

# Bakteriofágy a transdukce

.

# Obecná transdukce

- Souvisí s balením DNA do fágové hlavičky

# Fágová replikace

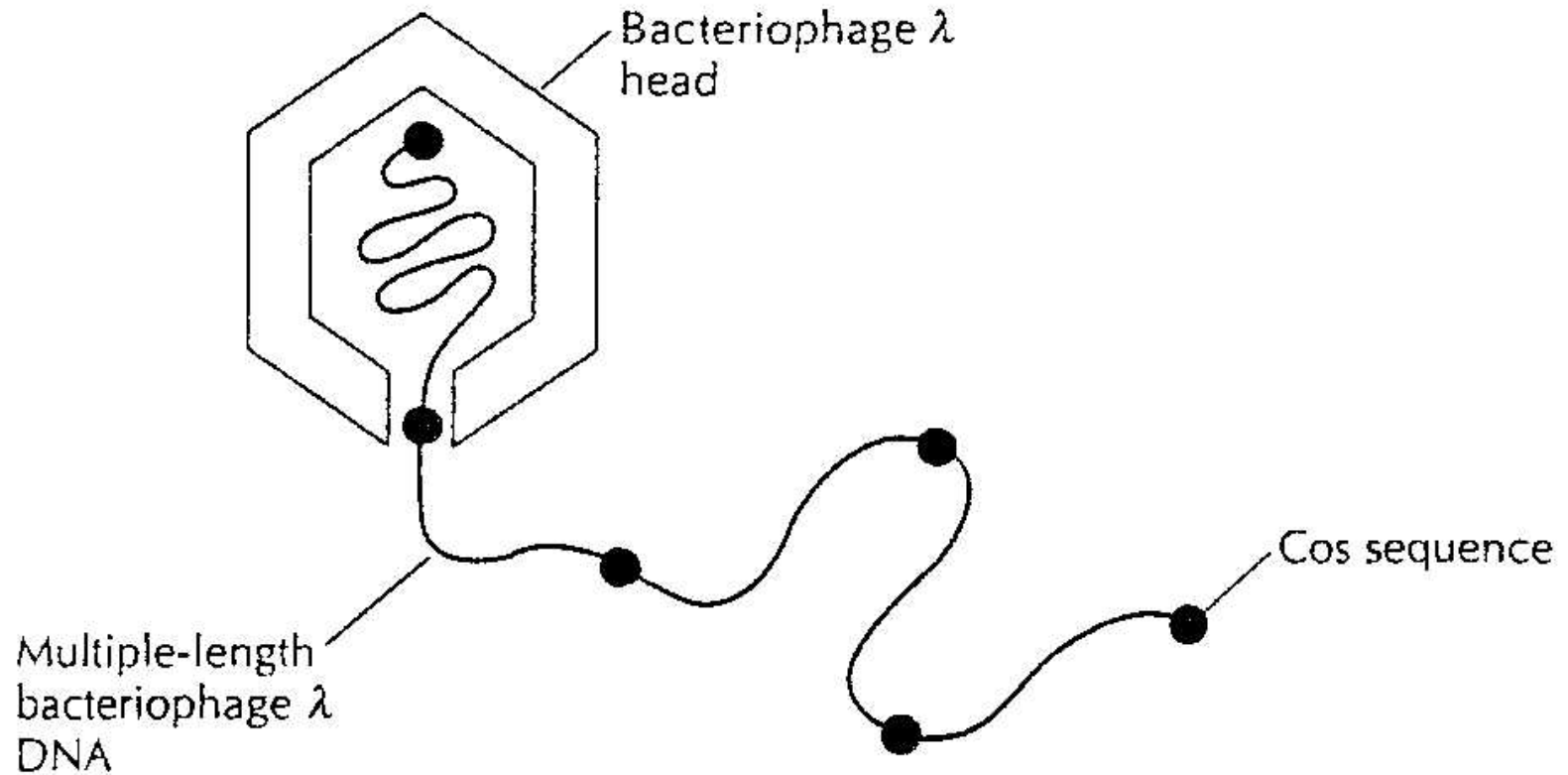
- Má 1 cíl a to
- Vytvořit co největší počet molekul v co nejkratší době
- během replikace se syntetizují konkatemery a
- je balena do fágových hlaviček z konkatemeru
- Různým způsobem

