

Základy genetiky prokaryotické buňky



Chromozomová (jaderná) DNA

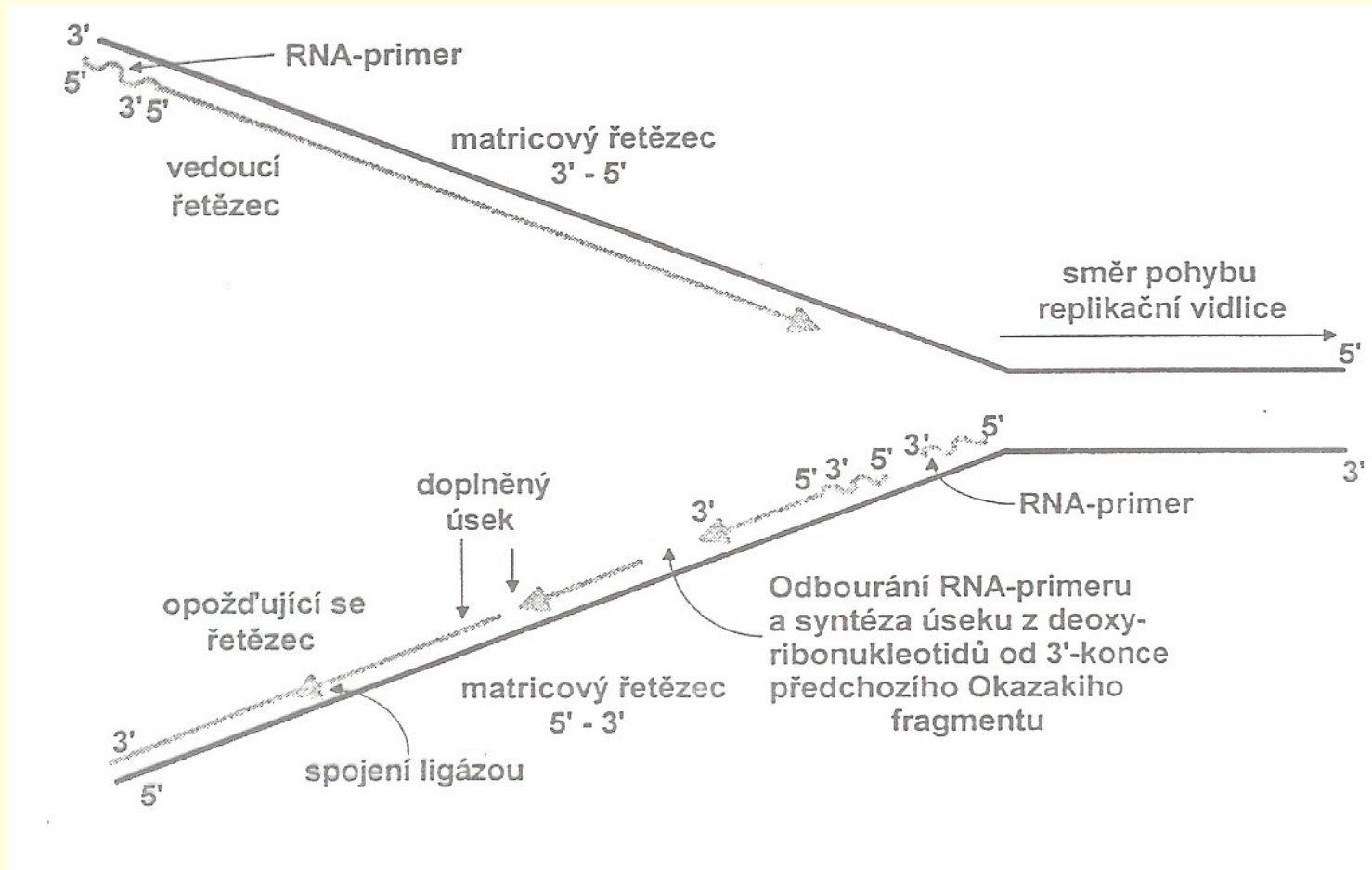
- U **prokaryot** (bakterie, archea)
dvouřetězcová většinou kružnicová
- U **eukaryot** dvouřetězcová lineární
- U **DNA-virů** dvouřetězcová lineární,
jednořetězcová lineární nebo
jednořetězcová kružnicová
- Extrachromozomální DNA - **plazmidová,**
chloroplastová a mitochondriová DNA
jsou většinou kružnicové

Replikace nukleových kyselin

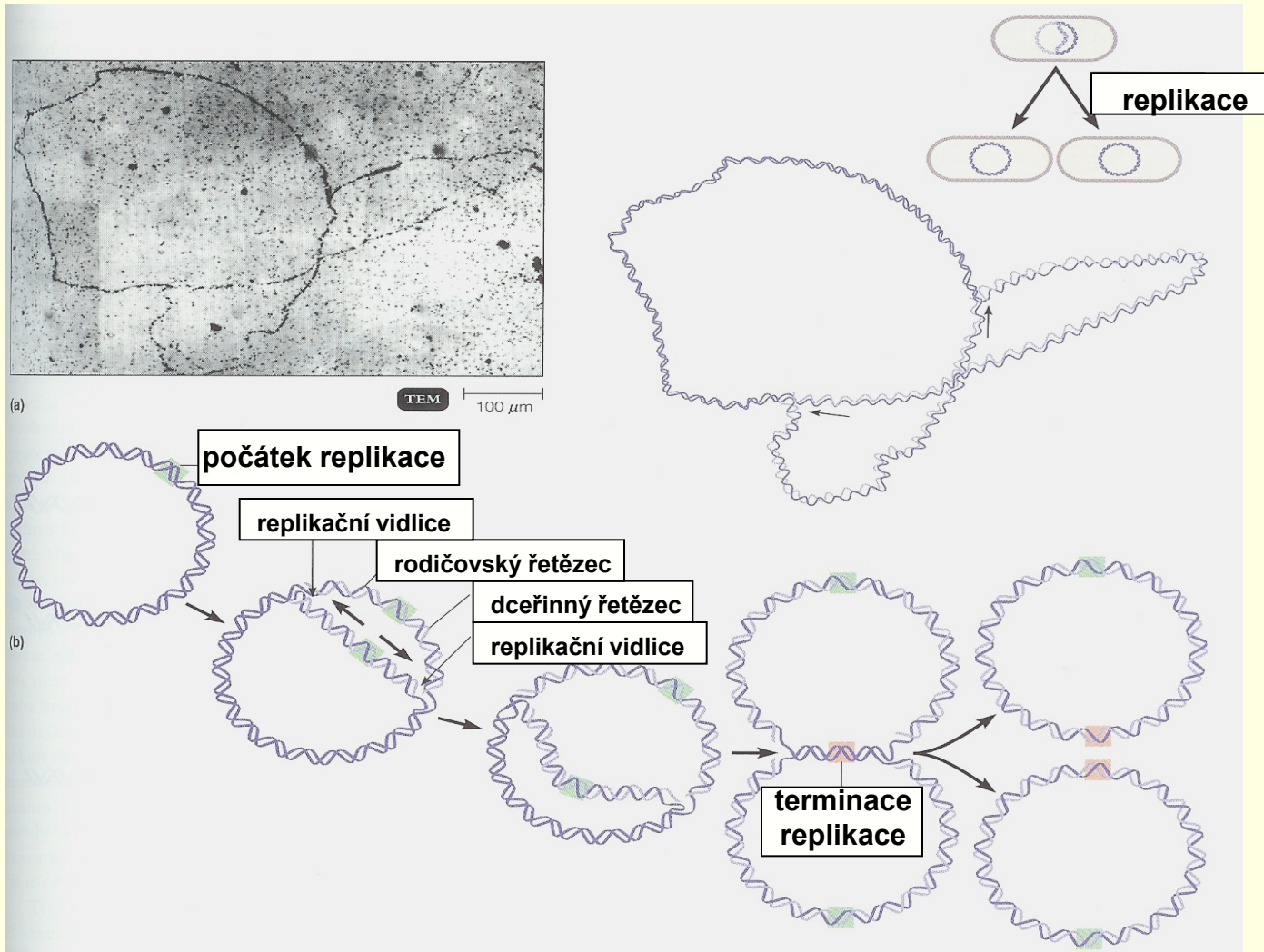
- Replikace – tvorba kopií molekul nukleových kyselin zajišťujících přenos genetické informace z DNA do DNA nebo z RNA do RNA

Semidiskontinuální syntéza DNA

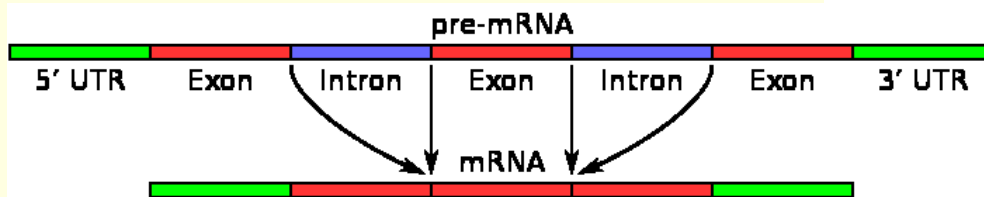
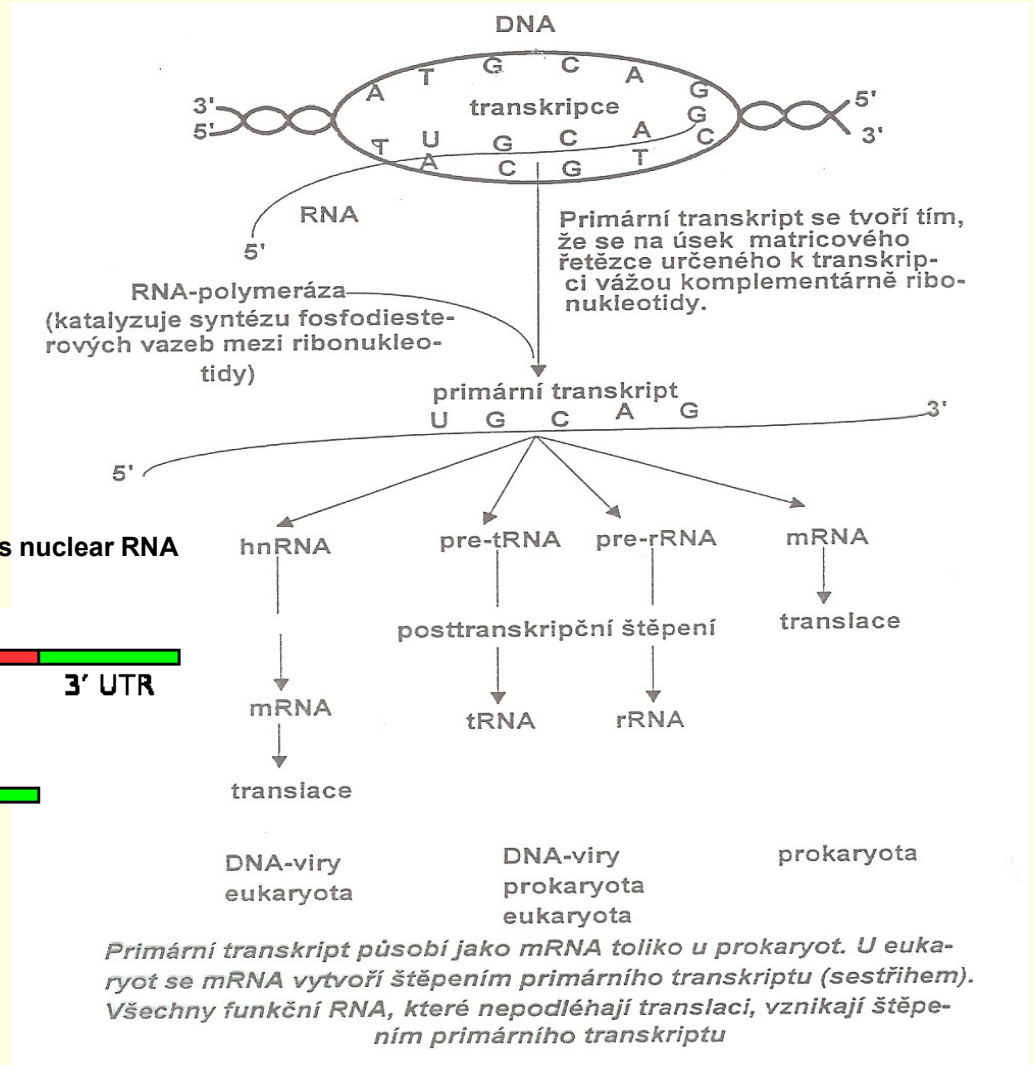
Replikace chromozómové DNA



