

Konjugace

Přenos DNA zprostředkovaný konjugativními plazmidy

Donor – recipient \longrightarrow transkonjugant (konjugant)

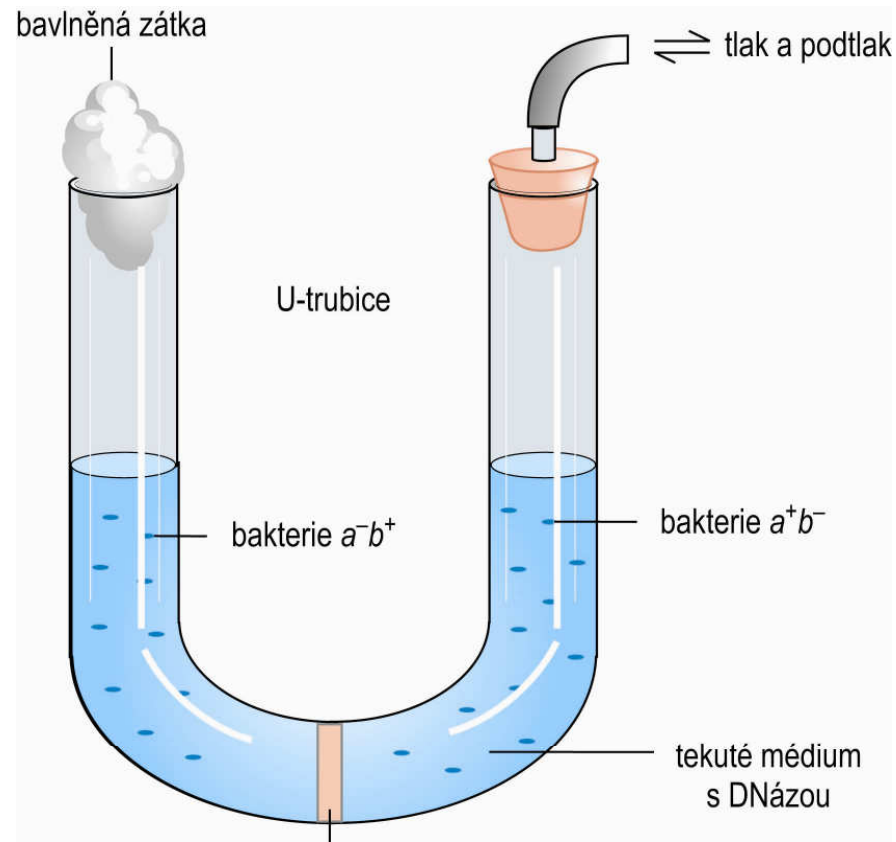
(Exkonjuganti - v rámci téhož druhu, transkonjuganti - v rámci různých druhů)

Přenášené typy elementů (DNA):

- Samopřenositelné (self-transmissible) plazmidy
- Mobilizovatelné plazmidy
- Chromozomová DNA
- *Konjugativní transpozony (+mobilizovatelné transpozony)*

Pokus s U-trubicí: důkaz, zda je pro přenos genů nutný kontakt buněk

Davies, 1950



Filtrem nemohou procházet bakterie, ale viry a DNA ano

Charakteristické rysy konjugace

- 1. Jednosměrný přenos plazmidů, jednosměrný/obousměrný přenos chromozomových markerů**
- 2. Je přenášen jen konjugativní plazmid, nebo dochází k mobilizaci dalších elementů (plazmidů, transpozonů, chromozomu)**

Výskyt konjugace u bakterií

G- (enterobakterie)

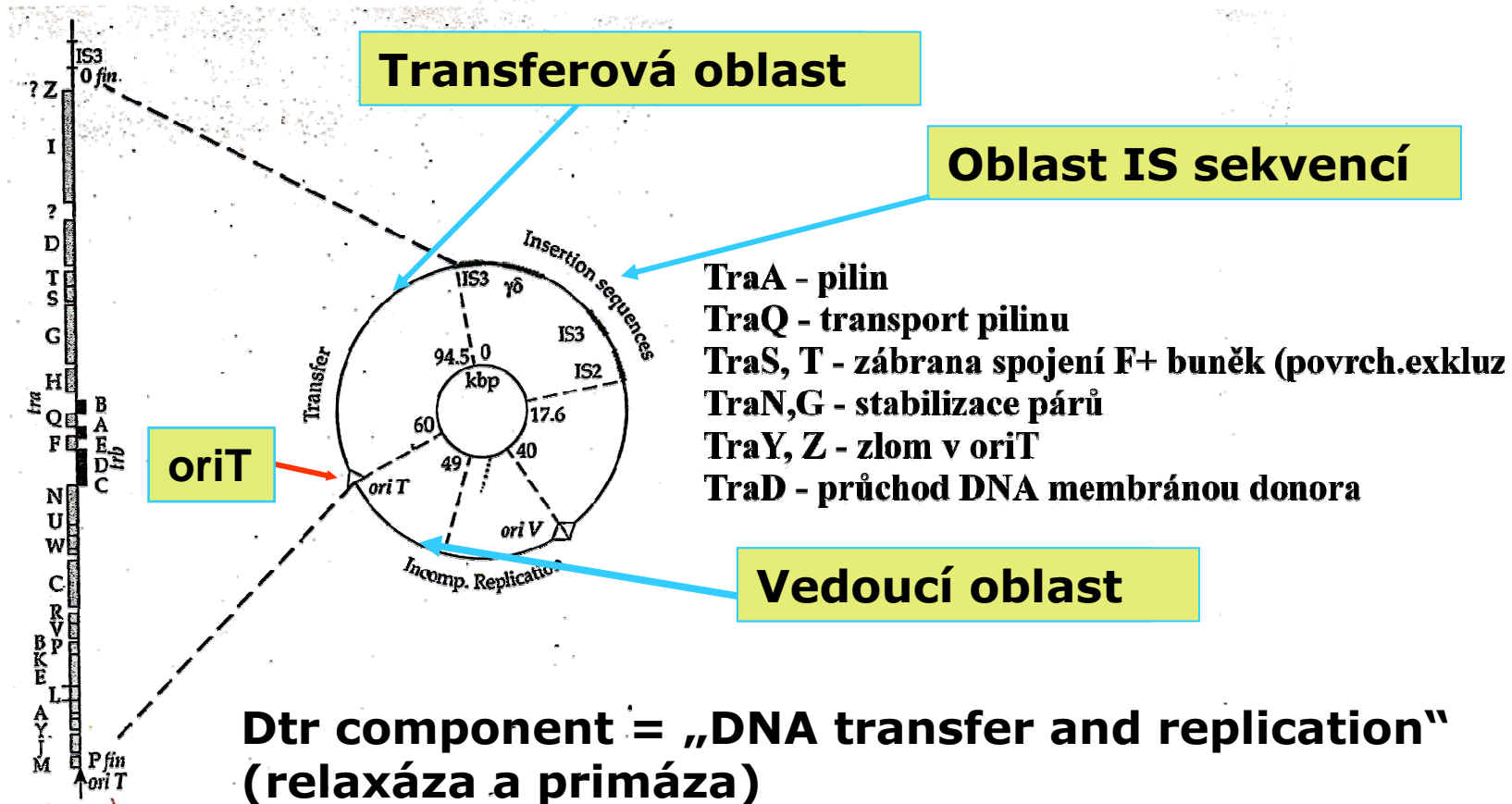
- prototypem je konjugace zprostředkovaná F-plazmidem**
- řada konjugativních R-plazmidů příbuzných F-plazmidu, mnoho jich má široké rozmezí hostitelů, např. RK2 (RP1, RP4)**

Další G-: Agrobacterium (Ti-plazmid), Pseudomonas,

G+ (enterokoky, stafylokoky, streptokoky, streptomycety)

- prototypem je konjugace zprostředkovaná pAD1**
- mnoho plazmidů má široké rozmezí hostitelů**

FUNKČNÍ OBLASTI F-PLAZMIDU



TRANSFEROVÁ OBLAST F plazmidu

- **33 kb. Oblast obsahuje veškerou genetickou informaci nezbytnou pro přenos. Asi 60 genů.**

- Geny lze podle funkce rozdělit do 5 skupin:
 1. Biosyntéza a sestavování F pilusu (traA,B,C,E,F,G,H,L,K,Q,U,V,W)
 2. Stabilizace párujících se buněk (traG,N)
 3. Konjugativní metabolismus (traD,I,M,Y,Z)
 4. Regulace přenosu (traJ,finO,finP)
 5. Povrchová exkluze (**traS, traT**)

TraT = vnější membránový protein zabraňující stabilnímu spojení buněk obsahujících plazmidy

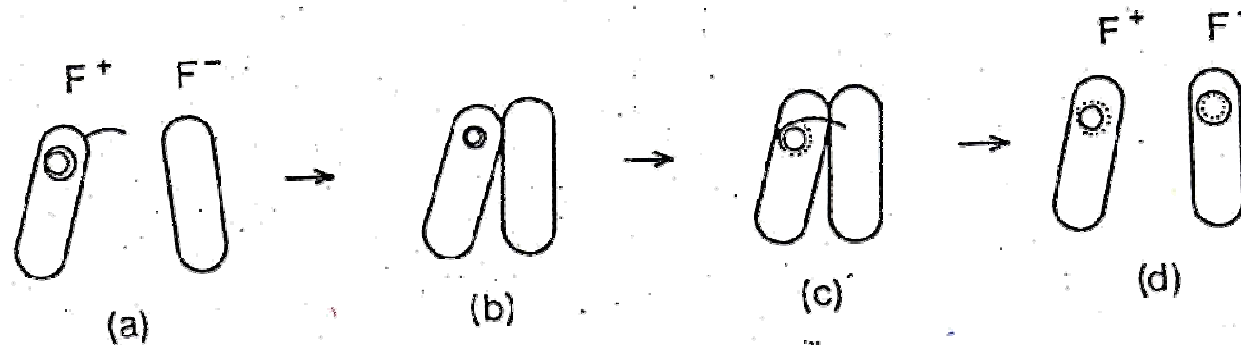
TraS = protein vnitřní membrány zabraňující vstupu DNA do buňky při náhodném spojení buněk F+

Fenokopie F- = buňky F+, které neexprimují *tra* geny.
Lze je připravit např. hladověním.

PRŮBĚH PŘENOSU PLAZMIDOVÉ DNA PŘI KONJUGACI

□ Stádia párování:

- Donorová buňka naváže kontakt s recipientní pomocí pilusu
- Následuje přibližování buněk depolymerizací pilusu (retrakce pilusu)
- Probíhá syntéza plazmidové DNA – chromozom se nereplikuje
- Dochází k aktivní disagregaci donorových a recipientních buněk



Typická buňka F⁺ má asi 20 pilusů – kontakt jedné donorové buňky s několika recipientními

Typy pilusů u G- bakterií

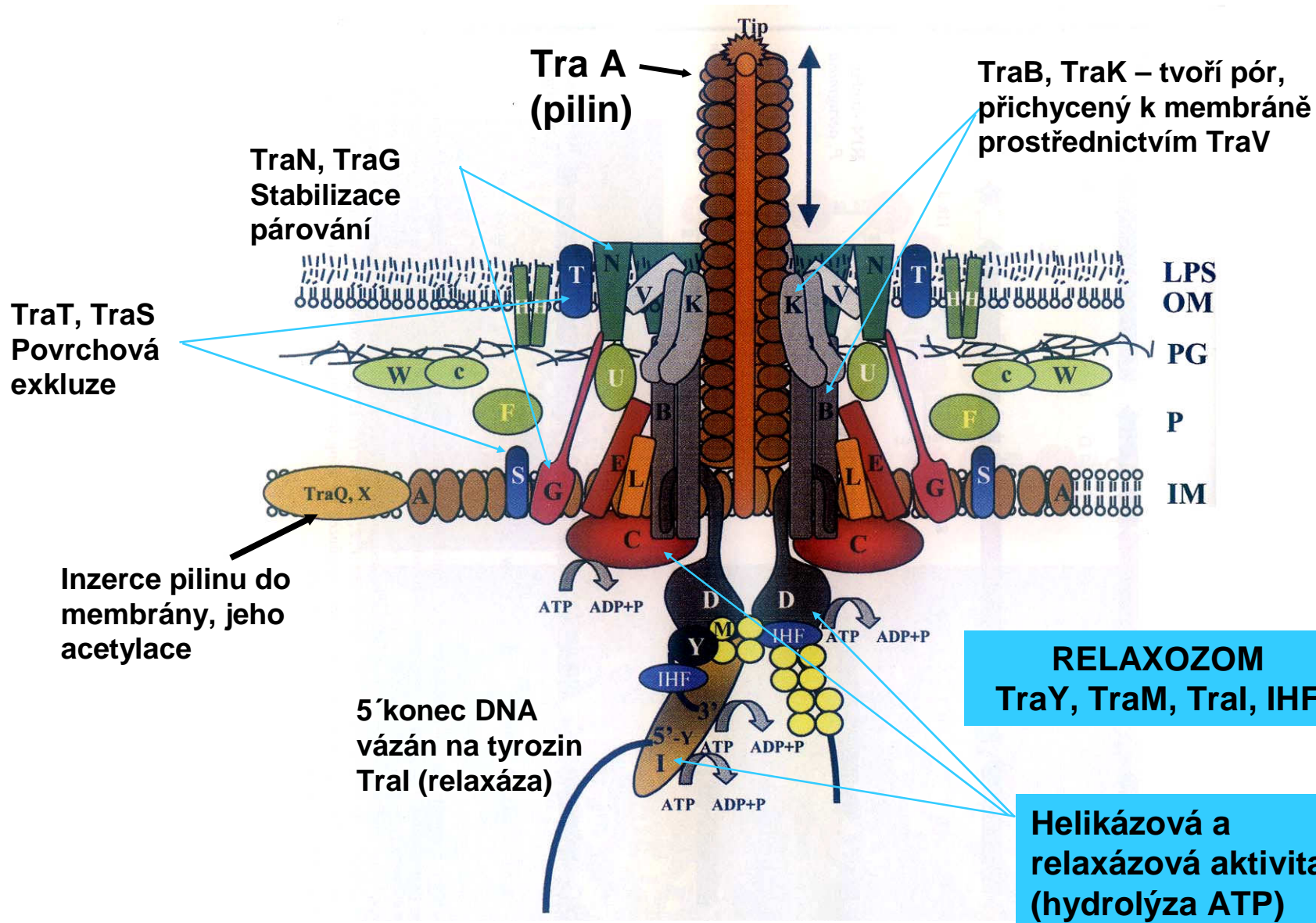
Rozlišují se flexibilní (ohybné, např. u F plazmidu) a neohebné (tuhé) pilusy (např. plazmid PKM101). To má praktický dopad na provedení konjugace. Když plazmid tvoří flexibilní pilusy, používá se tekuté medium, zatímco při neohebných je nutné použít pevný podklad. Přitom jsou buňky nejdříve buď zfiltrvány a filtr je pak přenesen na Petriho misku s živným médiem, nebo přímo smíchány na pevném živném mediu s kompletní půdou. Teprve po inkubaci přes noc jsou buňky smyty a přeneseny na selekční medium, kde vyrostou transkonjuganty (exkonjuganty).