# U fága lambda

- Jsou na konkateru rozpoznávána
- specifická cos místa (12 nukleotidů, konce molekul)
- ta jsou štěpena specifickou nukleázou (termináza)
- a DNA (48502 bp) je balena do fágových hlaviček
- (účinně se balí se od 37 000 bp do 52 000 bp)

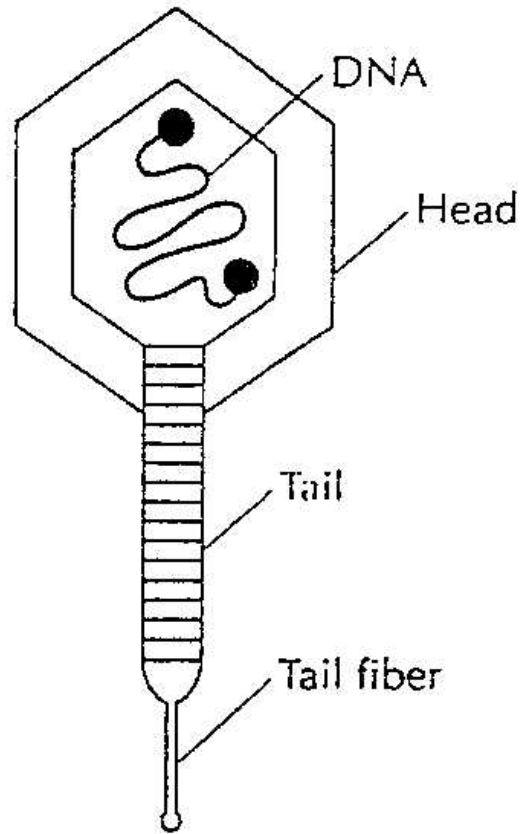
# Balení DNA fága lambda do hlavičky z konkatemernu (Snyder 1997)

A



# Virion s DNA (Snyder 1997)

B



# U fága T4 a dalších fágů

- Je známo balení DNA do fágový hlaviček mechanismem **plné hlavičky**
- Z dlouhých konkatemerů vstupuje do fágové hlavičky DNA tak dlouho, dokud hlavička není plná

# Genom fágů

- je terminálně redundatní
- je cyklicky permutovaný



# Terminální redundance a cyklická permutace u fága T4 (Snyder 1997)



**Figure 7.17** Headful packaging by phage T4. Vertical arrows indicate where cuts in concatemeric DNA are made. The letters represent fictional genes. Each packaged genome (horizontal arrows) is a cyclic permutation of the others.

# Balení DNA

- začíná na konkatemeru ve **specifickém místě PAC** (packaging)
- U různých fágů se vyznačuje různou specifitou
- Toto místo má význam pro obecnou transdukcii

# Transdukce

- Znamená přenos bakteriální DNA z jedné buňky na druhou pomocí bakteriofága
- Transdukující fág – fág schopný transdukce
- Donorový kmen – kmen, ve kterém se fág původně replikoval
- Recipientní kmen – kmen infikovaný transdukujícím fágem
- Transduktanti – buňky, které získaly DNA z jiné buňky transdukací

# Rozlišujeme

- Obecnou transdukci – fágem může být z buňky na buňku přenášena jakákoliv oblast bakteriální DNA
- Specializovanou transdukci – fágem jsou přenášeny pouze určité geny z bakteriálního genomu
- Oba typy transdukujících částic vznikají zcela odlišným mechanismem