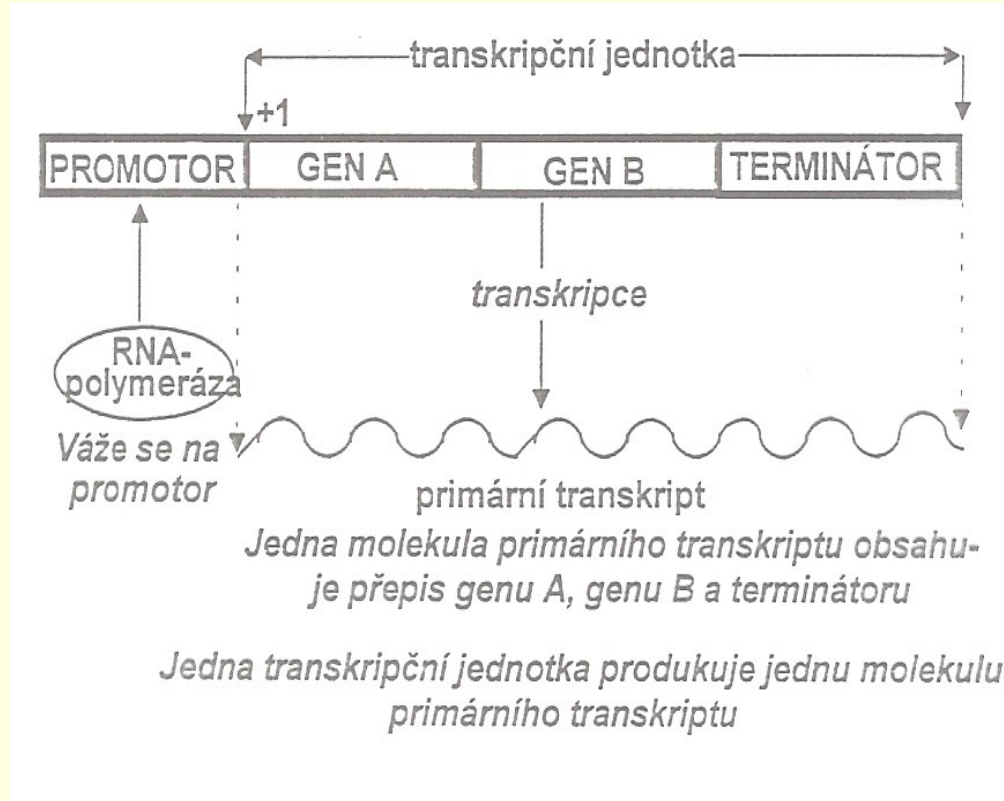
Replikace plazmidové DNA



Základní schéma transkripce



Transkripční jednotka



Dědičnost, proměnlivost a přenos znaků u mikroorganismů

- dědičnost – souhrn znaků, které jsou v procesu reprodukce předávány na potomstvo
- dědičné znaky

Genetická informace

- Genetická informace je obsažena ve sledu (pořadí) nukleotidů – nukleotidových sekvencích funkčních typů nukleových kyselin

Nukleotidové sekvence

* v DNA nebo RNA sekvenci je obsažena informace o **primární struktuře proteinu**

* v DNA je informace o **primární struktuře biologicky funkční RNA** (tRNA, rRNA, ...)

* RNA sekvence může obsahovat **informaci o struktuře DNA**

* DNA nebo RNA sekvence může obsahovat **informace o vazbě ke specifickým proteinům** (začátek nebo konec transkripce)

Základní pojmy

■ Gen – jednotka genetické informace

Gen obsahuje genetickou informaci o primární struktuře buď

- * funkční molekuly translačního produktu (polypeptidu, proteinu)
- * funkční molekuly produktu transkripce (tRNA, rRNA atd.) nepodléhající translaci

Genetický kód

- **System pravidel determinujících způsob přepisu pořadí nukleotidů do pořadí aminokyselin v peptidickém řetězci**

Genetický kód

- Základní jednotkou genetického kódu je

kodon

tj. pořadí nukleotidů, kódující určitou aminokyselinu v peptidickém řetězci

Genetický kód

- Genetický kód je **tripleťový**
- Je sestaven ze **64 kodonů**
- **Je degenerovaný** (jedna aminokyselina je kódována několika kodony)
- Schopnost kodonu kódovat aminokyselinu se označuje jako **smysl kodonu**
- Aminokyseliny kóduje pouze **61 kodonů**

Genetický kód

Kodony					
První nukleotid (5 konec)	Druhý nukleotid				Třetí nukleotid (3 konec)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	N	N n.Secys	A
	Leu	Ser	N	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met n.I	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

N – nesmyslný kodon

I – iniciační kodon

Genetický kód

- Některé kodony jsou **nesmyslné**
 - * **UAA** - ochre
 - * **UAG** - amber
 - signalizují ukončení syntézy polypeptidu (terminační kodony)
 - * **UGA** - opal je **bifunkční**
 - terminační kodon
 - kodon pro selenocystein

amber mutations (UAG) were the first set of nonsense mutations to be discovered, isolated by Richard Epstein and Charles Steinberg and named after their friend Harris Bernstein (whose last name means "amber" in German)

Gen

- v genu je kodována
 - * primární struktura bílkovinného řetězce (strukturní geny)
 - * struktura tRNA
 - * struktura rRNA
 - * mají regulační funkci

Gen

- **Lokus** - umístění genu kódujícího daný enzym metabolické dráhy na různých místech chromozomu (u eukaryot)

Genom – souhrn všech genů buňky nebo viru

- U **eukaryot** jsou geny lokalizovány v různých organelách → jádro, mitochondrie nebo chloroplasty (případně plazmidy)
- U **prokaryot** jsou geny lokalizovány na chromozomové DNA a plazmidech

Genotyp

- Souhrn všech genů představujících genetickou informaci
 - * nesených na chromozomální i extrachromozomální DNA
- Projev genotypu (potenciál pro projev v podobě znaků) je závislý na podmínkách vnějšího prostředí

Fenotyp

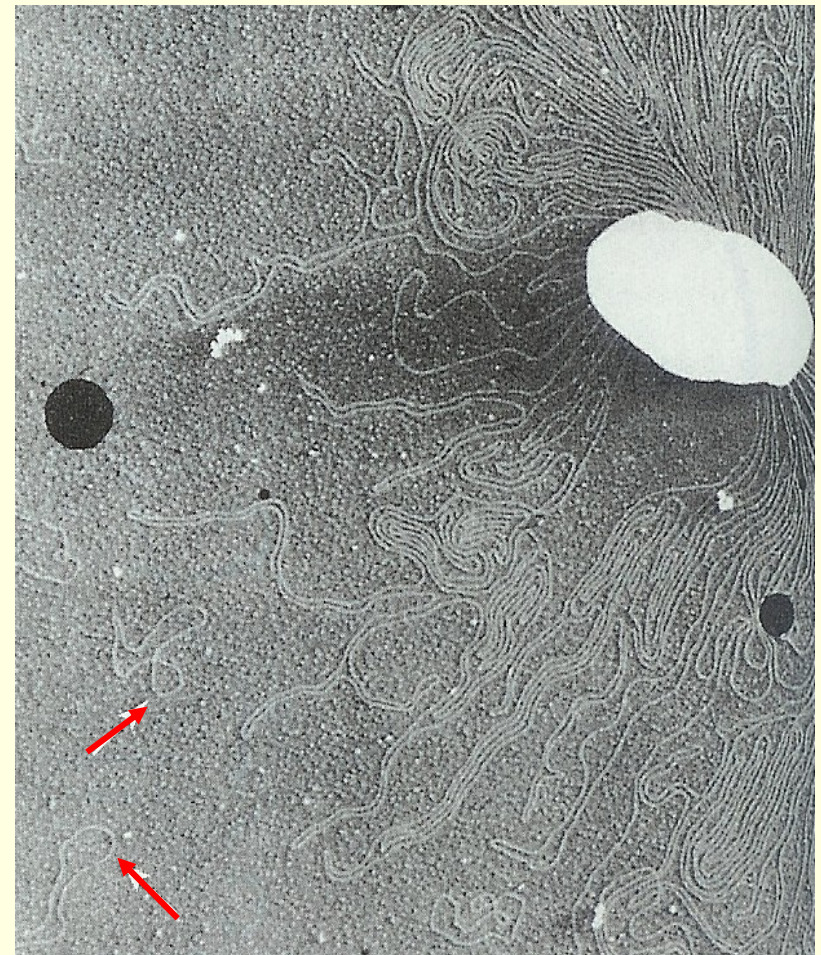
- Projev genotypu za daných vnějších podmínek
- Znamená to, že daný genotyp se může v různých podmínkách projevit různě

Fenotyp

- Pokud je změna vnějších podmínek tak intenzivní, že vede k nápadné změně fenotypu, označuje se tato změna jako **modifikace fenotypu**
- Modifikace se projevuje u **převážné části** mikrobiální populace
- Modifikace **je jev reverzibilní**. Po odeznění podmínek vyvolávajících změnu, se vrací populace do “normálního“ stavu

Plazmidy

- Samostatný replikon tvořený dsDNA (cirkulární nebo lineární)
- Některé plazmidy jsou epizomální (mohou se reverzibilně zabudovat do chromozomu)
- **Nenese informace o dělení buňky**
- Nese informace o specifickém fenotypovém projevu



plazmid

Plazmidy

- Každý plazmid obsahuje
 - * lokus **ori** – počátek replikace
 - * lokus **inc** – místo pro připojení na biologickou membránu při replikaci

Plazmidy

■ Plazmid je

- * **jednokopiový** – pouze jedna kopie DNA v buňce
- * **vícekopiový** – několik kopií téhož plazmidu v buňce

Plazmidy

■ Plazmid je

- * **kompatibilní** – dva různé plazmidy v jedné buňce mají odlišný lokus **inc**, mohou se replikovat současně
- * **inkompatibilní** – mají stejný lokus **inc**

Plazmidy

- Plazmid může být v
 - * **autonomním stavu** - samostatný replikon lokalizovaný volně v základní cytoplazmě (replikuje se nezávisle na replikaci chromozomu)
 - * **integrovaném stavu** – navázaný **mezi** geny v chromozomální DNA (replikuje se současně s replikací chromozomu)

Plazmidy

■ Plazmid je

- * **konjugativní** – obsahuje geny **tra** (označované i jako fertilitní faktor) zodpovědné za syntézu sexuálních pilusů, a průběh konjugace
- * **nekonjugativní** – neobsahují geny **tra**

Plazmidy u bakterií

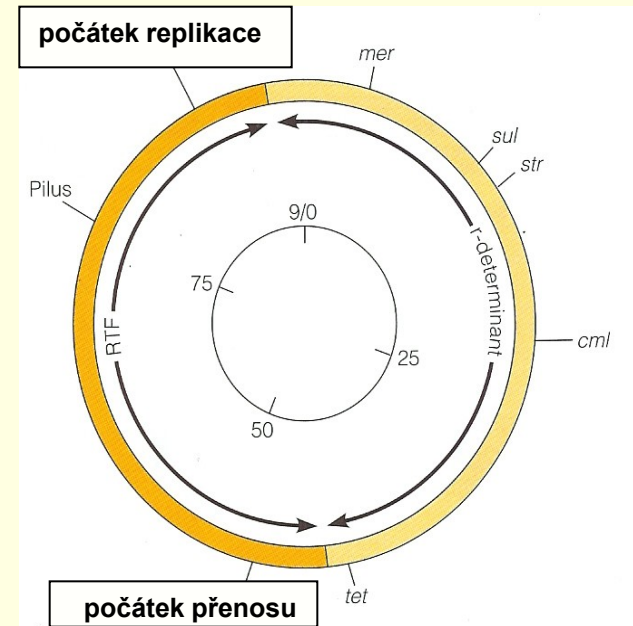
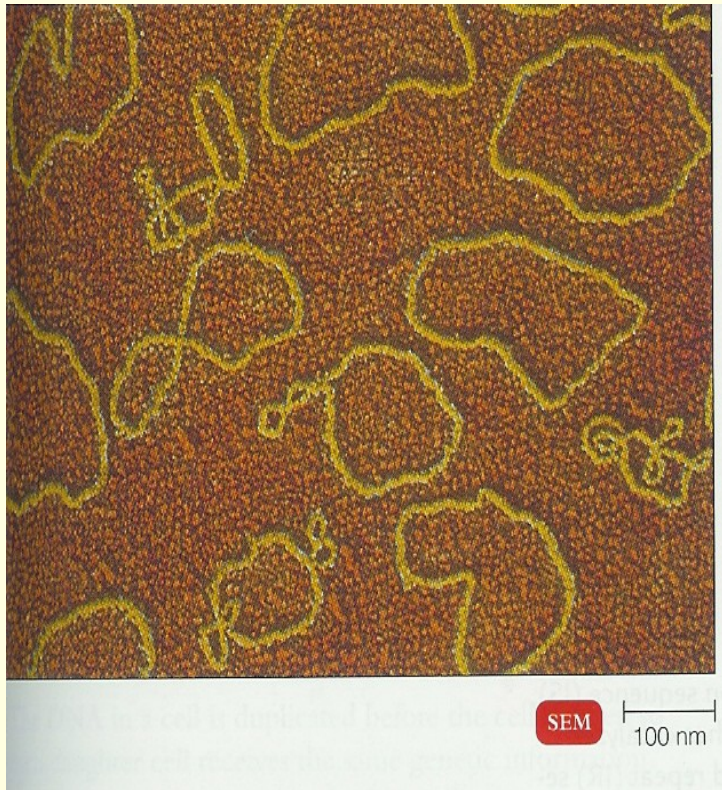
Plazmidy se u bakterií vyskytují velice často – málo druhů bez plazmidů