Male-specific phages – attach to sex pilus – adsorption site

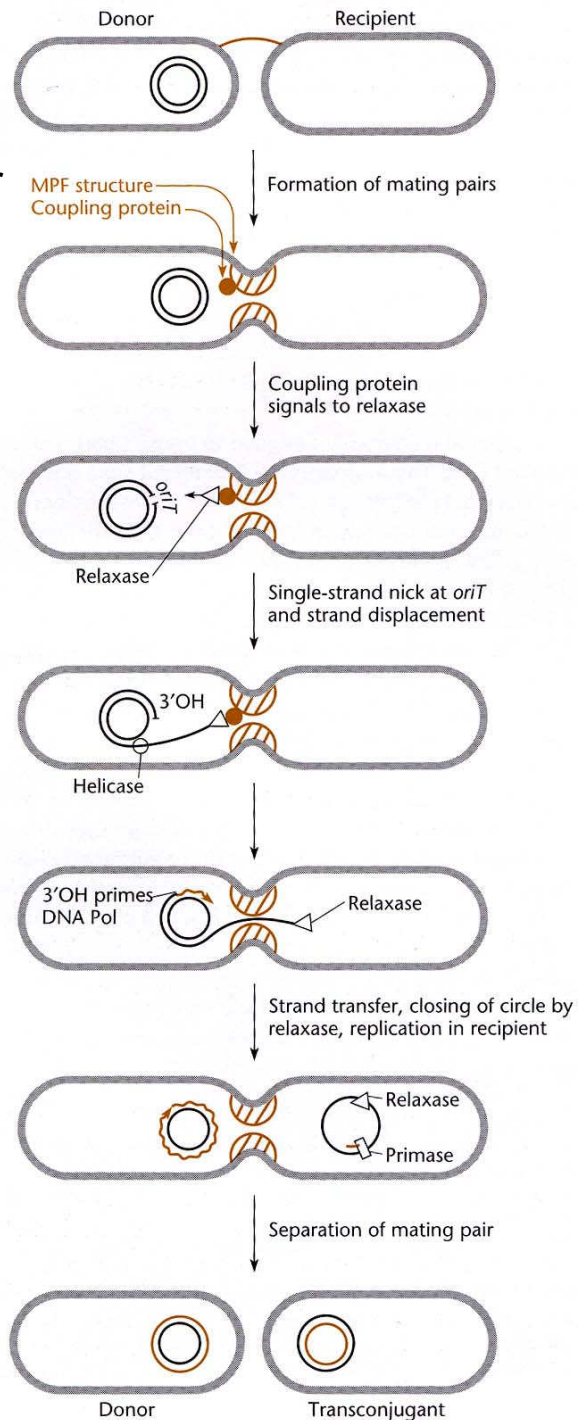
PRŮBĚH KONJUGATIVNÍHO PŘENOSU DNA

1. Dochází k jednořetězcovému zlomu v oriT v místě nic
2. Odmotávání DNA ve směru 5' → 3'
3. Přenos jednořetězcové DNA 5' koncem do recipienta
4. V donorové buňce je doreplikován komplementární řetězec replikací otáčivou kružnicí
5. V recipientu je komplementární řetězec dosyntetizován diskontinuálně
6. Cirkularizace DNA v recipientu (**v případě přenosu plazmidu**)

Přenosový aparát F plazmidu sestavený z informací o funkci jeho složek



Mating Pair Formation



Donorová buňka vytváří pilus, kterým kontaktuje recipientní buňku.

(povaha signálu není známa)

Dochází k vytvoření póru mezi oběma buňkami

Relaxáza aktivovaná „coupling“ proteiny vytvoří zlom v *oriT* na DNA

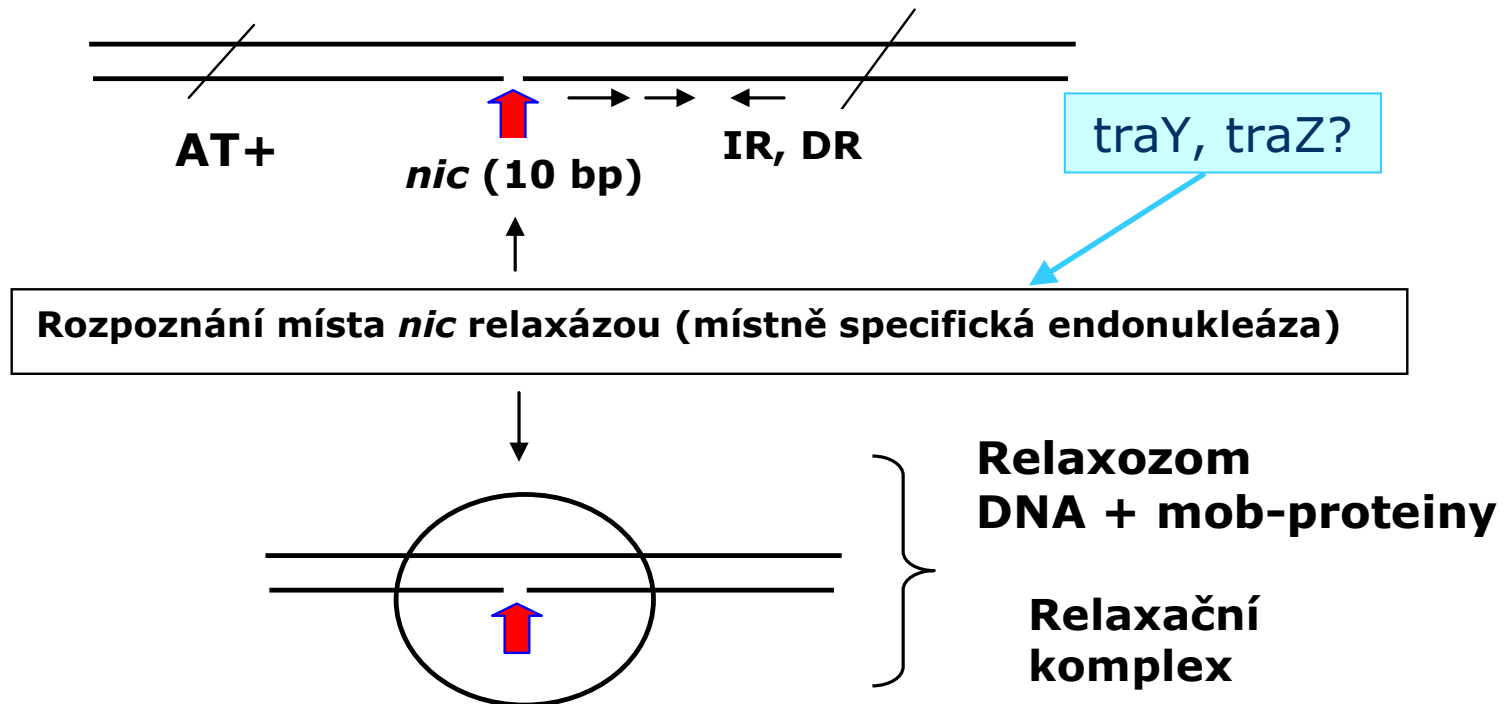
Relaxáza a DNA přecházejí do recipientní buňky, kde relaxáza cirkularizuje DNA

Primáza (kódovaná plazmidem nebo chromozomem) zahájí syntézu komplementárního řetězce

Dochází k separaci donorové buňky a transkonjuganta

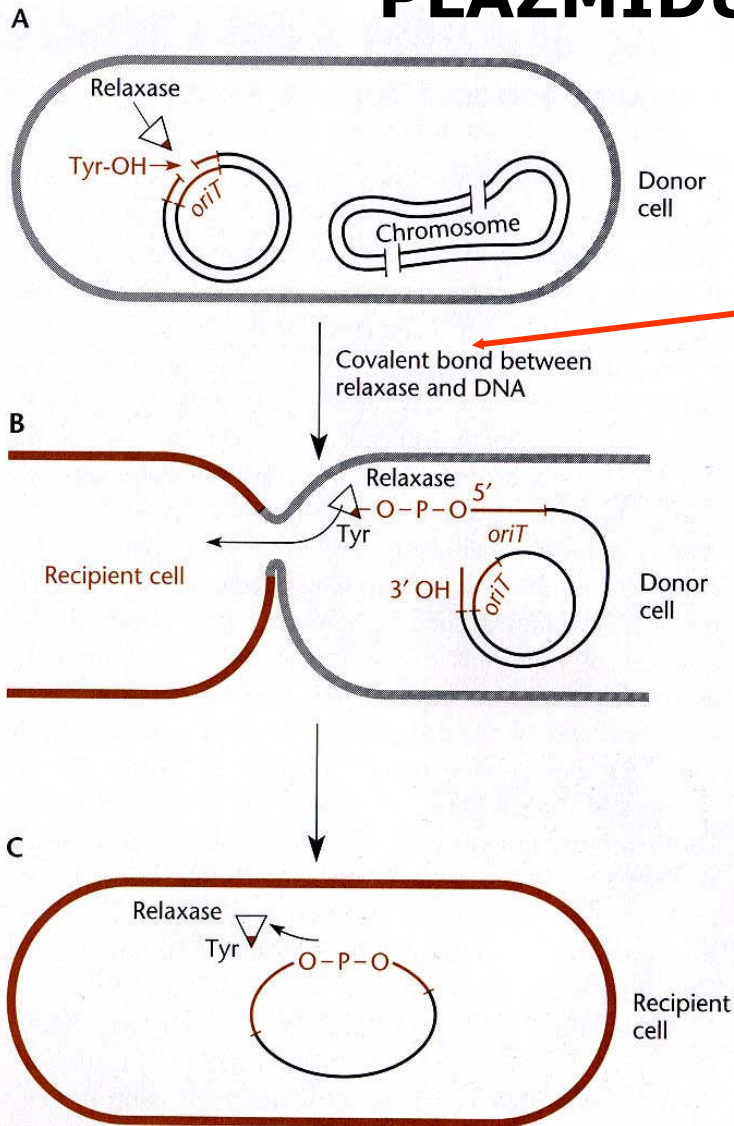
INTERAKCE MÍSTA *NIC* S RELAXÁZOU V MÍSTĚ *ORIT* PLAZMIDU *F*

Oblast *oriT* (373 bp)



OriT lze vložit do libovolného plazmidu, který je pak přenesen jako F

PŮSOBENÍ RELAXÁZY PŘI PŘENOSU PLAZMIDU KONJUGACÍ



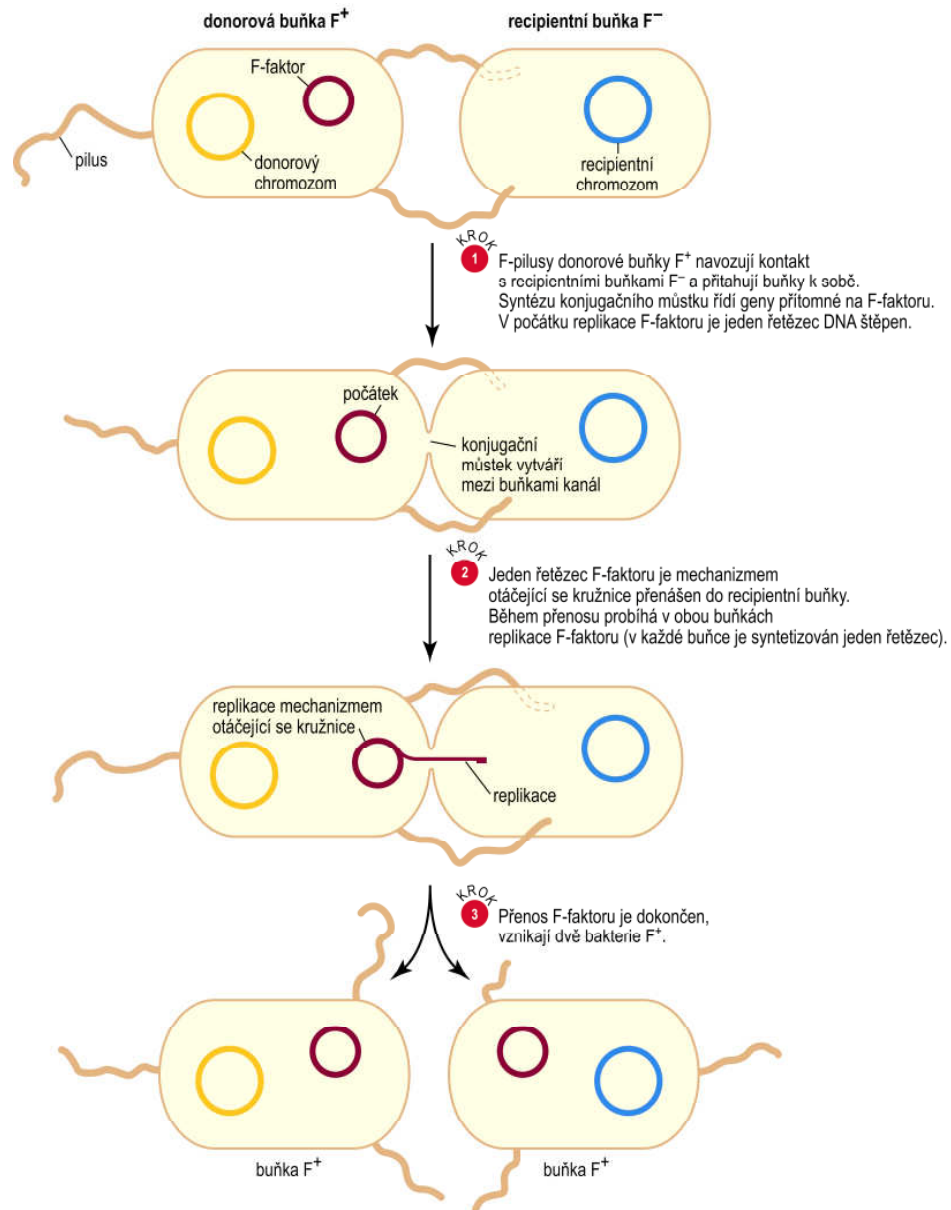
Relaxáza vytvoří zlom v místě *oriT*, 5' fosfát je z DNA přenesen transesterifikační reakcí na tyrozinový zbytek relaxázy

TraM protein se váže na ss zlom a rozšíří mezeru na 200 bp ve směru 5-3. Na tuto mezeru se váže protein Tral (helikáza I), která vytváří další rozmotávání za spotřeby ATP. Tak se rozmotá asi 1200 bp. Jednořetězce jsou stabilizovány vazbou SSB proteinů

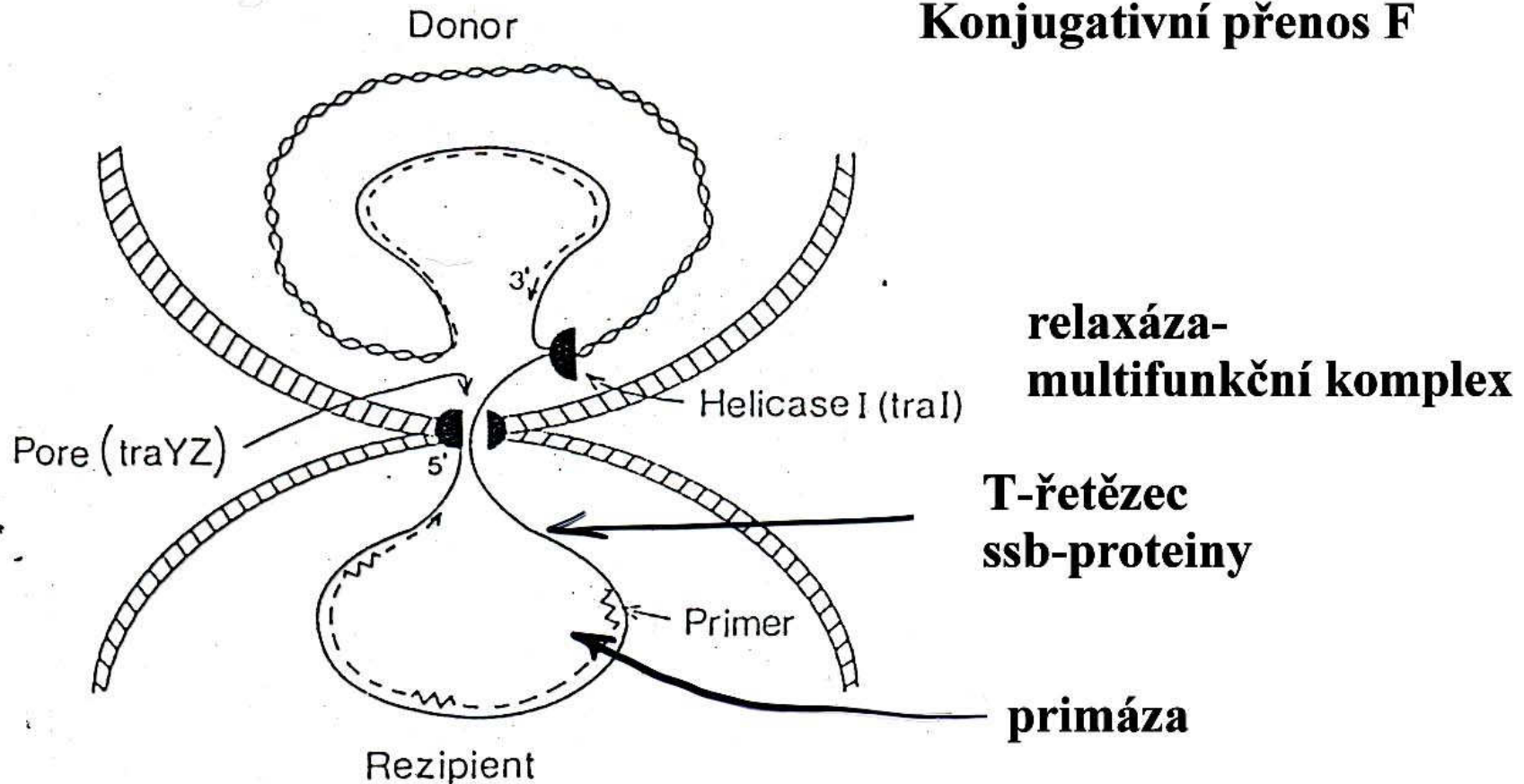
Relaxáza vstupuje do recipientní buňky a vtahuje do ní i jednořetězcovou DNA od 5' konce (T-řetězec)

