

Konjugace

.

Pozoruhodnou vlastností mnoha plasmidů

- je jejich schopnost přenášet se z jedné buňky do druhé procesem, který nazýváme **konjugace**.
- Donorová buňka **F+** je buňka, která obsahuje plasmid, který se přenáší
- **Recipientní** buňka **F-** je buňka, do které se plasmid přenáší
- Podobně rozlišujeme donorový a recipientní kmen nebo donorovou a recipientní kulturu.
- Recipientní buňka, která získala DNA konjugací se nazývá **transkonjugant** nebo **konjugant**.

Jakákoliv bakterie nesoucí konjugativní plasmid

- je potenciální donor plasmidu,
- protože může dojít k jeho přenosu do dalších bakterií, které plasmid neobsahují.
- Jakékoliv bakterie, co nenesou plasmid
- jsou potenciálním recipientem plasmidu
- Donory plasmidu bývají označovány jako **male**.

Konjugující buňky

- Bývají označovány jako rodičovské

Konjugativní plasmidy jsou nejvíce prostudovány

- U G- bakterií rodu *Escherichia* a *Pseudomonas*
- U G+ bakterií rodu *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* a *Streptomyces*
- Konjugativní (nebo mobilizovatelné) plasmidy pravděpodobně mají všechny bakterie
- Přenášejí se mezi buňkami jednoho druhu

Plasmidy promiskuitní

- Se mohou přenášet mezi nepříbuznými druhy
- Např. plasmid pKM101 (IncN), plasmid RP4 (IncP)
- Plasmidy IncP skupiny se mohou přenášet do všech G- baktérií a s nízkou frekvencí i do G+ baktérií (*Streptomyces*)
- Byl popsán i plasmid přenášející se z *E. coli* do kvasinek.
- Tyto přenosy jsou významné evolučně.

Velikost konjugativních plasmidů *E. coli*

- Konjugativní plasmidy bývají velké – nesou hodně genů, nezbytných pro konjugaci.
- Nazývají se *tra* geny (podmiňují přenos DNA z jedné buňky do druhé)
- U plasmidu pKM101 je známo 11 genů *tra*

Pro všechny konjugativní plasmidy je společné to

- že jsou na nich umístěny geny, které podmiňují přenos plasmidu z donorové buňky do recipientní (transferové *tra* geny)
- Ovlivňují fenotyp buňky tím, že kódují syntézu vláken označovaných jako **pilusy**
- Prostřednictvím těchto vláken se donorové buňky spojují s recipientními

Konjugační proces začíná

- interakcí **pilusů** donorové buňky se specifickými receptory proteinové povahy v povrchu recipientních buněk
- **Při této interakci dojde** k těsnému přiblížení buněk a ke vzniku otvoru v donorové i recipientní buňce
- Tímto otvorem přechází plasmid z donorové buňky do recipientní a to tak, že současně dochází k replikaci přenášeného plasmidu, během níž 1 kopie plasmidu zůstává v donorové buňce a druhá přechází do recipientní.

Geny *tra* kódují mj.

- syntézu proteinu pilinu,
- z něhož jsou tvořeny pilusy
- Na 1 buňku *E. coli* připadá asi 1-10 pilusů
- Vnitřek pilusu tvoří dutina o průměru asi 2.5 až 3 nm

Různá morfologie pilusů

- Pilus kódovaný plasmidem pKM101 je dlouhý a rigidní,
- pilus F plasmidu je dlouhý a flexibilní,
- pilus plasmidu RP4 je krátký a rigidní.
- Některé pili slouží pro adsorpci fágů na povrch buňky (F specifické fagy, male specifické fagy)

Pro konjugační proces je nezbytná

- Ori T (transfer) sekvence na DNA konjugativního plasmidu
- (!sekvence odlišná od *oriV*, počátku replikace)

Ori T sekvence a začátek přenosu

- Je rozpoznávána **endonukleázou** (produkt *tra* genu)
- *oriT* plasmidu F je menší než 300 bp, obsahuje invertované repetice a je bohatá na AT
- Endonukleáza rozštěpí DNA v jednom řetězci
- V tomto místě začíná působit **helikáza** (další produkt *tra* genu), která rozmotává řetězce.
- Jeden řetězec plasmidové DNA se **5 koncem** začne přenášet do recipientní buňky
- Protože se tento konec uvolňuje po naštěpení endonukleázou v místě *ori* vždy na stejném místě, je počátek, kterým vstupuje řetězec plasmidové DNA do recipientní buňky vždy stejný.