- **Plazmidy F a F'** - konjugativní plazmidy u *E.coli* K12
 - * F faktor (fertilní faktor)
 - * Jsou zodpovědné za průběh konjugace
 - * Jsou zodpovědné za syntézu sexuálních pilusů

R - plazmidy

- R faktory jsou zodpovědné za rezistenci k
 - * antibiotikům
 - * těžkým kovům
 - * buněčným toxinům
- Objeveny byly v Japonsku v r. 1950 při epidemii dysenterie
- Jeden plazmid může nést informaci o rezistenci k několika látkám – vznik polyrezistentních kmenů

R - plazmidy

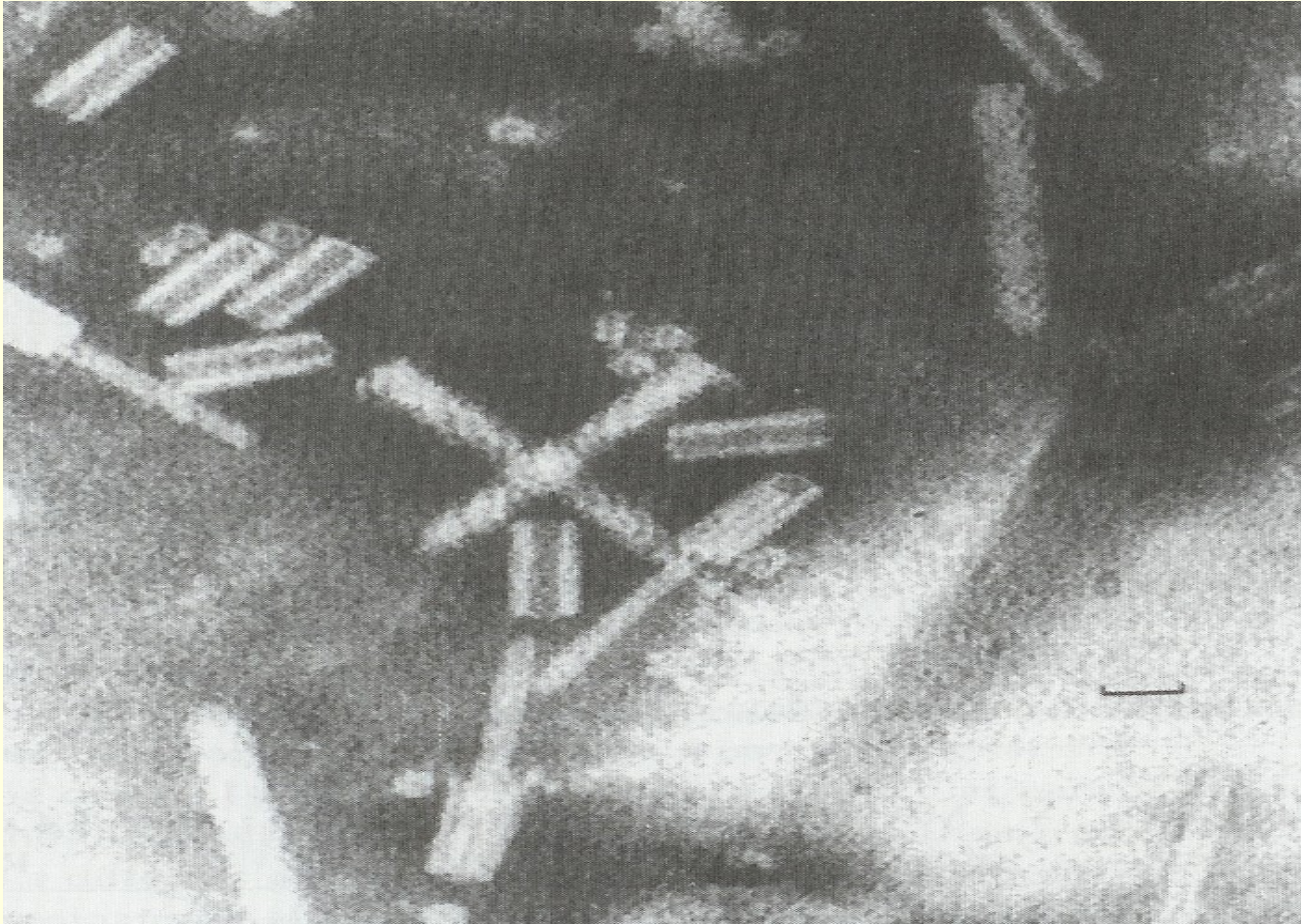


R plazmid *Bacteroides fragilis* kodující rezistenci ke clindamycinu

Bakteriocinové faktory

- Bakteriocin – bílkovina usmrcující citlivé kmeny téhož druhu nebo jiných druhů
- Bakteriociny působí na cytoplazmatickou membránu nebo na syntézu bílkovin. Mohou také blokovat vazebná místa na buněčné stěně (receptory)
- Col plazmidy (koliciny)

Bakteriocin



Pyocin R - *Pseudomonas aeruginosa*

Plazmidy

■ Kryptické

Představují skupinu plazmidů, jejichž fenotypový projev není dosud znám

■ Degradativní

Nesou informaci o schopnosti využívat “neobvyklé“ látky (toluen, oktan, kafr, kys. salicylovou,)

Plazmidy kvasinek

- Dosud popsány u některých druhů rodu *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida* a *Zygosaccharomyces*
- Nejlépe prostudovaným je plazmid označený 2 μ m *Saccharomyces cerevisiae*
- Vyskytuje se v **nukleoplazmě** v 60-100 kopiích na diploidní buňku
- Plazmid 2 μ m se používá v genovém inženýrství jako vektor pro klonování

Plasmid 2 μ m

- The 2 μ m circle is a small double stranded DNA plasmid that occurs at about 60 copies per cell in the nuclei of virtually all strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The plasmid has no apparent phenotypic effect on host cells, and is the basis of many useful vectors for the transformation of yeast. Under certain circumstances, the plasmid is apparently able to replicate more than once per cell cycle; this over-replication allows the maintenance of the plasmid at high copy number. The plasmid has two inverted repeat sequences, and encodes a product that catalyses intramolecular recombination between these two repeats. Models are proposed whereby recombination leads to copy number amplification. In particular, it is proposed that intra-molecular recombination during replication flips the orientation of one replication fork with respect to the other, so that both forks travel in the same direction around a circular monomer template, generating a large multimer from a monomer and a single initiation of replication.

Změna genetické informace

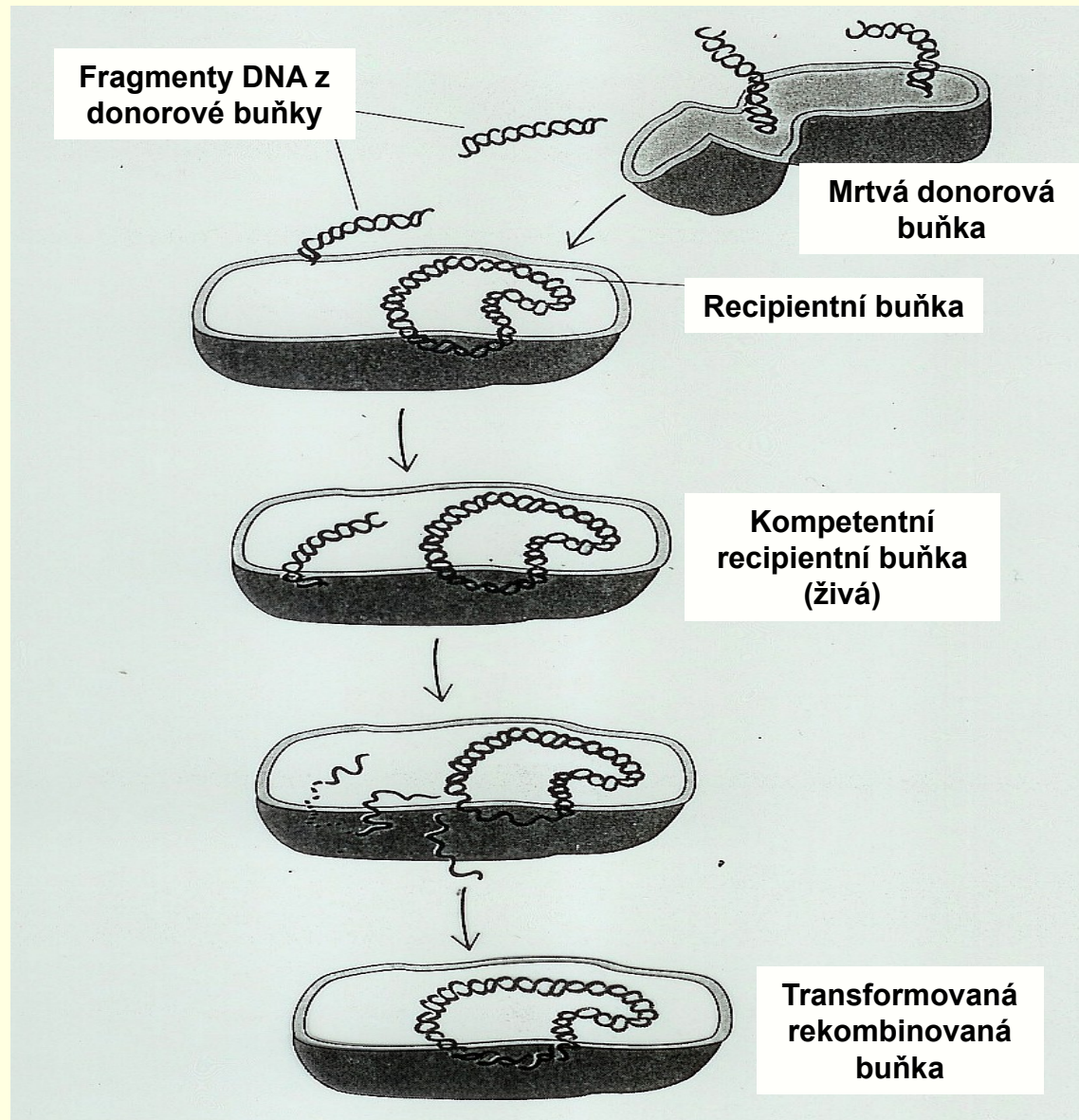
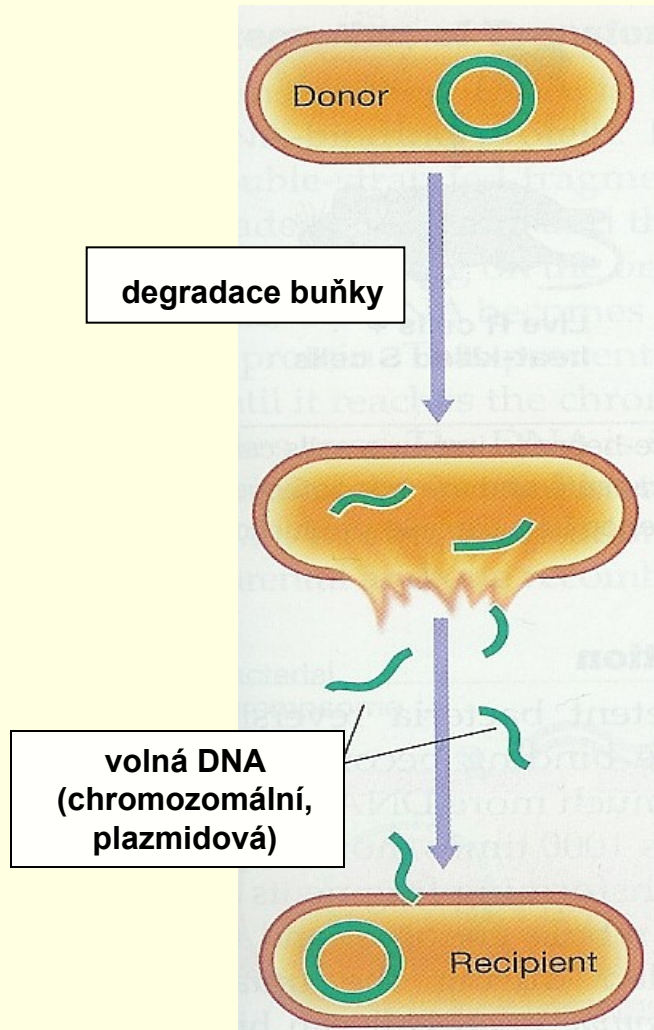
- Mutace
- Přenos znaků
 - * u prokaryot
 - * u eukaryot