Zpětnou transesterifikační reakcí je fosfát přenesen na 3' OH konec přenesené DNA, čímž se tato recirkularizuje a relaxáza se uvolní

Přenos F-plazmidu z buňky F⁺ do buňky F⁻

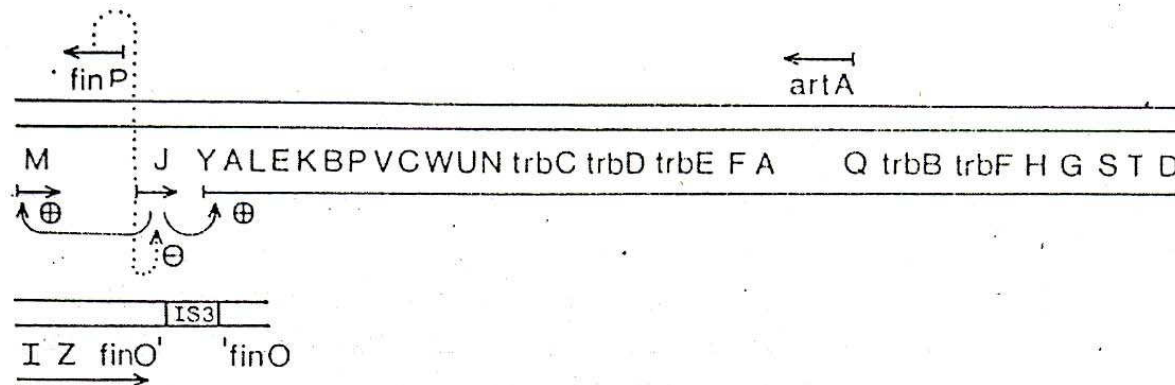


Konjugativní přenos F



Donor conjugal DNA synthesis (DCDS) - náhradová syntéza DNA v donorové buňce mechanismem otáčející se kružnice

Repliconation - syntéza komplementárního řetězce v recipientní buňce - diskontinuální syntéza



Genetická regulace tra-operonu

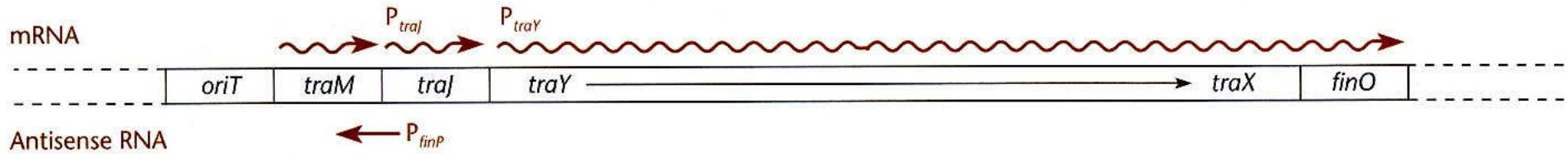
Je řízena dvěma regulačními okruhy:

1. Produkty genů *finO* a *finP* regulují expresi genu *traJ* negativně
2. Produkt genu *traJ* reguluje expresi genu *traM* a operonu *traYZ* pozitivně.

U F plazmidu je gen *finO* inaktivován IS3a.

Produkty genů *finO* a *finP* reprimují transkripci genů *tra*. Zatímco gen *finO* kóduje protein, exprimuje gen *finP* krátkou RNA (u F má délku 78 b). Gen *finP* leží v oblasti genu *traJ*, je však transkribován v opačné orientaci. Přesný mechanismus zábrany exprese *traJ* není dosud znám. Pravděpodobně *finP*-RNA zabraňuje transkripci nebo/a translaci genu *traJ*. Protein *FinO* působí buď společně s *FinP*-RNA, nebo nezávisle na ní. K represí jsou však zapotřebí v každém případě oba produkty.

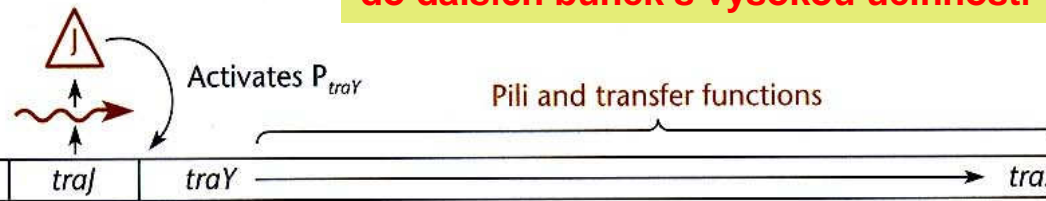
A Genetic organization of *tra* region



B Immediately after entry into cell

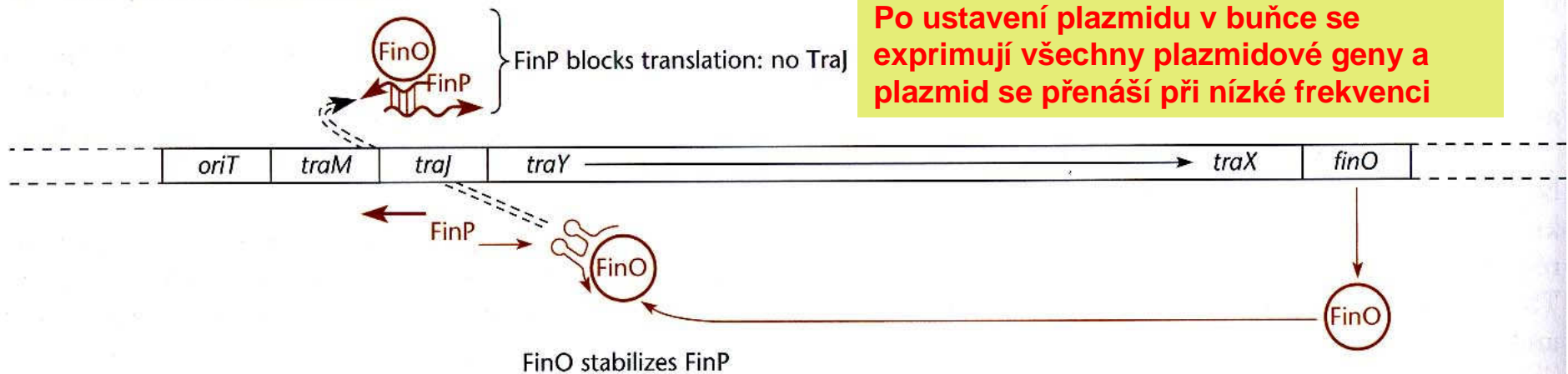
Nově vzniklý konjugant přenáší plazmid do dalších buněk s vysokou účinností

TraJ = transkripční aktivátor

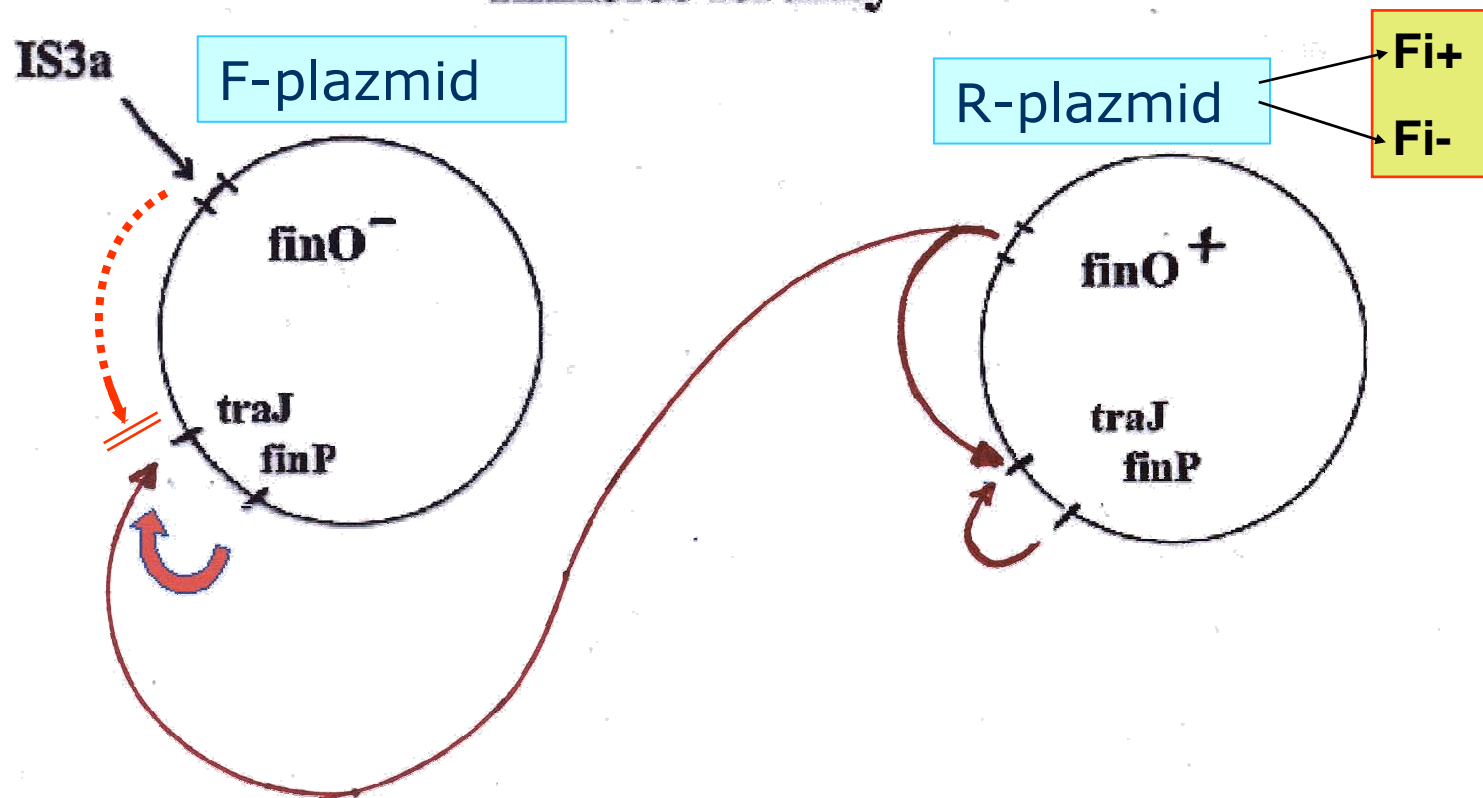


C After plasmid establishment

Po ustavení plazmidu v buňce se exprimují všechny plazmidové geny a plazmid se přenáší při nízké frekvenci



Inhibice fertility

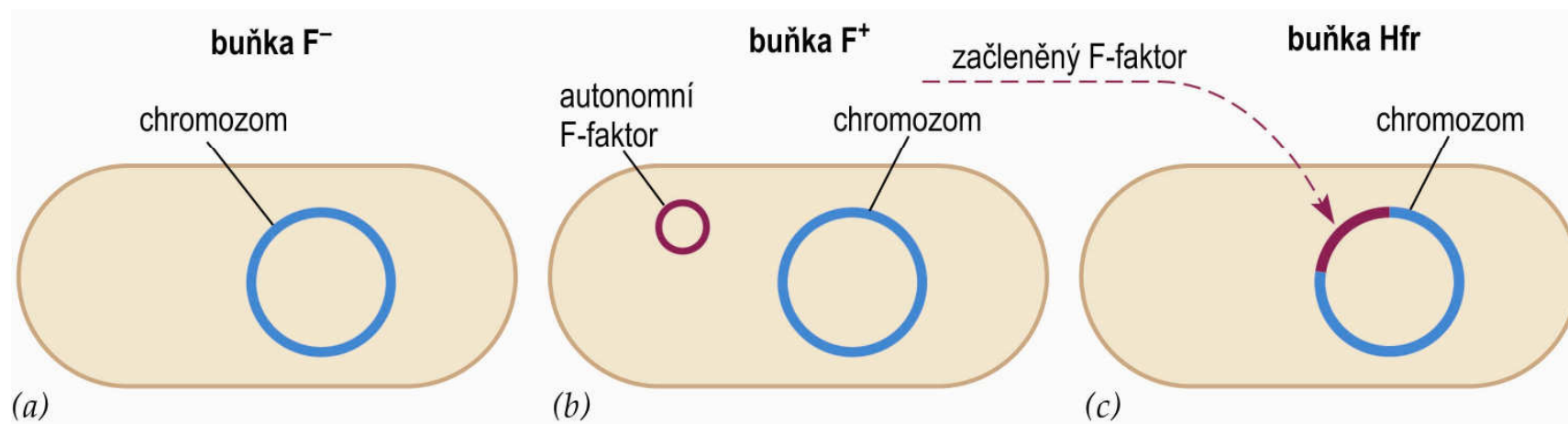


$finO$ = negativní regulátor --- represor

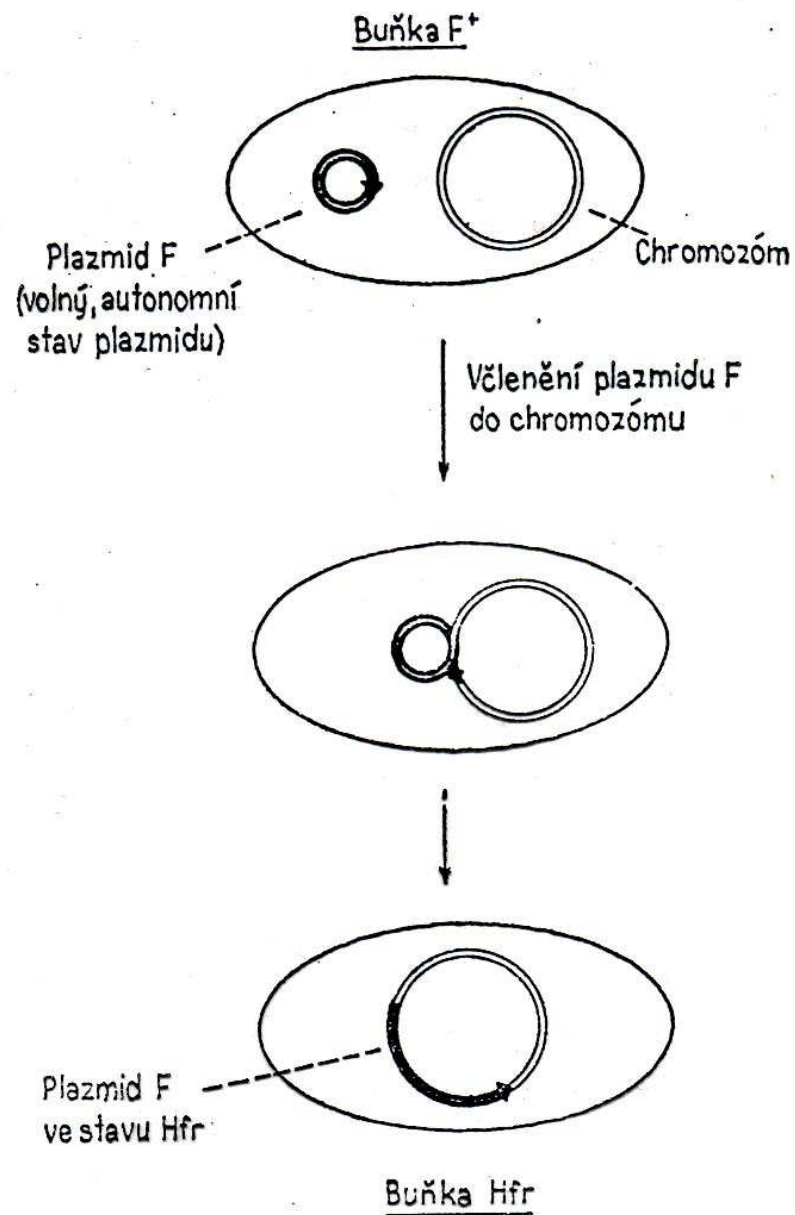
$finP$ = negativní regulátor --- antisense RNA