Mechanismus přenosu DNA během konjugace. Přenos 1 řetězce z donorové buňky do recipientní (Snyder 1997)

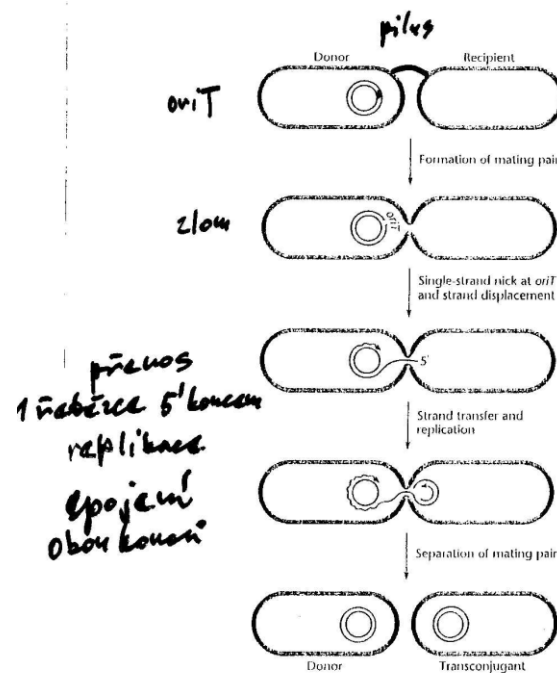


Figure 5.2 Mechanism of DNA transfer during conjugation. The donor cell produces a pilus, which is encoded by the plasmid and contacts a potential recipient cell that does not contain the plasmid. Retraction of the pilus brings the cells into close contact, and a pore forms in the adjoining cell membranes. Formation of the mating pair signals the plasmid to begin transfer from a single-stranded nick at *oriT*. The nick is made by plasmid-encoded *tra* functions. The 5' end of a single strand of the plasmid is transferred to the recipient through the pore. During transfer, the plasmid in the donor is replicated, its DNA synthesis being primed by the 3' OH of the *oriT* nick. Replication of the single strand in the recipient proceeds by a different mechanism with RNA primers. Both cells now contain double-stranded plasmids, and the mating pair separates.

Během konjugace dochází k replikaci plasmidu

- Nepřenesený řetězec v donorové buňce je matricí pro syntézu komplementárního řetězce, který se syntetizuje **kontinuálně**.
- Podle řetězce vytěsňovaného z kružnice do recipientní buňky se syntetizuje **diskontinuálně nové vlákno DNA**,
- jeho replikace je katalyzována DNA-polymerázou III recipientní buňky.
- V recipientní buňce se potom další replikací vytvoří více kopií téhož plasmidu.

Replikace konjugativních plasmidů během konjugace

- .Obr. Rosypal

Mnoho plasmidů kóduje

- Vlastní primázu
- Primáza se syntetizuje v donorové buňce a
- přenáší se spolu s DNA do buňky recipientní.
- Tak je zabezpečeno, že ihned po přenosu začne syntéza komplementárního vlákna DNA
- Tím, že plasmidy kódují vlastní primázu, se rozšiřuje jejich rozmezí hostitele, protože některé buněčné primázy mohou být odlišné od plasmidových

Transferové geny kódují

- Nukleázu (provede zlom v 1 řetězci DNA)
- Helikázu (separuje oba řetězce)
- Primázu (nezbytnou pro syntézu RNA primeru pro syntézu komplementární DNA)
- Další produkty, které se podílejí na přenosu DNA z buňky na buňku
- Např. proteiny napomáhající přiblížení konců řetězců v recipientní buňce, což je nezbytné pro spojení obou řetězců do kružnicové molekuly.

