

SYSTÉMY ZPROSTŘEDKOVANÉHO PŘENOSU DNA

přenos bakteriální DNA (chromozomové nebo plazmidové) bakteriofágem

- **A. Transdukce**

- *E. coli, S. typhimurium, Bacillus, Klebsiella, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces*

- **Nespecifická**

- (*P22, P1, SP β , ϕ 11*)

- abortivní

- **Specifická**

- (fág lambda)

} Jsou přenášeny libovolné geny

} Jsou přenášeny jen určité geny

- **B. Kapsdukce**

- *Rhodobacter capsulatus* (GTA = gene transfer agent) (VTA = *Methanococcus voltae*)

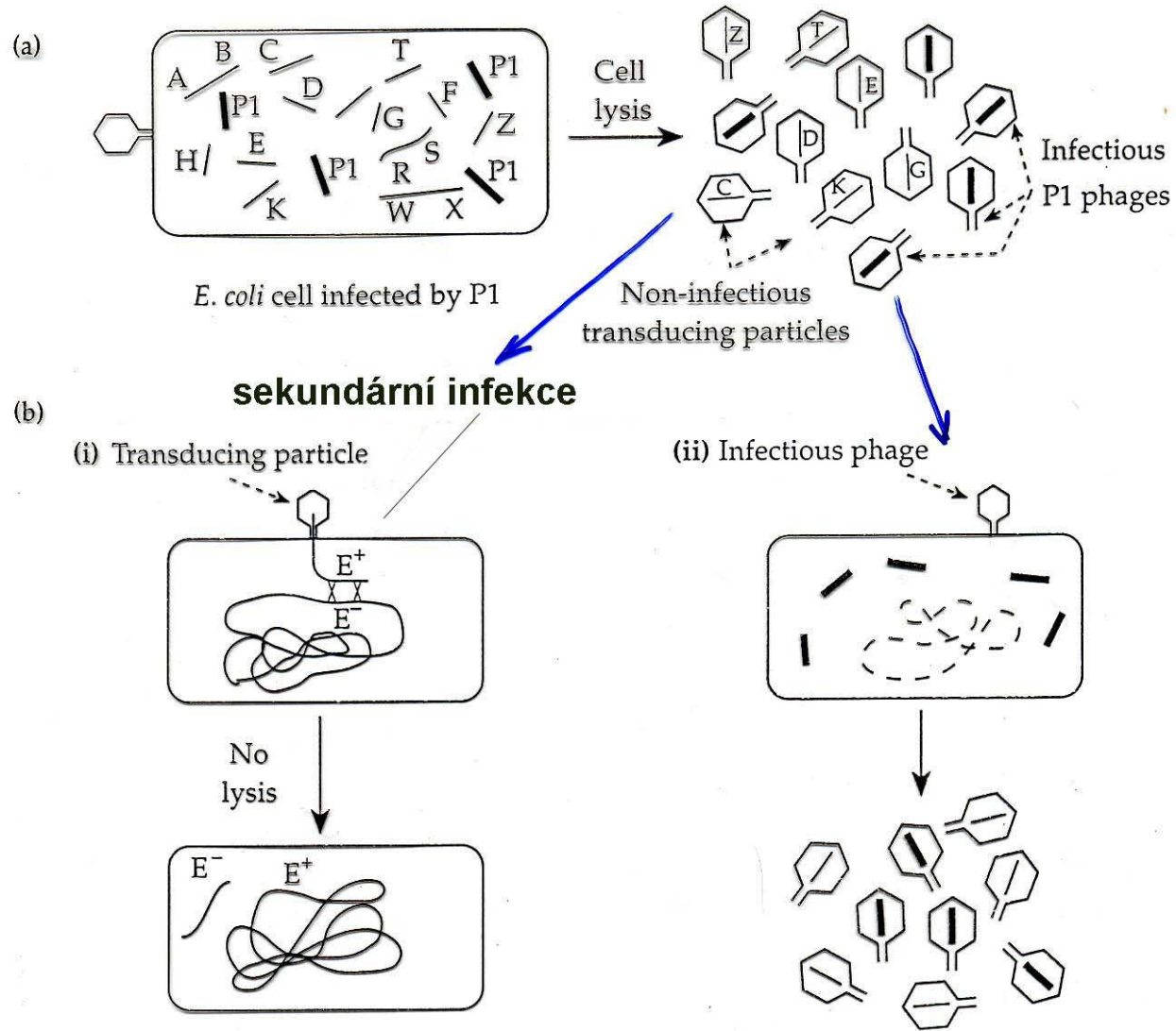
DONOR - RECIPIENT

- Transdukující částice = pseudovirion**

- Transduktanta**
 - Rekombinantní – přenos chromozomové DNA**
 - Abortivní – přenos chromozomové DNA**
 - Plazmidová – přenos plazmidů**

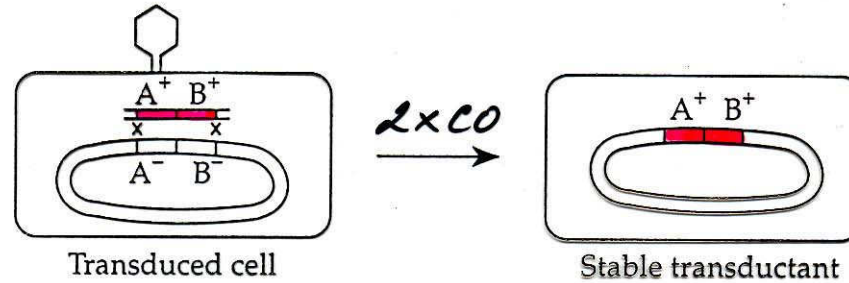
- Kotransdukce = současný přenos dvou nebo více genů donora do recipienta transdukci**