F = drd = derepressed mutant plasmid

Charakter buněk F⁻, F⁺ a Hfr



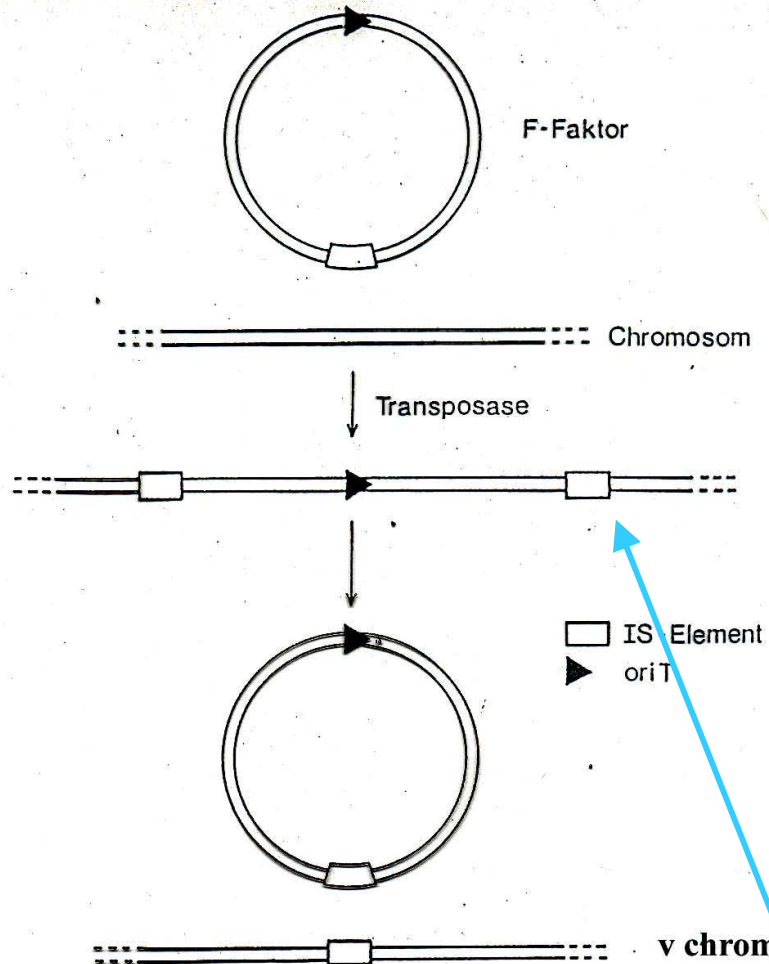
Vznik buněk Hfr začleněním F do chromozomu



ZPŮSOBY ZAČLENĚNÍ F PLAZMIDU DO CHROMOZOMU

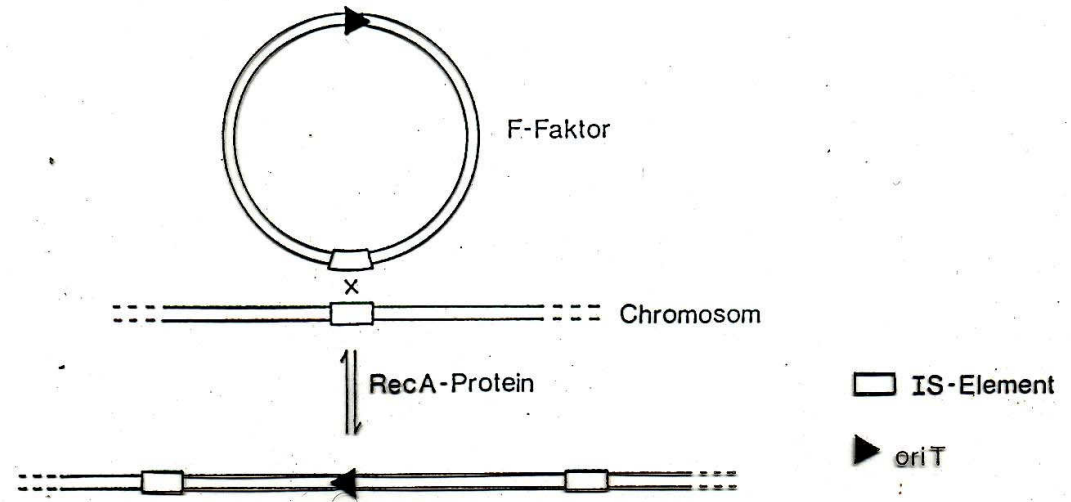
integrace nezávislá na RecA

transpozice

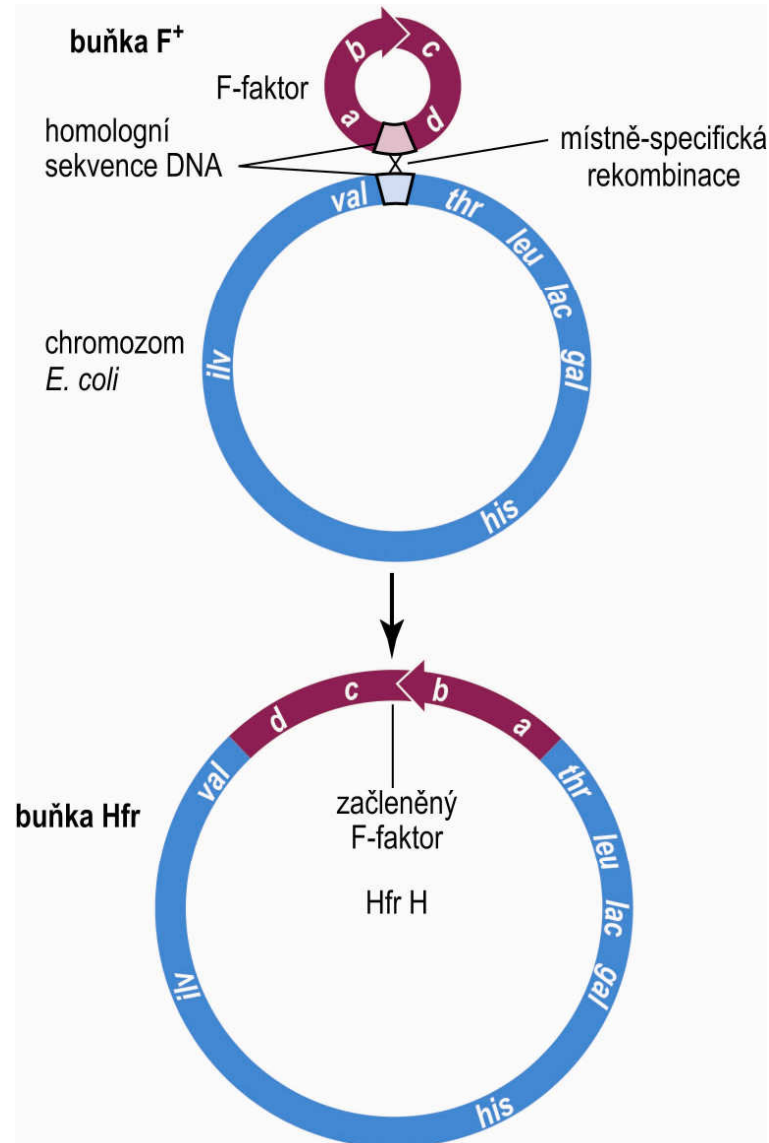


integrace závislá na RecA

homologní rekombinace



Vznik buňky Hfr (HfrH) začleněním F-plazmidu do chromozomu *E. coli*

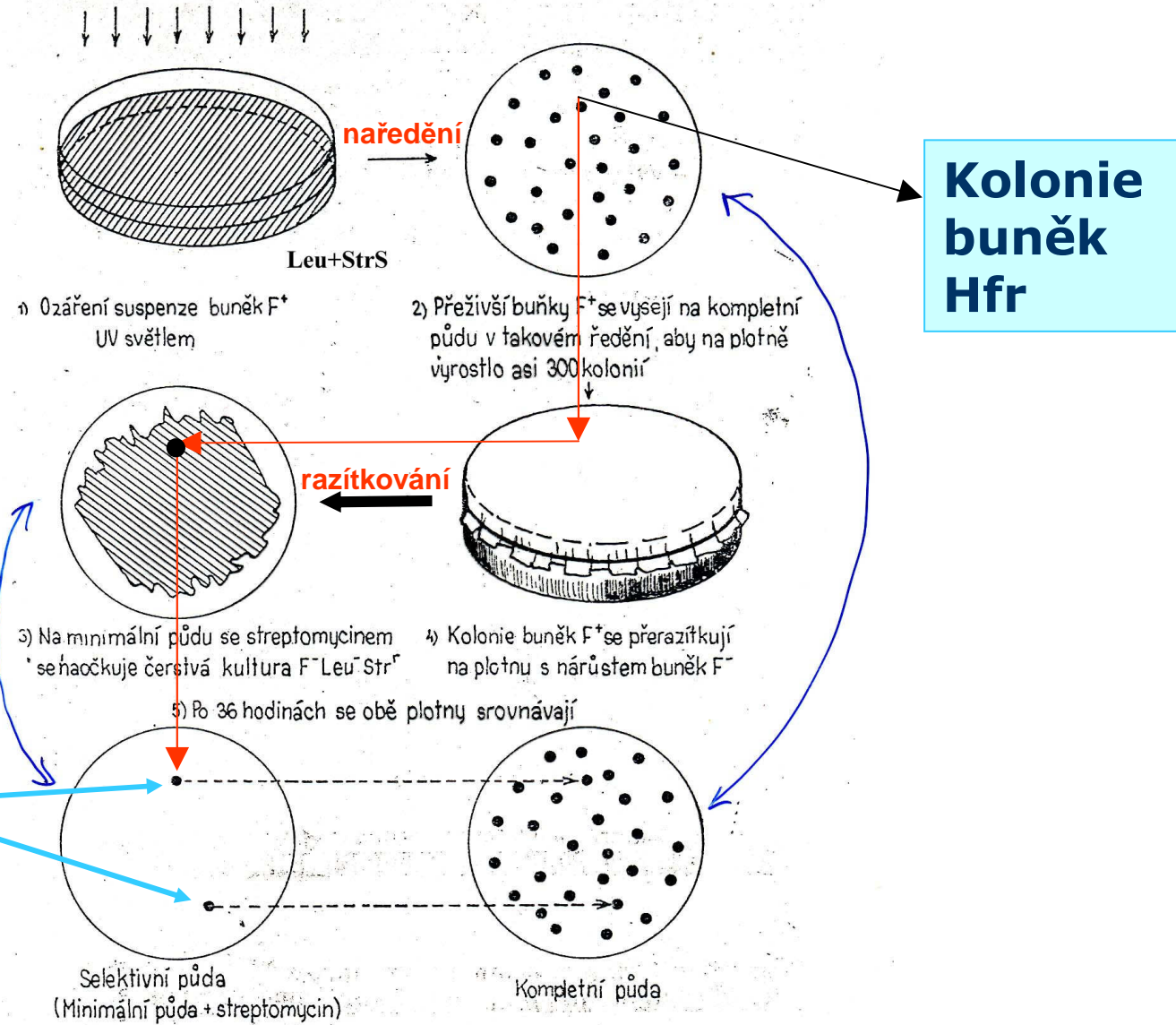


IZOLACE KMENŮ HFR

$F^+ = \text{Leu}^+ \text{Str}^S$

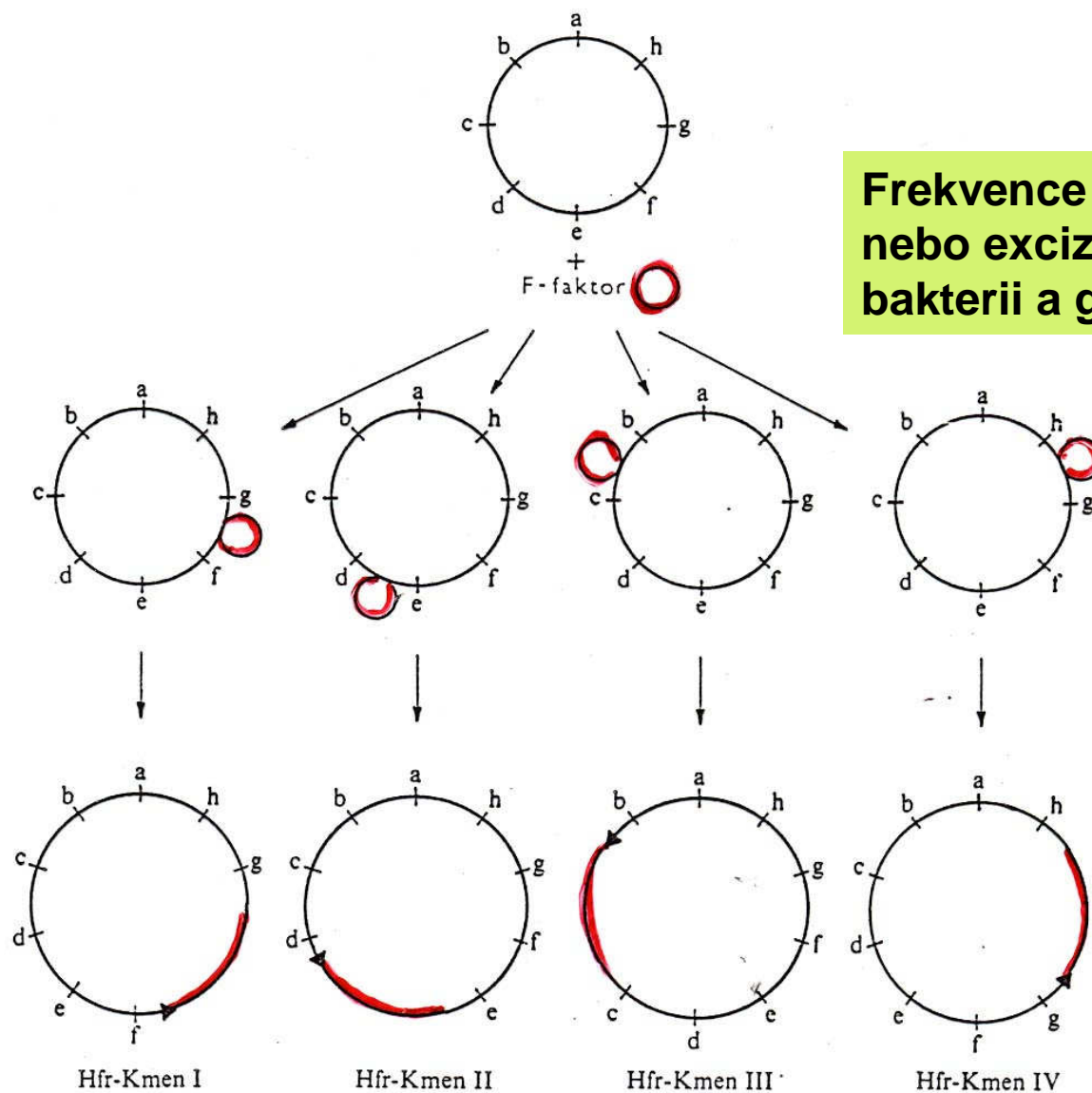
$F^- = \text{Leu}^- \text{Str}^R$

Rekombinanty
= $\text{Leu}^+ \text{Str}^R$



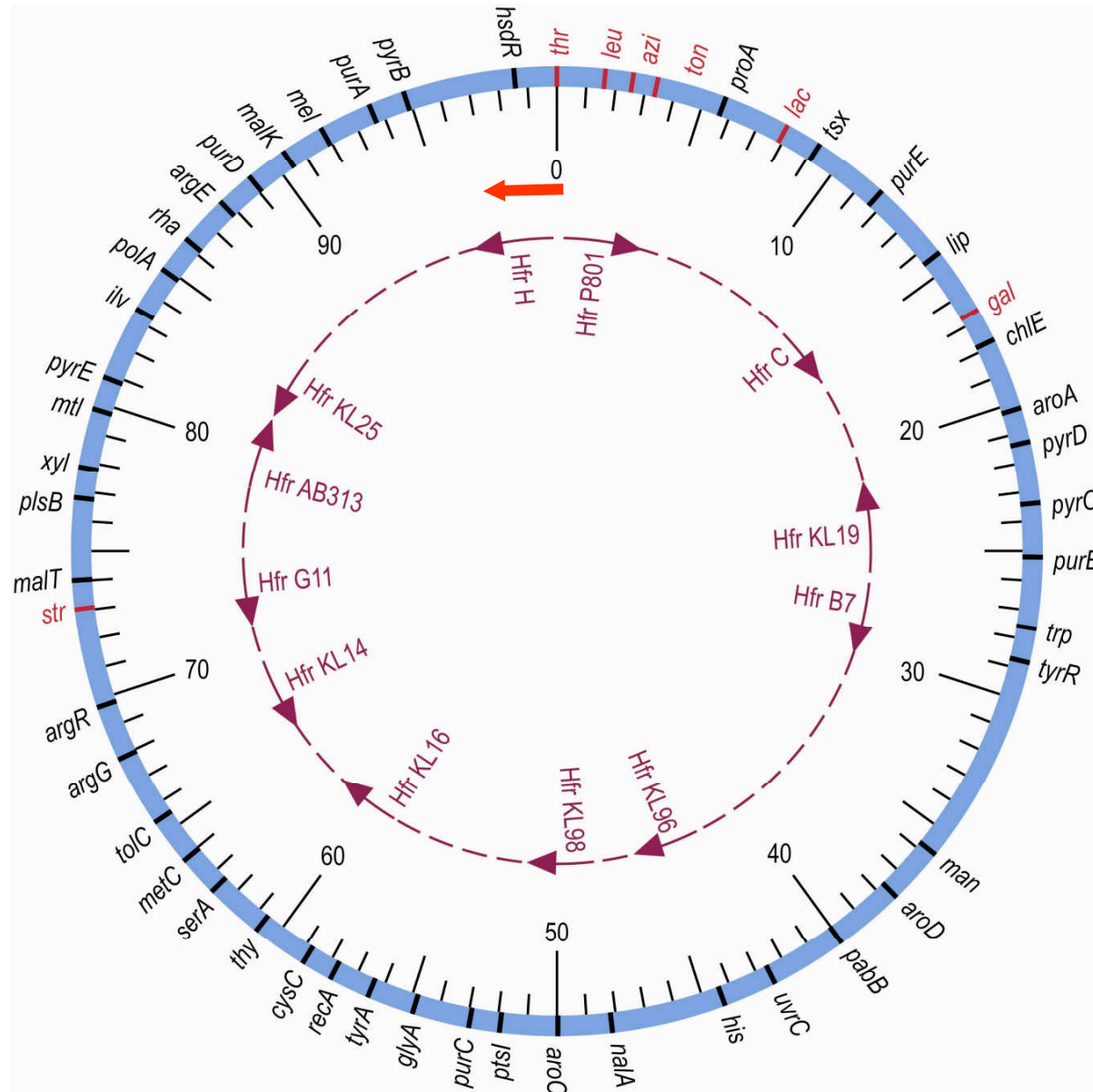
Místa na minimální půdě vyznačující se hustým nárůstem představují rekombinanty $\text{Leu}^+ \text{Str}^R$, které vznikly konjugací buněk F^- s buňkami Hfr přenesenými na plotnu razítkem

Vznik kmenů Hfr začleněním F plazmidu do různých míst chromozomu E. coli. Začlenění probíhá v místech IS.