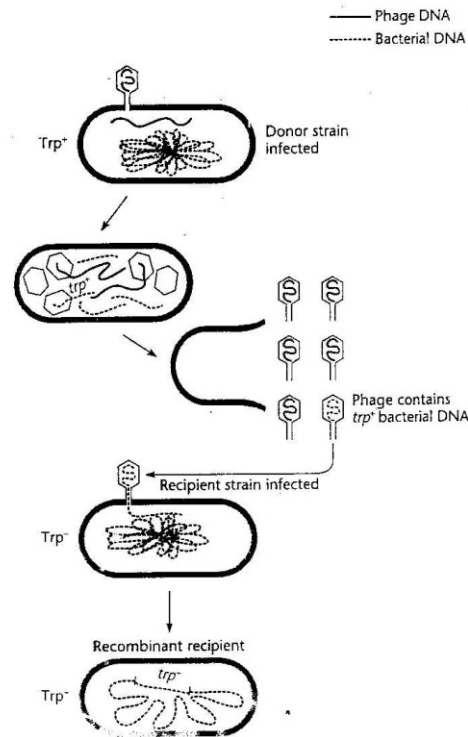
# Mechanismus obecné transdukce

- Fág obvykle balí do hlaviček fágovou DNA, avšak někdy může omylem zabalit DNA hostitelské buňky (sekvence podobná PAC sekvenci, konec molekuly)

# Vlastnosti transdukujícího fága

- Může infikovat bakteriální buňky
- Po infekci se netvoří fágové potomstvo ani plaky
- Přenesená DNA může rekombinovat s homologní sekvencí recipientní buňky za vzniku transduktanta

# Příklad obecné transdukce (Snyder 1997)



**Figure 7.18** An example of generalized transduction. A phage infects a  $Trp^+$  bacterium, and in the course of packaging DNA into heads, the phage mistakenly packages some bacterial DNA containing the  $trp$  region instead of its own DNA into a head. In the next infection, this transducing phage injects the  $Trp^+$  bacterial DNA instead of phage DNA into the  $Trp^-$  bacterium. If the incoming DNA recombines with the chromosome, a  $Trp^+$  recombinant transductant may arise. Only one strand of the DNA is shown.

# Obecná transdukce

- Je událost řídká
- Transdukující fágy vyžadují, aby hostitelská DNA nebyla degradovaná a obsahovala vhodná pac místa
- Dobrý transdukující fág je fág P1, protože má menší nároky na specifitu pac místa, po rozštěpení balí DNA od konce
- Má široké rozmezí hostitele (transdukuje DNA z *E. coli* do mnoha G- baktérií)
- Fág P22 je také dobrý transdukující fág. Z jednoho pac místa balí DNA do asi 5 fágových hlaviček. Proto jsou některé chromosomální geny transdukovány s větší frekvencí než jiné



## Charakteristika 2 obecně transdukujících fágů P1 a P22 (Snyder 1997)

<b>TABLE 7.3</b> Characteristics of generalized transducing phages P1 and P22		
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

## Fág T4 a fág $\lambda$

- Nejsou dobře obecně transdukující fágy
- Fág T4 po infekci degraduje hostitelskou DNA
- Stává se transdukujícím až po vyblokování odpovídajících genů mutací
- Pak balí do hlaviček hostitelskou DNA s vysokou frekvencí
- Fág  $\lambda$  potřebuje pro účinné balení DNA do hlavičky 2  $\cos$  místa
- vzdálená od sebe na délku fágového genomu (37 až 52 kb)
- a proto není dobrý obecně transdukující fág.