Nespecifická transdukce



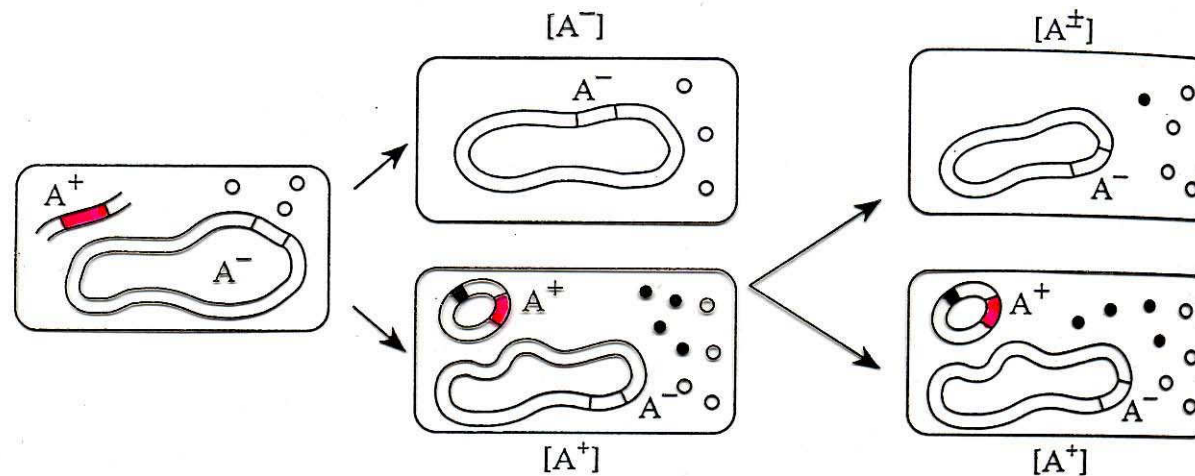
Nespecifická a abortivní transdukce

(a) Vytváření rekombinantních transduktant



Proces je závislý na RecA

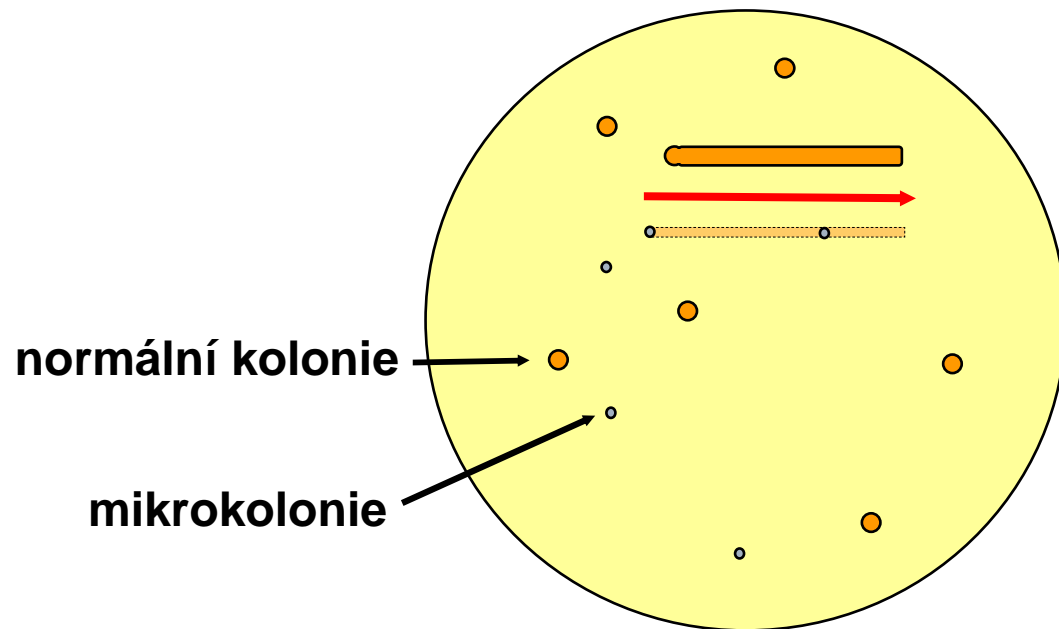
(b) Abortivní transdukce



Rekombinantní transduktanta – normální kolonie

Abortivní transduktanta – mikrokolonie

Odlišení rekombinantních a abortivních transduktant

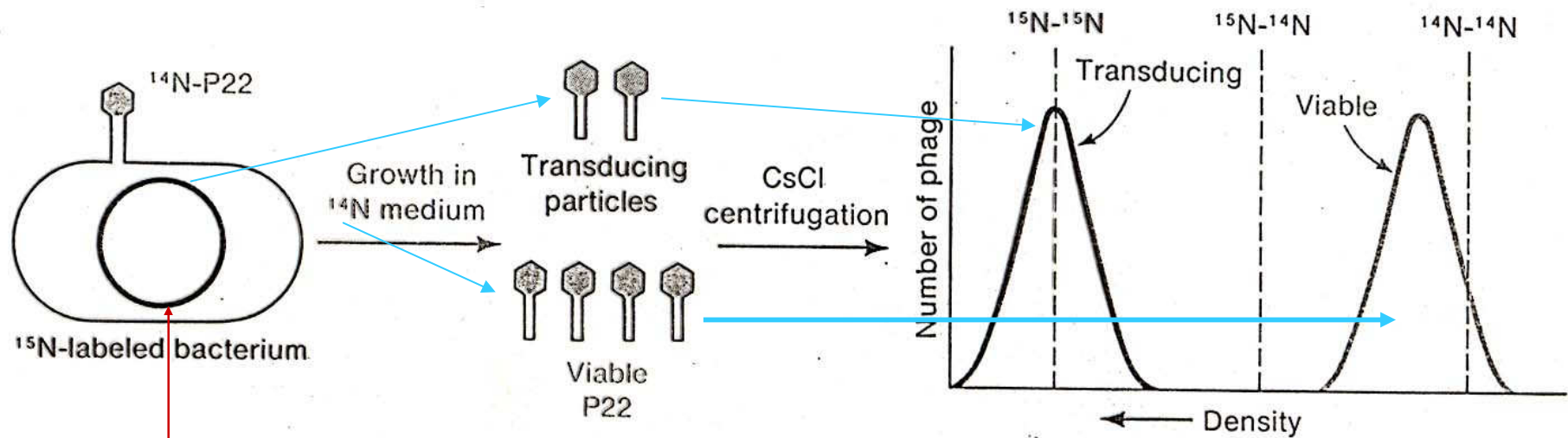


CHARAKTERISTIKA NESPECIFICKY TRANSDUKUJÍCÍCH FÁGŮ

Characteristic	Phage	
	P1	P22
Length (kb) of DNA packaged	100	44
Length (%) of chromosome transduced	2	1
Packaging mechanism	Sequential headful	Sequential headful
Specificity of markers transduced	Almost none	Some markers transduced at low frequency
Packaging of host DNA	Packaged from ends	Packaged from <i>pac</i> -like sequences
% of transducing particles in lysate	1	2
% of transduced DNA recombined into chromosome	1-2	1-2

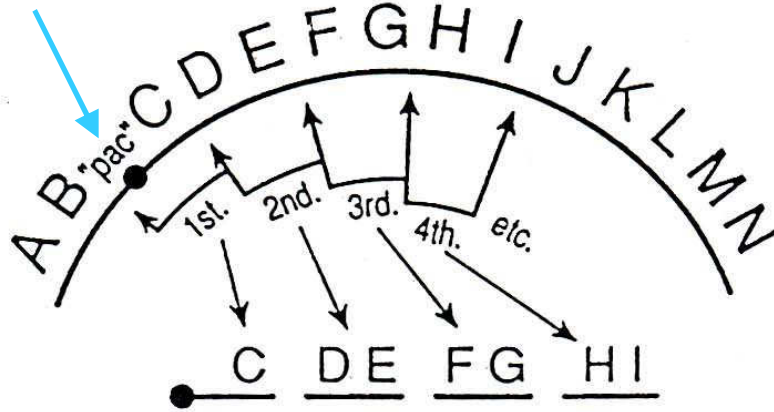
od zlomů na DNA ←

Experimentální důkaz přítomnosti toliko bakteriální DNA v transdukcijících částicích fága P22 (při nespecifické transdukci)

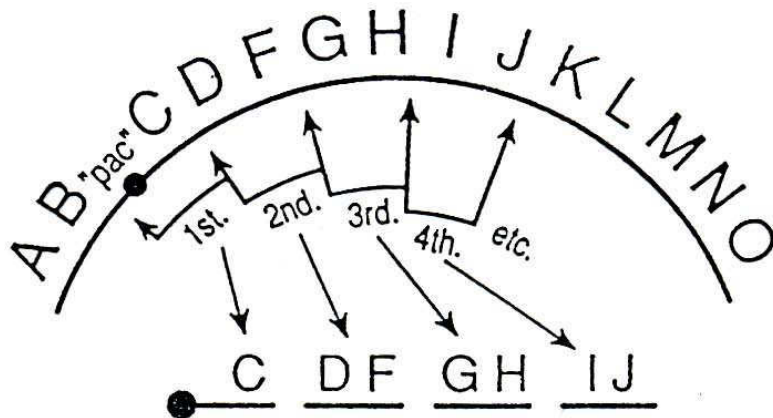


Chromozom
naznačen ^{15}N

„Pseudopac“ místo



A. Wild type chromosome



B. Chromosome deleted for E

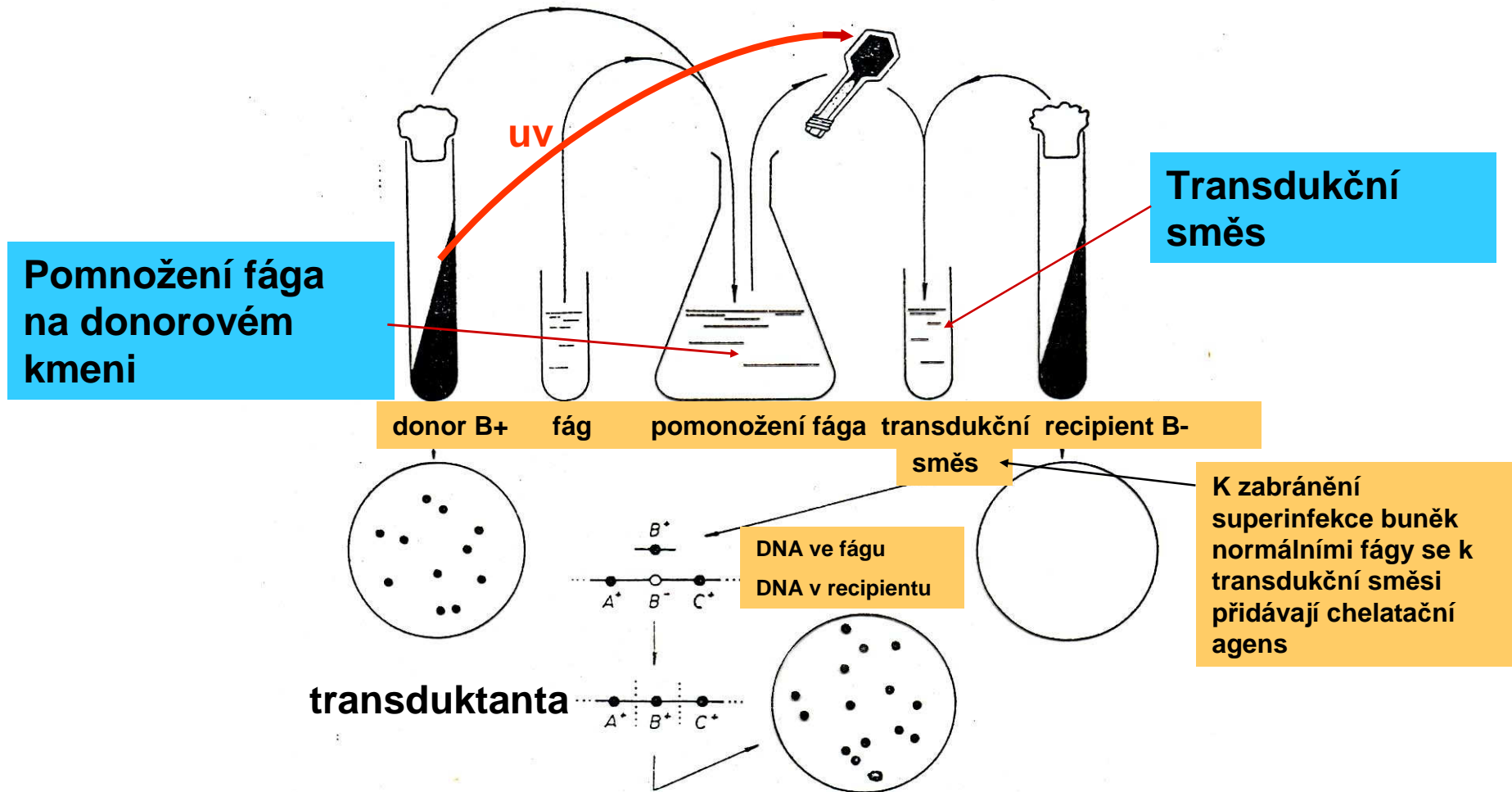
Zabalování hostitelské DNA fágem P22 mechanismem naplňování hlaviček. A. Chromozom obsahuje "pac" místa rozpoznávaná zabalovacím aparátem fága. Zabalování začíná od místa "pac" a probíhá sekvenčně v jednom směru. B. Zabalování bakteriálního chromozomu s deletovaným genem E. Kotransdukce genů je pozměněna (delece pozměnila vzdálenost genů)

Fág P22HT = mutantní fág se sníženou nukleázovou specifitou rozpoznávající další „pseudopac“ místa