Obr. 64. Mechanismus vzniku různých typů Hfr-kmenů (viz text)

Místa začlenění F-plazmidu do chromozomu *E. coli*



TABULKA 35

POŘADÍ GENŮ NA CHROMOZÓMU NĚKTERÝCH KMENŮ Hfr.

Podle Stenta (1971)

Kmen Hfr	Pořadí přenosu genů
HfrH	O-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly-str-mal-xyl-mtl-ile-met-thi
Hfr1	O-leu-thr-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro-ton-azi
Hfr2	O-pro-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac
Hfr3	O-pur-lac-pro-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal
Hfr4	O-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro-ton-azi-leu-thr
Hfr5	O-met-thi-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly-str-mal-xyl-mtl-ile
Hfr6	O-ile-met-thi-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly-str-mal-xyl-mtl
Hfr7	O-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro

Přenos genů probíhá v definovaném pořadí, může probíhat v obou směrech, a probíhá konstantní rychlostí 45 kb/minutu. Celý chromozom *E. coli* se přenesse za 100 minut.

Sledování frekvence rekombinant při použití různých kmenů Hfr

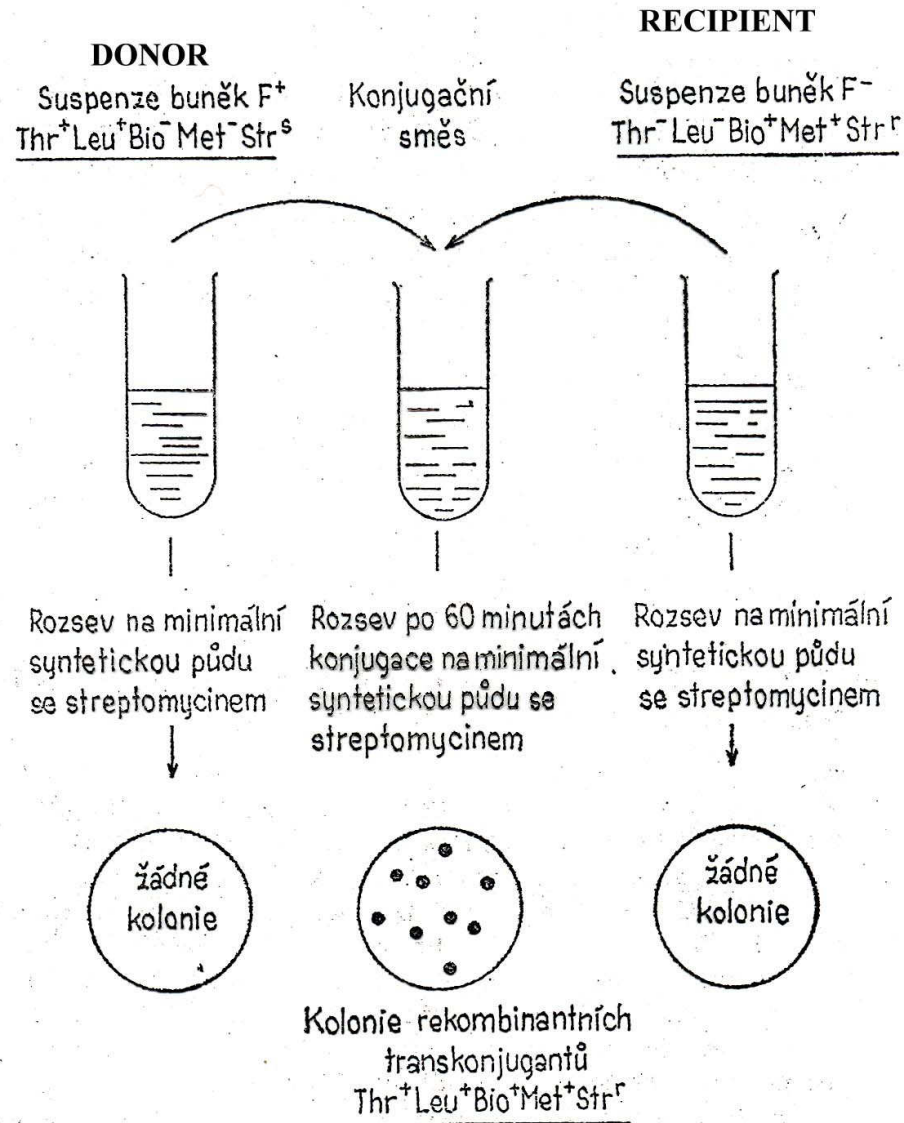
Závěry, které vyplynuly z prvních experimentů

- 1. Počet rekombinant přibývá s dobou trvání konjugace, lineárně až po dosažení vrcholu.**
- 2. Různé markery jsou přenášeny s různou frekvencí, když byly srovnány stejné doby trvání konjugace.**

Přenos z Hfr do F- probíhal řízeným způsobem (geny měly své přesné pořadí a přesný čas přenosu). Přenos chromozomu probíhal od pevného místa (ori) orientovaně)

Závěr: pokud probíhá přenos chromozomu konstantní rychlostí, je doba přenosu genů úměrná vzdálenosti mezi nimi. To umožnilo použít minuty jako jednotky genové mapy.

Křížení kmene F+ a F-

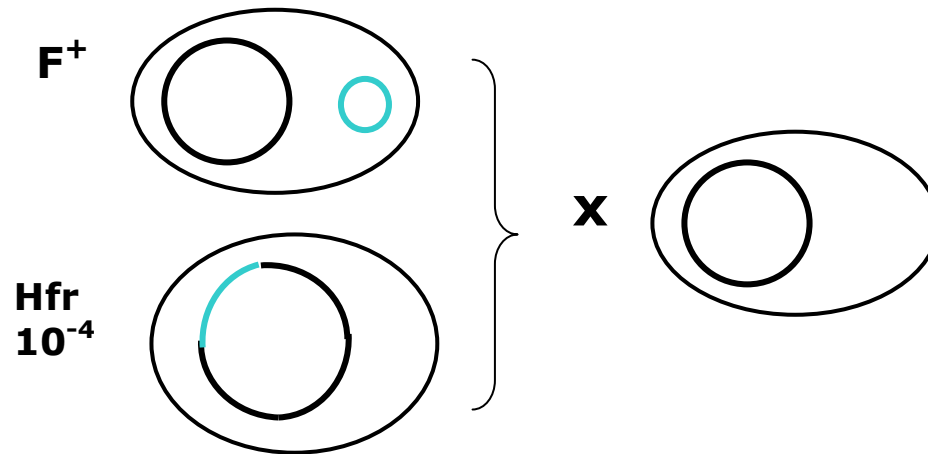


Za vznik rekombinantů jsou zodpovědné buňky Hfr

Křížení kmenů F^+ x F^-

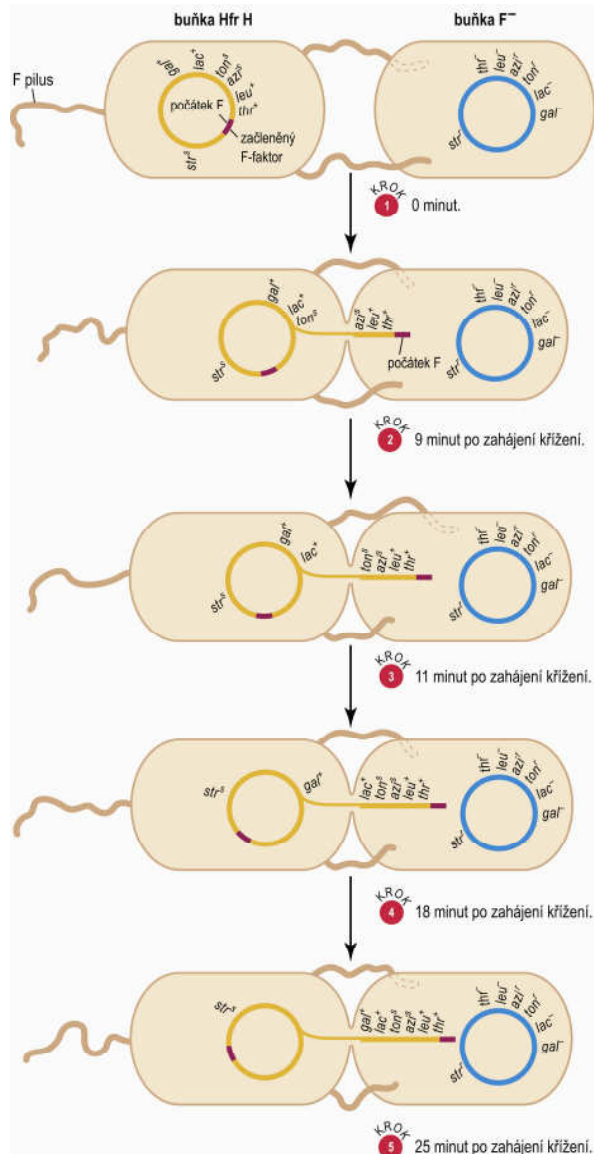
Populace buněk F^+

buňky F^-



1. V populaci buněk F^+ je nízká proporce buněk Hfr , v nichž je F -plazmid začleněn do různých míst chromozomu
2. Volný F -plazmid se přenáší do F^- buněk za vzniku buněk F^+
3. Z buněk Hfr se přenáší část chromozomu do F^- buněk za vzniku rekombinant
4. Dochází k superinfekci rekombinant F plazmidem, v důsledku čehož výsledné rekombinanty obsahují F -plazmid

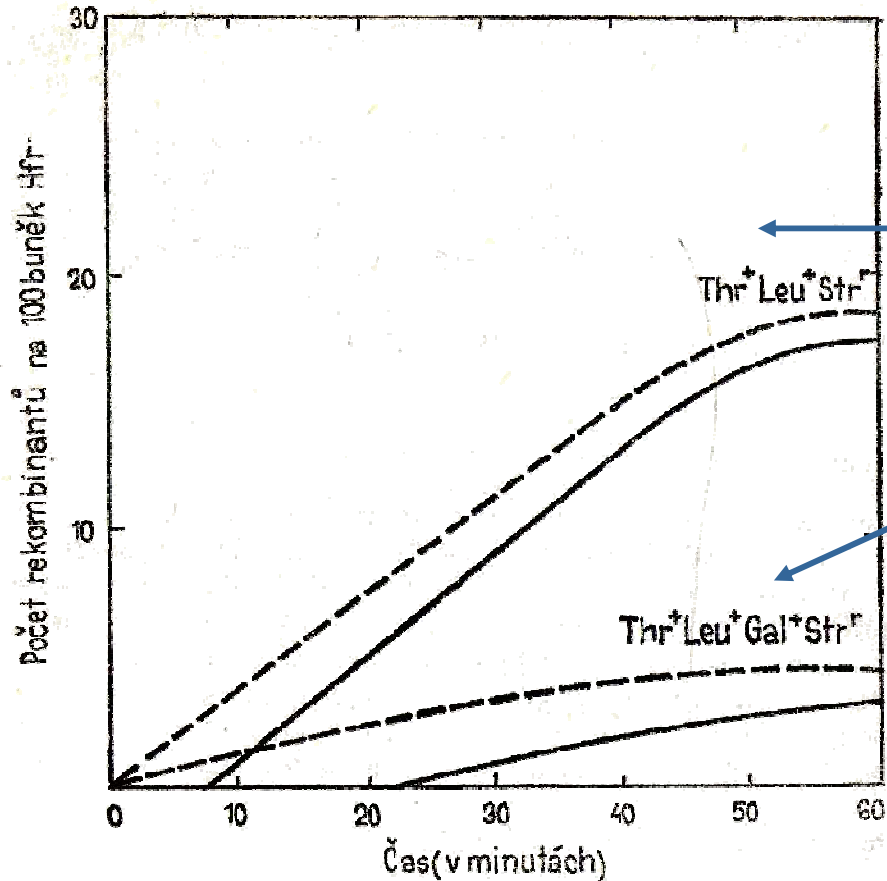
Křížení přerušovanou konjugací



Charakteristika přenosu:

1. Přenos začíná od oriT na F-plazmidu
2. Chromozomální geny jsou přenášeny v lineárním pořadí od oriT
3. Doba přenosu genů je úměrná jejich vzdálenosti od oriT
4. Pravděpodobnost přenosu genů klesá s jejich vzdáleností od oriT
5. Pravděpodobnost začlenění genů přenesených z donora do chromozomu recipienta je pro všechny přenesené geny stejná

Kinetika přenosu markerů při přerušované a nepřerušované konjugaci; - - - - - nepřerušovaná k., ——— přerušovaná k.