Přenos znaků u prokaryot

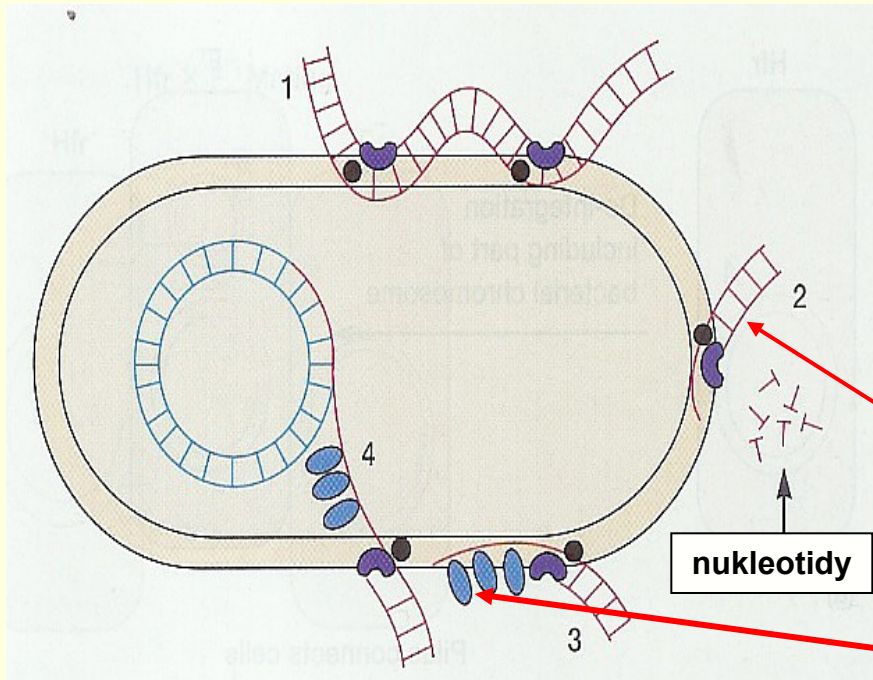
■ Rekombinace

- * **transformace** – přenos izolované DNA do recipientní buňky
- * **transdukce** – přenos DNA z donorové buňky do recipientní pomocí bakteriofága
- * **konjugace** - přenos DNA z donorové buňky do recipientní konjugačním můstkem

Transformace

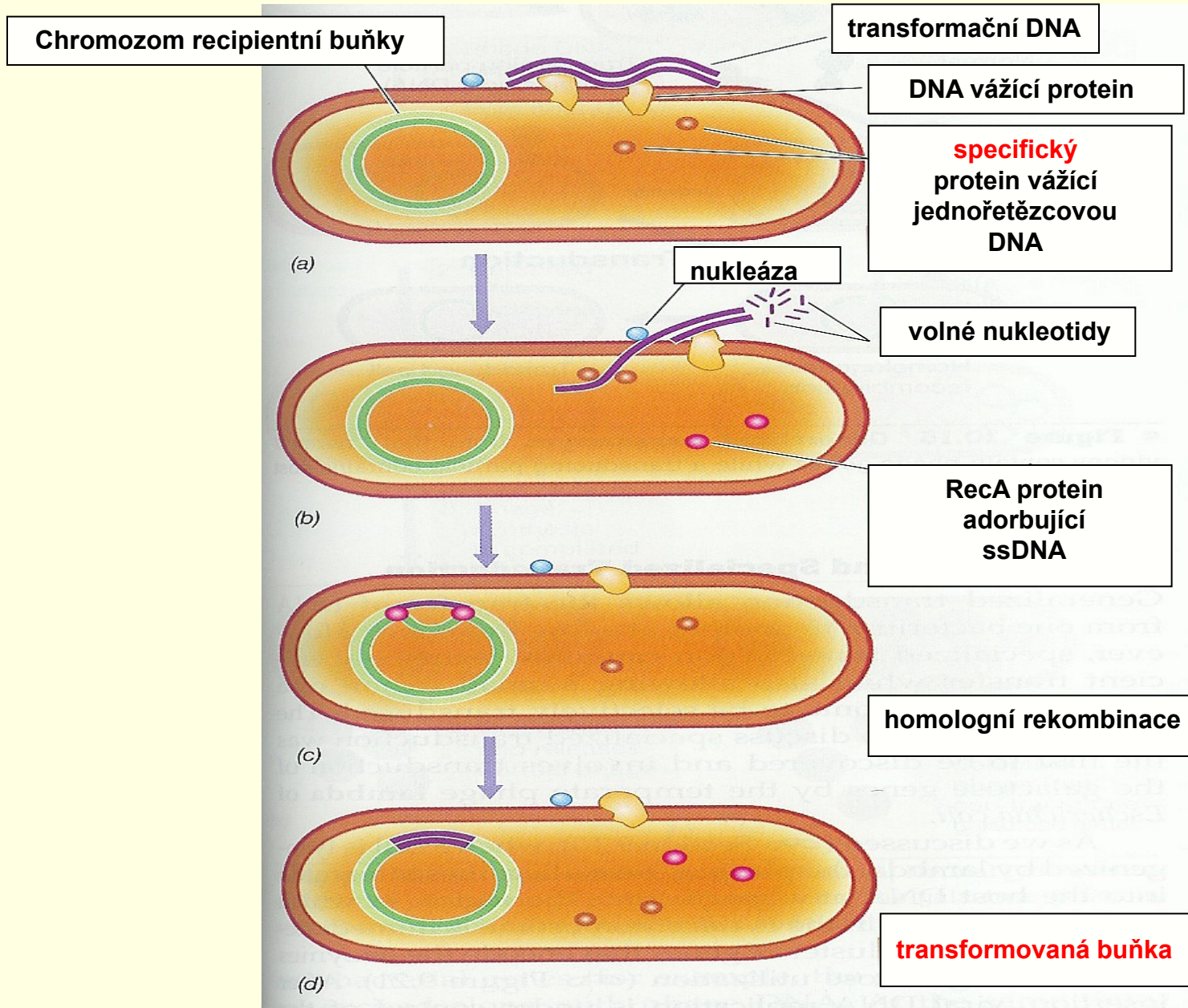


Transformace – vstup DNA do buňky



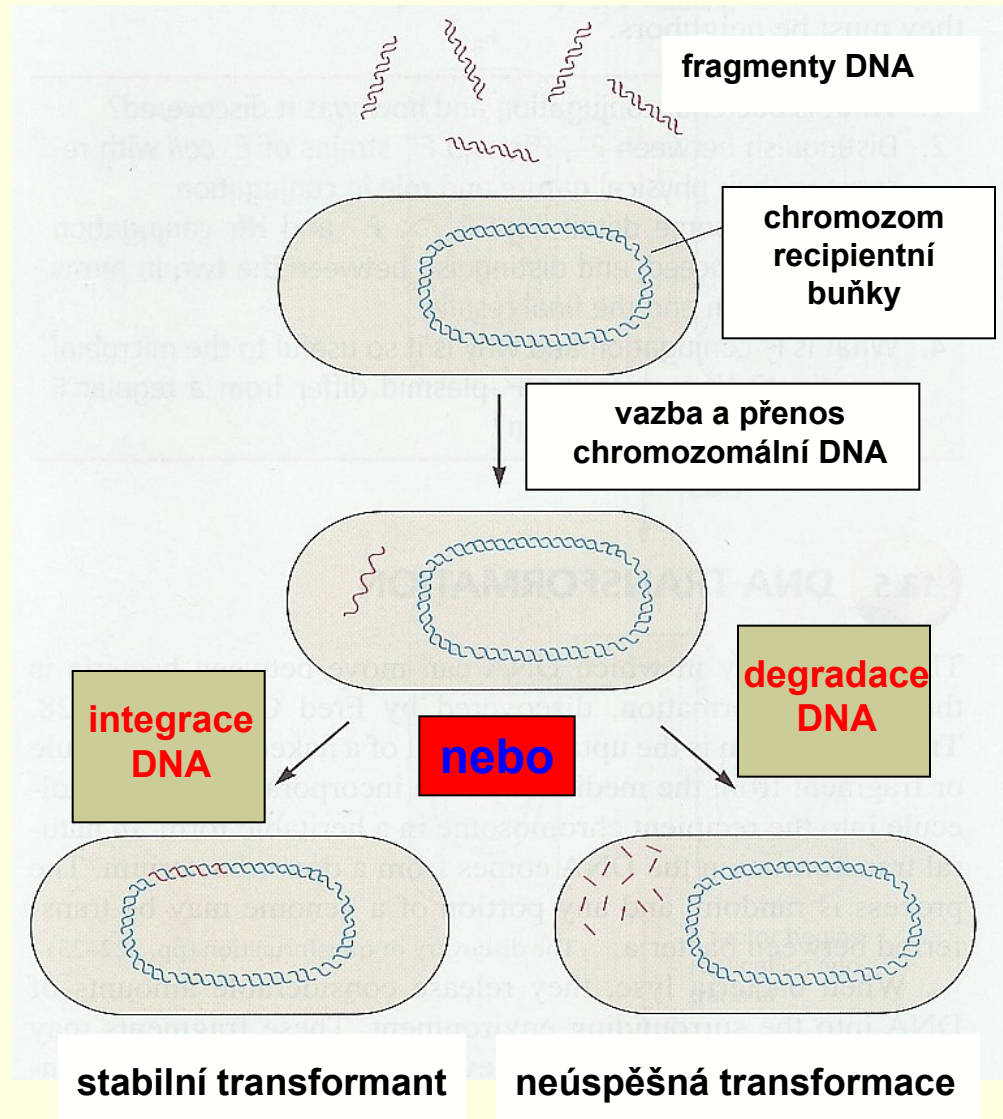
1. Dlouhé fragmenty chromozomální DNA nebo plazmidu se váží k **vazebným bílkovinám** na vnější straně buněčné stěny a je částečně štěpena nukleázami
2. Jeden řetězec DNA je degradován DNAázou
3. Nedegradovaný řetězec se napojuje na specifický **kompetenční protein**
4. Jednoduchý řetězec vstupuje do buňky a je integrován do chromozomu recipientní buňky výměnou homologní části chromozomu