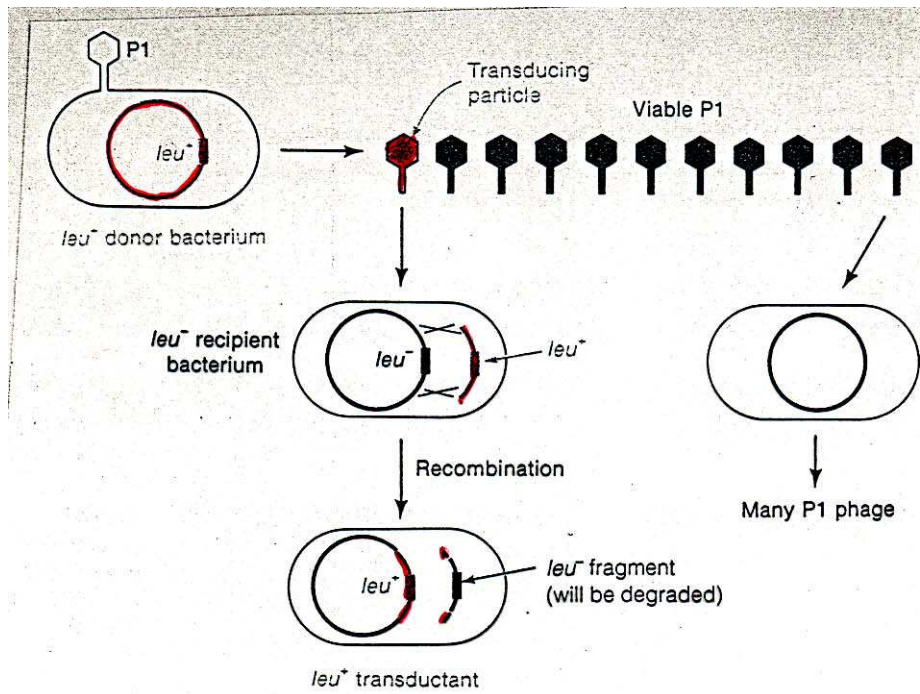
P22HT transdukuje plazmid pBR322, který není P22 přenášen

POMNOŽENÍ FÁGA NEBO JEHO INDUKCE V DONOROVÉM KMENI



Obr. 84. Diagram transdukčního pokusu s prototrofním donorem a auxotrofním recipientem.

Transdukce jednotlivých genů

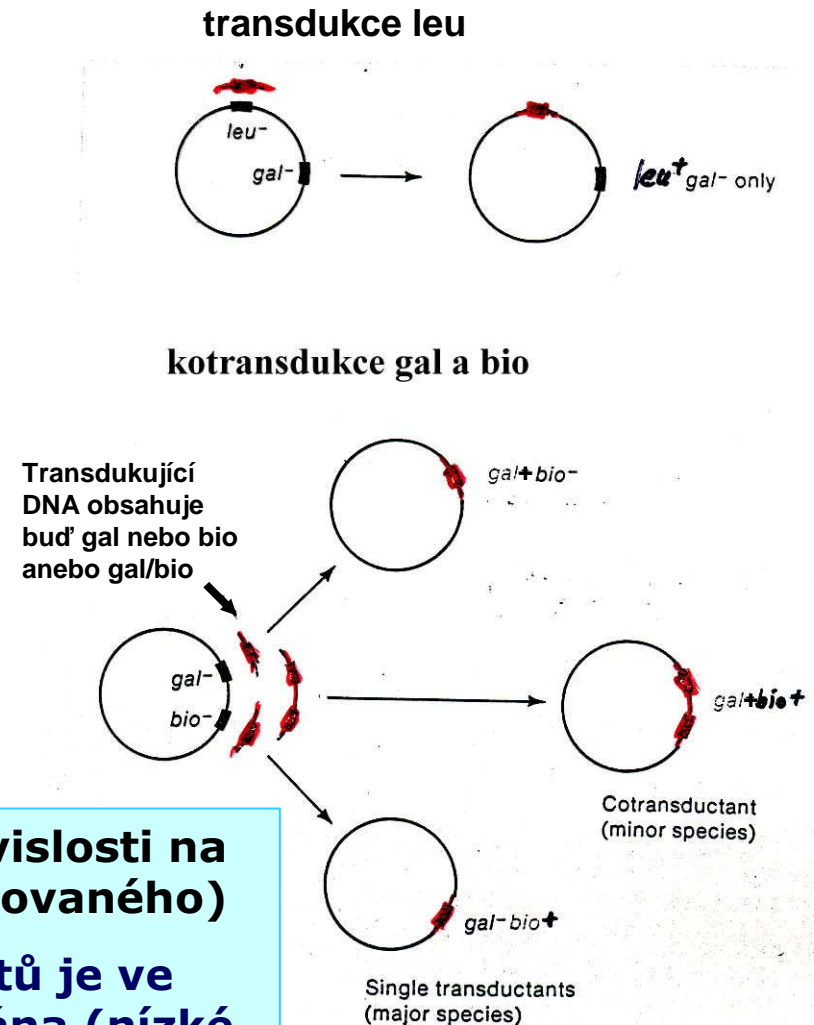


závislost na RecA systému

Frekvence kotransdukce = 0-100%, v závislosti na vzdálenosti markerů (referenčního a sledovaného)

Výhoda: délka transdukovaných fragmentů je ve srovnání s transformací přesněji definována (nízké hodnoty MOI)

Kotransdukce dvou genů



STANOVENÍ FREKVENCE TRANSDUKCE

□ $A = y/p$

□ y = počet transduktant pro daný znak v 1 ml transdukční směsi

□ p = počet virionů (PFU/ml)

□ **Parametry ovlivňující frekvenci transdukce**

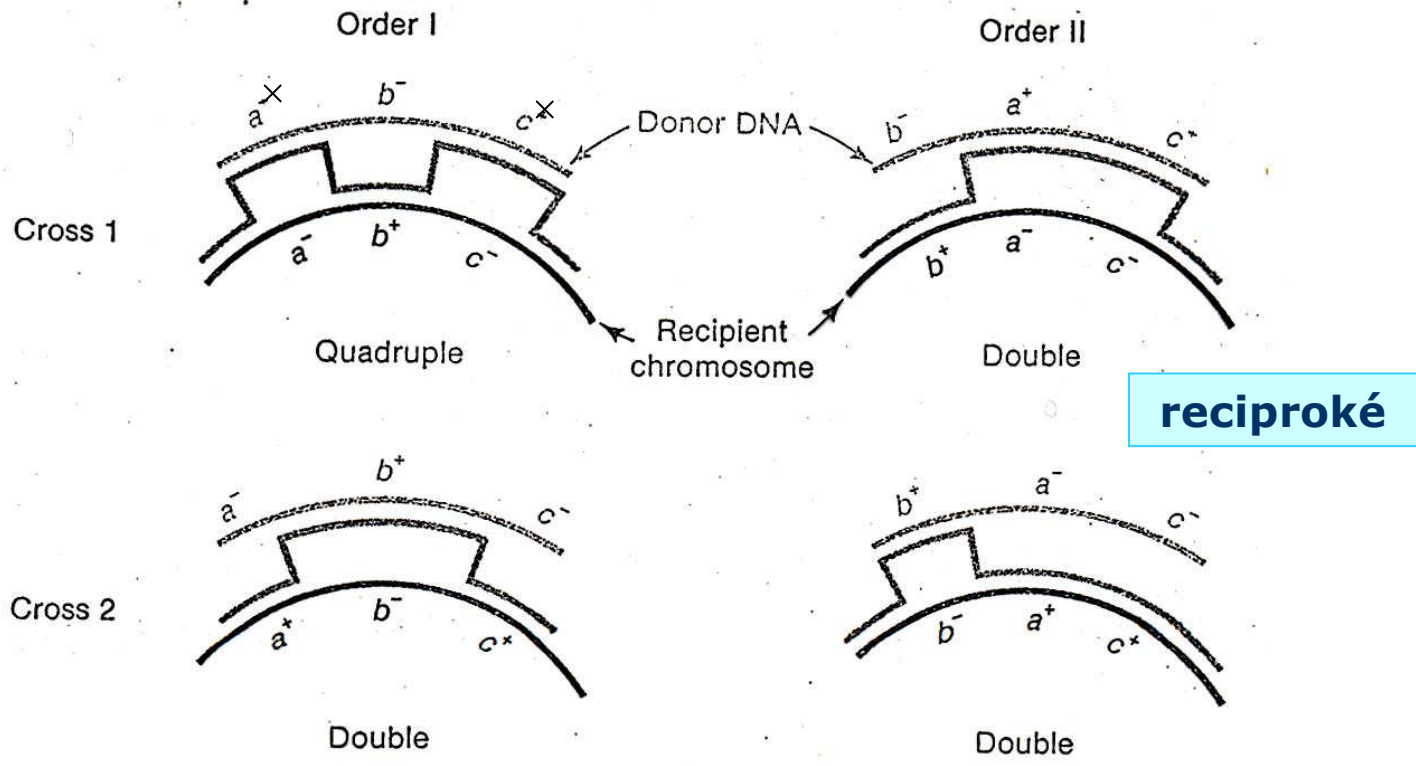
- velikost genomu fága
- počet virionů uvolněných z jedné buňky (fágový výnos)
- aktivita RM systémů v recipientní buňce
- účinnost procesu rekombinace v recipientní buňce
- velikost plazmidu

VÝPOČET VZDÁLENOSTI GENŮ Z FREKVENCE KONTRASDUKCE

$$\square C = (1 - d/L)^3$$

- \square C = frekvence kontrasdukce
- \square d = vzdálenost markerů (min)
- \square L = velikost transdukovaného fragmentu (min)

