

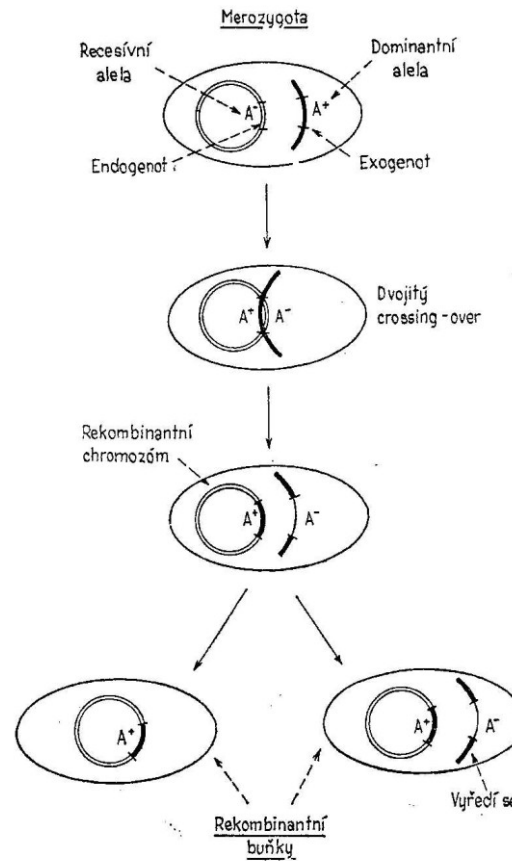
Genetické mapování s využitím konjugace

.

Během konjugace

- Nebývá do buňky přenesen celý plasmid s chromozomem a nedochází k recirkularizaci DNA řetězce
- (vznikne merozygota)
- Přenesená DNA však může rekombinovat s chromosomem recipientní buňky
- Rekombinanty můžeme detekovat, jestliže se donorová a recipientní buňka liší genotypem

Rekombinace v merozygotě (Rosypal 1981)



Rekombinace v merozygotě.

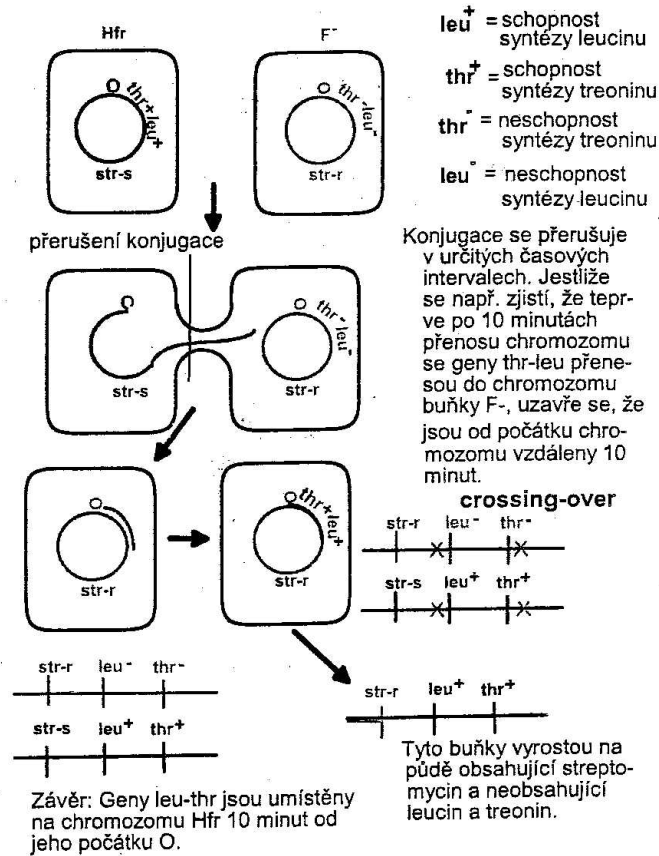
Časová posloupnost přenosu

- Geny, které jsou lokalizovány v místě integrace plasmidu
- Jsou do buněk přenášeny jako první a s vyšší frekvencí než geny, které jsou od počátku chromosomu vzdálenější
- Počátkem chromosomu zde rozumíme jeho konec, kterým po naštěpení jeho původně kružnicové formy vchází do recipientní buňky
- Časová posloupnost se využívá při genetickém mapování