Transformace – vstup DNA do buňky



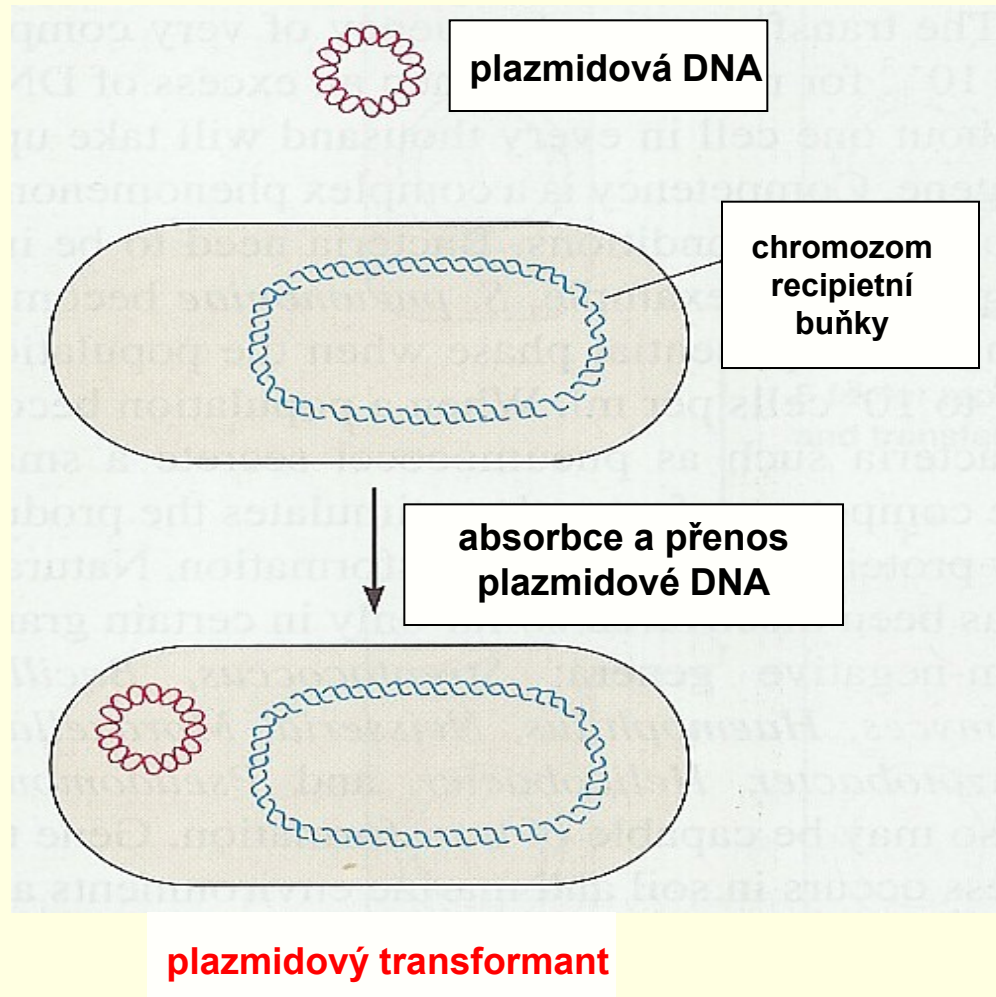
Transformace –

vznik rekombinantního transformanta



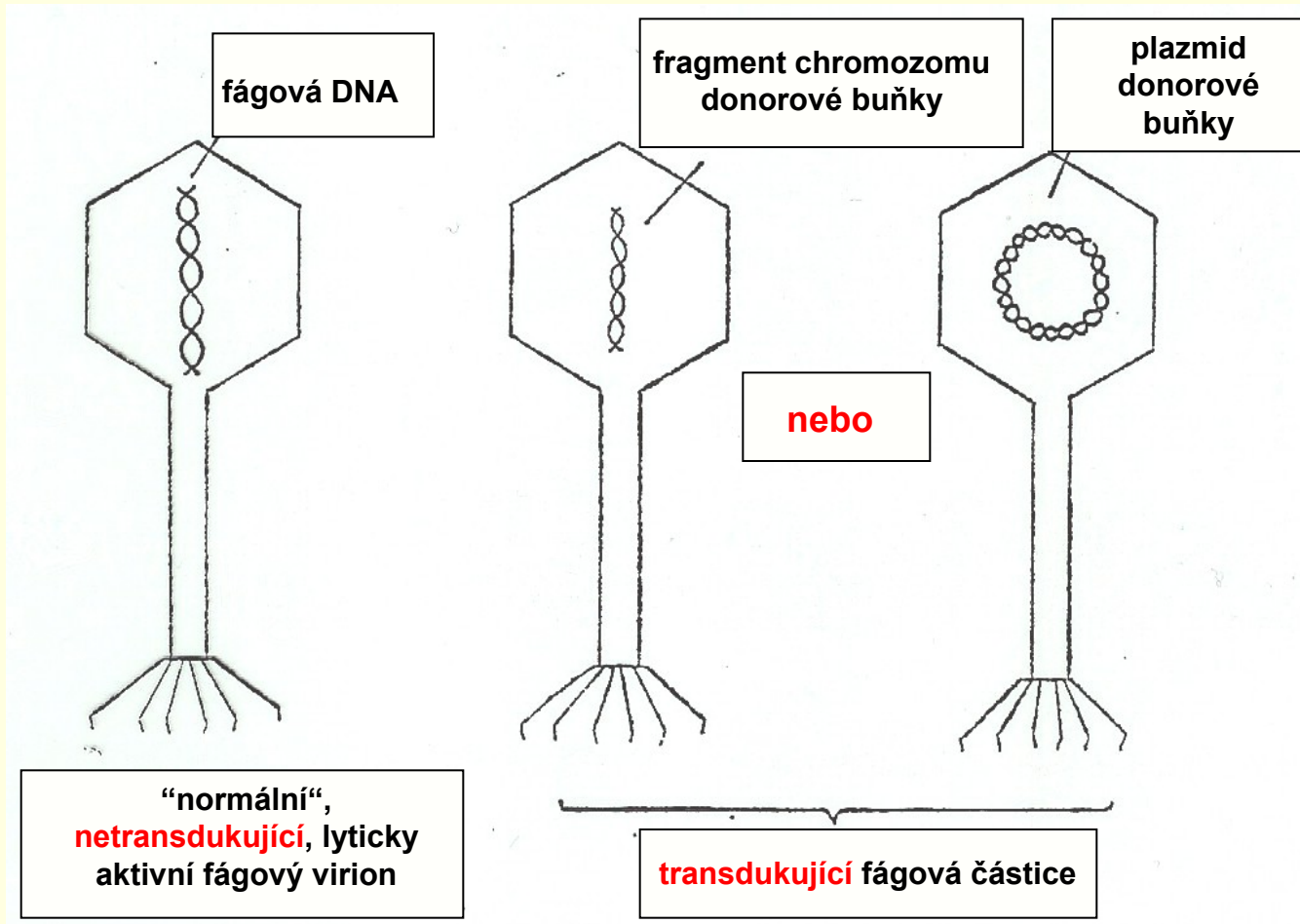
Transformace –

vznik plazmidového transformanta



Transdukce

přenos DNA donorové buňky do recipientní bakteriofágem

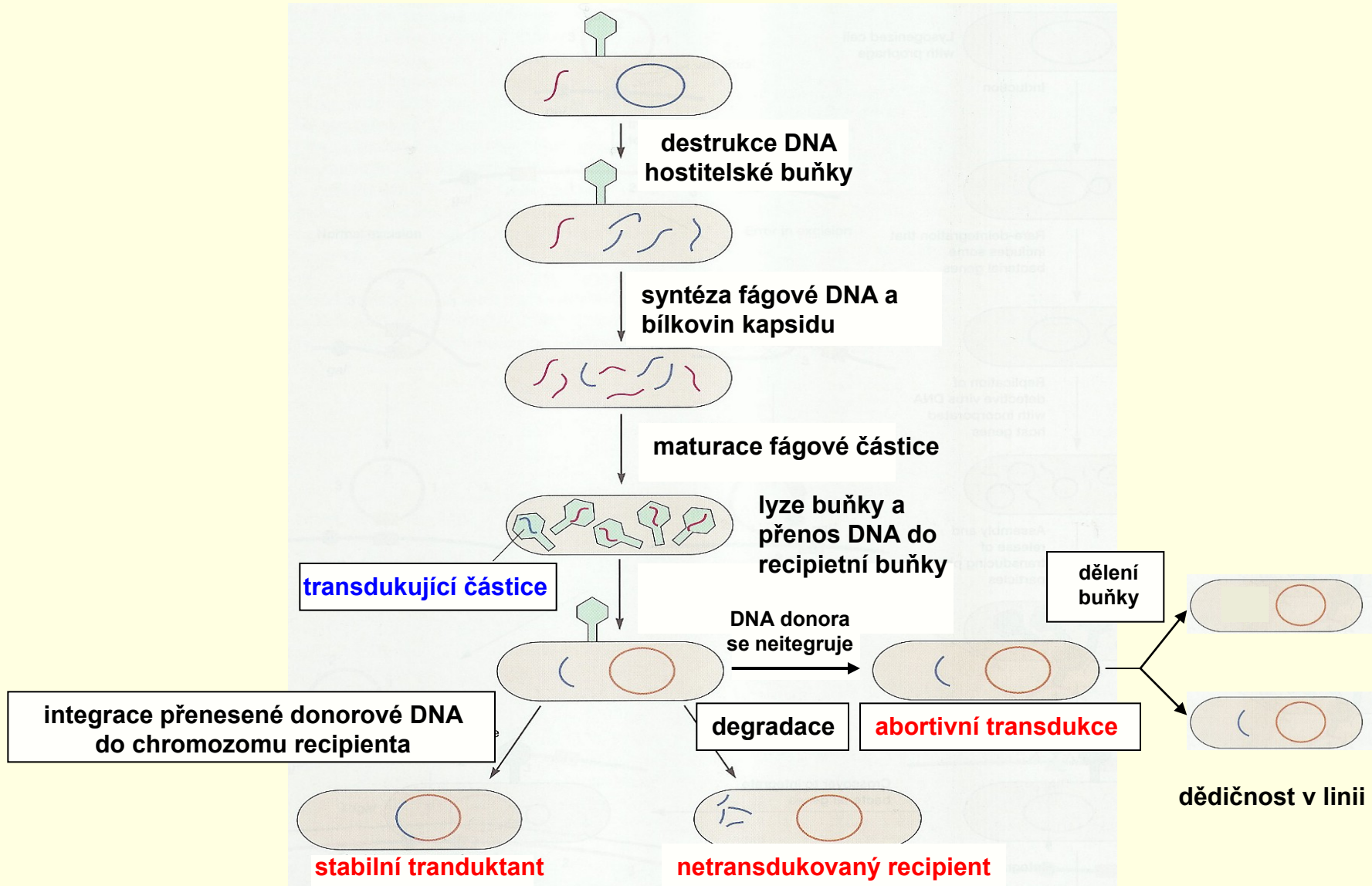


Transdukce

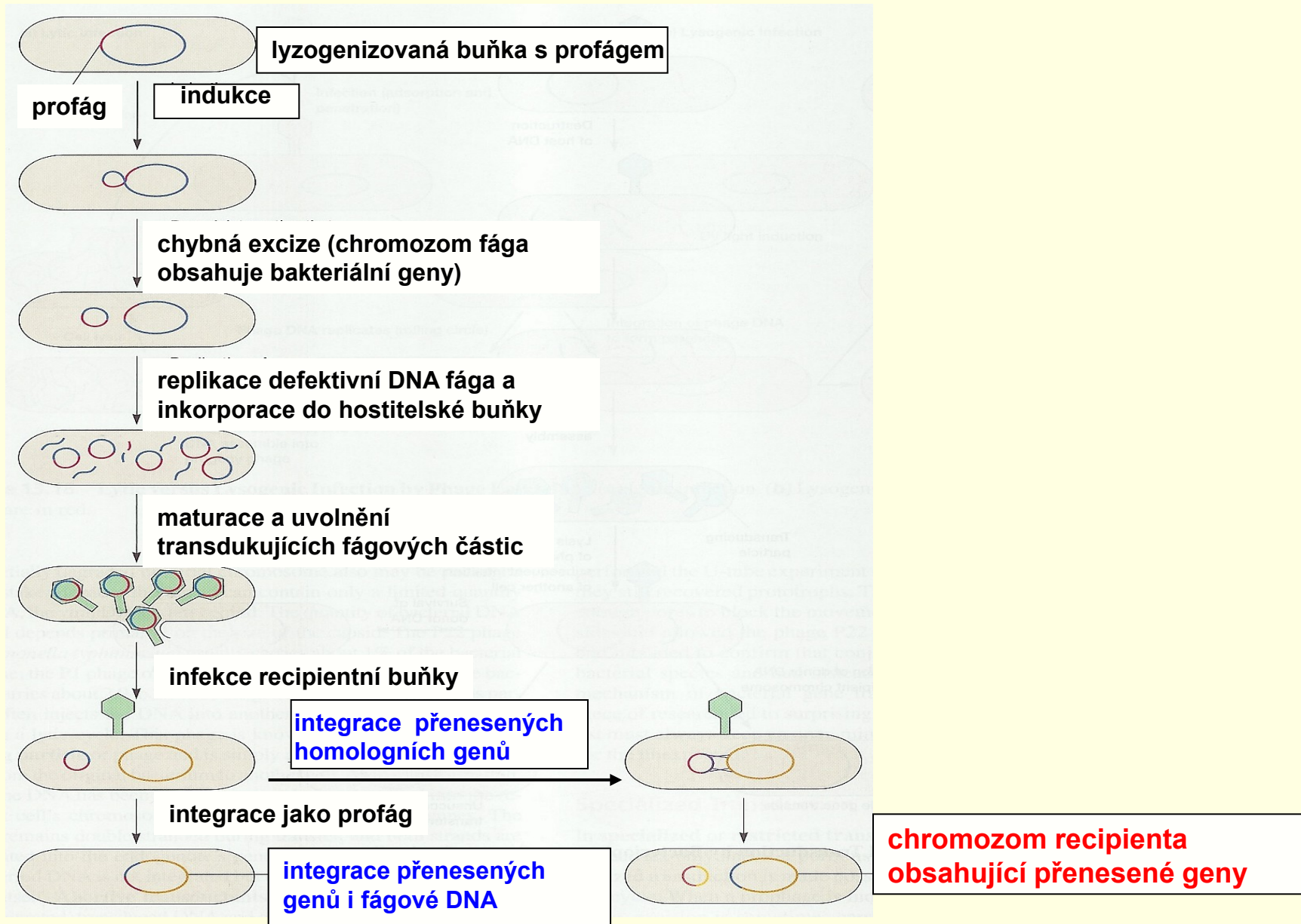
- Pro transdukci je používán pouze **temperovaný bakteriofág**
- **Transdukce nespecifická** – je přenášen jakýkoliv úsek DNA hostitelské buňky (fragment chromozomu nebo plazmid)
- **Transdukce specifická** – je přenášen určitý úsek DNA hostitelské buňky (fág λ *E.coli* přenáší pouze gen **gal** nebo **bio** – syntéza biotinu)