# Transdukující fágy

- Byly izolovány u řady bakterií a použity při jejich genetické analýze
- Nalezení obecně transdukujících fágů je náročné
- Transdukce bývá nahrazována konjugací, transpozonovou mutagenézou, technikami rekombinantní DNA
- zvláště u bakterií, které nejsou příliš charakterizované

# Do fágové hlavičky se může nabalit

- Kromě chromosomální DNA
- Plasmidová DNA (může se v buňce začít replikovat)
- DNA nesoucí transposon (ten může transponovat do některého replikonu v buňce – chromosomu nebo plasmidu)
- Tyto vlastnosti jsou důležité z hlediska evoluce

# DNA ve fágové hlavě

- Je stabilnější než volná DNA
- V prostředí může déle vydržet (je chráněná proteinovým obalem)

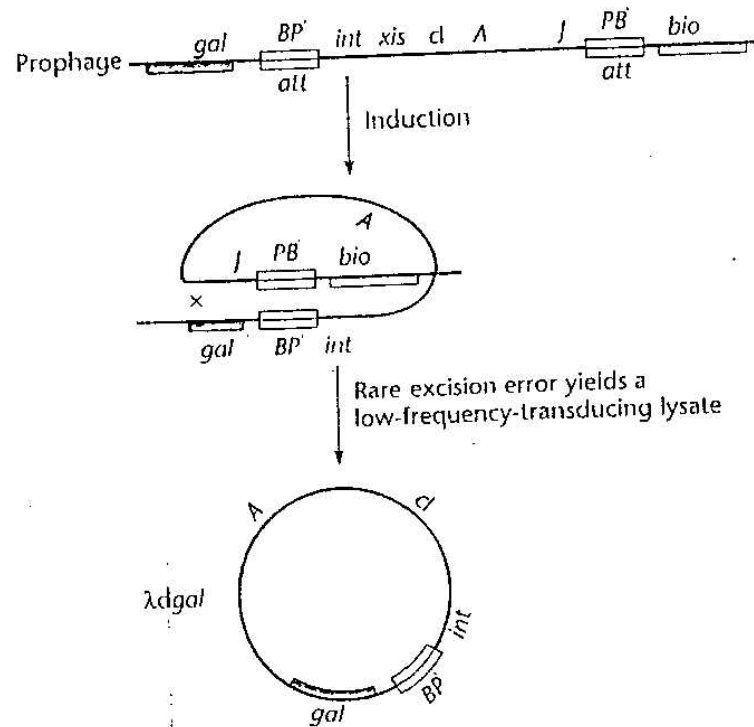
# Specializovaná transdukce

- Souvisí s lyzogenií a týká se mírných fágů
- Při této transdukci mohou být přenášeny pouze geny lokalizované v blízkosti profága (místa integrace fága)

# Vznik specializovaného transdukujícího fága

- Transdukující fág vzniká velmi vzácně chybnou excisí profága z chromosomu
- Transdukující fág nese jak bakteriální geny tak fágové geny

# Schéma vzniku specializovaného transdukujúceho fága (Snyder 1997)



**Figure 7.25** Formation of a  $\lambda$ dgal transducing particle. A rare mistake in recombination between a site in the prophage DNA (in this case between *A* and *J*) and a bacterial site to the left of the prophage results in excision of a DNA particle in which some bacterial DNA has replaced phage DNA.



# U fága $\lambda$

- Vznikají dva typy transdukujících fágových částic:
- **$\lambda$ dgal** a  **$\lambda$ pbio**
- Částice jsou defektní
- Vlastnosti transdukujících částic jsou determinovány chybějícími geny

# $\lambda$ dgal

- $\lambda$ dgal netvoří plaky
- nemá geny hlavičky a bičíku
- nemůže tvořit virové částice
- Může infikovat bakteriální buňky
- Nese gen pro utilizaci galaktózy

