

Transformace

- Přirozená
- indukovaná

Při transformaci

- Buňka přijímá volnou DNA ze svého prostředí
- Volná DNA pochází z donorové buňky (donora)
- DNA je přijímána recipientní buňkou (recipient)
- Buňka selektovaná po transformaci je transformant

Přirozená kompetence

- Je stav, ve kterém jsou bakteriální buňky schopné přijímat volnou DNA
- Baktérie schopné přijímat volnou DNA se nazývají kompetentní

Přirozeně kompetentní bakterie

- Patří do více rodů G+ a G- bakterií
- (*Bacillus subtilis* a půdní bakterie, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*)

Objevení transformace

- jako mechanismu přenosu genetického materiálu
- u bakterií *Streptococcus pneumoniae*
- Tím se zároveň potvrdilo, že DNA je nositelkou genetické informace

Streptococcus pneumoniae tvoří 2 druhy kolonií

- Drsné, nepatogenní (typ R)
- Hladké, patogenní (s polysacharidovou kapsulou, díky níž buňky přežívají v infikovaném hostiteli a usmrcují jej) (typ S)

Griffith's experiment (Snyder 1997)




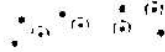
	Bacterial type	Effect in mouse	Bacteria recovered
A	Live type R 	Nonpathogenic	None
B	Live type S  Capsule	Pathogenic	Live type S
C	Heat-killed type S 	Nonpathogenic	None
D	Mixture of live type R and heat-killed type S 	Pathogenic	Live type S

Figure 6.1 The Griffith experiment. Heat-killed pathogenic encapsulated bacteria can convert nonpathogenic nonencapsulated bacteria to the pathogenic encapsulated form. Type R indicates rough-colony formers and type S indicates smooth-colony formers.

V experimentu na myších bylo prokázáno

- Že varem usmrcené patogenní bakterie přeměňují (transformují) nepatogenní bakterie na patogenní (byly izolovány z infikovaných myší)
- Totéž bylo později provedeno *in vitro* ve zkumavce
- Tak bylo zjištěno, že transformující látkou je DNA

Kompetence

- Schopnost bakteriálních buněk přijímat volnou DNA
- Většina přirozeně se transformujících bakterií může přijímat DNA pouze v určité fázi růstového cyklu
- Obvykle před dosažením stacionární fáze růstu

Geny, jež se účastní vzniku kompetence

- Jsou nejvíce prostudovány u *B. subtilis*
- K navození kompetence dochází, když je
- vysoká hustota buněk a
- nedostatek živin v prostředí

Stav kompetence je řízen

- Quorum sensing systémem
- Jedná se o dvojsložkový regulační systém závislý na sensoru:
 - 1. senzorový protein, membránový, kináza (autokináza) (katalyzuje fosforylaci)
 - 2. regulační protein – získává fosfátovou skupinu od sensorového proteinu – aktivuje transkripci nebo jiné funkce b.

Proteiny, jež se účastní vzniku kompetence u *Bacillus subtilis*

- ComP ... sensorový protein v buněčné membráně.
- Zachycuje informace o nedostatku živin a o dostatečné hustotě buněk.
- Protein se aktivuje se fosforylací
-
- ComA... protein, na který je přenášena fosfátová skupina z ComP proteinu.
- Ve fosforylovaném stavu funguje jako transkripční aktivátor mnoha genů,
- včetně operonu *srfA*, který je nezbytný pro vznik kompetence

Regulace vývoje kompetence u *Bacillus subtilis* (Snyder 1997)

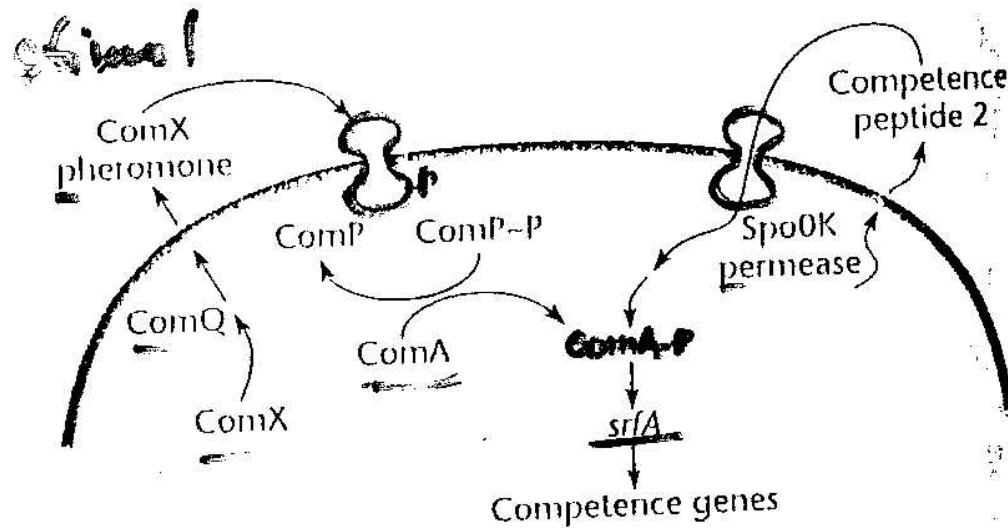


Figure 6.2 Regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. The ComP protein in the membrane senses high cell density and is phosphorylated. The phosphate is then transferred to ComA, which allows transcription of competence genes. The ComP protein phosphorylation involves two competence pheromone peptides, one of which cooperates with an oligopeptide permease, the product of the *spo0K* gene.