Transdukce -nespecifická

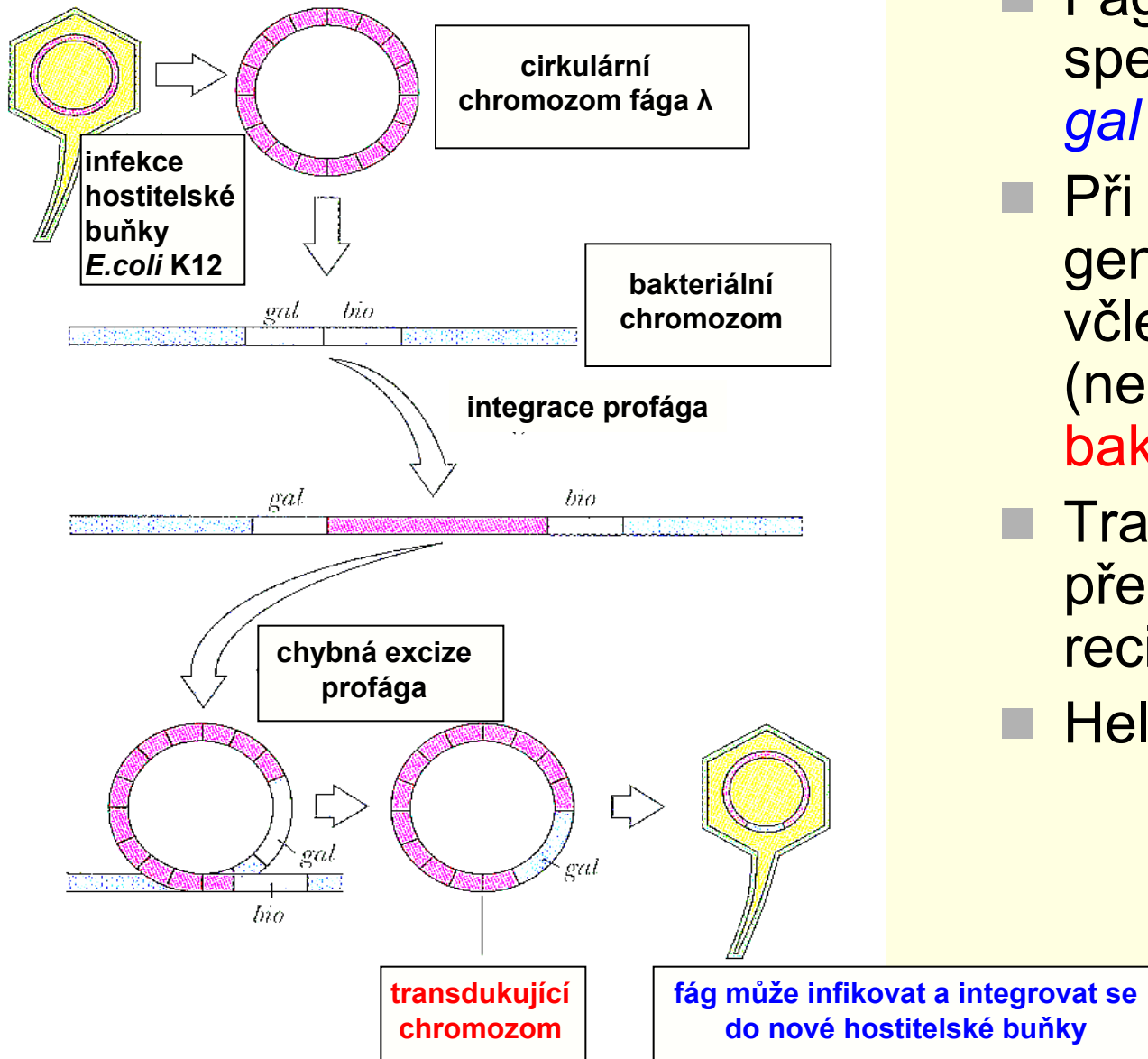
vznik rekombinantního transduktanta



Transdukce - specifická

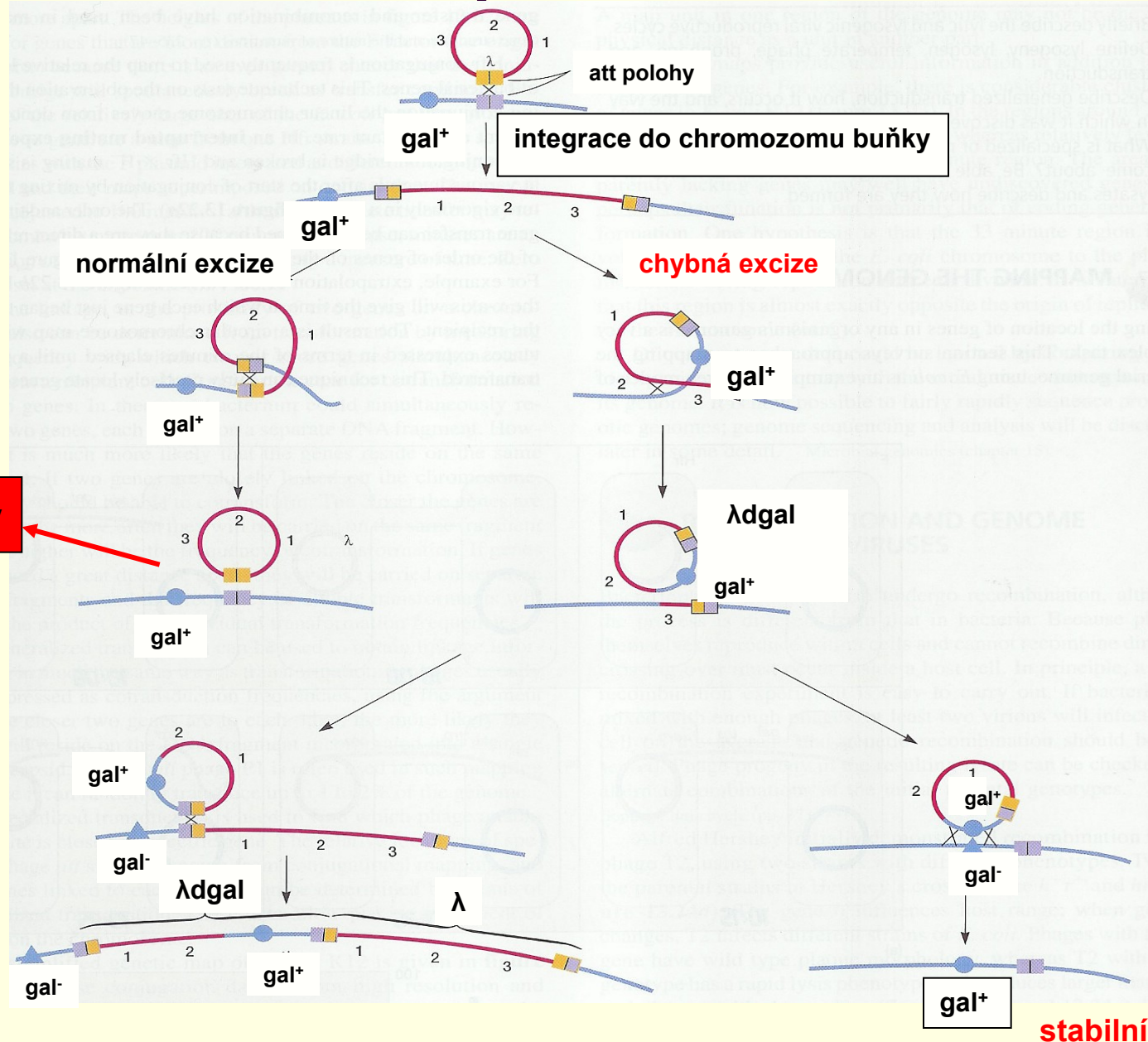


Transdukce - specifická



- Fág λ se začleňuje specificky mezi geny *gal* a *bio*
- Při excisi je do genomu fága včleněn gen *gal* (nebo *bio*) – **defektní bakteriofág**
- Transdukující fág přenese gen do recipientní buňky
- Helper fág