Využití recipročního křížení pro stanovení pořadí genů a, b, c



Selection for $a^+b^+c^+$ in all crosses

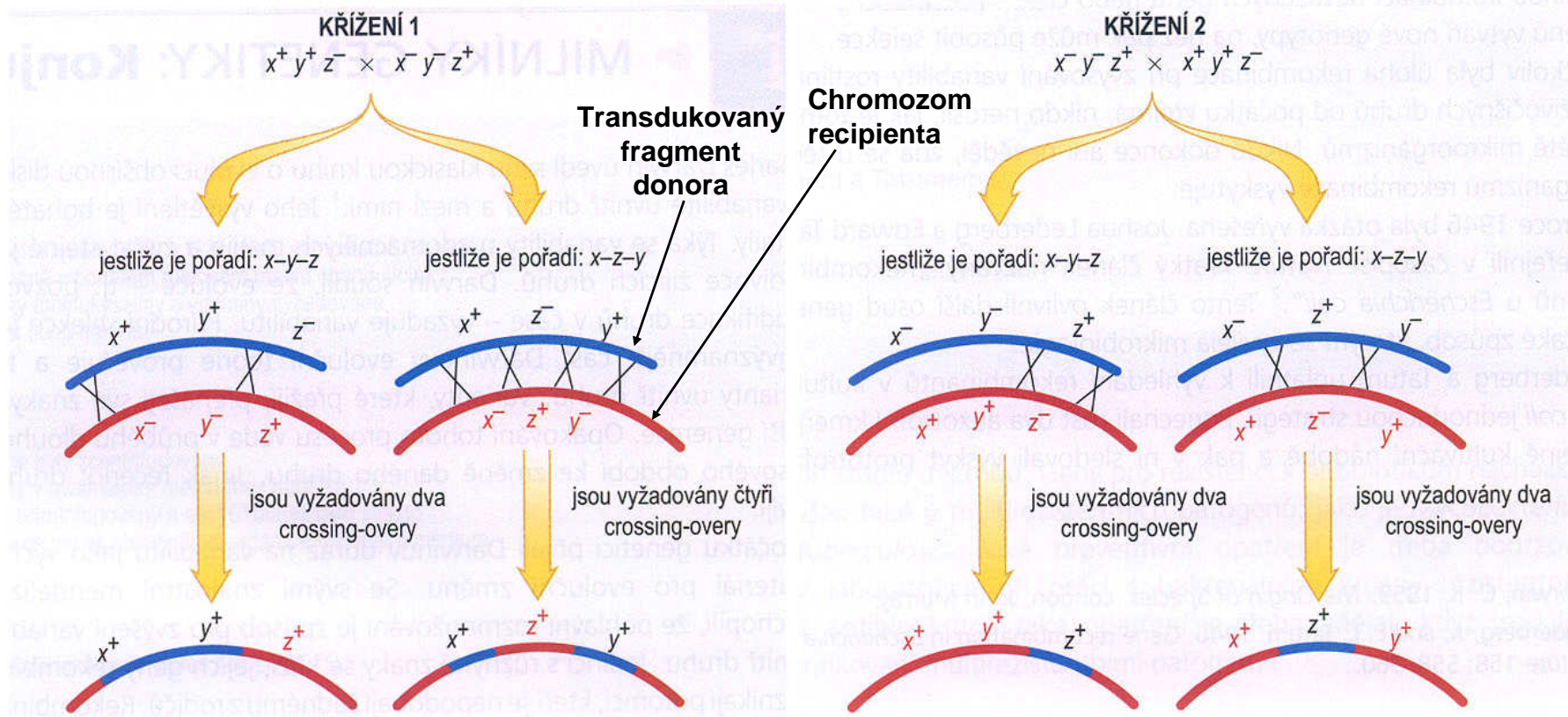
Expected results: $(a^+b^+c^+)_1 \ll (a^+b^+c^+)_2$

$(a^+b^+c^+)_1 \approx (a^+b^+c^+)_2$

Frekvence kontransdukce stanovená **třifaktorovým** křížením
 $a-b = 90\%$, $a-c = 33\%$, $b-c = 32\%$ (pořadí může být a-b-c nebo b-a-c)

Jelikož frekvence $a^+b^+c^+$ je v křížení 1 mnohem nižší než v křížení 2, musí být pořadí a-b-c ($P4 \times CO \ll P2 \times CO$)

Mapování genů bakterií pomocí transdukce: stanovení pořadí těsně vázaných genů tříbodovým křížením s využitím parciálních diploidů

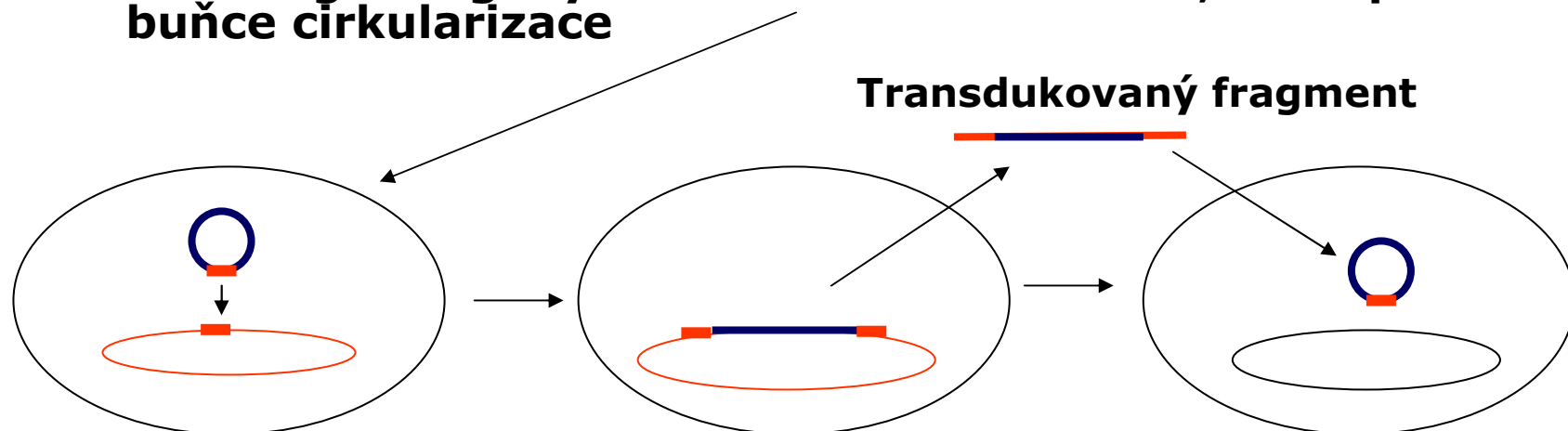


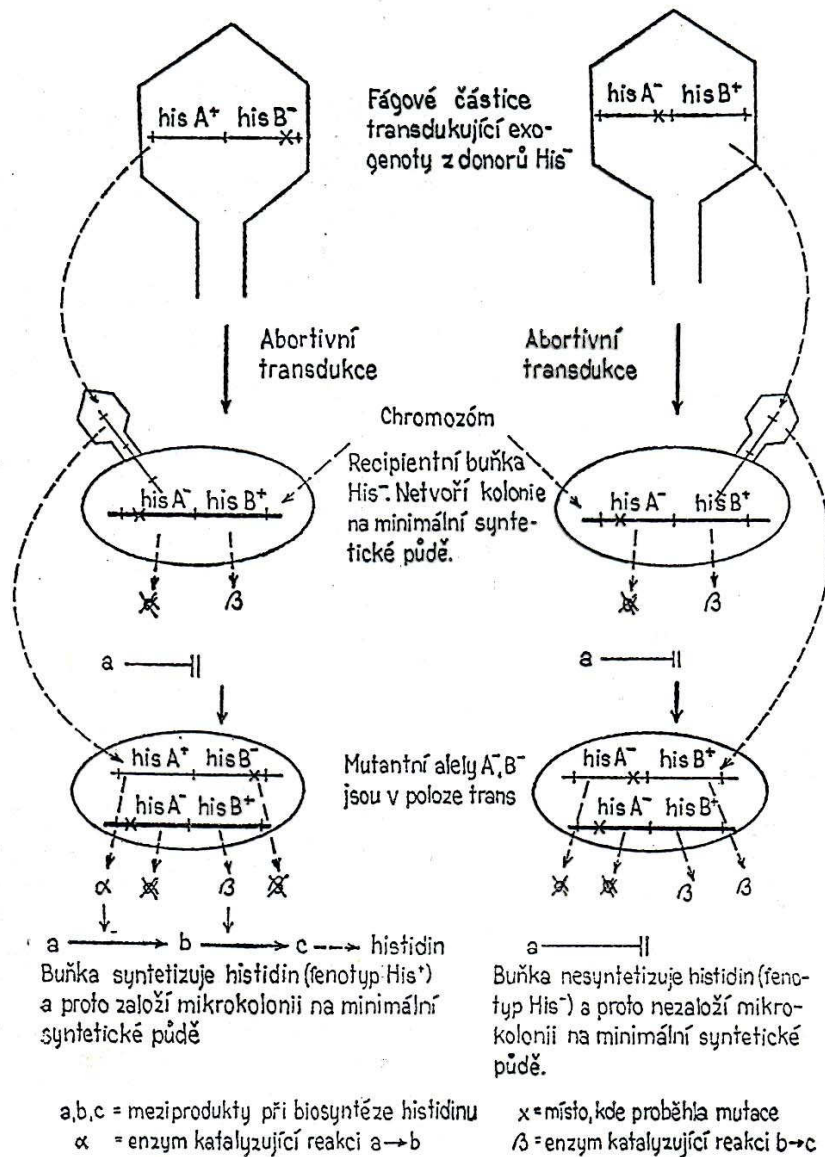
Jestliže je pořadí $x-y-z$, bude četnost rekombinantů $x^+ y^+ z^+$ zhruba stejná při křížení 1 a 2.

Jestliže je pořadí $x-z-y$, bude četnost rekombinantů $x^+ y^+ z^+$ při křížení 1 mnohem nižší než při křížení 2.

TRANSDUKCE PLAZMIDŮ

- transdukce plazmidů větších než je genom fága:
„transduction shortening“ - zachování počátku replikace + deletovaná část plazmidu
- transdukce plazmidů menších než je genom fága:
zabalování části konkatemerů (replikačních intermediátů - multimerů)
- transdukce vektorů odvozených z plazmidů - interakce s homologními geny na chromozomu donora, v recipientní buňce cirkularizace





Test intergenové komplementace (cis-trans test) realizovaný abortivní transdukcí

Stabilní parciální diploid

Obr. 341. Test intergenové komplementace (cis-trans test) realizovaný abortivní transdukcí.