Proteiny, jež se účastní vzniku kompetence

- Feromony kompetence ... peptidy, produkované během růstu *B. subtilis*
- Ke vzniku kompetence jich musí být nasyntetizováno velké množství, čehož je dosaženo při vyšší koncentraci buněk
- ComX...feromonový peptid, jež vzniká odštěpením z delšího polypeptidu. Umožňuje fosforylaci sensorového proteinu ComP (neznámým mechanismem)
- ComQ ...proteáza, která vyštěpuje feromonový peptid
- Spo0K...permeáza. Je aktivována dalším peptidem kompetence, který signalizuje kritickou hustotu buněk

Současně se vznikem kompetence

- Začíná *B. subtilis* sporulovat
- Při zahájení sporulace se využívá rovněž produktu genu *spo0K*

Některé kompetentní bakterie

- Přijímají pouze DNA vlastního druhu (např. *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*)
- U *Neisseria gonorrhoeae* byla zjištěna specifická sekvence dlouhá 10 – 12 bp nutná pro přenos DNA do buněk
- Jiné kompetentní bakterie přijímají jakoukoliv DNA (např. *Bacillus subtilis*)

Specifické sekvence nutné pro přenos cizorodé DNA do kompetentních buněk (Snyder 1997)

<i>Haemophilus influenzae</i>	5' AAGTGC GG TCA 3'
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5' GCCGTCTCAA 3'

Figure 6.4 The uptake sequences on DNA for some types of bacteria. Only DNA with these sequences will be taken up by the bacteria indicated. Only one strand of the DNA is shown.

Mechanismus

- kterým různé genové produkty činí buňku permeabilní pro DNA není znám.
- Některé proteiny se zřejmě vážou k DNA
- Jiné působí na buněčnou membránu
- A umožňují průnik DNA do buněk během transformace

Mechanismus transformace

- Je nejvíce prostudován u
- *Streptococcus pneumoniae* a
- *Hemophilus influenzae*

Mechanismus transformace u *Streptococcus pneumoniae*

- ds DNA uvolněná lyzí donorových bakteriálních buněk
- se váže na specifický receptor na povrchu recipientní buňky
- Jeden řetězec navázané DNA je degradován nukleázou lokalizovanou na membráně
- Druhý řetězec je transportován do buňky
- Transportovaný DNA řetězec je inkorporován do homologní oblasti buněčné DNA

Transformation *Streptococcus pneumoniae* (Snyder 1997)

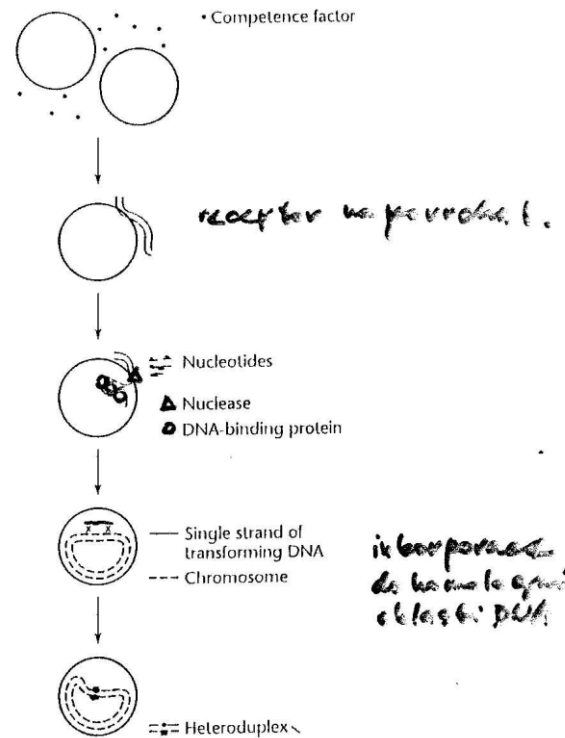


Figure 6.5 Transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Competence factors accumulate as the cells reach a high density. Double-stranded DNA binds to the cell, and one strand is degraded. The remaining single strand replaces a strand of the same sequence in the chromosome, creating a "heteroduplex" in which one strand comes from the donor and one comes from the recipient.