Po přenosu do recipientní buňky mají všechny geny stejnou pravděpodobnost začlenění do chromozomu (vyjma prvních 1-2')

Geny thr a leu přenášené jako první (vysoká pravděpodobnost přenosu)

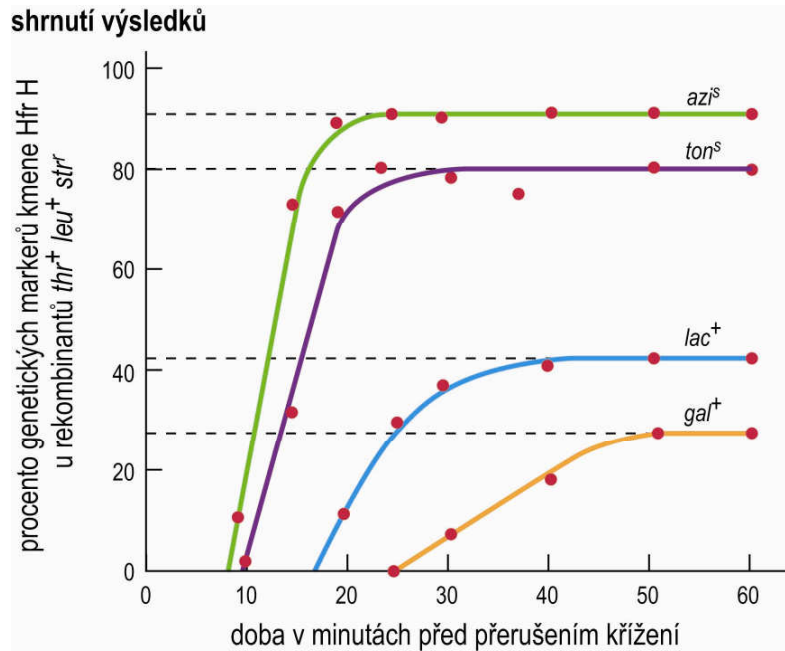
Gen gal a další přenášené později (nízká pravděpodobnost přenosu)

Křivky vycházejí ze sledování průběhu konjugace v populaci



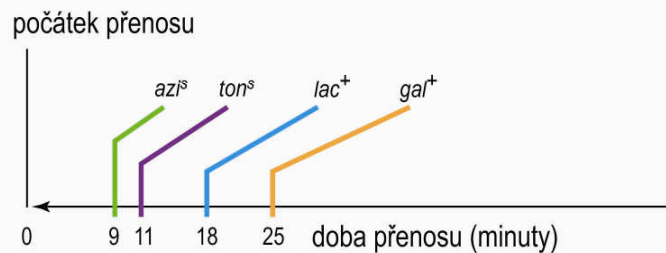
Geny, které se nezačlení

Četnost neselektovaných markerů u rekombinant $thr^+ str^R$ při **přerušované** konjugaci jako funkce časového intervalu, v němž bylo křížení přerušeno



(a)

interpretace výsledků



(b)

Konkrétní příklad nepřerušované konjugace

Křížení:

HfrH Leu⁺Pro⁺Lac⁺Gal⁺Trp⁺Str^s x F⁻ Leu⁻Pro⁻Lac⁻Gal⁻Trp⁻Str^r

Selekce jednotlivých kategorií rekombinantů se provede na minimální půdě se streptomycinem a doplněné takto:

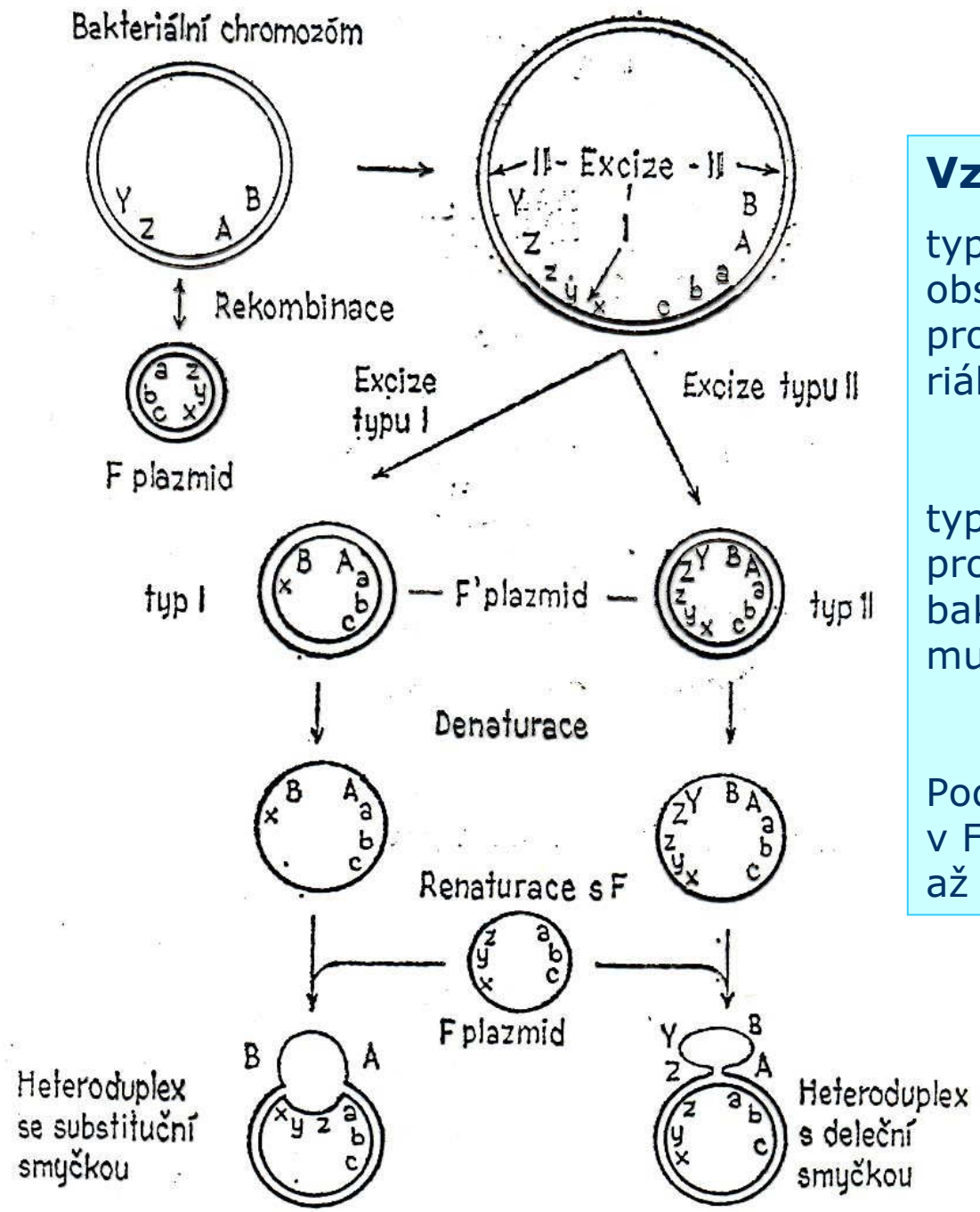
<u>REKOMBINANTI</u>	<u>Půda</u>	<u>FREKVENCE REKOMBINANTŮ</u>
1. Leu ⁺ Str ^r	: + pro, glu, trp	0,20
2. Pro ⁺ Str ^r	: + leu, glu, try	0,15
3. Lac ⁺ Str ^r	: + leu, pro, lak, trp	0,13
4. Gal ⁺ Str ^r	: + leu, pro, gal, trp	0,078
5. Trp ⁺ Str ^r	: + leu, pro, glu	0,044

FREKVENCE REKOMBINANTŮ = $\frac{\text{počet rekombinantů daného typu}}{\text{počet buněk Hfr}}$

Odvozené pořadí genů na chromozomu kmene HfrH:

O-leu-pro-lac-gal-trp

Donorové a recipientní buňky se smíchají, inkubují 60 minut a vysejí na plotny



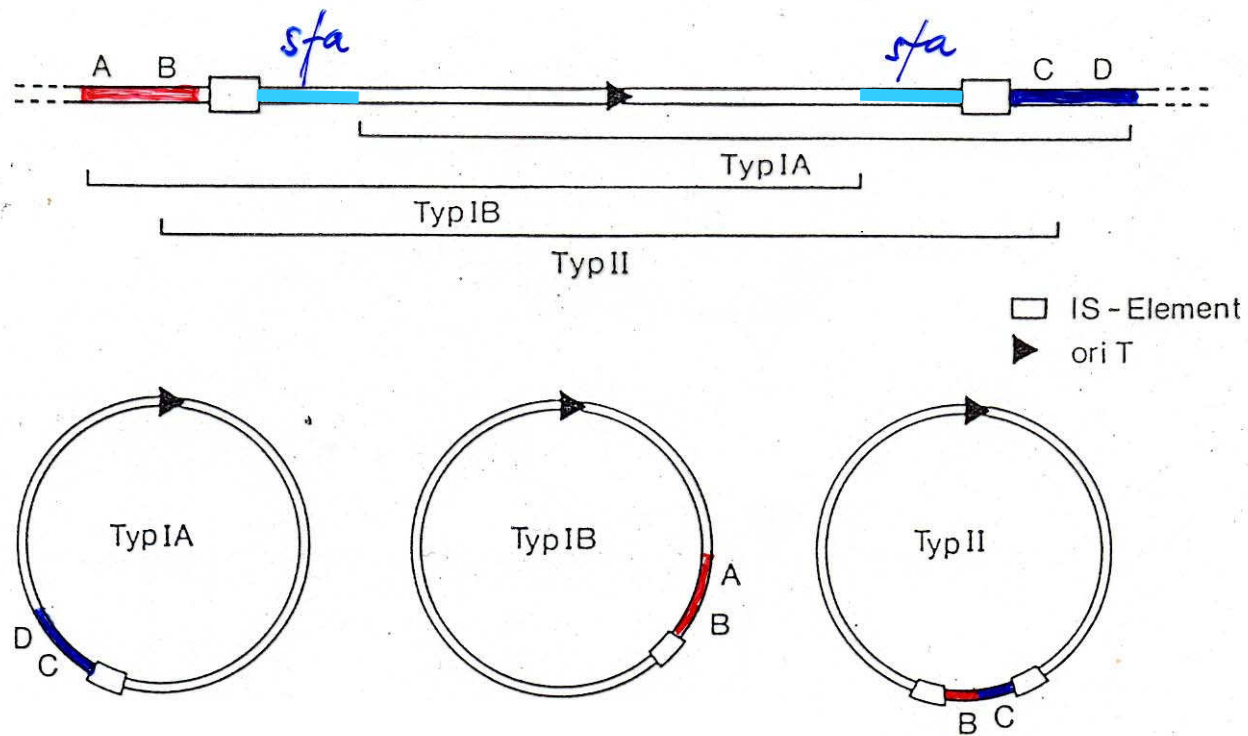
Vznik plazmidů F'

typ I (IA n. IB) - plazmid obsahuje distální nebo proximální část bakteriálního chromozomu

typ II - plazmid obsahuje proximální i distální část bakteriálního chromozomu

Podíl chromozomové DNA v F' plazmidu může činit až 30%

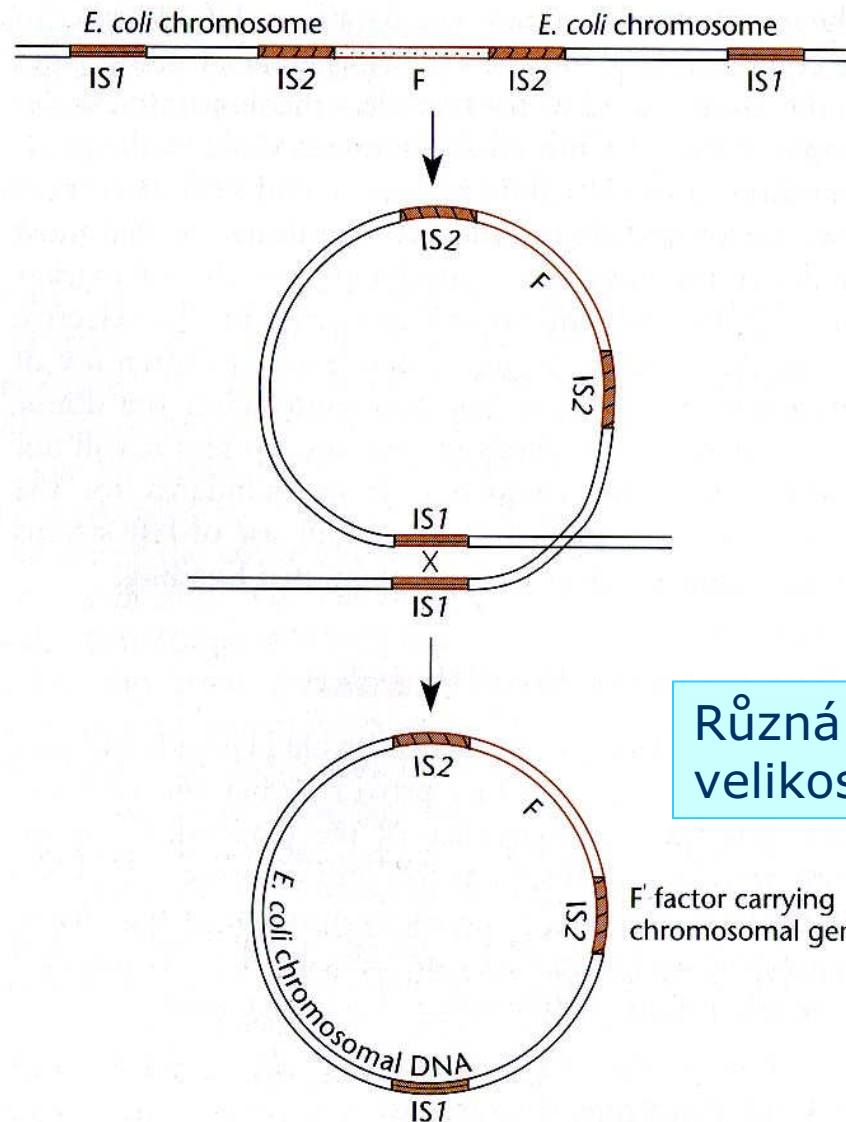
Vznik plazmidů F'



v chromozomu zůstává část F plazmidu

sfa = Sex factor affinity

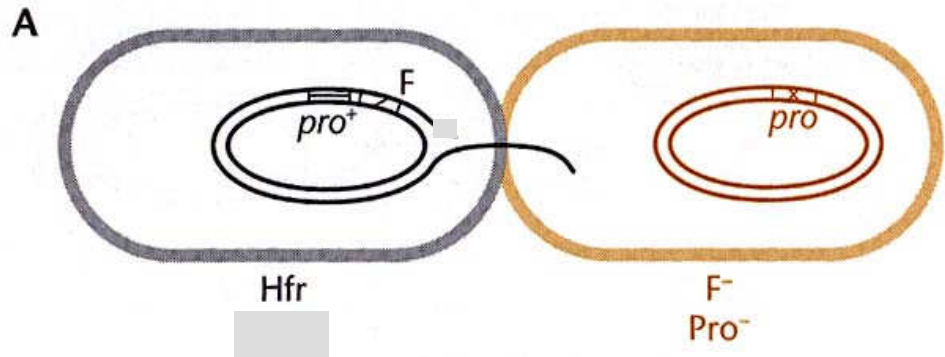
VZNIK F' PLAZMIDŮ HOMOLOGNÍ REKOMBINACÍ MEZI IDENTICKÝMI IS ELEMENTY



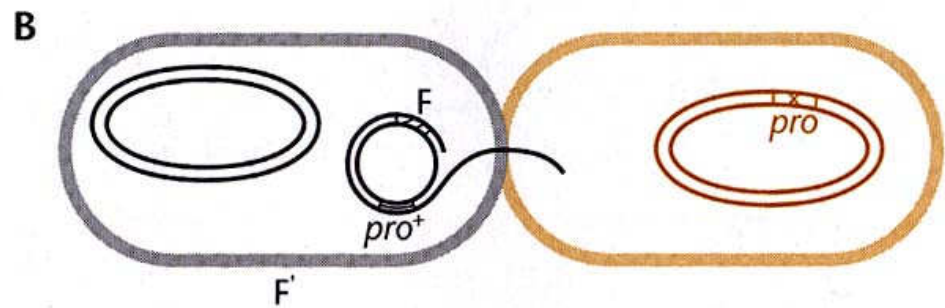
Různá konstituce a velikost F' plazmidů

F' factor carrying chromosomal genes

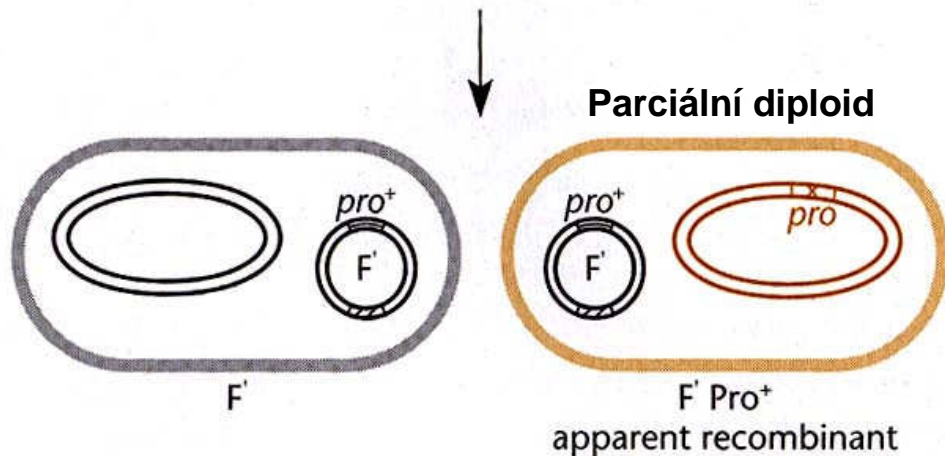
SELEKCE F' PLAZMIDU NA ZÁKLADĚ ČASNÉHO PŘENOSU **pozdního** MARKERU



A. Kmen Hfr přenášejí gen *pro* jako pozdní marker. Při křížení s kmenem F- bude gen *pro* přenášen zhruba po 60 minutách.



