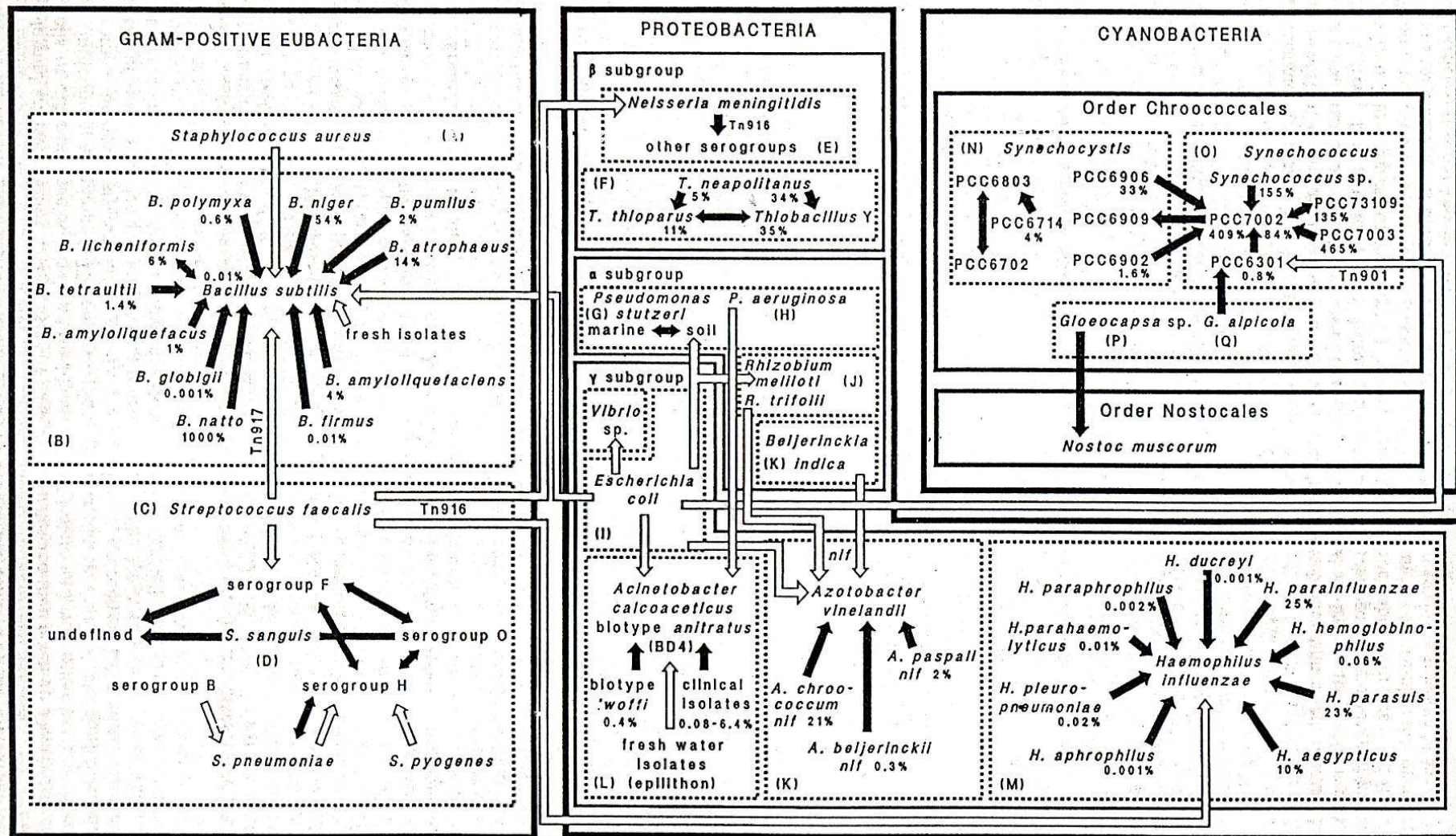


FIG. 2. Routes of gene transfer by transformation among bacteria. The arrows indicate in vitro transfer of chromosomal markers (solid arrows) or of plasmid and (as indicated) transposon markers (open arrows). Values below species names or strain designations indicate the interspecies or interracial transformation frequency relative to that obtained when the recipient was transformed by homologous DNA. Letters in brackets refer to the references as follows: (A), 120; (B), 82, 102, 120, 125, 127, 214, 221, 363; (C), 163, 164, 398; (D), 34, 46, 183, 283, 288, 308; (E), 163; (F), 394; (G), 348; (H), 237; (I), 32, 59, 62, 73, 99, 173, 198, 237, 282, 294, 321, 379; (J), 23, 263; (K), 263; (L), 20, 153, 298; (M), 5; (N), 115, 342; (O), 342; (P), 322; (Q), 71.