Transformace *Haemophilus influenzae*

- ds DNA (velikosti 30 až 50 kb) se váže na membránový receptor na povrchu recipientní buňky
- Do recipientní buňky vstoupí ds DNA ve formě transformasomů
- Z transformasomu je uvolňován jeden řetězec DNA
- Jednořetězcová DNA se účastní rekombinace a vzniku transformanta

Transformace u *Haemophilus influenzae* (Snyder 1997)

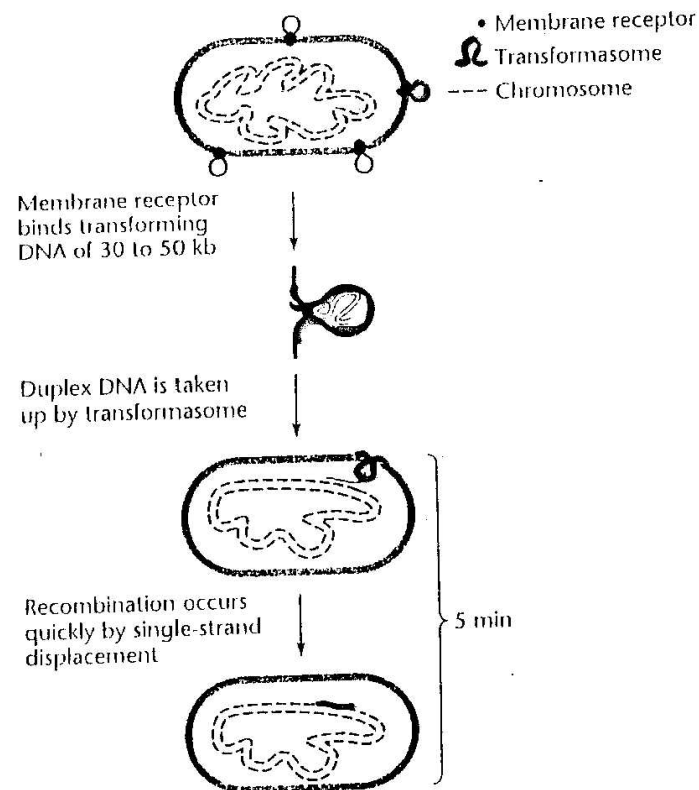


Figure 6.6 Transformation in *Haemophilus influenzae*. Double-stranded DNA is first taken up in transformasomes. One strand is degraded, and the other strand invades the chromosome, displacing one chromosome strand.

V obou případech

- Se na povrch bakteriálních buněk váže **pouze ds DNA**
- **Pouze ds DNA se může účastnit transformace**
- V cytoplasmě recipientní buňky je lokalizován 1 řetězec DNA, který se účastní rekombinace s chromosomální DNA
- Rekombinanty lze detekovat tehdy, když se donorové a recipientní buňky liší svým genotypem

Přirozeně kompetentní bakteriální buňky

- Jsou účinně transformovány pouze chromosomální DNA
- Neplatí to pro plasmidovou nebo fágovou DNA (nemůžou se v buňce cirkularizovat a tudíž ani replikovat)
- Použijeme-li dimery plasmidových a fágových DNA, umožníme jejich recirkularizaci (rekombinací), čímž získáme transformanty

Význam přirozené kompetence pro buňku

- 1. DNA slouží jako zdroj C, N a energie
- 2. Buňky přijímají DNA z jiných buněk s cílem reparovat poškození vlastní DNA
- 3. Transformace umožňuje rekombinaci 2 individuí jednoho druhu a vznik nových kombinací genů. Nahrazuje sexuální reprodukci známou u vyšších organismů.
- 4. Výhoda např. u některých druhů *Neisseria* vede transformace ke zvýšení antigenní variability druhu. To umožňuje uniknout imunitnímu systému hostitele.

Proč jsou některé druhy bakterií přirozeně transformovatelné

- Neznáme
- Není vyloučeno, že většina bakterií je přirozeně transformovatelných – v nízkých frekvencích, které nejsme schopny detekovat
- Umožnilo by to vysvětlit mutace, jež se zdají být řízené

Uměle indukovaná transformace bakteriálních buněk

- Se využívá v technikách genových manipulací
- K navození stavu kompetence se používají chemická činidla (Ca^{2+} ionty)
- Chemicky indukovaná transformace je málo účinná
- Bývá transformováno malé % buněk (0.01%) – DNA používaná pro transformaci musí proto nést nějaký selekční marker

Uměle kompetentní buňky

- Můžou přijímat ds DNA, ss DNA, lineární či kruhové molekuly

Transfekce

- Zavedení virové DNA nebo RNA do buňky
- Princip transfekce je stejný jako u transformace

Elektrotransformace

- Metoda pro zavedení cizorodé DNA do buněk
- Směs kompetentních bakteriálních buněk (buňky promyté v glycerolu) a DNA je po velmi krátkou dobu (msec) vystavena silnému elektrickému poli (20kV/cm).
- To vede ke vzniku pórů a průniku cizorodé DNA do buněk

Elektrodukce

- Je obdoba elektroporace,
- Která probíhá v přírodě např. za bouřky
- Bývá řazena - vedle konjugace, transdukce a přirozené transformace –
- jako další způsob sexuální reprodukce u bakterií.