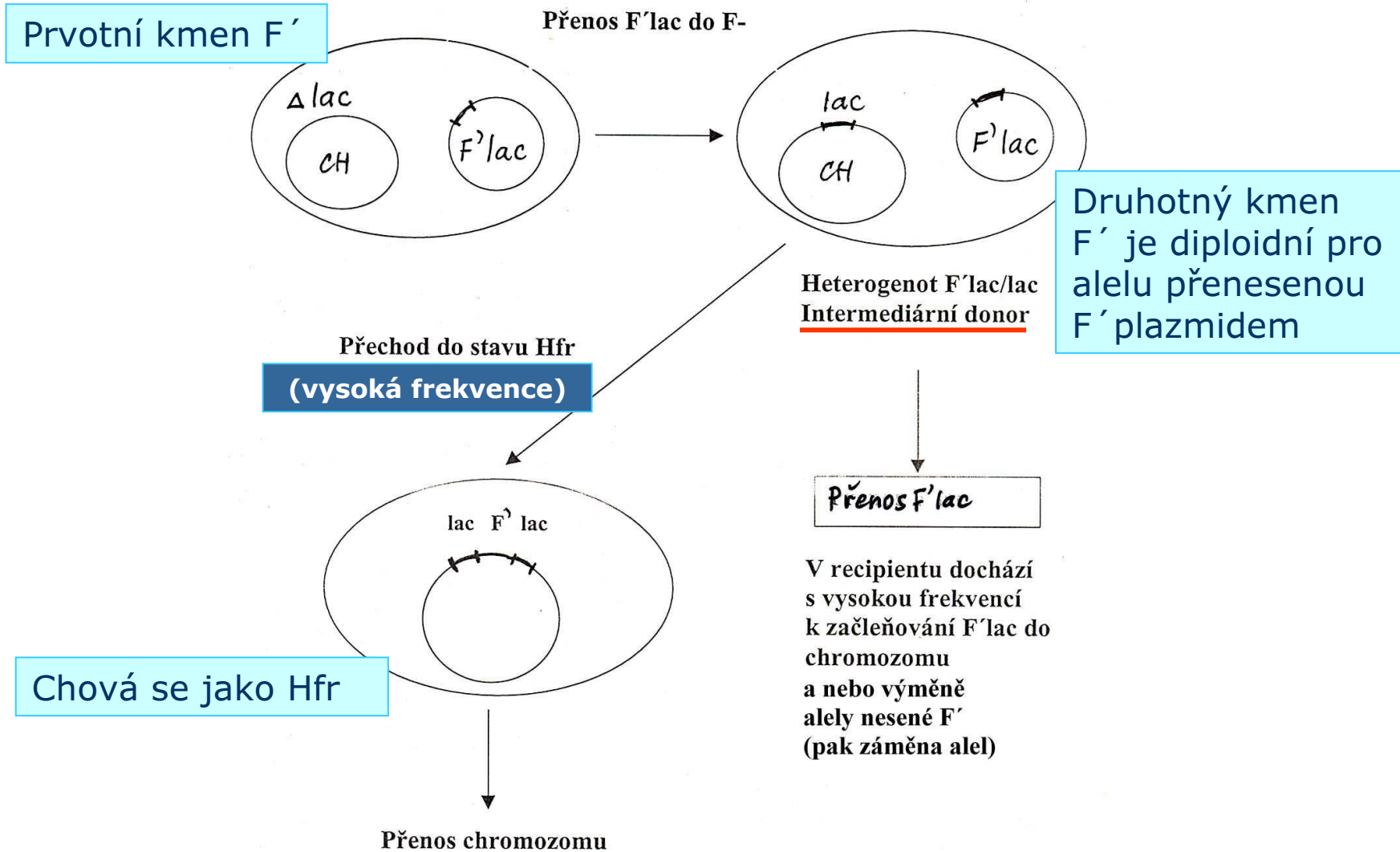
B. Vznik F' plazmidu se začleněným genem *pro*. Při křížení s kmenem F- bude F' *pro* přenesen během 5 minut. Výsledný **zdánlivě rekombinantní** kmen bude schopen gen *pro* dále přenášet při vysoké frekvenci



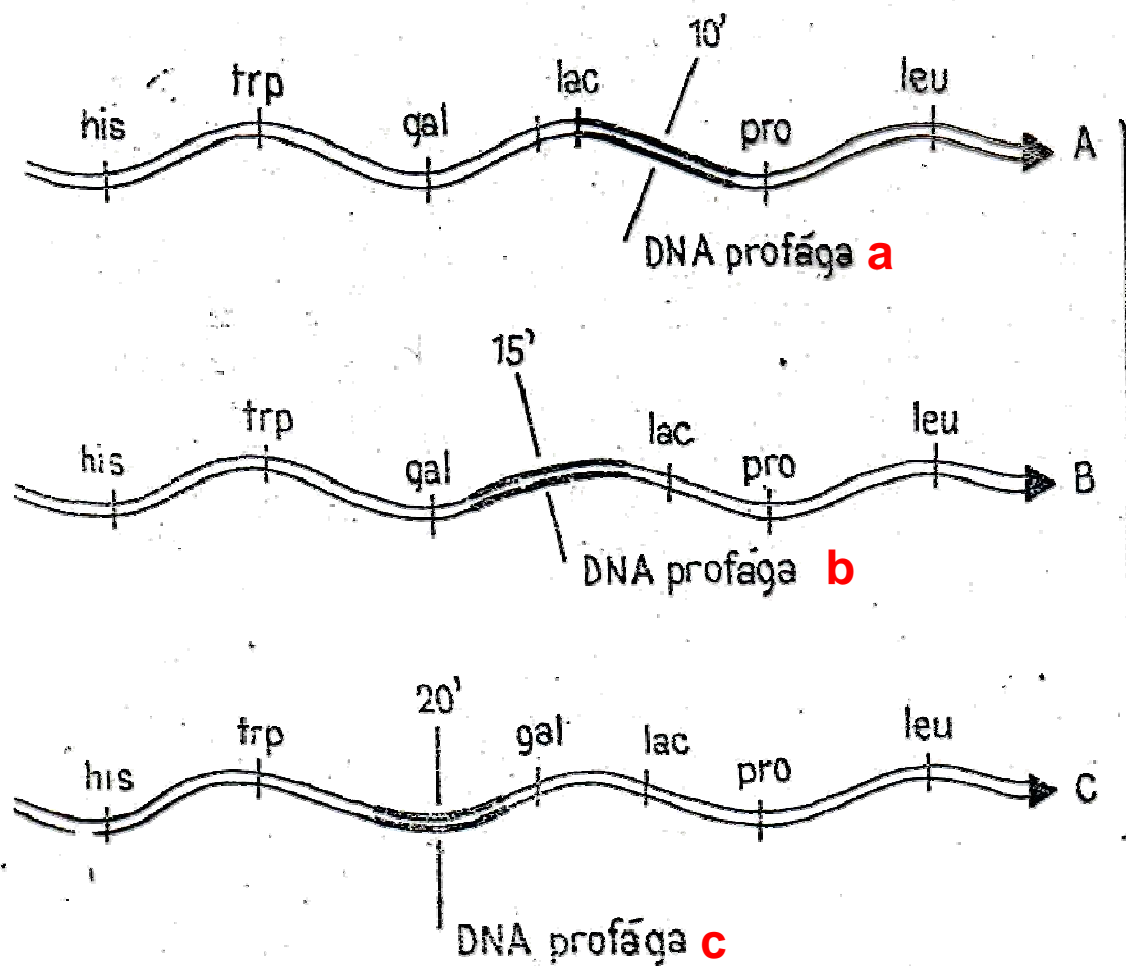
**Další možnost:
použití recipienta
recA⁻**

Citliví k fágu M13

VZNIK DRUHOTNÝCH KMENŮ F'



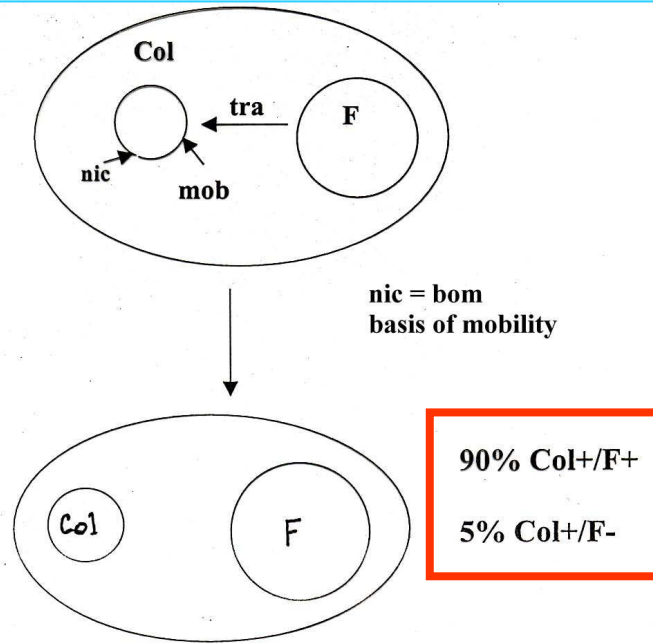
ZYGOTICKÁ INDUKCE



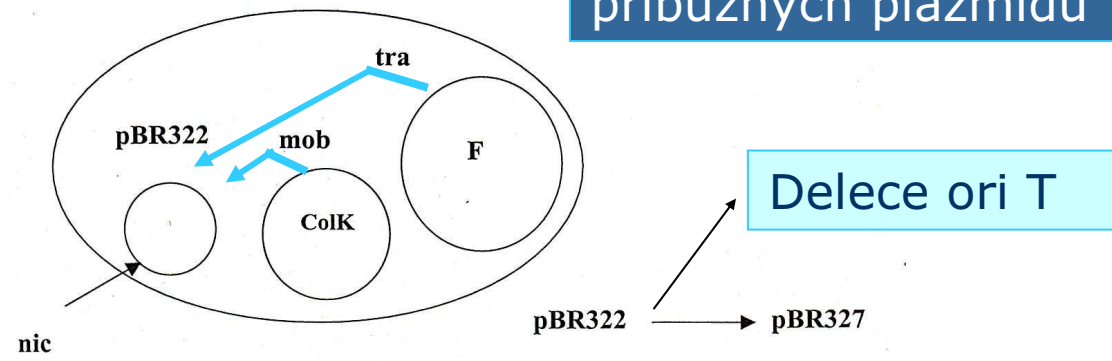
Chromozómy kmene
Hfr H s různým
umístěním profága

MOBILIZACE NEKONJUGATIVNÍCH PLAZMIDŮ DONACÍ

- Nedochází k fyzickému kontaktu plazmidů

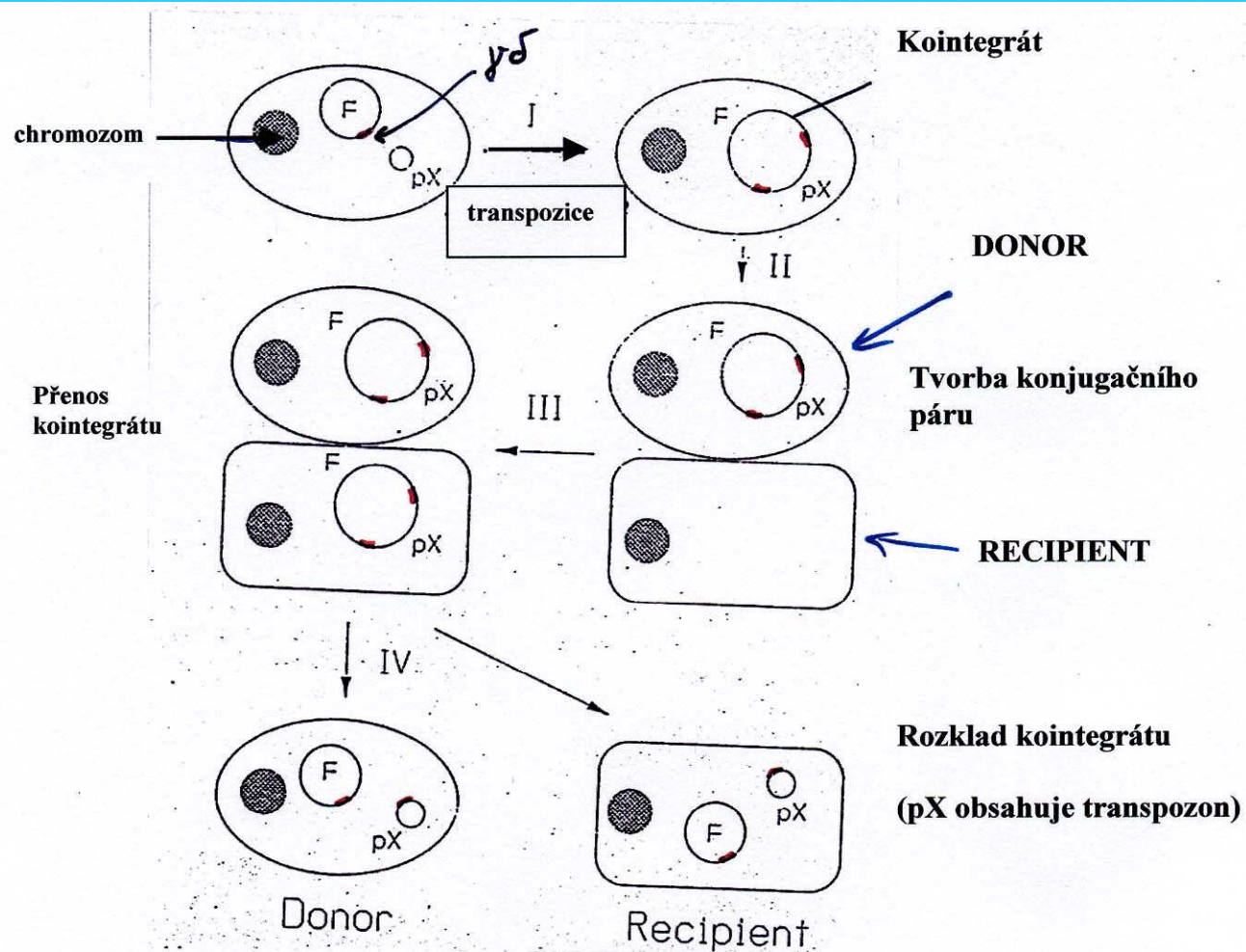


Mobilizace prostřednictvím příbuzných plazmidů



Mobilizace plazmidů kondukci

- dochází k fyzickému kontaktu obou plazmidů



pX = plazmid nemobilizovatelný donací

Salmonella: mají řadu svých plazmidů, často fin+. Po jejich odstranění se do salmonely vnesly F plazmidy.

U *S. typhimurium* se F včleňuje jen do jednoho místa (místo sfa, jehož původ není znám)

Pseudomonas: divergentní skupina druhů a kmenů, má řadu konjugačních systémů, samopřenositelných nebo mobilizovatelných. Plazmid FP2 může mobilizovat chromozom v jednom směru z jediného chromozomového místa. Byly popsány jiné plazmidy, mobilizující od jiných míst. Mechanismus mobilizace není znám.

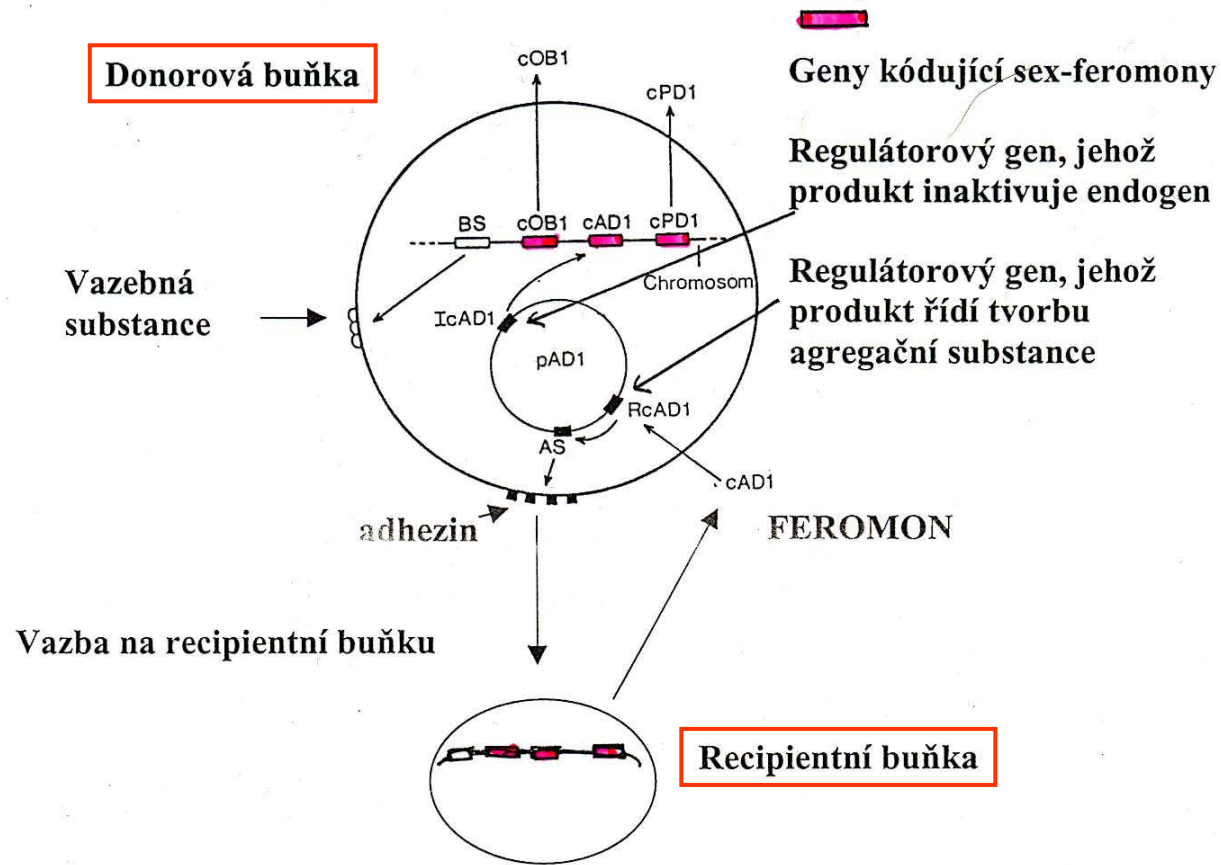
Konjugace u G+ bakterií

Konjugační přenos je znám u mnoha rodů: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* a *Streptomyces*.