Výsledkem konjugace

- Jsou 2 buňky – donorová a recipientní (konjugant, transkonjugant), které obě obsahují plasmid

Účinnost přenosu

- Za optimálních podmínek se některé plasmidy mohou přenášet do buněk se 100% účinností (po každém kontaktu)
- U jiných přirozeně se vyskytujících plasmidů dochází k expresi *tra* genů a k přenosu jen po krátkou dobu

Byly popsány geny

- *eex* (entry exclusion)
- Zabraňují vstupu plasmidů se stejnými funkcemi *Tra* do recipientní buňky

U konjugativních plasmidů G+ baktérií

- Se netvoří pili
- Vstup plasmidů do buňky je umožněn tzv. feromony

Produkty genů *tra*

- Mohou působit i na jiné plasmidy v buňce

Mobilizovatelné plasmidy

- Těmto plasmidům chybí některé geny *tra* (asi 10 genů) nutných pro vznik pilusu
- Pro svůj přenos můžou využívat pilusu kódovaného konjugativním plasmidem, jež se nachází ve stejné buňce
- plasmid musí mít pro mobilizaci vlastní *oriT* místo

Plasmidy izolované z přírody

- Mívají *ori T* místo a geny *mob*, jež jsou analogické některým genům *tra*
- *mob* geny např. kódují
- nukleázu, která štěpí *oriT* místo
- helikázu, která odděluje řetězce
- Některé produkty genů *mob* rozšiřují rozmezí hostitele (primáza)

Molekulární mechanismus mobilizace

- Buňka obsahuje dva plasmidy:
- plasmid F (*tra* geny) a plasmid mobilizovatelný (*mob* geny)
- Na obr. je znázorněn přenos mobilizovatelného plasmidu

Schéma přenosu mobilizovatelného plasmidu. Mechanismus mobilizace.

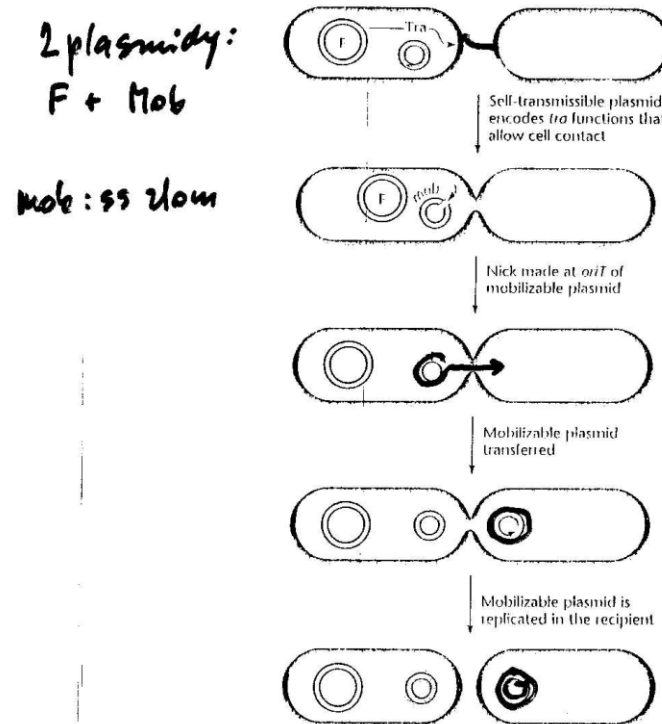


Figure 5.4 Mechanism of plasmid mobilization. The donor cell carries two plasmids, a self-transmissible plasmid, F, which encodes the *tra* functions that promote cell contact and plasmid transfer, and a mobilizable plasmid (blue). The *mob* functions encoded by the mobilizable plasmid make a single-stranded nick at *oriT* in the *mob* region. Transfer and replication of the mobilizable plasmid then occur. The self-transmissible plasmid may also transfer.