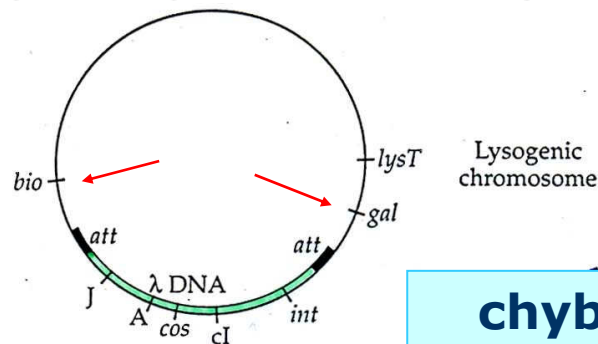
Specifická transdukce

Specifická (specializovaná) transdukce je založena na indukci integrovaného profága. Transdukována může být jen specifická a omezená na oblast bakteriálního chromozomu, která přiléhá k inzerčnímu místu profága.

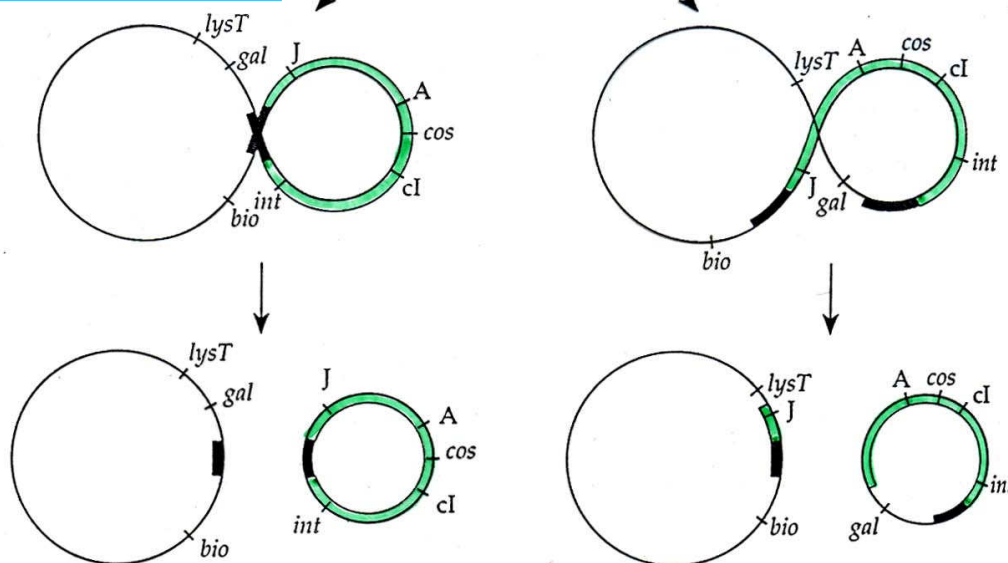
Modelovým systémem je transdukce zprostředkovaná fágem lambda u *E. coli*.

VZNIK TRANSDUKUJÍCÍCH ČÁSTIC FÁGA λ PŘI SPECIFICKÉ TRANSDUKCI

Získání fágového lyzátu indukci UV-světlem z lyzogenních buněk *E. coli*



chybná excize



WT bacterial chromosome

WT λ chromosome

Δgal bacterial chromosome

$\lambda d.gal$ molecule

Genom defektní fágové částice

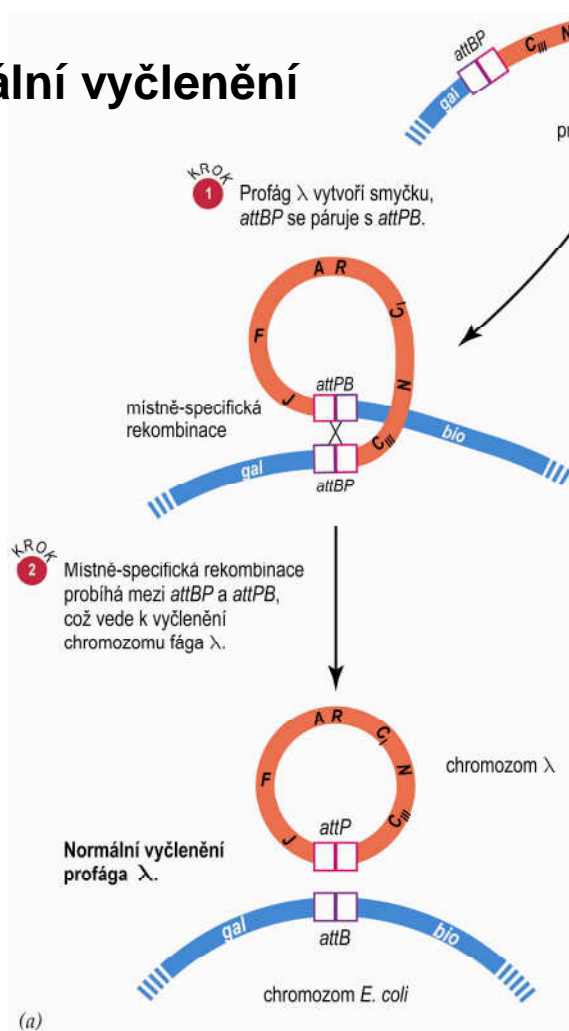
10% fágového genomu je nahrazeno

Min.požadavek Δgal : cos + ori

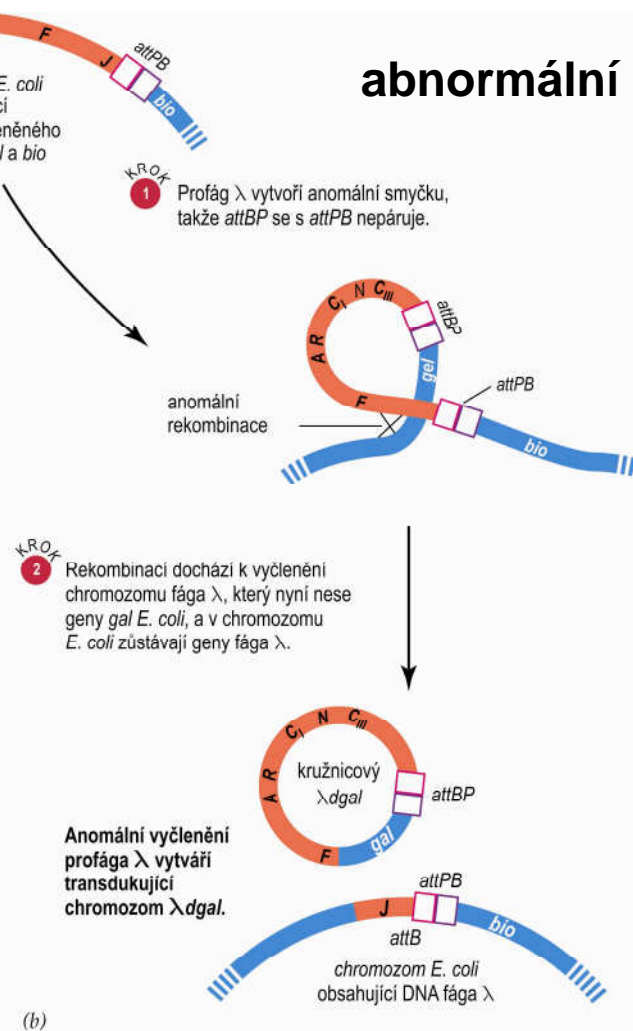
$\lambda pgal$ – nedefektní fágová částice

Možné způsoby vyčlenění profága lambda

normální vyčlenění

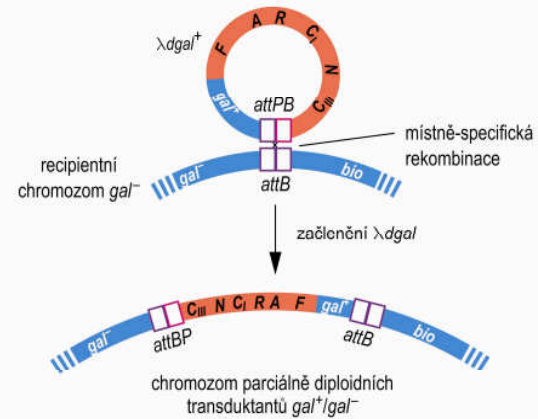


abnormální vyčlenění



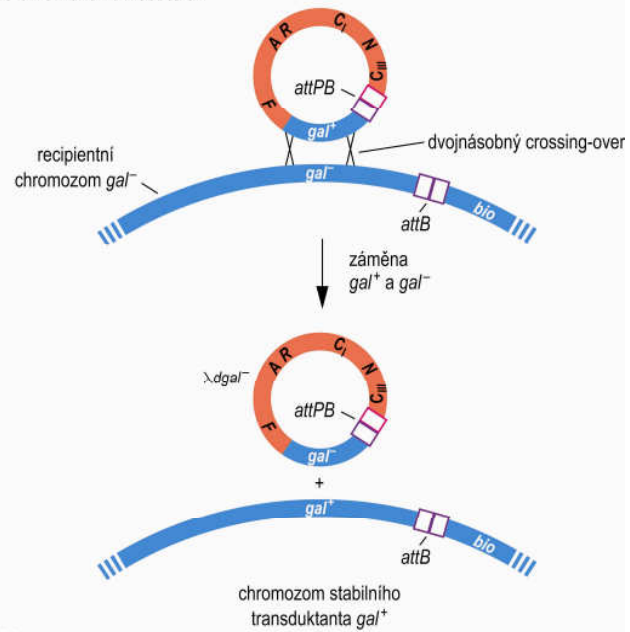
Rekombinace v recipientních buňkách gal⁻ infikovaných transdukujícím fágem λdgal⁺

Začlenění λdgal⁺ v místě attB vytváří parciální diploidy gal⁺gal⁻.



(a)

Dvojnásobný crossing-over vede k začlenění alely gal⁺ fága λdgal⁺ do chromozomu hostitele.



