

# Konjugace

Přenos DNA zprostředkovaný konjugativními plazmidy

Donor – recipient  $\longrightarrow$  transkonjugant

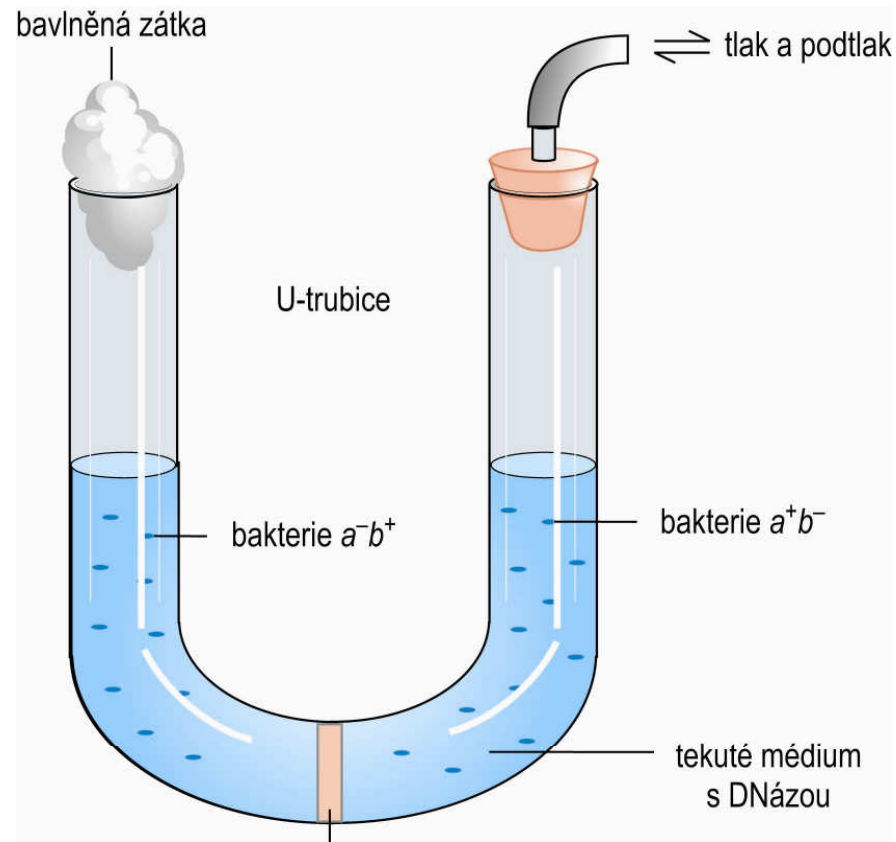
(Exkonjuganti - v rámci téhož druhu, transkonjuganti - v rámci různých druhů)

Přenášené typy elementů (DNA):

- Samopřenositelné (self-transmissible) plazmidy
- Mobilizovatelné plazmidy
- Chromozomová DNA
- *Konjugativní transpozony (+mobilizovatelné transpozony)*

# Pokus s U-trubicí: důkaz, zda je pro přenos genů nutný kontakt buněk

Davies, 1950



**Filtrem nemohou  
procházet bakterie,  
ale viry a DNA ano**

## **Charakteristické rysy konjugace**

- 1. Jednosměrný přenos plazmidů, jednosměrný/obousměrný přenos chromozomových markerů**
- 2. Je přenášen jen konjugativní plazmid, nebo dochází k mobilizaci dalších elementů (plazmidů, transpozonů, chromozomu)**