Když jeden plasmid mobilizuje druhý

- Obvykle dochází i k jeho přenosu
- Recipientní buňka získá oba plasmidy

Uměle byly zkonstruovány

- Mobilizovatelné plasmidy,
- které obsahují pouze oriT místo
- Využívají se v molekulární biotechnologii
- Jsou menší a proto vhodnější jako vektory pro přenos cizorodé DNA
- Klonované geny jsou spolu s mobilizovatelným plasmidem přenášeny do recipientních buněk

Přenos bakteriálního chromosomu plasmidy

- Plasmidy mohou přenášet i DNA svého bakteriálního hostitele.
- Nezbytné je, aby došlo k integraci plasmidu do bakteriálního chromosomu.

K integraci plasmidu do chromosomu

- dochází homologní rekombinací v místě homologních sekvencí (IS sekvence)
- IS sekvence musí být lokalizovány na plasmidu i v bakteriální DNA
- Takovéto kmeny s integrovaným plasmidem se nazývají **Hfr kmeny** (high frequency of recombination)

Integrace F plasmidu do chromosomu homologní rekombinací. Vznik Hfr buňky.

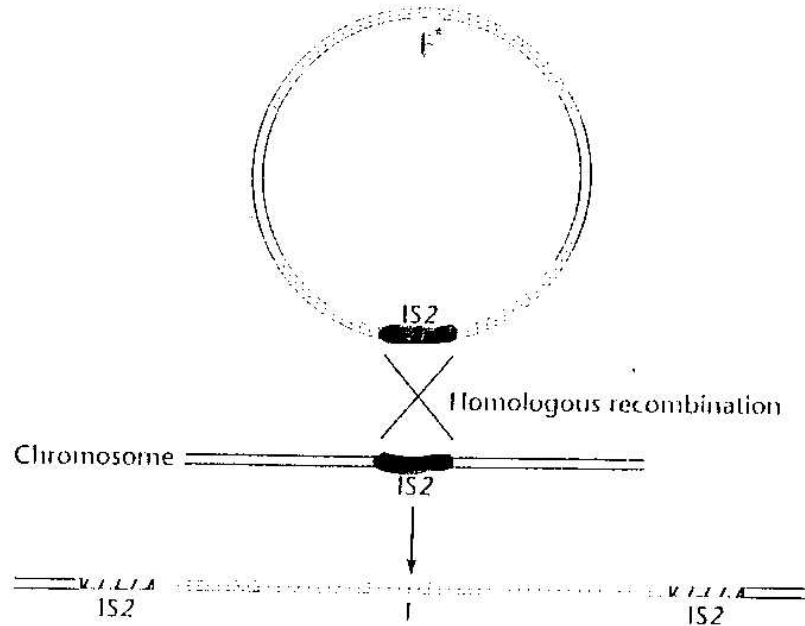


Figure 5.5 Integration of the F plasmid by homologous recombination between IS2 elements in the plasmid and in the chromosome, forming an Hfr cell. Integration can also occur through recombination of the IS3 or $\gamma\delta$ sequences on the F plasmid (see Figure 5.3).

Hfr kmeny

Chromosom *E. coli*

- obsahuje 20 míst s IS sekvencemi, v nichž se může plasmid integrovat, má-li homologní IS sekvence

Konjugativní plasmidy v integrovaném stavu

- Přenášejí chromosomální DNA
- Integrovaný plasmid exprimuje *tra* geny, takže dochází k tvorbě pilusů, ke kontaktu donorové buňky s recipientní, ke štěpení *oriT* místa a k přenosu DNA řetězce

Nejprve se přenáší

- Část plasmidové DNA a pak následuje
- přenos chromosomální DNA.
- Geny, které jsou lokalizovány u 5 konce oriT plasmidu jsou do buněk přenášeny jako první
- Přenos celého chromosomu a plasmidu trvá při 37°C asi 100 minut.
- Výsledkem je diploidní buňka

Většinou však dojde

- k přerušení spojení buněk
- nebo ke zlomení DNA řetězce.
- Proto v recipientní buňce nemůže dojít k recirkularizaci DNA řetězce
- Přenesená DNA však může rekombinovat s chromosomem recipientní buňky (obecná rekombinace)
- Při této rekombinaci jde o interakci mezi lineární dsDNA z donorové buňky a kružnicovou dsDNA buňky recipientní