(b)

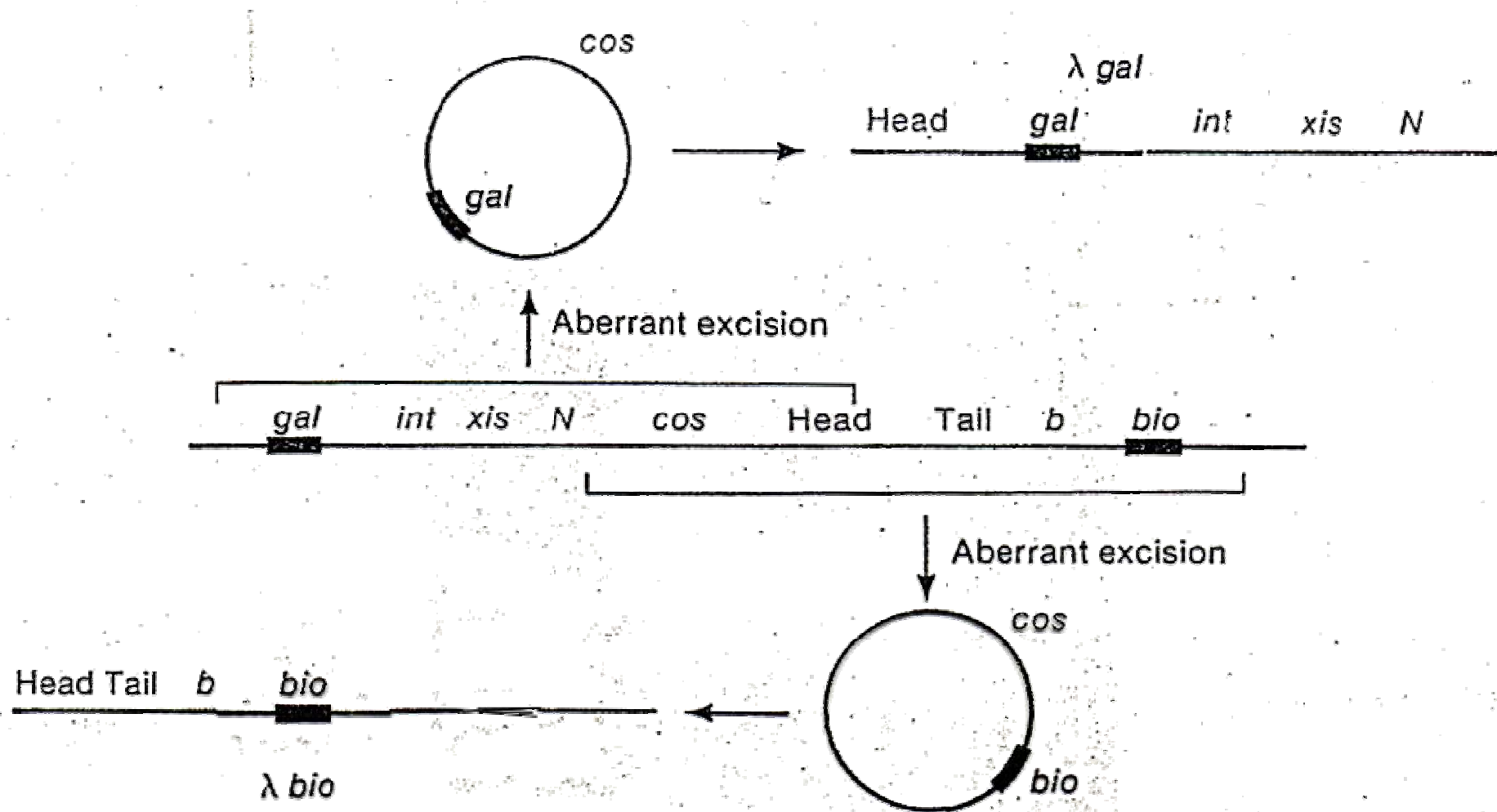


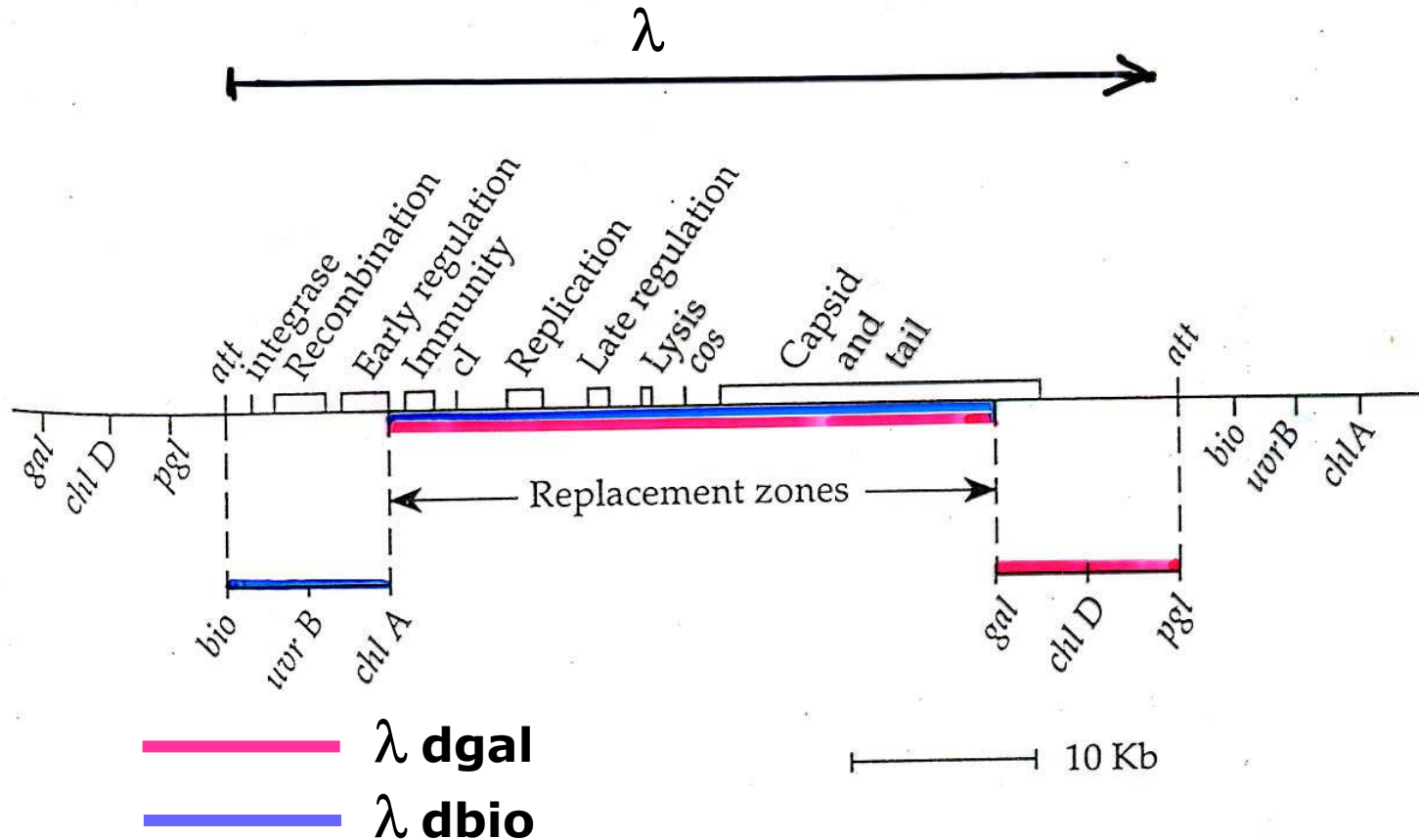
Figure 18-6. Aberrant excision leading to production of λgal and λbio phages.

Frekvence vzniku transdukujících částic = 10^{-6} (na jeden virion lambda)

lyzát LFT (low frequency of transduction)

GENOM TRANSDUKUJÍCÍ FÁGŮ

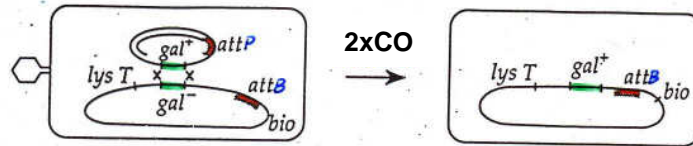
λ dgal a λ dbio



Po delecí *att* na bakteriálním chromozomu mohou být využita sekundární místa *att* - pak dochází k transdukci jiných oblastí chromozomu

Různé rekombinační události při specifické transdukcii

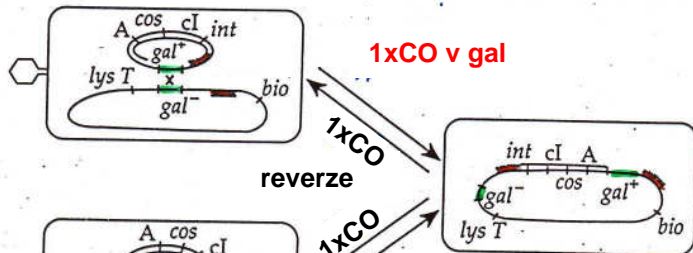
(a) homologní rekombinace



fág se vyřadí

typ I

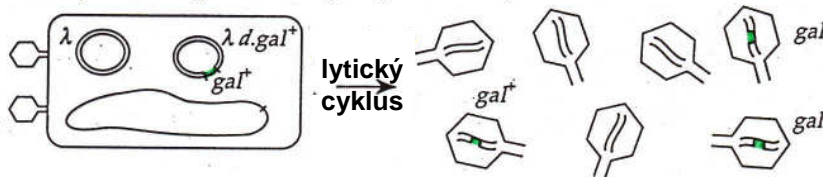
(b) reverzní rekombinace v merodiploidní rekinantě