Transdukce - specifická

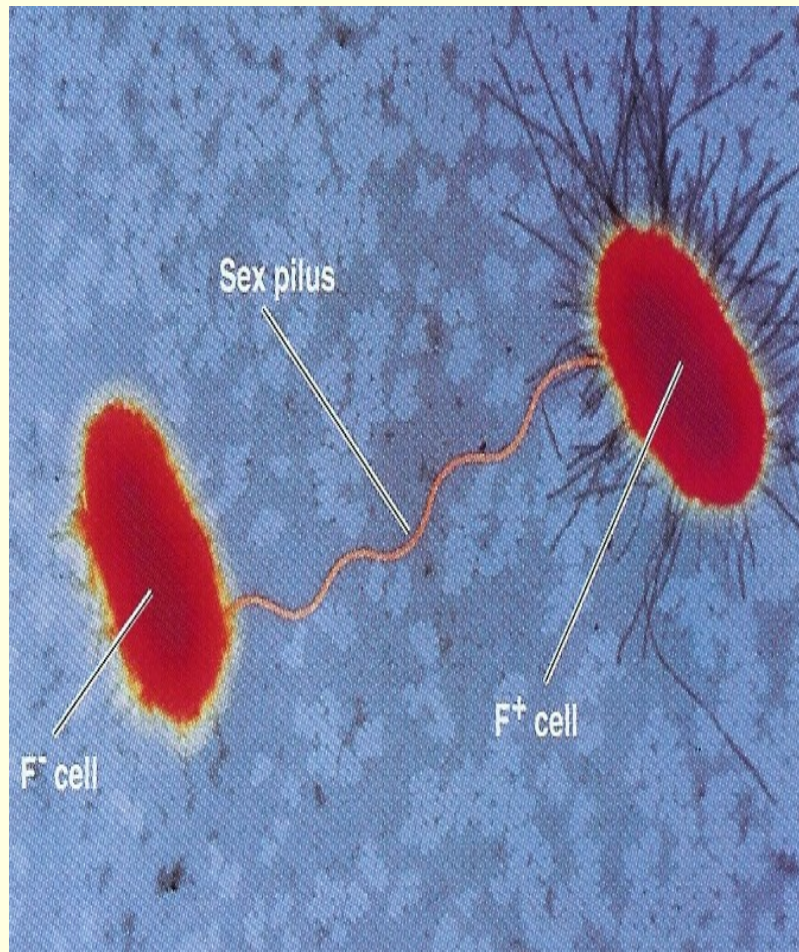


lyze buňky

nestabilní transduktant

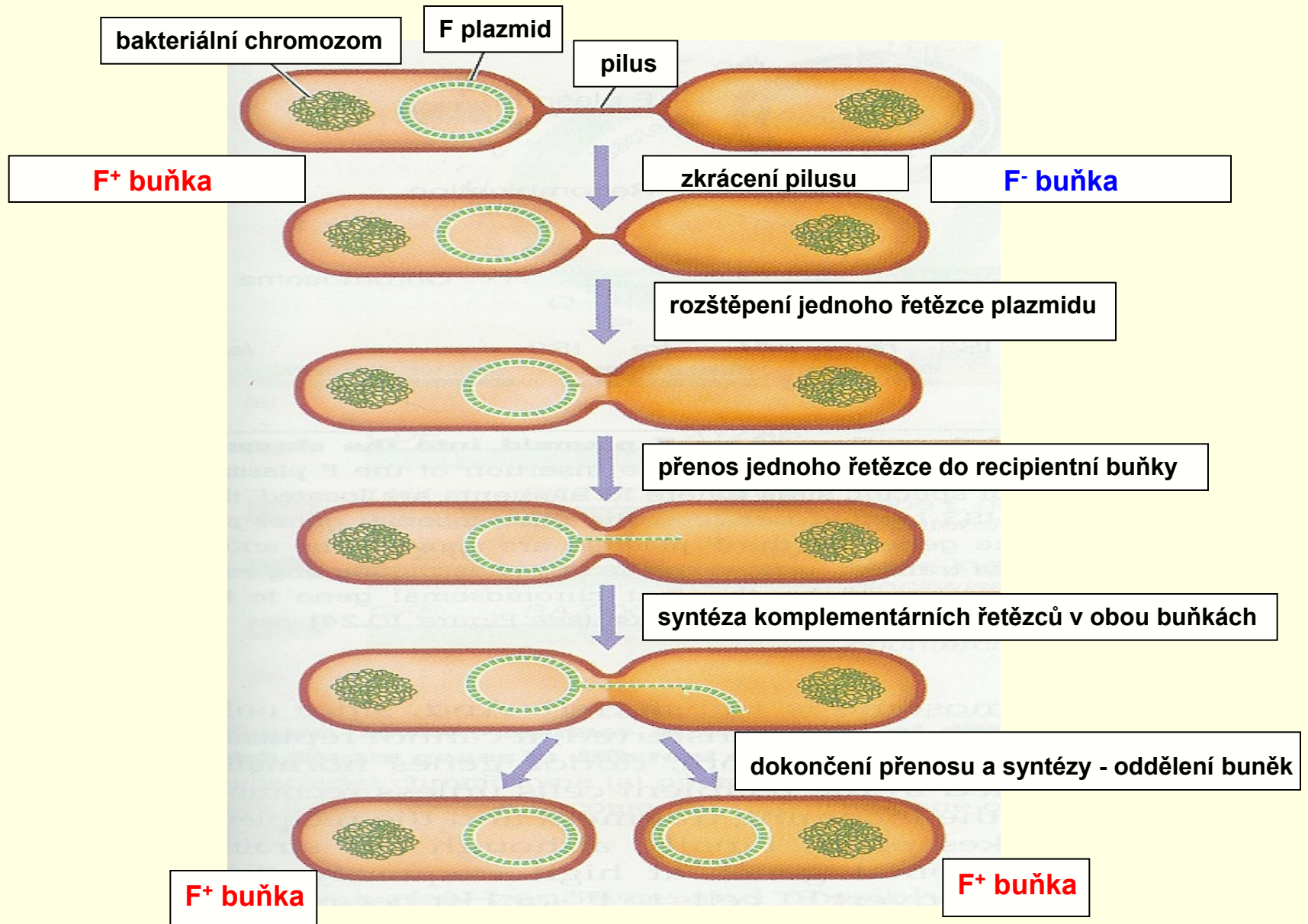
stabilní transduktant

Konjugace



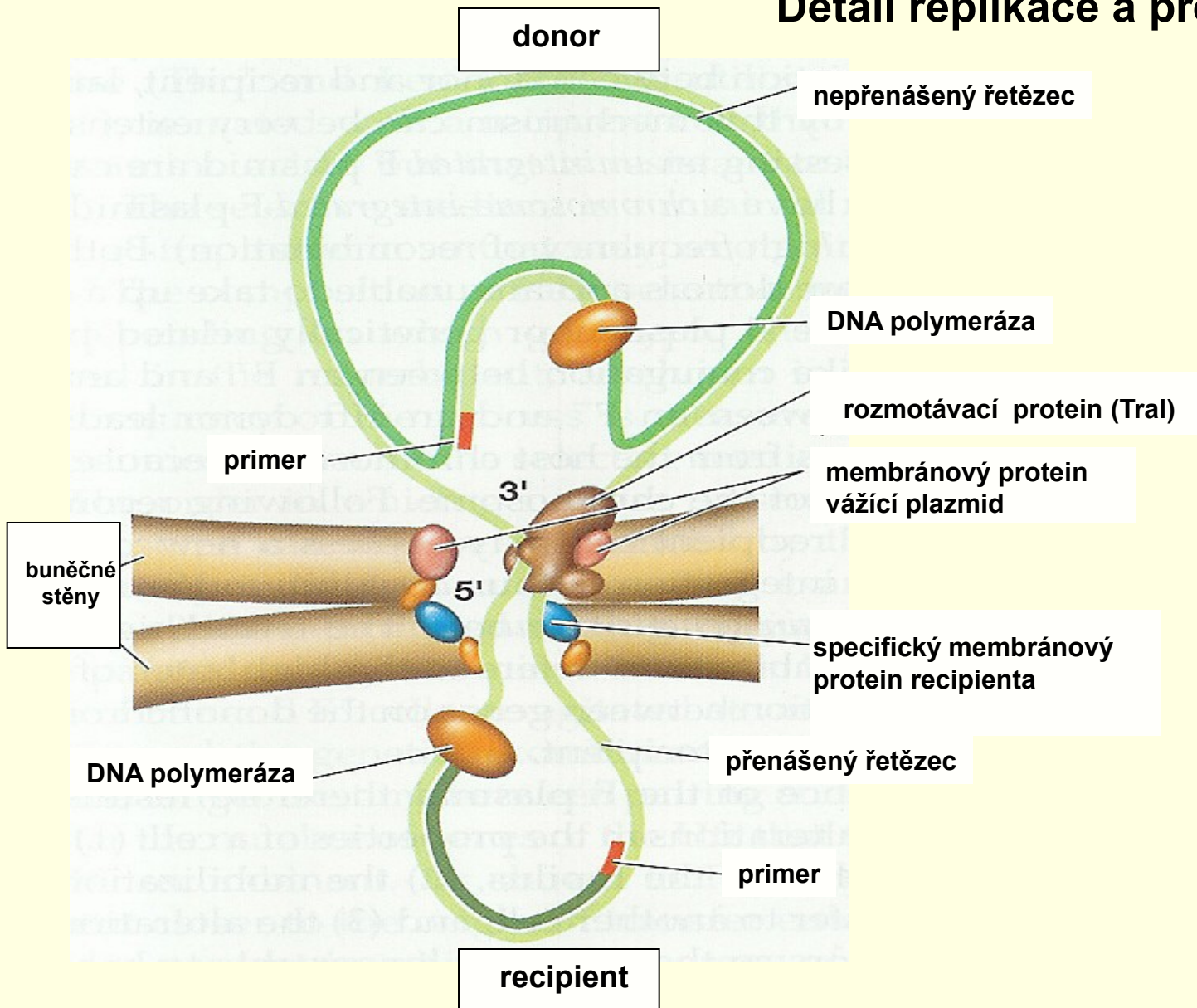
- Tvorbu **sexuálního pilusu** koduje gen nesený na **plazmidu F** (buňky F⁺) – **fertilní faktor** – **gen transkonjugativní plazmid**
- Výsledkem konjugace je
 - * **plazmidový transkonjugant**
 - * **rekombinantní transkonjugant**

Vznik plazmidového transkonjuganta



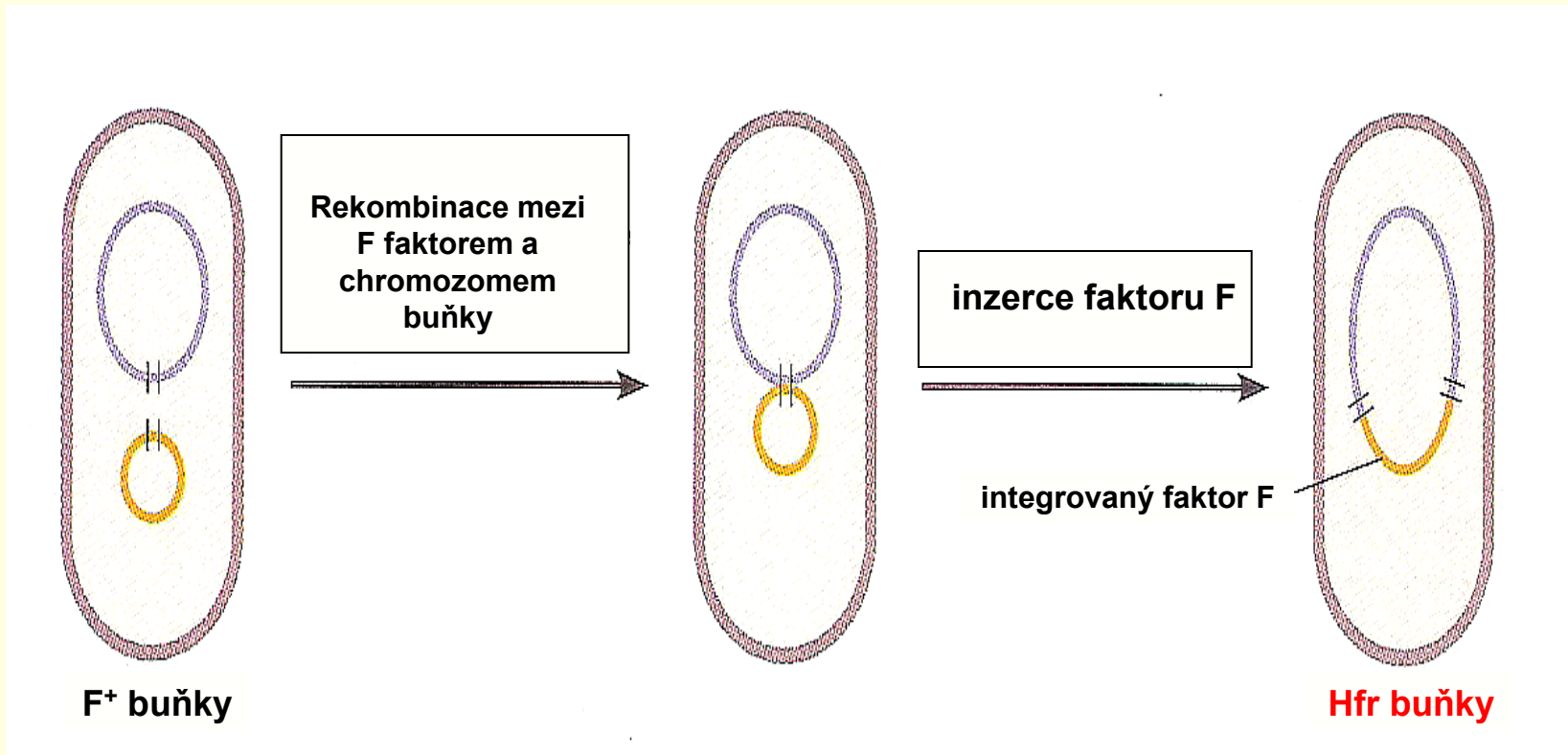
Vznik plazmidového transkonjuganta

Detail replikace a přenosu plazmidu



Vznik rekombinantního transkonjuganta

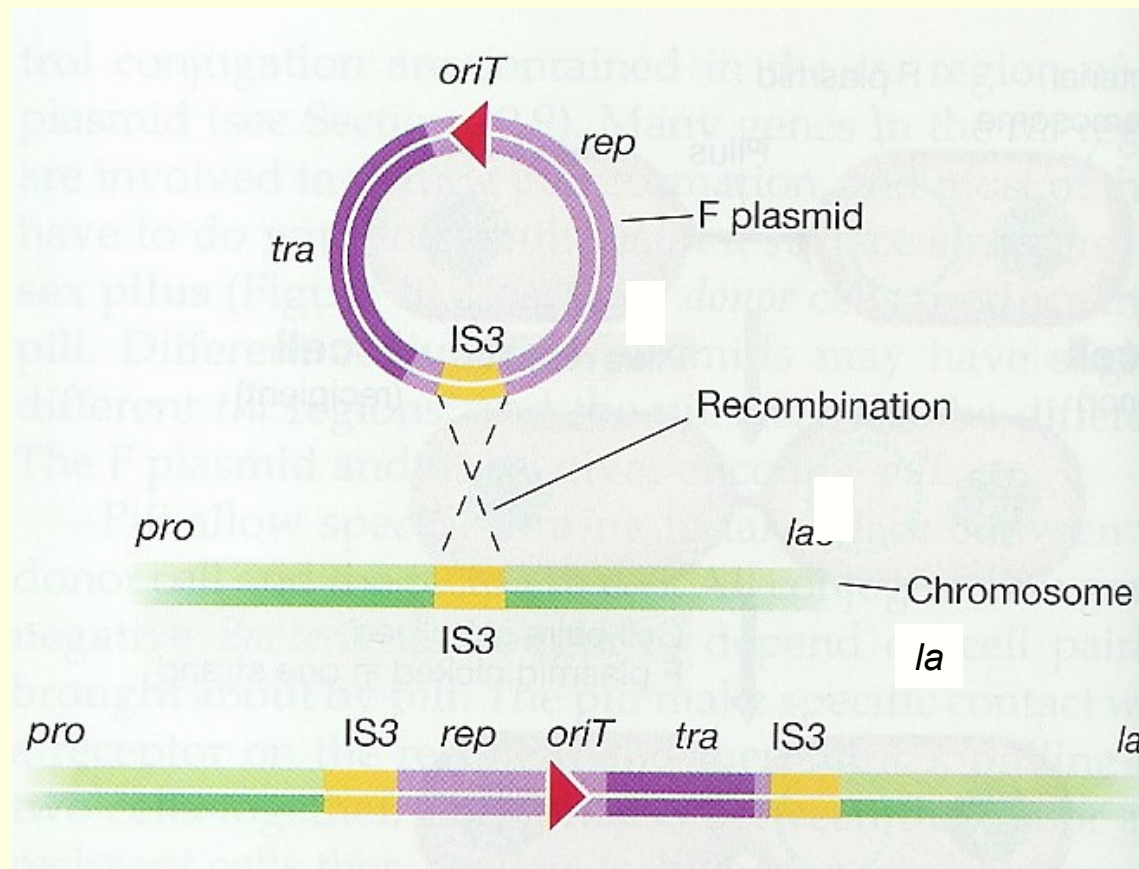
1. Vznik buněk Hfr (high-frequency recombination)