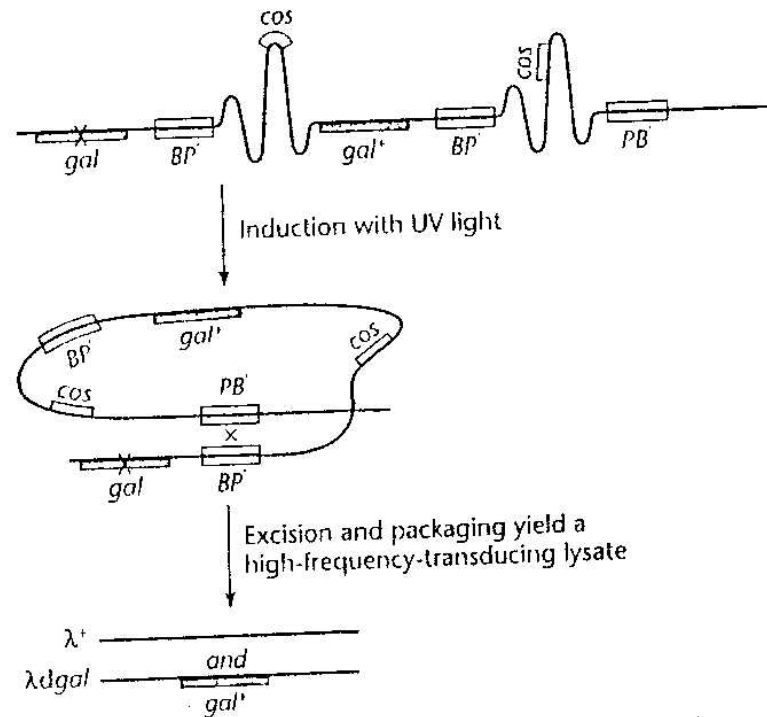
# Selekce $\lambda$ dgal

- Se provádí v recipientních buňkách, které jsou Gal-.
- Na miskách s galaktózou narostou Gal+ transduktanty po integraci fága  $\lambda$ dgal do chromosomu

# $\lambda$ dgal

- Může lyzogenizovat bakteriální buňky
- Po indukci profága z takto vzniklých lyzogenních kmenů získáme HFT lyzáty (High frequency transduction), protože všechny fágy nesou gal geny
- Fágy jsou defektní
- Chybějící geny nahradí helper fág

# Indukce $\lambda_{dgal}$ fága z dilysoenního kmene (Snyder 1997)



**Figure 7.26** Induction of the  $\lambda_{dgal}$  phage from a dilysoenního kmene containing both  $\lambda_{dgal}$  and a wild-type  $\lambda$  in tandem. Recombination between the hybrid  $PB'$  and  $BP$  sites at the ends excises both phages. The wild-type phage helps the  $\lambda_{dgal}$  phage to form phage particles. See the text for details.

# $\lambda$ p<sub>bio</sub>

- tvoří plaky
- bez helper fága však nemůže lysogenizovat hostitelské buňky
- Nese bakteriální gen pro biosyntézu biotinu

# Specialisované transdukující fágy

- Našly využití v mikrobiální genetice
- Používají se ve speciálních aplikacích
- Dnes byly nahrazeny mnohem jednoduššími technikami rekombinantní DNA

# Genetická analýza fágů

- Klasická genetická analýza zahrnuje:
- Izolaci mutantů se změněnou funkcí, kterou chceme studovat
- Komplementaci s cílem zjistit, kolik genů kóduje změněné produkty
- Křížení s cílem zjistit pořadí a vzdálenost genů



# Infekce sensitivních hostitelských buněk fágem

- Je jednoduchá
- Smíchají se bakteriální buňky s fágovými částicemi
- K infekci dojde díky náhodným kolizím buňky s virionem
- % infikovaných buněk závisí na koncentraci buněk a virusů
- Když je každá buňka infikována 2 virovými částicemi,
- může v buňkách docházet ke komplementaci nebo k rekombinaci

# Multiplicita infekce (MOI)

- Vyjadřuje poměr počtu fágů k počtu buněk
- Počet fágů stanovíme jako pfu/ml (plaque forming units)
- Počet buněk stanovíme jako cfu/ml (colony forming units)
- MOI vysoká – fágových částic je mnohem více než buněk (MOI 5)
- MOI nízká – fágových částic je mnohem méně než buněk (MOI 0.5)
- MOI určuje počet buněk infikovaných virem. Řídí se statisticky Poissonovou distribucí.