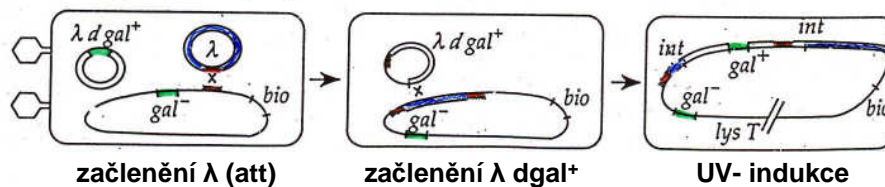
segregace dvou typů haploidních chromozomů gal-

typ II

(d) vytvoření lytického lyzátu HFT (při vysoké MOI)



(e) vytvoření dvojnásobně lyzogenního merodiploida



začlenění λ (att)

začlenění λ dgal+

UV- indukce

homologní rekombinací

site-specific integrace

HFT

**Nízká
multiplicita
infekce**

**Vysoká
multiplicita
infekce**

Infekce nelyzogených buněk fágem λgal^+
 Asi 0,001% buněk získá gal^+

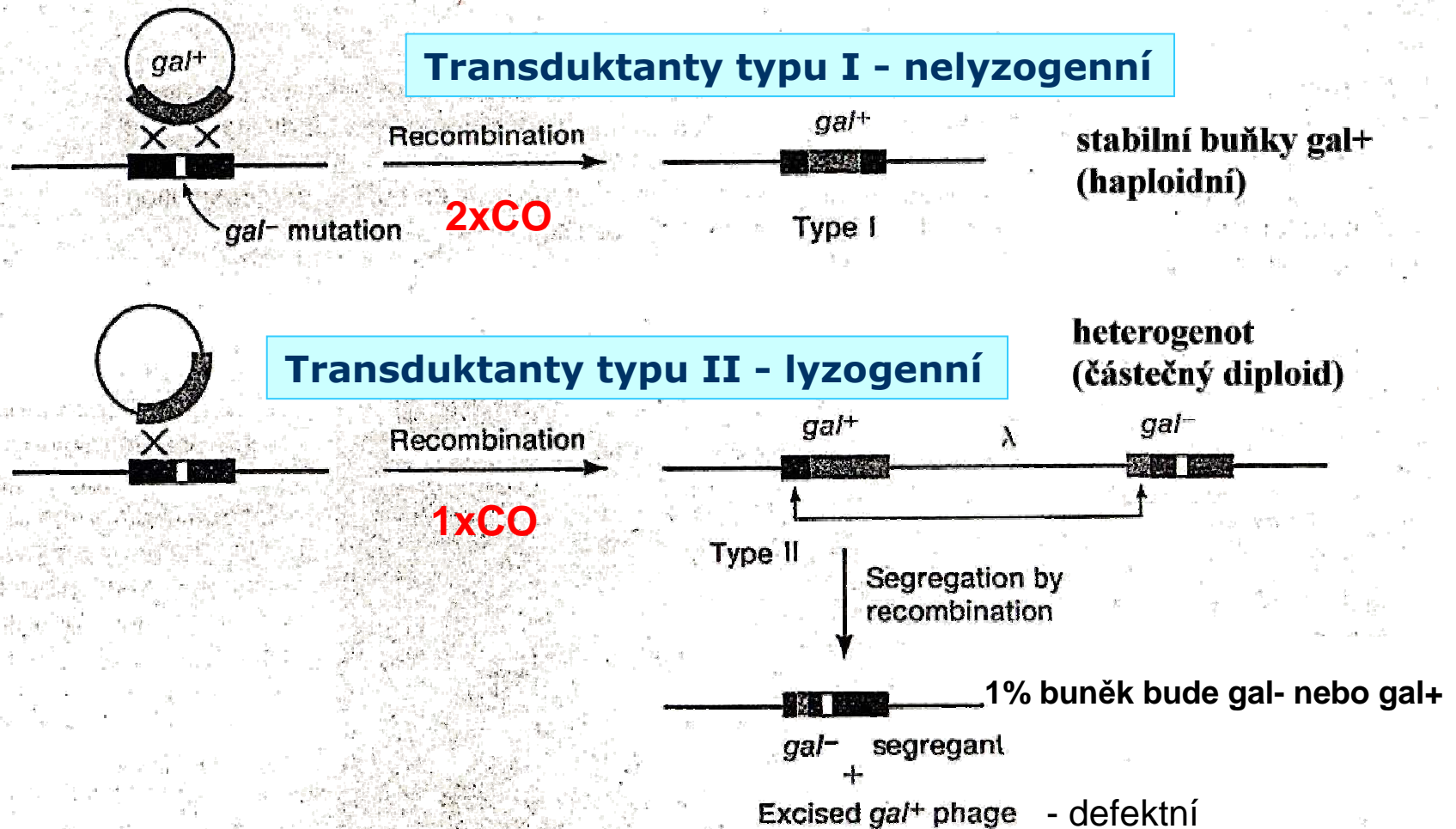
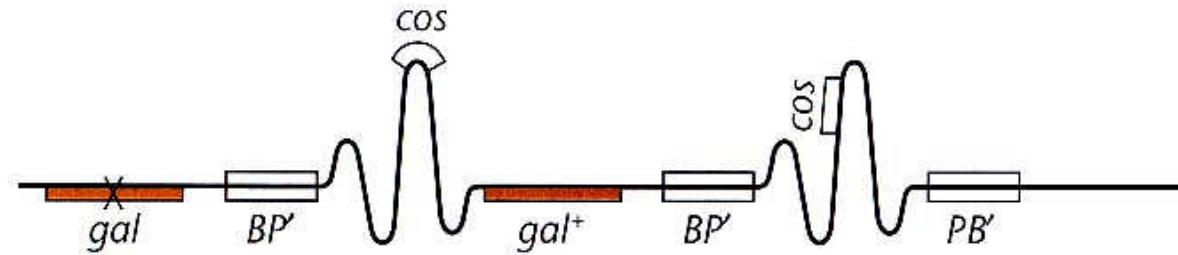


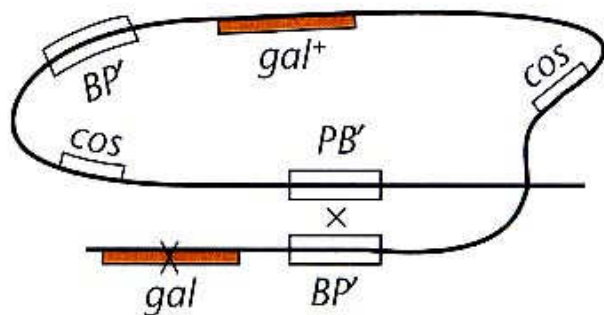
Figure 18-9. Production of type I and type II λgal transductants and segregation of gal^- cells from a type II cell.

VZNIK LYZÁTŮ TRANSDUKUJÍCÍCH S VYSOKOU FREKVENCÍ (LYZÁT HFT)

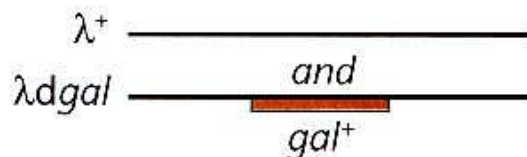


Dvojnásobně
lyzogenní kmen
($\lambda + \lambda$ dgal)

Indukce UV světlem



Excize a zabalení fágových genomů

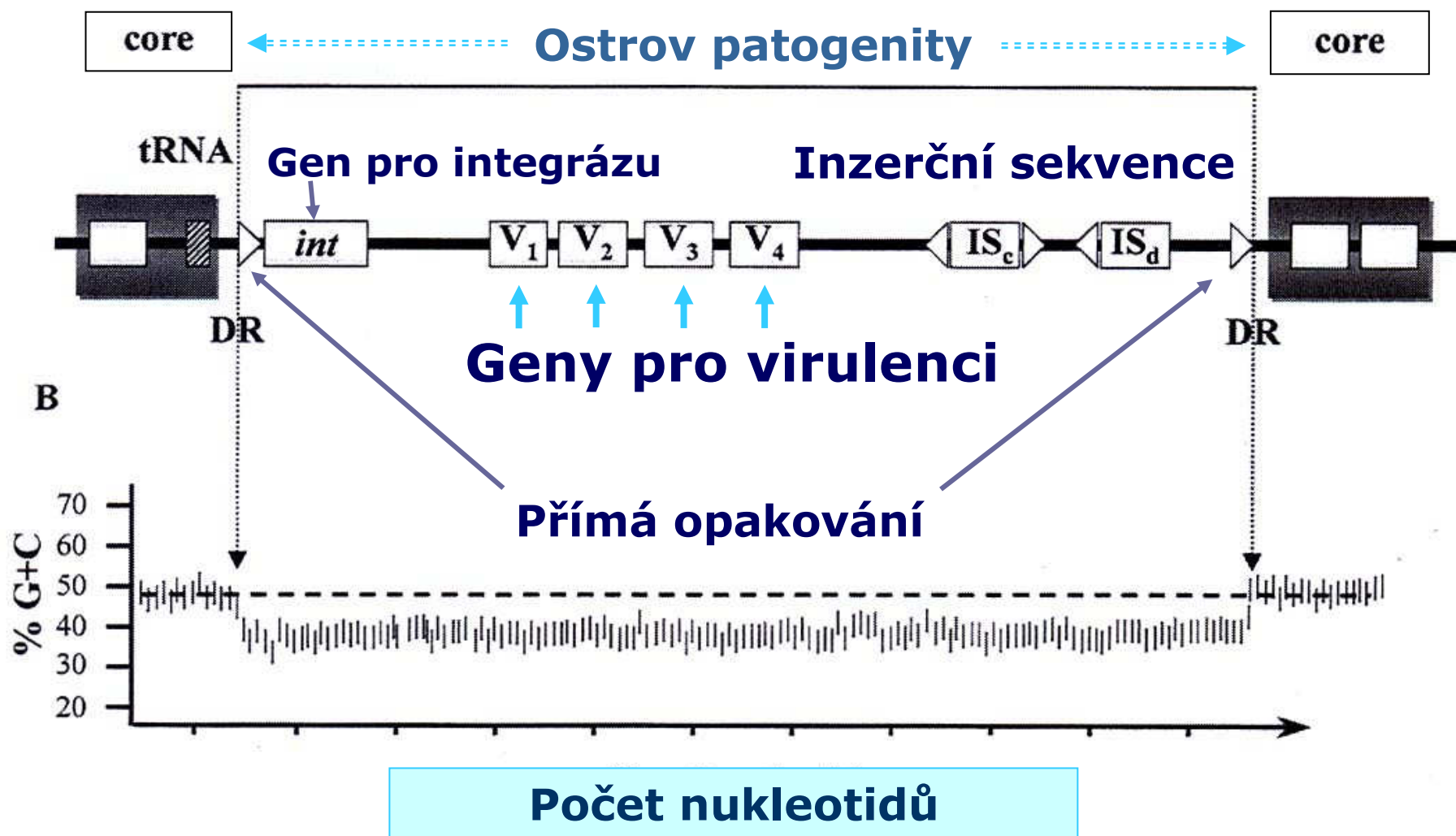


**Lyzát HFT (50% částic
je transdukujejících)**

Využití transdukce

- Analýza specifických oblastí bakteriálního genomu (gal operon)
- Mapování genů
- Charakterizace transpozonů – heteroduplexní analýza
- Analýza fágových genomů při konstrukci vektorů (odvozených z fága lambda)
- HGT: Objasnění evoluce bakteriálních genomů