Genetická mapa chromosomu *E.coli* K-12

- Se zakládá na údajích, které byly získány konjugačním přenosem z donorového kmene Hfr do recipientního kmene F-.
- Přenášené geny se integrovaly c-0 do chromosomu recipientní buňky v závislosti na vzdálenosti od počátku chromosomu do ní přeneseného.

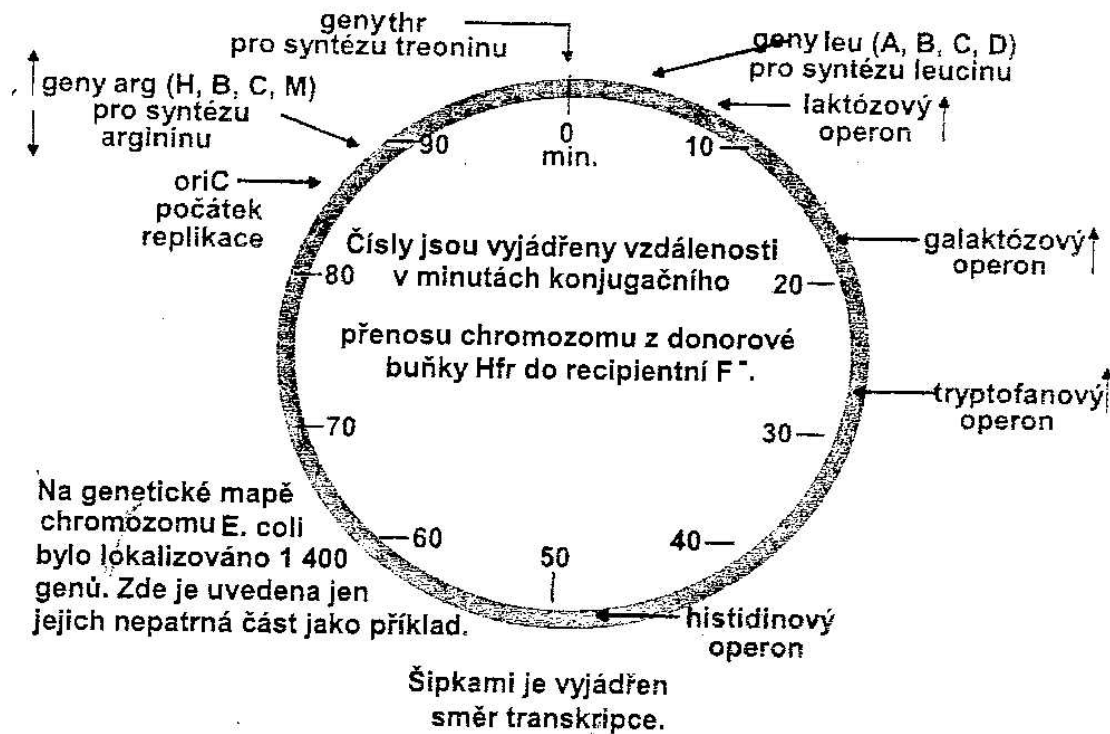
Přenos genů z buněk Hfr do buněk F- (Rosypal 2006)



Obr. 107

Přenos genů z buněk Hfr do buněk F⁻

Zjednodušená genetická mapa chromosomu *E.coli* K-12 (Rosypal 2006)



Obr. 108

Zjednodušená genetická mapa chromozomu *Escherichia coli*-K12

Nepřerušovaná konjugace

- Proces konjugace se nechá proběhnout bez přerušení
- Vytvoří se merozygoty s různě velkými chromosomovými segmenty, které do nich přešly z buněk Hfr
- Merozygoty s kratšími segmenty se budou vyskytovat ve vyšší frekvenci než merozygoty s delšími segmenty
- Z toho důvodu lze očekávat vyšší frekvenci přenosu pro geny, které jsou umístěny blíže počátku chromosomu