Přenos chromosomální DNA integrovaným plasmidem

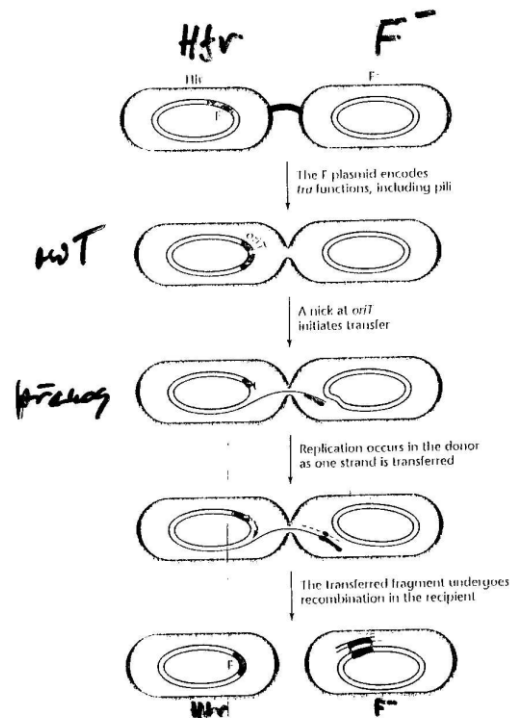
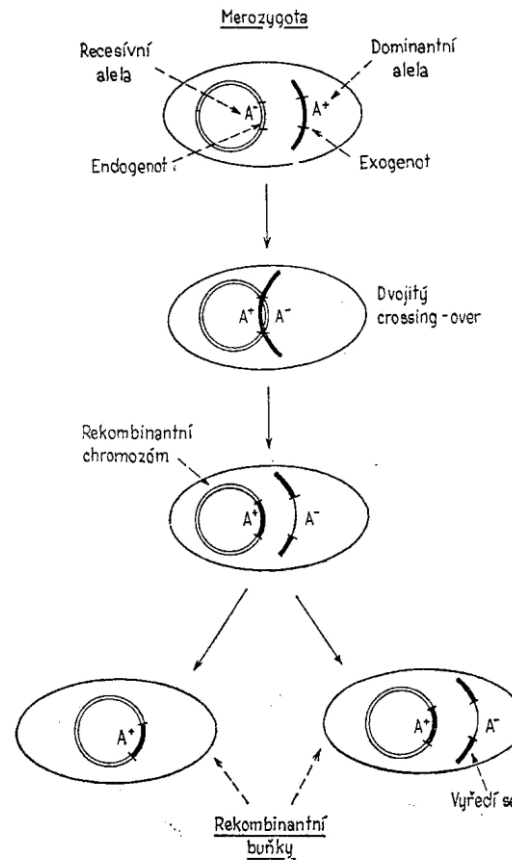


Figure 5.6 Transfer of chromosomal DNA by an integrated plasmid. Formation of mating pairs, nicking of the F *oriT* sequence, and transfer of the 5' end of a single strand of F DNA proceed as in transfer of the F plasmid. Transfer of the covalently linked chromosomal DNA will also occur as long as the mating pair is stable. Complete chromosome transfer rarely occurs, and so the recipient cell remains F⁻, even after mating. Replication in the donor usually accompanies DNA transfer. Some replication of the transferred single strand may also occur. Once in the recipient cell, the transferred DNA may recombine with homologous sequences in the recipient chromosome.

Jesliže se donorová a recipientní buňka liší genotypem

- vzniknou rekombinanty, které můžeme detekovat

Obecná rekombinace v merozygotě (Rosypal 1981)



Rekombinace v merozygotě.