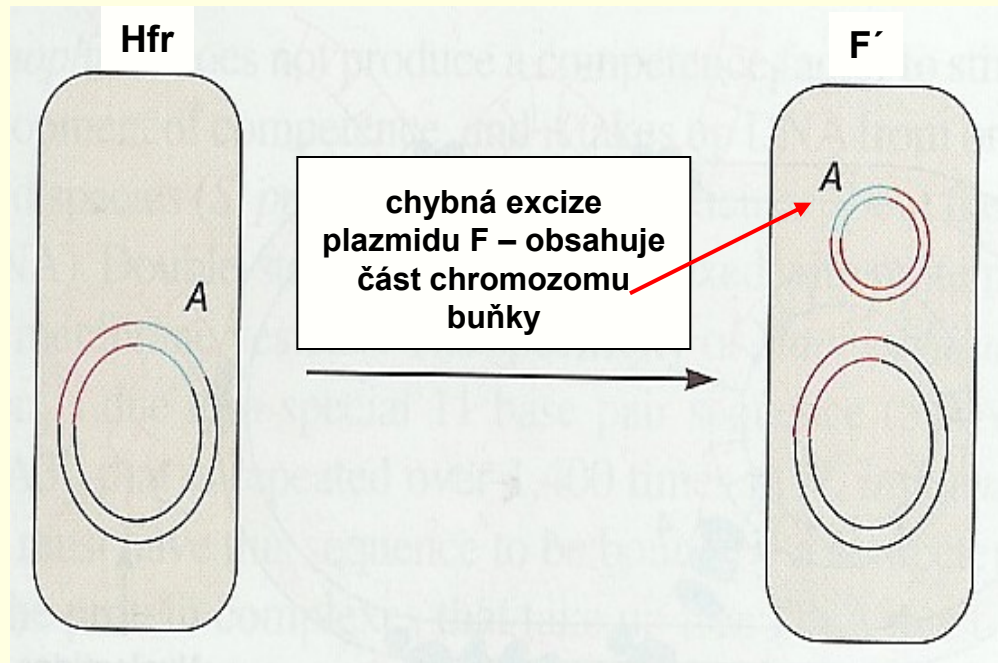
Hfr buňky vznikají inzercí plazmidu F do chromozomu donorové buňky

Vznik rekombinantního transkonjuganta

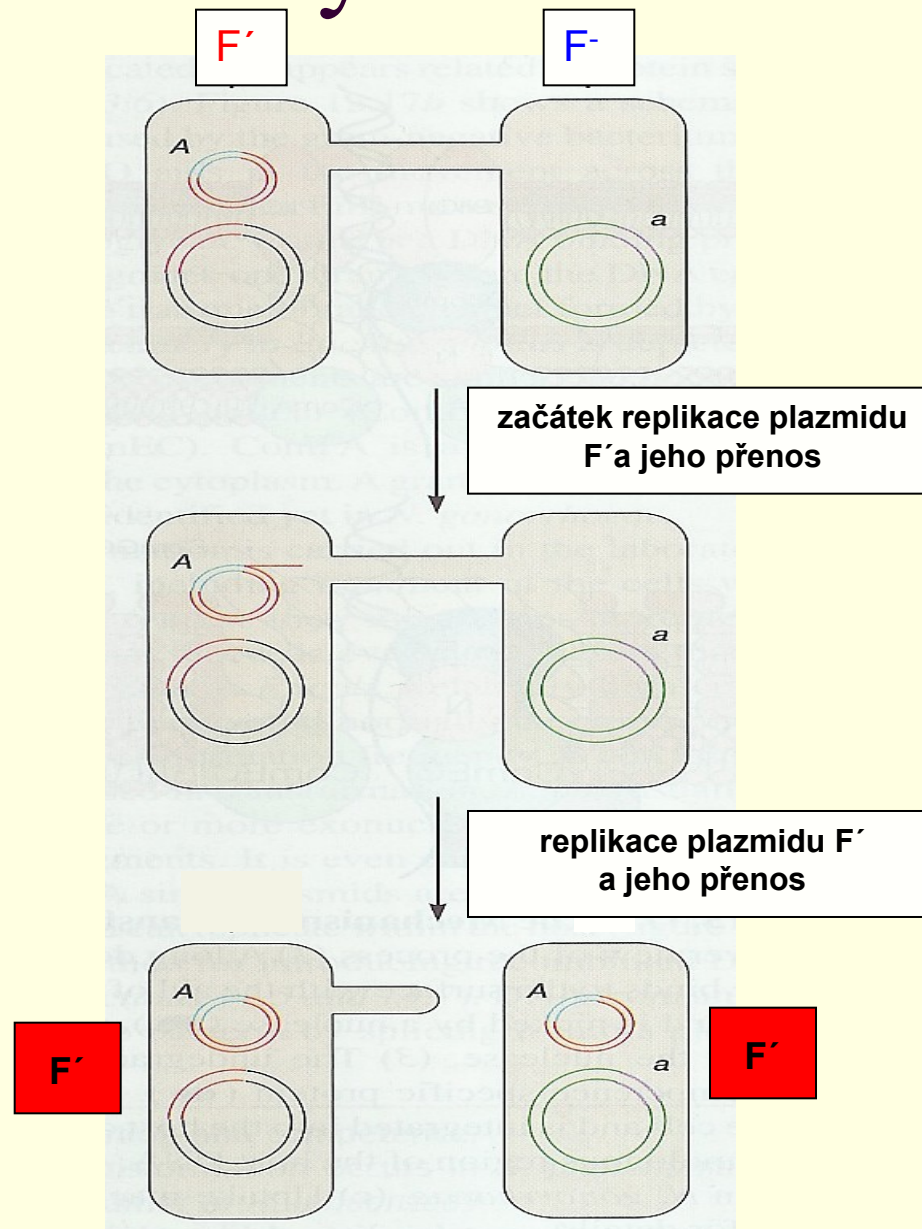
1. Vznik buněk Hfr – začlenění plazmidu F do chromozomu buňky F⁺ (*high frequency recombination*)



Vznik plazmidu F'

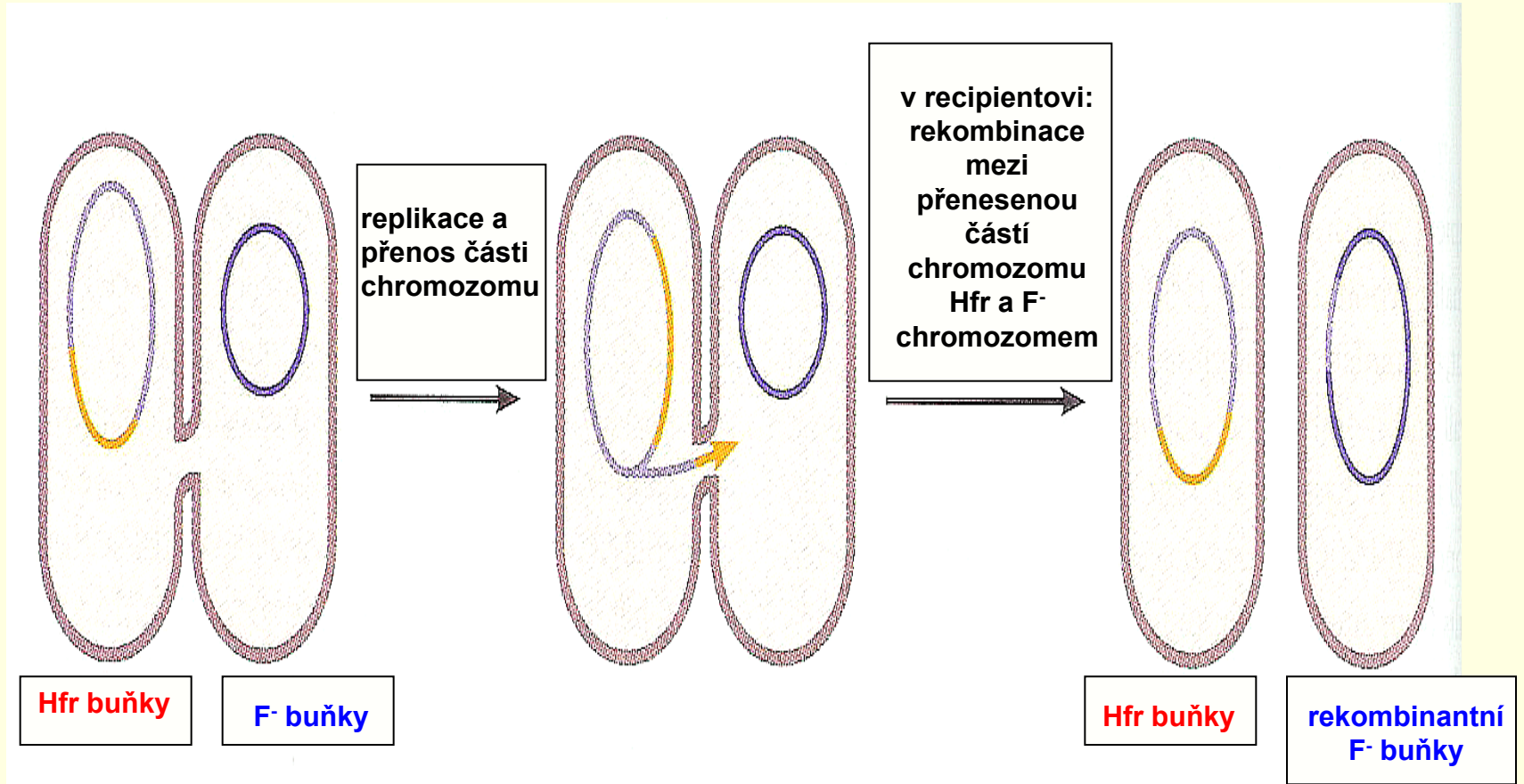


Konjugace buňky F' s buňkou F⁻



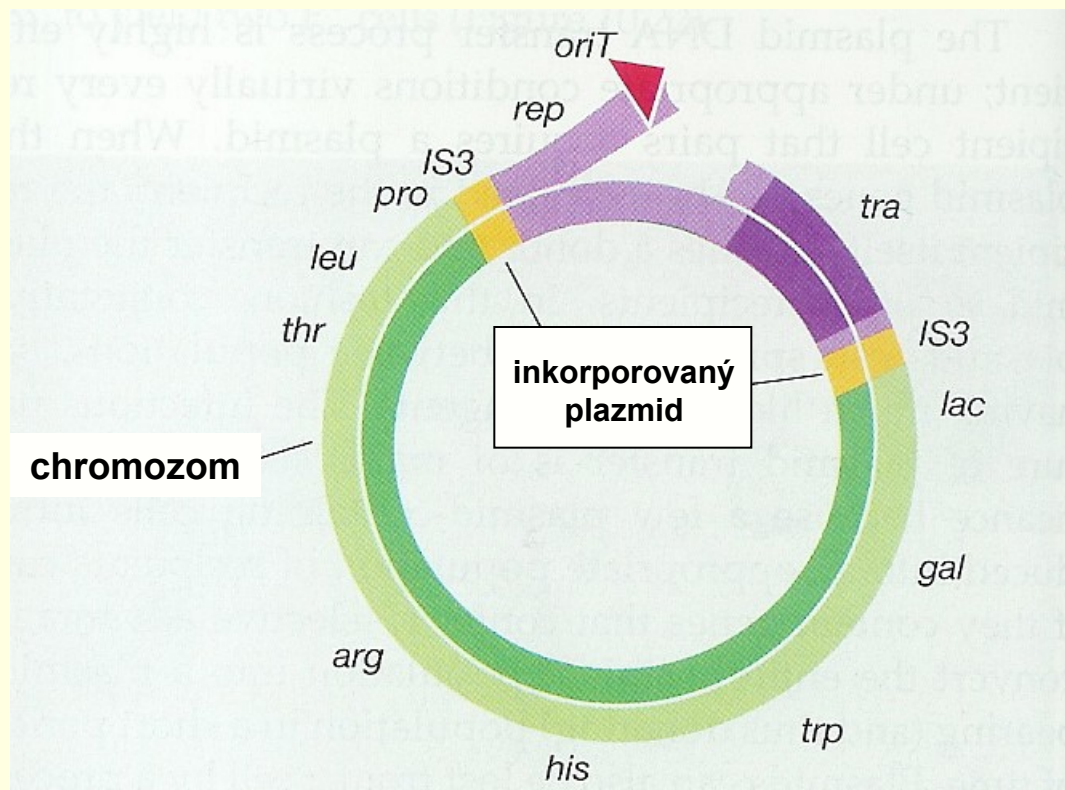
Vznik rekombinantního transkonjuganta

2. Přenos chromozomu Hfr do buněk F⁻



Vznik rekombinantního transkonjuganta

Přenos chromozomu Hfr do recipientní buňky



Detekce rekombinant