Nepřerušovaná konjugace

- Příklad nepřerušované konjugace
- HfrH Leu⁺Pro⁺Lac⁺Gal⁺Trp⁺Str^S X F⁻ Leu⁻Pro⁻Lac⁻Gal⁻Trp⁻Str^R
- Frekvence jednotlivých rekombinantních typů = počet rekombinantů daného typu/počet buněk Hfr
- Uvedené typy rekombinantů byly v těchto frekvencích:
- Leu⁺Str^R ve frekvenci 0,20
- Pro⁺Str^R ve frekvenci 0,15
- Lac⁺Str^R ve frekvenci 0,13
- Gal⁺Str^R ve frekvenci 0,078
- Trp⁺Str^R ve frekvenci 0,044
- Z toho plyne, že chromosom HfrH má následující pořadí genů: O-leu-pro-lac-gal-trp

Nepřerušovanou konjugací

- Se zjistí pořadí genů na chromosomu

Přerušovaná konjugace

- Vychází z toho, že se v různých časových intervalech konjugující páry od sebe oddělí
- Do recipientních buněk vstoupí různě velké fragmenty chromosomu
- Čím delší bude tato doba od počátku konjugace, tím delší fragmenty (a více genů) vstoupí do recipientní buňky

Jestliže se provede selekce transformantů pro geny, které již vstoupily do recipientních buněk

- Lze stanovit dobu vstupu těchto genů do recipientních buněk
- A odstupňovat tak vzdálenost mezi geny na chromosomu v časových jednotkách
- Rekombinanti $\text{Thr}^+\text{Leu}^+\text{Str}^R$ se začínají objevovat u té směsi, kde bylo provedeno protřepání po 8,5 min. od začátku pokusu
- To znamená, že geny *thr* a *leu* jsou vzdáleny 8,5 min. o začátku chromosomu

Přerušovaná konjugace

- Příklad přerušované konjugace
- HfrH Thr⁺Leu⁺Thi⁺Lac⁺Gal⁺Mal⁺Xyl⁺Str^S X
- F⁻ Thr⁻Leu⁻Thi⁻Lac⁻Gal⁻Mal⁻Xyl⁻Str^R
- F=počet rekombinantů daného typu/počet buněk Hfr
- Uvedené typy rekombinantů se začínají objevovat po určité době:
- Thr⁺Leu⁺Str^R po 8,5 min.,
- Thr⁺Leu⁺Gal⁺Str^R po 25 min. atd.

V minutách přenosu chromosomu do recipientní buňky

- Bylo možné určit vzdálenost mezi geny
- vzdálenost je udávána časovými jednotkami

Pomocí konjugace se zjistilo

- Že chromosom *E.coli* K-12 je kruhový
- K tomu byly využity různé Hfr kmeny
- Plasmid se může včlenit na různých místech chromosomu
- Potom se přenášejí různé geny

Obr. Různé Hfr kmeny E.coli K-12 (Snyder 1997)