K obecné (homologní) rekombinaci dochází při

- konjugaci
- transdukci
- transformaci

Obecná rekombinace (Rosypal 2003)

- Kromě mutace se na změnách genetické informace podílí rekombinace
- Obecná rekombinace je proces, kterým vzniká nová kombinace nukleotidových sekvencí, která je způsobena crossing-overem

Jako crossing-over se označuje

- Výměna nukleotidových sekvencí mezi dvěma homologními molekulami DNA
- Výměna probíhá zlomem a znovuspojením
- Zlom a znovuspojení představuje naštěpení dvou paralelních homologických polynukleotidových řetězců a křížové spojení fragmentů vzniklých tímto štěpením

Organismus, jehož změněný genom je výsledkem rekombinace

- Se označuje jako rekombinant (rekombinanta)

Obecná (homologní) rekombinace může být

- Intergenová tj. probíhající mezi geny homologických vazbových skupin nebo
- Intragenová tj. probíhající mezi nukleotidovými sekvencemi alel téhož genu
- (vazbová skupina: soubor genů, které se nacházejí na stejném genoforu)

Obecná rekombinace probíhá

- Při nízkých frekvencích u všech organismů a to při
- transformaci, transdukci a konjugaci bakterií,
- mezi virovými genomy, kterými je infikována hostitelská buňka a
- během meiózy eukaryotických buněk

Místně specifická rekombinace

- Je omezena na interakce virového genoforu s DNA chromosomů hostitelských buněk.
- Při těchto interakcích dochází k integraci (začlenění do chromosomu hostitelské buňky) a excisi virových genoforů

Popis Hollidayova modelu obecné rekombinace

- Nejlépe propracován je u *E.coli*
- Viz Obr.198 Rosypal

Jednotlivé kroky modelu

- 1. Párování homologických molekul DNA - musí být v těsném kontaktu, musí být dostatečně homologické tj. s podobnou primární strukturou DNA, k rekombinaci dochází mezi paralelními DNA řetězci tj. mezi řetězci se stejnou orientací fosfodiesterových vazeb
- 2. Vytvoření zlomů v paralelních řetězcích – vlivem endonukleáz
- 3. Vzájemné prostupování řetězců, jejich výměna a asimilace - jeden řetězec obou ds molekul DNA se svým zlomeným koncem spojí s paralelním řetězcem druhé dsDNA. Spojení obou molekul dsDNA formou překřížených asimilovaných homologických DNA řetězců je tzv. Hollidayův spoj (chi-struktura)

Hollidayův model

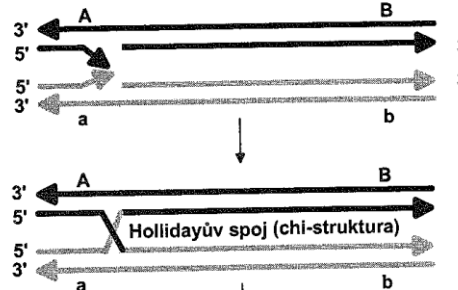
1. Párování homologických molekul.



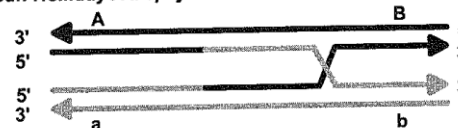
2. Vytvoření zlomů v paralelních řetězcích.



3. Vzájemné prostupování řetězců, jejich výměna a asimilace.



4. Posun Hollidayova spoje.



Obr. 198a

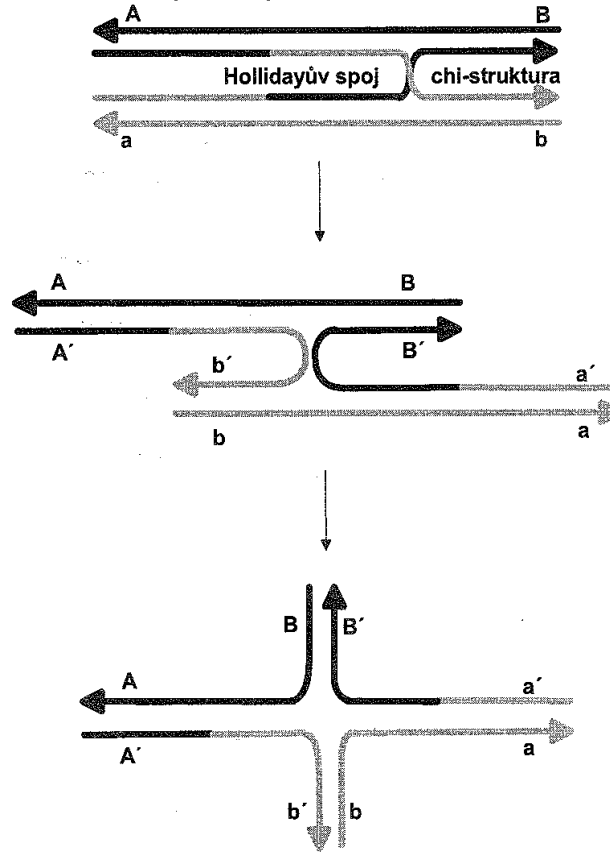
Schéma Hollidayova modelu obecné rekombinace

Pokr.