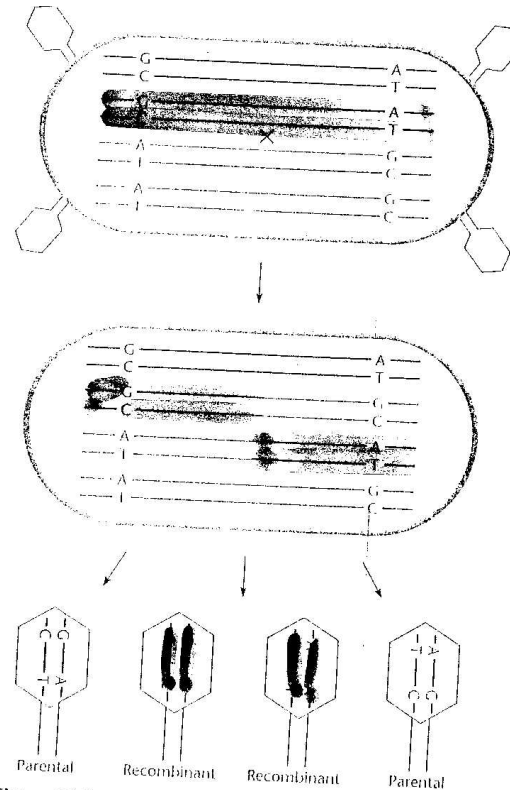
# Křížení fágů

- K infekci jsou použity současně 2 fágové mutanty s různými mutacemi (např. c-)
- V buňce dochází k homologní rekombinaci mezi fágovými genomy
- a k expresi genů obou mutantů

# Frekvence rekombinace

- Poskytuje informaci o vzdálenosti mutací na DNA
- Záleží na lokalizaci mutací
- Čím blíže jsou na DNA, tím hůře mezi nimi dochází ke *c-o* a tudíž k rekombinaci
- Frekvence rekombinace v křížení =  
počet rekombinantních fágů/počet všech fágů

# Rekombinace mezi virovými mutanty (Snyder 1997)



**Figure 13.1** Recombination between two virus mutations. The two different mutant parent viruses infect the same permissive host cell and their DNA replicates. Crossovers occur in the region between the two mutations, giving rise to recombinant types that are unlike either parent virus. Only the positions of the mutated base pairs are shown. The DNA of one parent virus is shown in black, and the other is shown in blue.

# Virusy, jimiž infikujeme buňku

- Se nazývají rodičovské typy
- Po rekombinaci získáme rekombinantní typy (rekombinanty)

# Frekvence rekombinace v %

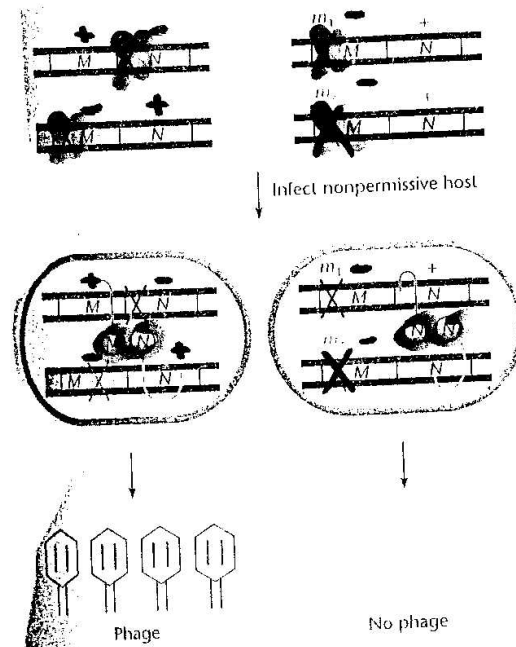
- Se nazývá mapová jednotka
- Např. dávají-li 2 mutace frekvenci rekombinace 0,01 (1%), připadá 1 rekombinant na 100 překřížení. Vzdálenost mutací je  $0.01 \times 100 = 1$  mapová jednotka
- Mapová jednotka je pouze relativní hodnota.
- Fyzicky představuje různou délku DNA.
- Jsou-li mutace příliš vzdáleny, může mezi nimi docházet k dvojitým c-o, což snižuje detekovanou frekvenci rekombinace, protože 2 c-o vedou k obnově rodičovských typů