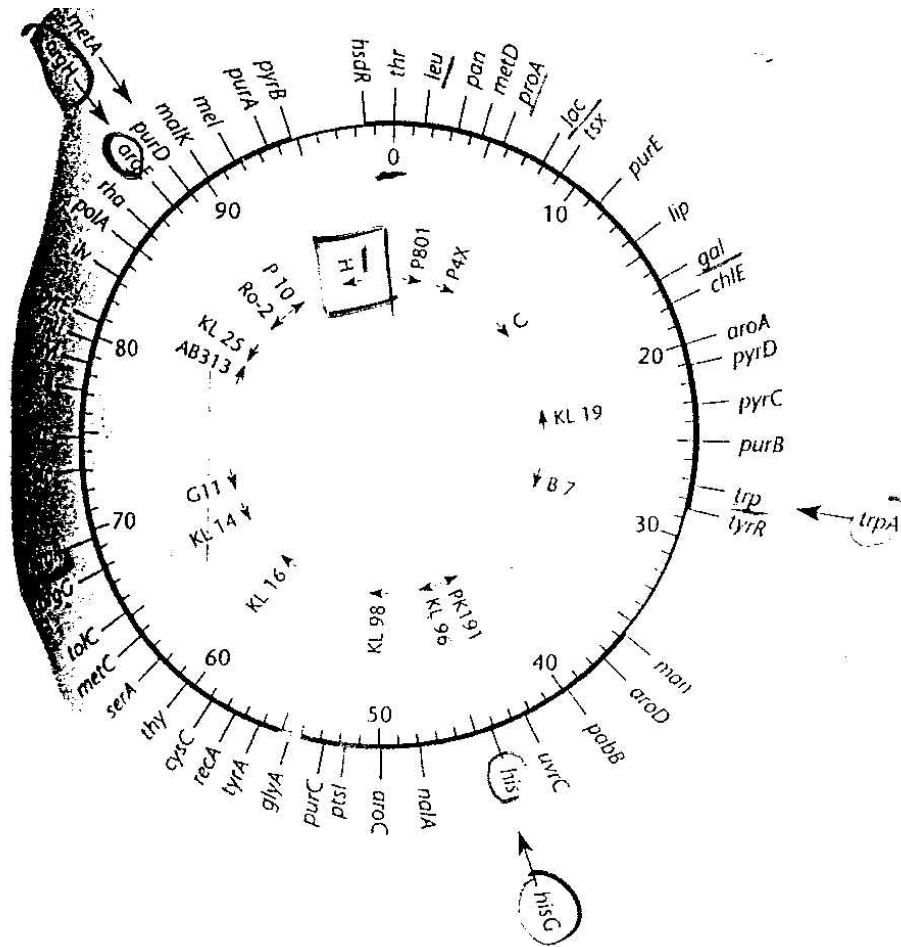
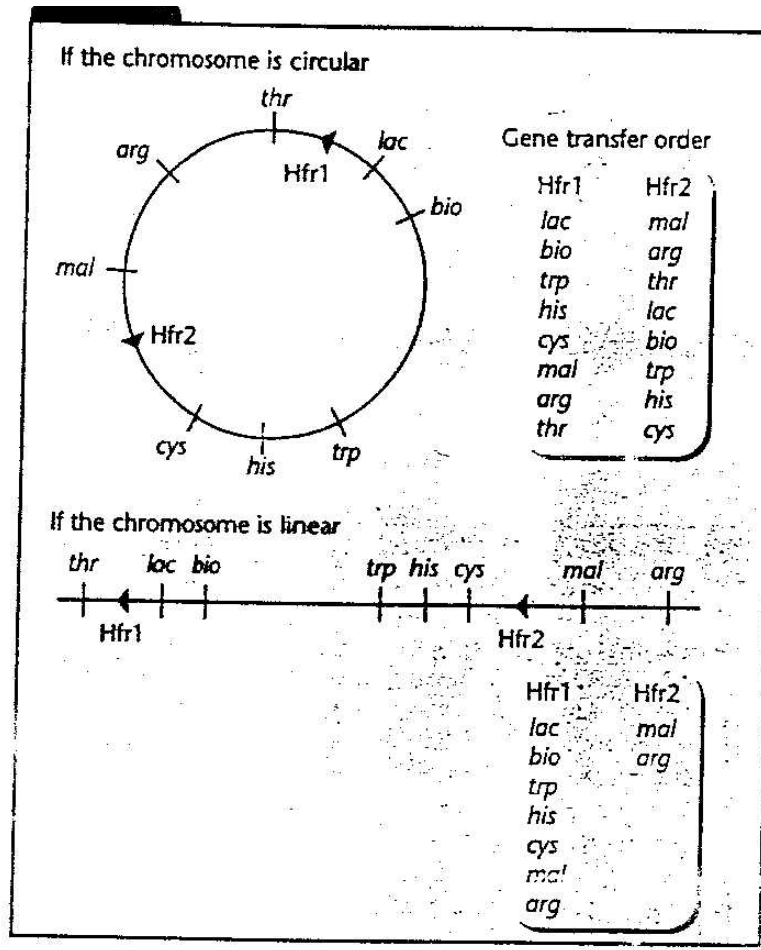