BIOLOGICKÉ FUNKCE PŘÍJMU DNA

1. Regulace genové exprese

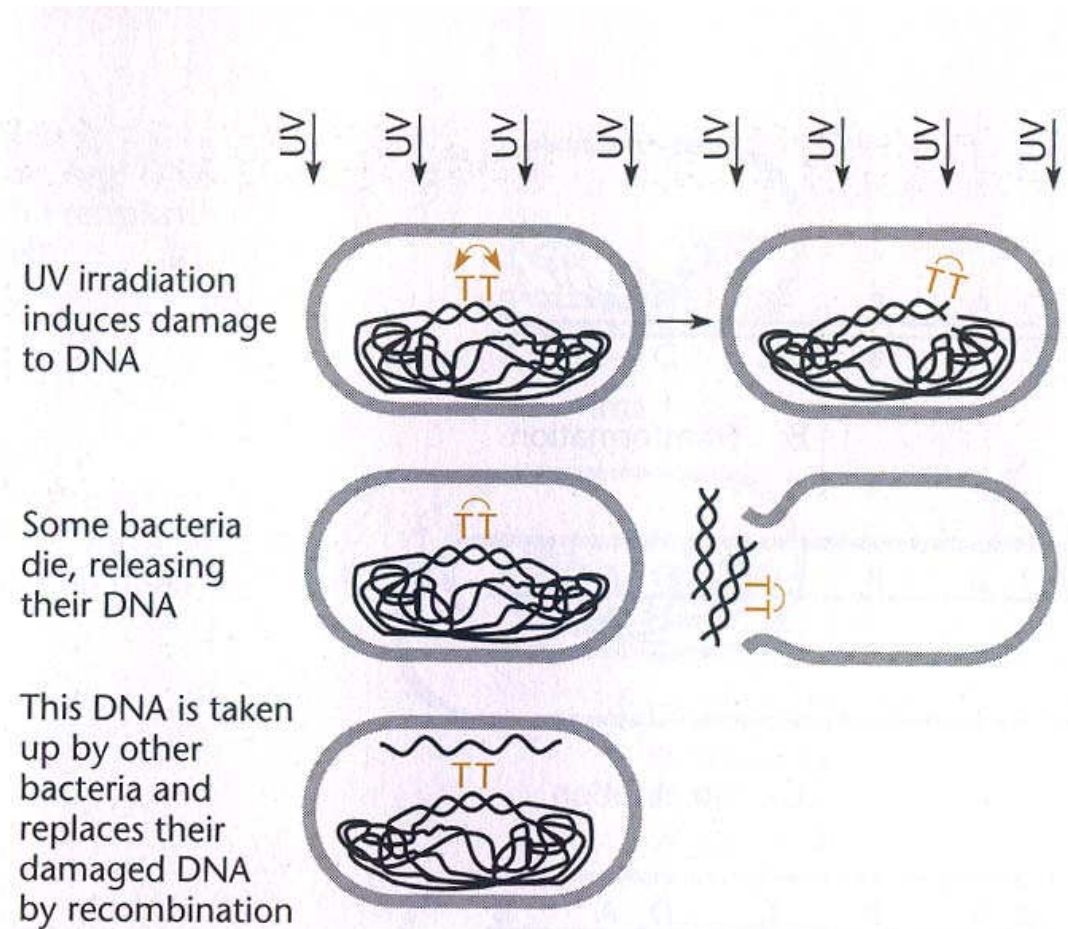
- Např. u neisserií: variace antigenních vlastností:
Exprese pilinových genů je regulována intrachromozomovou rekombinací mezi silentními pilinovými geny a pilinovým expresním lokusem nebo **integrací silentního genu na vstupující donorové extrachromozomové DNA** (po autolýze buněk) za tvorby intragenní minikazety

2. Protekce buněk před bakteriofágy

- Různé kmeny *S. pneumoniae* mají RM systémy DpnI a DpnII kodované alternativními kazetami ve stejném lokusu na chromozomu. Oba systémy rozpoznávají stejnou cílovou sekvenci, která se však liší stavem metylace. Fágy propagované na jednom kmeni jsou restringovány na druhém a naopak. **Transformací DNA z donorového kmene změní recipientní kmen díky homologní rekombinaci svůj RM systém.**

3. DNA reparace

- Vstupující homologická **DNA je použita pro rekombinační reparaci lézí na DNA přítomných na chromozomu recipienta**. Transformace vede ke zvýšenému přežívání kompetentních (sexuálních) buněk ve srovnání s nekompetentními (asexuálními) buňkami po ozáření UV světlem