# Komplementačními testy

- Se stanovují interakce mezi genovými produkty, jež jsou syntetizovány z různých částí DNA molekul v 1 buňce.
- Komplementační test ukáže, zda 2 mutace inaktivují stejné nebo různé geny.
- Jestliže mutace komplementují, jsou obvykle v různých genech a naopak.



# Komplementační test (Snyder 1997)



**Figure 13.2** Complementation tests between virus mutations. Viruses with different mutations infect the same host cell, in which neither mutant virus can multiply. (Left) The mutations, represented by the minus signs, in different genes (*M* and *N*). Each mutant virus will synthesize the gene product that the other one cannot make; complementation will occur, and new viruses will be produced. (Right) The mutations (minus signs) prevent the synthesis of the *M* gene product. There is no complementation, the mutants cannot help each other multiply, and no viruses are produced.

# Konstrukce genetické mapy fágů

- Ukazuje pořadí a vzdálenost mutací v jednotlivých genech

# Genetická a fyzikální mapa fága L (Španová 1988)

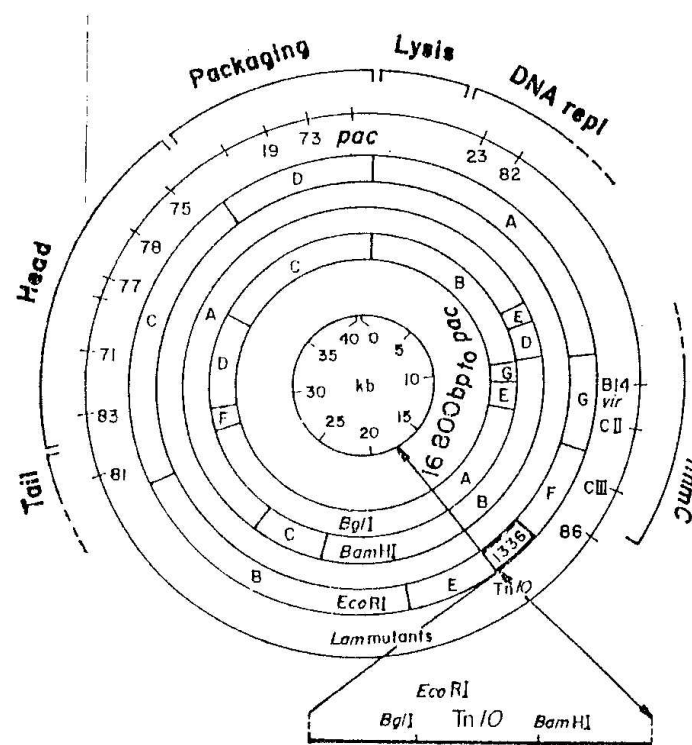


FIG. 2. Physical and genetic map of phage L (Karlovský *et al.* 1984) with *Tn10* localized in the insertion mutant L::*Tn10*--8; *Tn10* is localized in the E fragment of *EcoRI* 16 800 bp from the *pac* site and 1 336 bp from the border between the E and F fragments with the orientation of the longer *EcoRI* *Tn10* fragment (Jorgensen *et al.* 1979) towards the F fragment.