Figure 14.4 Partial genetic linkage map of *E. coli* showing the positions (large arrows) of the known markers used for the Hfr gradient of transfer in Figure 14.5. The small arrows indicate the position of integration of the F plasmid in some Hfr strains, including PK19⁺ (located near the position of *hisG* at 44 min). In each of these Hfr strains, the chromosomal DNA will be transferred beginning from the tip of the arrow. Adapted from B. J. Bachmann, K. B. Low, and A. L. Taylor, *Bacteriol. Rev.* 40:116–167, 1976.

Cirkulární chromosom *E. coli* (Snyder 1997)



F plasmidy

- Chromosomální geny mohou být přenášeny také po inkorporaci do konjugativních plasmidů
- Plasmid, který nese část chromosomální DNA se nazývá F (F s čarou, F prime)
- Vzniká homologní rekombinací nebo transpozicí

Integrovaný F plasmid

- Se z chromosomu vyčlení homologní rekombinací
- c-o mezi původními homologními sekvencemi
- c-o mezi jinými homologními sekvencemi

Vznik F plasmidu homologní rekombinací (Snyder 1997)

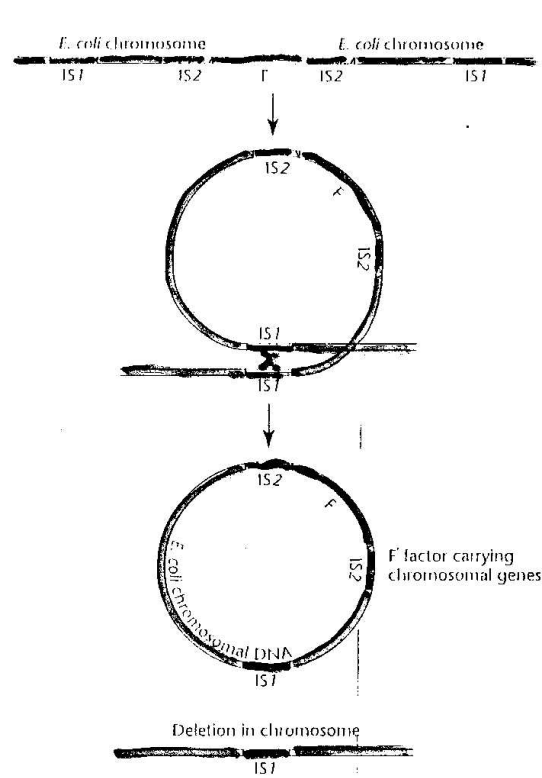


Figure 5.8 Creation of a prime factor by homologous recombination. Recombination may occur between homologous sequences, such as IS sequences, in the chromosomal DNA outside the F factor. The F factor will then contain chromosomal sequences, and the chromosome will carry a deletion.

F

F

F

g. čten
was lost
ball.
chrom.

Recipientní buňka s F plasmidem

- Je merodiploidní (částečně diploidní)
- Je diploidní pro geny nesené F plasmidem
- v buňce jsou 2 replikony
- (nemusí docházet k rekombinaci)