- 4. Posun Hollidayova spoje – k posunu dochází podél dvoušroubovice, vlivem otáčení DNA. Dochází k postupnému posunování překřížených DNA řetězců při rekombinaci
- 5. Roztažení Hollidayova spoje. V konečné fázi posunu se spoj roztáhne do určitého tvaru
- 6. Zrušení Hollidayova spoje (zrušení chi-struktury) - po naštěpení endonukleázami za vzniku produktů, které lze prokázat jako výsledek rekombinace.
- Výsledné molekuly DNA jsou charakteristické heteroduplexními oblastmi, ve kterých protilehlé úseky DNA nejsou zcela komplementární, jestliže pocházejí z různých alel téhož genu

Hollidayův model

5. Roztažení Hollidayova spoje.

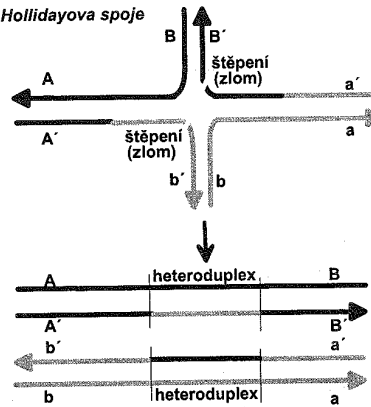


Obr. 198b

Schéma Hollidayova modelu obecné rekombinace

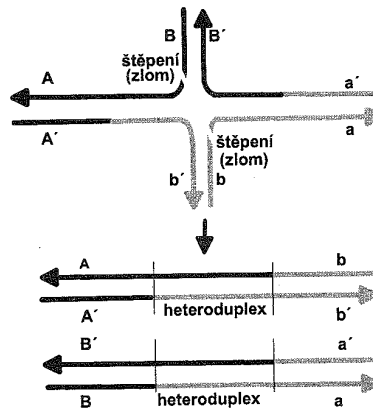
Hollidayův model

6. Zrušení Hollidayova spoje



Obr. 198c

Schéma Hollidayova modelu obecné rekombinace



Obr. 198d

Schéma Hollidayova modelu obecné rekombinace

Heteroduplex je

- Hybridní molekula DNA, která se vyznačuje neúplnou komplementaritou
- Pouze některé molekuly se liší v kombinaci alel proti původní kombinaci
- Tj. na jedné molekule DNA jsou kombinace alel Ab proti původní AB a na druhé aB proti původní ab.

U bakterií dochází k rekombinaci

- Běžně při konjugaci
- Při této rekombinaci jde o interakci mezi lineární dsDNA z donorové buňky a kružnicovou dsDNA buňky recipientní (dvojitý c-o)
- (Jednoduchým c-o se integruje konjugativní plasmid do chromosomu v místě IS elementů)

Rekombinaci

- Katalyzují enzymy (RecA protein)
- Byly zjištěny i u eukaryálních organismů
- Lze předpokládat, že eukaryální rekombinace se nebude lišit od bakteriální

Obecná rekombinace u eukaryí

- Má značný význam v prvním meiotickém dělení při segregaci chromosomů
- Na každý homologní pár chromosomů připadá 1 rekombinace
- Četnost rekombinace na chromosom v meiotickém jádře je podobná četnosti rekombinace v rámci konjugace bakterií

U kvasinek i u ostatních organismů

- Se v meiotické profázi uskutečňuje přechodně dvojitý c-o a to v tzv. horkých místech
- Tato místa jsou štěpena nespecifickými nukleázami
- U bakterií c-o probíhá na chi-sekvencích