Podobně jako u G- bakterií mohou být plazmidy přenášeny i mezi rody a druhy.

Model konjugativního přenosu plazmidů u
Streptococcus faecalis

Enterococcus (Streptococcus) faecalis



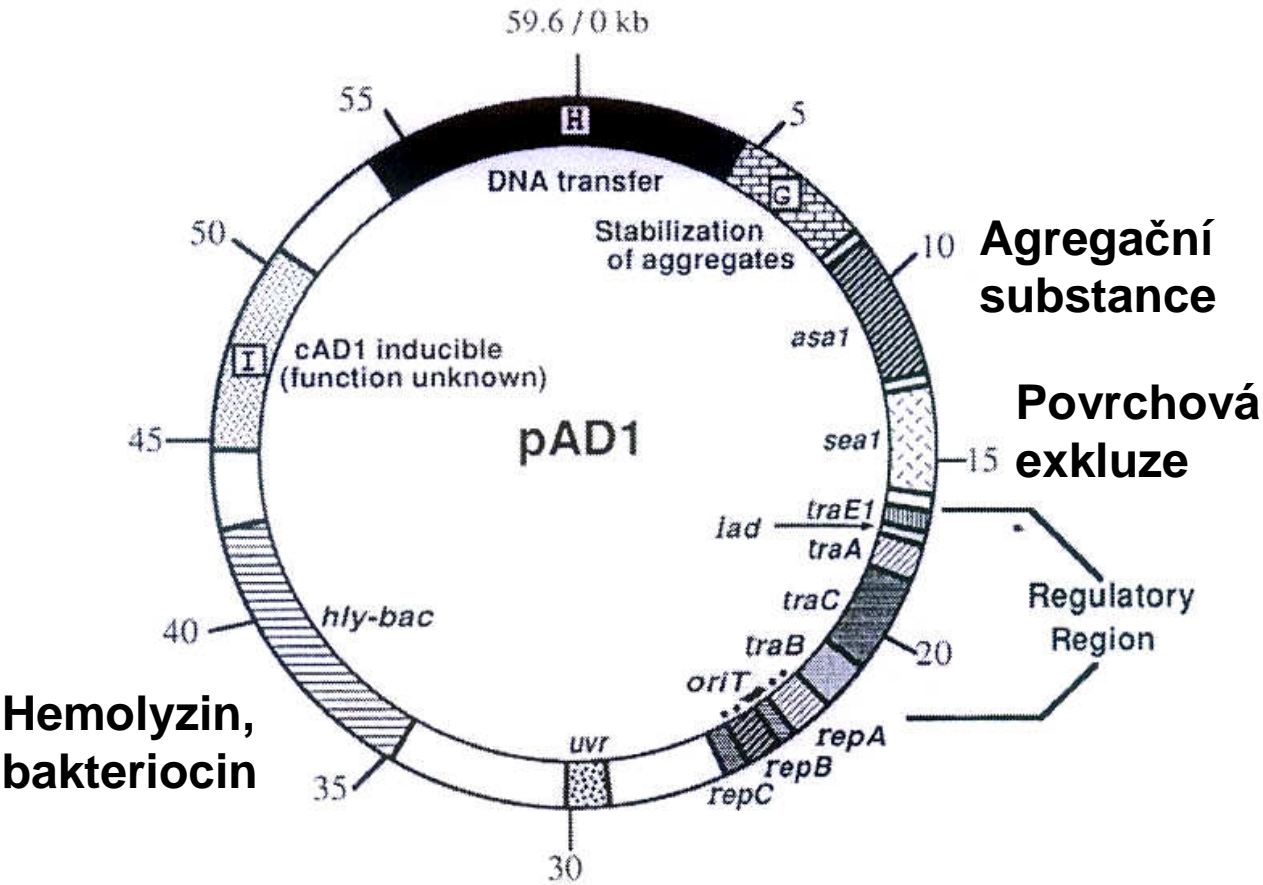
Feromony = hydrofobní okta- nebo heptapeptidy odvozené úpravami signálních sekvencí lipoproteinových prekurzorů (7-8 aa z C-konce)

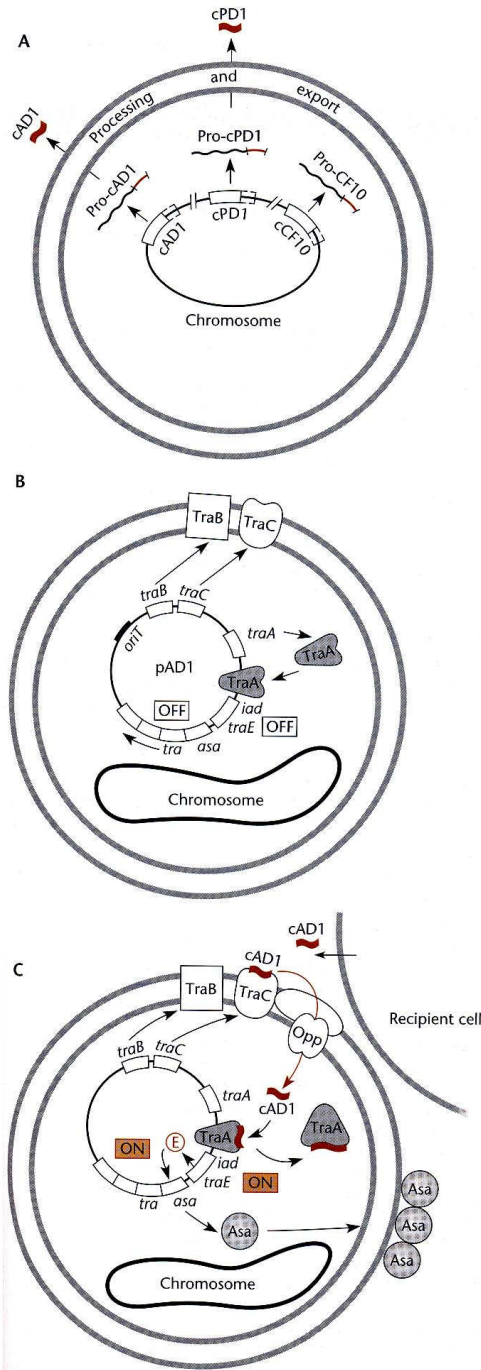
sex-feromony streptokoků

Plazmid	Velikost (kb)	Feromon
pAD1	59,6	cAD1
pOB1	71	cOB1
pPD1	54	cPD1
pAM γ 1	60	cAM γ 1
pAM γ 2	~ 60	cAM γ 2
pAM γ 3	~ 60	cAM γ 3
pAM373	36	cAM373
pCF10	54	cCF10

- * Jeden kmen může tvořit více druhů feromonů a získávat tak různé plazmidy.
- * Plazmidy nesou geny pro tvorbu virulenčních faktorů, bakteriocinů a rezistence k antibiotikům
- * Plazmidy mohou být přenášeny do jiných druhů bakterií (*Staphylococcus*)

Struktura plazmidu pAD1 (~60 kb)

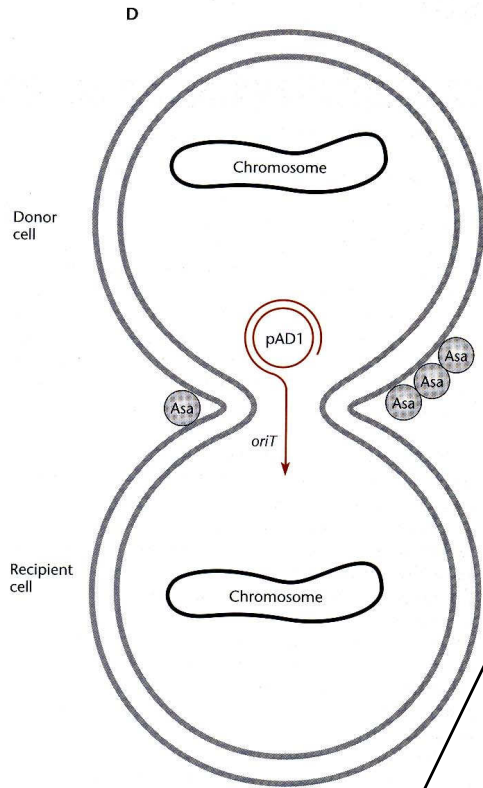




A. Recipientní buňka tvoří feromony: geny pro feromony jsou umístěny na chromozomu. Feromony vznikají odštěpením signálních sekvencí z proferomonů (Pro-cAD1) při jejich exportu z buňky. „Quorum sensing“. Na povrchu se vytváří binding substance (BS).

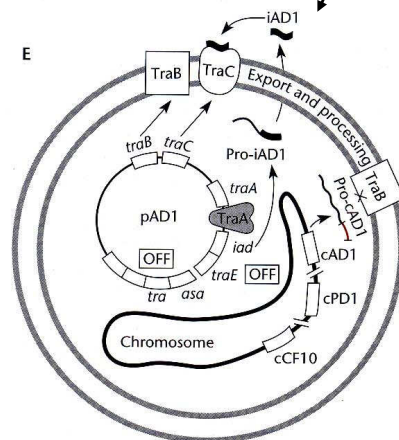
B. Donorová buňka: nese plazmid exprimující protein TraA (repressor), který reprimuje transkripci tra genů vyjma traC, který kóduje povrchový protein TraC (receptor) zachytávající feromon.

C. Indukce párování. Feromon se váže na TraC na povrchu donora a vstupuje do buňky, kde se váže na repressor TraA, tím jej inaktivuje a navozuje tvorbu TraE, který pak aktivuje expresi tra genů včetně genu asa kódujícího agregační substanci (Asa) Asa – faktor virulence



D. Přenos plazmidu. Donorová a recipientní buňka navážou kontakt a plazmid se přenes za vzniku transkonjuganta.

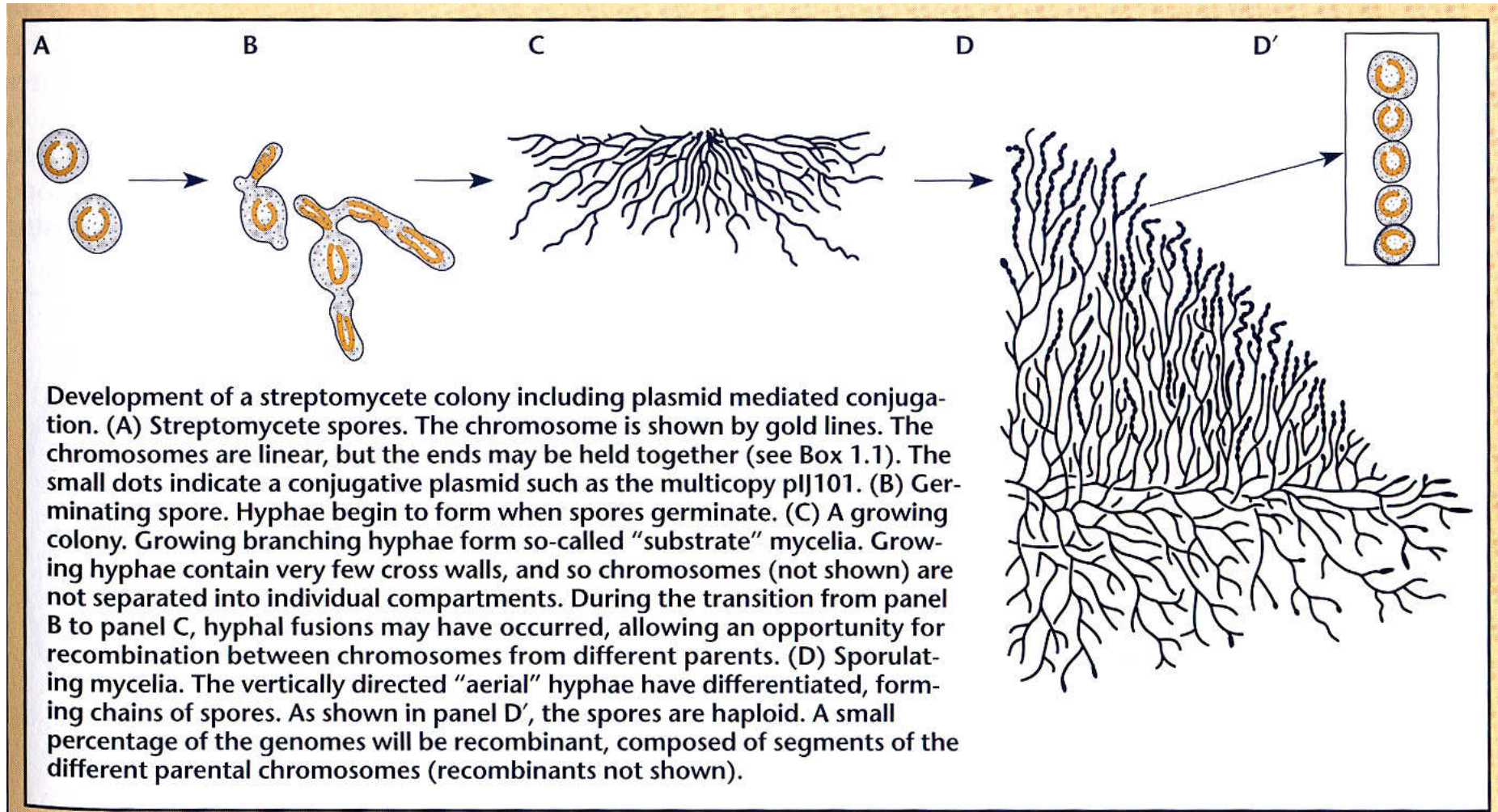
E. V recipientní buňce (transkonjugantu) se přestává vytvářet zralý feromon. Inhibitorový peptid iAD1 se váže na TraC a zabraňuje párování dvou donorových buněk. TraB je inhibitorový protein, který brání exkreci feromonu.



Mechanismy zábrany příjmu homologního plazmidu:

- 1. Tvorba povrchových proteinů - exkluze vstupu**
- 2. Tvorba peptidů (iAD1) zabraňujících vazbě feromonu**
- 3. Tvorba proteinů (TraB) - zábrana úpravy proferomonu a jeho exkrece**

KONJUGACE U STREPTOMYCET



SPECIFICKÉ RYSY KONJUGATIVNÍHO PŘENOSU U STREPTOMYCET

- Konjugace nevyžaduje plazmidově-kódované geny pro kontakt buněk (hyf)
- Není známo, zda přenos plazmidů nebo chromozomové DNA vyžaduje jednořetězcový zlom, a zda se přenáší jednořetězec
- Chromozomy se přenášejí obousměrně, aniž v nich je plazmid začleněn: není pozorován gradient přenosu chromozomových genů
- Plazmid pIJ101 kóduje jen jeden Tra-protein, který asi napomáhá přenosu DNA mezi hyfy. Po přenosu se plazmid velmi rychle v hyfech šíří.

Letální zygoza – inhibice růstu recipientních buněk, do nichž byl konjugací přenesen plazmid – v okolí kolonie tvořené donorovou buňkou vznikají na nárůstu recipientních buněk pocky (pocks)

Závěry, které vyplynuly z prvních experimentů

- 1. Počet rekombinant přibývá s dobou trvání konjugace, lineárně až po dosažení vrcholu.**
- 2. Různé markery jsou přenášeny s různou frekvencí, když byly srovnány stejné doby trvání konjugace.**

Přenos z Hfr do F- probíhal řízeným způsobem (geny měly své přesné pořadí a přesný čas přenosu). Přenos chromozomu probíhal od pevného místa (ori) orientovaně)

Závěr. pokud probíhá přenos chromozomu konstantní rychlostí, je doba přenosu genů úměrná vzdálenosti mezi nimi. To umožnilo použít minuty jako jednotky genové mapy.