Merodiploidní buňka

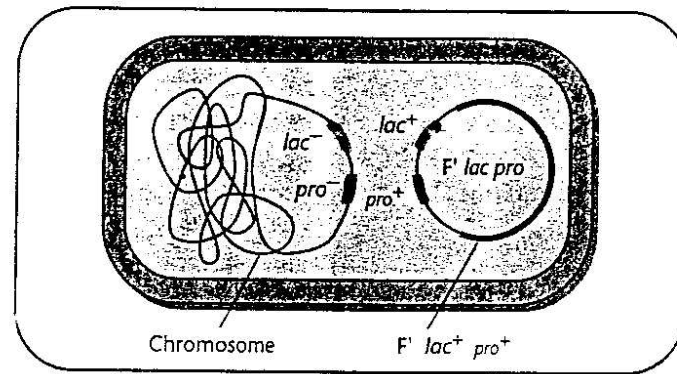


Fig. 10.10 Merodiploids contain two copies of a defined region of the chromosome. In this case, both the *lac* and *pro* genes are present in two copies in the chromosome - or rather, mutations in the *lac* and *pro* genes; the F-prime can supply these functions to the cell. This cell shown would be able to grow on lactose and in the absence of proline.

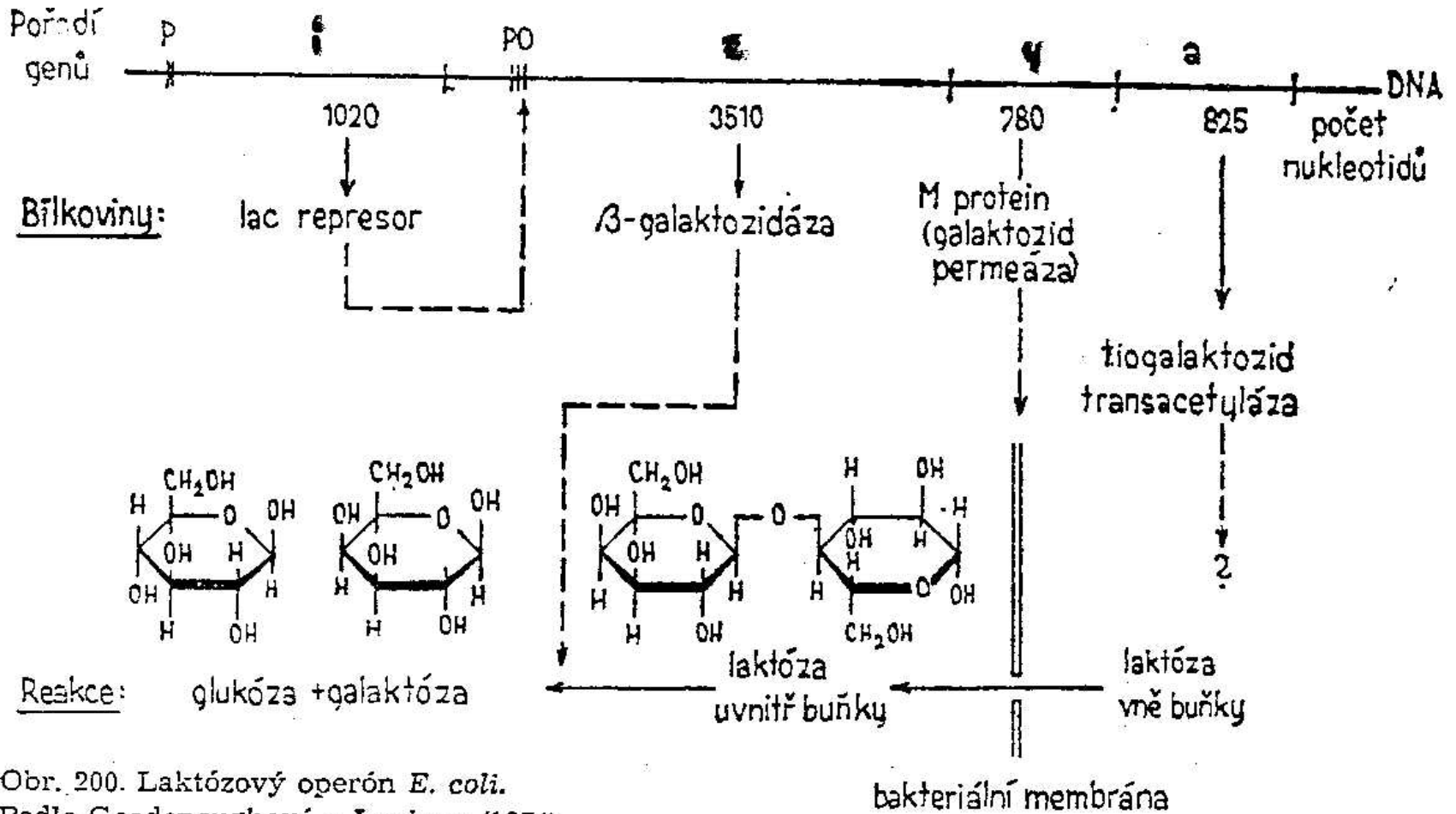
Geny nesené F plasmidem

- Mohou být použity pro testy komplementace
- V případě, že plasmid a chromosom nesou různé alely téhož genu

Testy komplementace

- Umožnily rozlišit dominantní a recesivní mutace např. regulátorového genu laktózového operonu
- a mutace operátoru
- umožňují zjistit, jestli jsou ovlivněny funkce *in trans* nebo *in cis* (na DNA)

Laktosový operon (Rosypal 1981)



Obr. 200. Laktosový operon *E. coli*.
Podle Goodenoughové a Levinea (1974)

Mutace regulátorového genu – 3 alely

- i^- konstitutivní alela (reprezor se neváže na operátor)
- i^s superreprezní alela (reprezor se nastálo váže k operátoru)
- i^+ alela inducibilní (w.t.)

Genotyp

- $i^+ z^+ y^+$ vedoucí k inducibilní syntéze β -galaktosidázy a permeázy
- $i^- z^+ y^+$ vedoucí ke konstitutivní syntéze β -galaktosidázy a permeázy
- $i^s z^+ y^+$ nesyntetizující β -galaktosidázu a permeázu ani inducibilně ani konstitutivně