BIOLOGICKÉ FUNKCE PŘÍJMU DNA

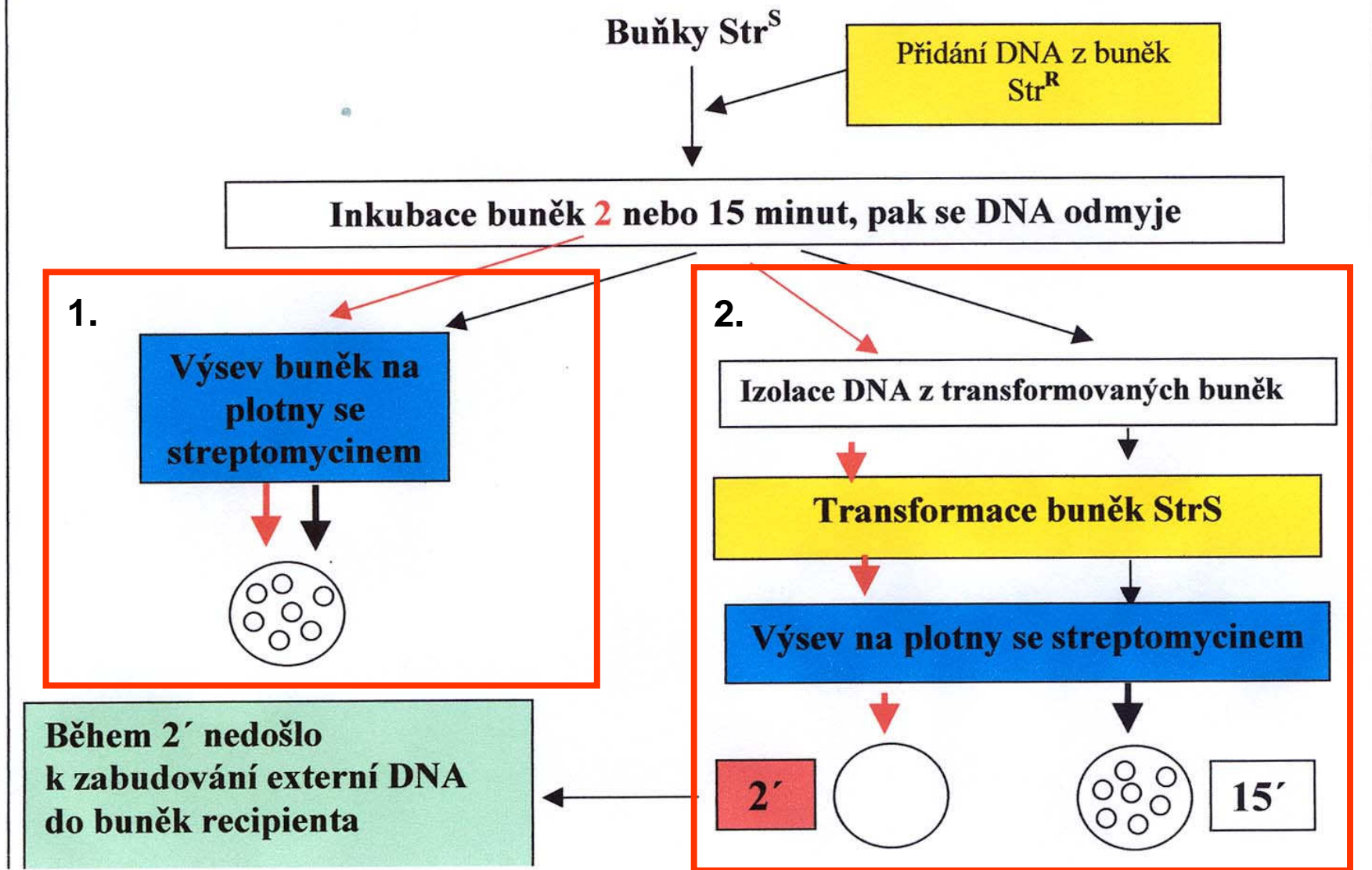
4. Zdroj živin a energie

(rozklad DNA extracelulárními nukleázami, příjem složek DNA, např. nukleotidů specifickými dráhami) –
?? Rozklad jen jednoho řetězce??

UMĚLE NAVOZENÁ TRANSFORMACE

- **A) Transformace u *E. coli*:** Ovlivnění propustnosti buněčné stěny divalentními ionty (Ca, Mg) a dimetylsulfoxidem - změna integrity a organizace lipopolysacharidové vrstvy, vystavení buněk nízké teplotě, hladovění. Vstupující plazmidy zřejmě nejdříve interagují se specifickými kanály v povrchu stěny buněk (počet kanálů 10 do 200). Teplotní šok 42-45°C indukuje faktory zvyšující kompetenci. **Přijímání DNA je neselektivní, do buněk mohou vstupovat i zcela nepříbuzné plazmidy.**
 - Účinnost transformace plazmidů je vysoká, chromozomové DNA nízká (mutace podjednotky D RecBCD-nukleázy zvyšuje účinnost příjmu lineární chromozomové dsDNA)
- **B) Transformace zprostředkovaná PEGem.** Postup vhodný pro G+, které nemají přirozenou kompetenci. Bakterie je třeba zbavit peptidoglykanové vrstvy (enzymy) a pak přenést do osmoticky stabilizujícího media. Pak se přidá PEG, který fúzuje membrány (fúzogen) a precipituje DNA. Následuje regenerace buněk na vhodných mediích.
- **C) Elektroporace (elektrotransformace)**
- **D) Biolistická metoda**

Experimentální stanovení doby trvání eklipse



Fáze eklipse = doba, kdy nelze DNA z povrchu buněk odmyt ani ji v buňkách prokázat

Modely pro sekreci a příjem DNA při transformaci u G- a G+ bakterií