OBEČNÁ STRUKTURA OSTROVŮ PATOGENITY



VÝZNAČNÉ RYSY OSTROVŮ PATOGENITY

- Nesou jeden nebo několik genů pro virulenci
- Jsou přítomny jen u patogenních kmenů daného druhu
- Představují relativně velké úseky genomu (10 – 200 kb)
- Mají odlišný obsah GC a jiné využívání kodonů
- Jsou často umístěny poblíž genů pro tRNA (kotvy pro inzerci cizí DNA)
- Jsou často spojeny s mobilními genetickými elementy.
- Často jsou ohraničeny DR (16-130 bp) - rozpoznávací místa pro enzymy zajišťující integraci a excizi mobilních elementů (integráza nebo transponáza)
- Jsou často nestabilní a jsou deletovány s různými frekvencemi.
- Mají mozaikovitou strukturu – jsou složeny z elementů, které se během evoluce v různé době a z různých zdrojů akumulovaly do určitých míst.

Přenos (transdukce) ostrovů patogenity u *S. aureus*

- **SaPI1: 15 kb ostrov patogenity u *S. aureus*, nesoucí gen *tst* zodpovědný za syndrom toxického šoku (TSST1) - (horečka, exantém, hypotenze, olupování kůže).**
- **SaPI1 je mobilizován fágem 80 α . Když fág 80 α infikuje buňky *S. aureus* nesoucí SaPI1, vyčleňuje se ostrov z chromozomu a replikuje se pomocí proteinů fágového replikačního aparátu. Geny ostrova způsobí, že fág 80 α vytváří menší hlavy, které pak zabalují přednostně DNA ostrovů spíše než vlastní fágovou DNA. Když vytvořený „pseudofág“ infikuje další buňku, je DNA ostrova injikována do buňky, kde se začleňuje do chromozomu pomocí svého vlastního Int proteinu.**

LYZOGENNÍ KONVERZE

- změna vlastností kmene po infekci fágem, který ve svém genomu nese geny zodpovědné za změnu fenotypu hostitele (faktory virulence nebo toxiny).

- Příklady

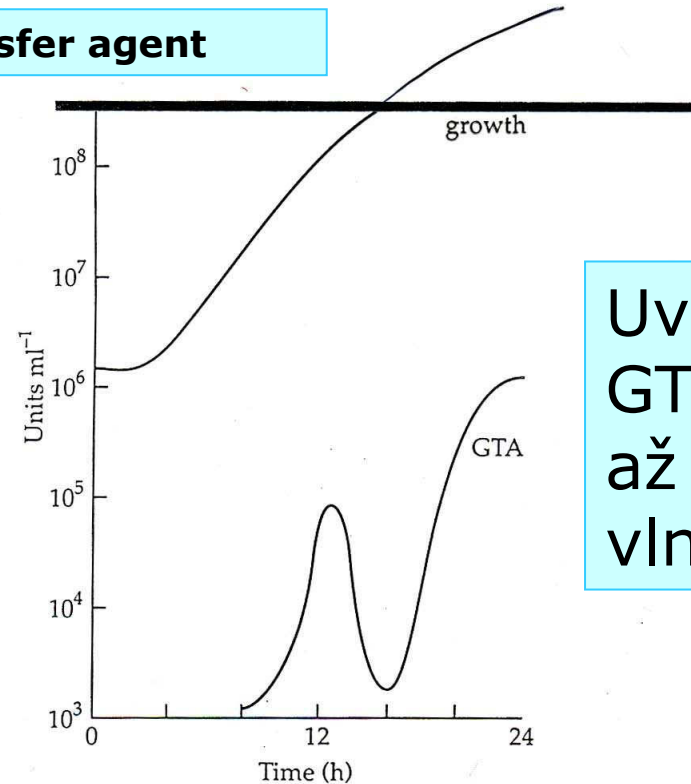
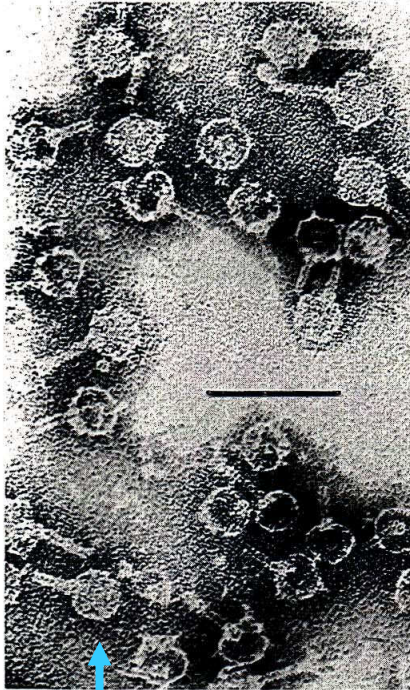
- Fág lambda: *E. coli* – rezistence k séru, schopnost přežívat v makrofágách
- Fág ϕ 361 (příbuzný fágu lambda): *E. coli* – Shiga toxin
- Fág β : *Corynebacterium diphtheriae* – difterický toxin (záškrť)
- Fág CTX ϕ : *Vibrio cholerae* – toxin cholery
- Fágy u *S. aureus*: fibrinolysin, enterotoxin
- Fágy beta-hemolytických streptokoků sk.A: erytrogenní toxiny
- Fág u *Clostridium botulinum*: botulotoxin
- Fág u *Clostridium tetani*: tetanotoxin
- Fág u *Salmonella*: změny somatických antigenů

Kapsdukcce - *Rhodococcus capsulatus*

(*Rhodopseudomonas palustris*)

částice GTA

Gene transfer agent



Uvolňování
GTA v jedné
až dvou
vlnách

Fig. 12.8 Time-course of release of GTA activity by a growing culture of *Rhodobacter capsulatus*.

8 proteinů, průměr hlavy
30 nm, bičík 30-50 nm,

**Nebyly identifikovány fágy
příbuzné s GTA**

PARAMETRY PŘENÁŠENÉ DNA

- velikost přenášené DNA = 1,5-2 kb (až 5 kb)
- DNA je heterogenní, tj. je bakteriální
- přenos až 3-4 genů na jednu částici GTA
- 10^5 GTA/ml pro daný marker
- přenos všech chromozomových markerů
- frekvence rekombinant $10^{-4}/^{-5}$ /marker/buňku
- frekvence „kotransferu“ genů $F = 1 - (dL)^2$

(d = vzdálenost markerů, L = délka přenášeného úseku DNA)

Přenos je regulován bakteriálními geny, které indukují expresi strukturních genů GTA během specifické růstové fáze buněk

Další GTA – *Silicibacter pomeroyi* aj. mořský bakterioplankton
– počet genů kódujících kapsid, bičík, portál, zabalování DNA,
= zhruba 15 genů podobných GTA u *R.c.*

VTA – Voltae Transfer Agent

částice podobné bakteriofágům u kmene METHANOCOCCUS VOLTAE PS
(Archaea)

- Velikost částic je 40 nm, délka bičíku 60 nm
- Dvě částice na buňku
- Nesou fragmenty chromozomové DNA o průměrné velikosti 4,4 kb
- Přenášená DNA je necitlivá k DNAáze
- Jsou přenášeny náhodně všechny geny
- Frekvence přenosu jednotlivých genů 10^{-2} až 10^{-5}

Úloha GTA v evoluci mořských bakterií

Roseovarius nubinhibens, Reugeria mobilis

- GTA přenášejí geny mezi různými druhy mořských bakterií
 - Frekvence přenosu genů = 6.7×10^{-3} až 4.7×10^{-1} jsou tisíckrát až milionkrát vyšší než frekvence přenosu transformací nebo transdukcí
 - Umělý přenos genů AntR v uzavřených nádobách s mořskou vodou – až 47% bakterií získalo tyto geny a integrovalo je do svého genomu
- ?? – stejný způsob přenosu genů i mezi klinickými kmeny

GTA = „promiscuous little bastards“

BACTERIOPHAGE-LIKE PARTICLES ASSOCIATED WITH THE GENE TRANSFER AGENT OF *METHANOCOCCUS VOLTAE* PS.

- **The methanogenic archaeobacterium *Methanococcus voltae* (strain PS) is known to produce a filterable, DNase-resistant agent (called VTA, for voltae transfer agent), which carries very small fragments (4400 bp) of bacterial DNA and is able to transduce bacterial genes between derivatives of the strain.**
- **Examination by electron microscopy of two preparations of VTA that were concentrated and partially purified by different methods showed virus-like particles with isometric heads, about 40 nm in diameter, and with 61 nm long tails.**

Transdukce – objev 1952 (Zinder a Lederberg)

Salmonella typhimurium, fág P22

Studium auxotrofních mutant – vznik prototrofních rekombinant

-Proces není ovlivněn DNázou

-Není nutný kontakt buněk (U-trubice)

-Přenosovým agens jsou fágy