Z těchto genotypů lze získat heterogenoty s následujícími vlastnostmi

- $i^+ z^+ y^+ / F \ i^- z^+ y^+$ syntetizuje β -galaktosidázu a permeázu inducibilně
- $i^- z^+ y^+ / F \ i^- z^+ y^+$ syntetizuje β -galaktosidázu a permeázu konstitutivně
- $\Delta i z^+ y^+ / F \ i^- z^+ y^+$ syntetizuje β -galaktosidázu a permeázu konstitutivně
- $i^s z^+ y^+ / F \ i^+ z^+ y^+$ nesyntetizuje β -galaktosidázu a permeázu ani inducibilně ani konstitutivně
- $i^s z^+ y^+ / F \ i^- z^+ y^+$ nesyntetizuje β -galaktosidázu a permeázu ani inducibilně ani konstitutivně

Z vlastností heterogenotů plyne

- i^s je dominantní vzhledem k i^+ a i^-
- i^+ je dominantní vzhledem k i^-

Mutace operátoru

- O^c konstitutivní mutace operátoru - nereaguje na represor
- O^+ standardní alela operátoru
- Alela O^c vzniká ze standardní alely operátoru O^+

Genotyp

- $i^+o^c z^+y^+$ syntetizuje β -galaktosidázu a permeázu konstitutivně
- $i^+o^+z^+y^+$ syntetizuje β -galaktosidázu a permeázu inducibilně

Z těchto genotypů lze získat heterogenoty s následujícími vlastnostmi

- $i^+o^+z^+y^+/F \quad i^+o^c z^+y^+$ syntetizuje β -galaktosidázu a permeázu konstitutivně
- $i^s o^+z^+y^+/F \quad i^+o^+z^+y^+$ nesyntetizuje β -galaktosidázu a permeázu ani inducibilně ani konstitutivně
- $i^s o^+z^+y^+/F \quad i^+o^c z^+y^+$ syntetizuje β -galaktosidázu a permeázu konstitutivně

Z vlastností heterogenotů plyne

- o^c alela je dominantní vzhledem k o^+