### **Výskyt konjugace u bakterií**

#### **G- (enterobakterie)**

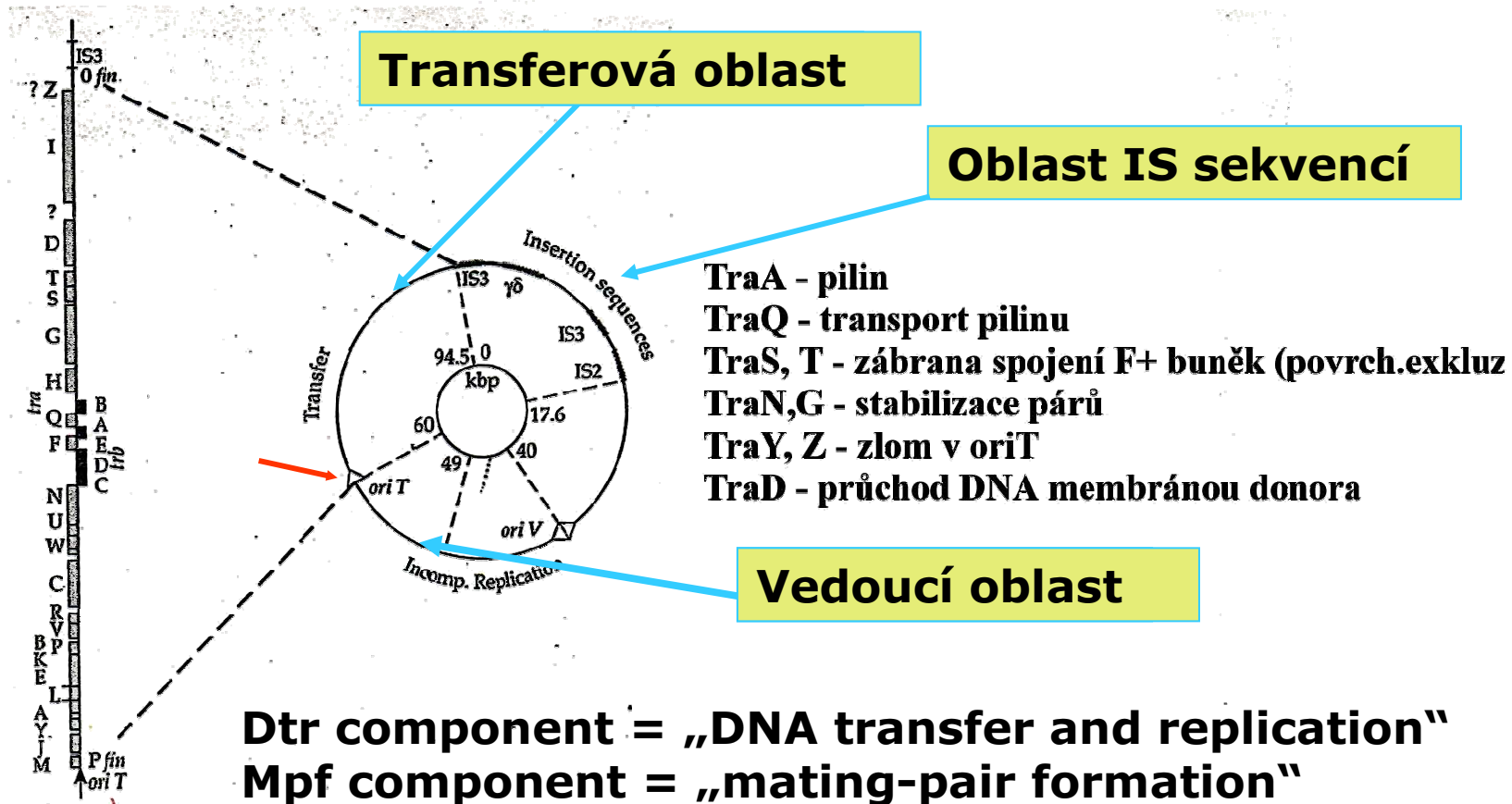
- prototypem je konjugace zprostředkovaná F-plazmidem**
- řada konjugativních R-plazmidů příbuzných F-plazmidu, mnoho jich má široké rozmezí hostitelů, např. RK2 (RP1, RP4)**

**Další G-: Agrobacterium (Ti-plazmid), Pseudomonas,**

#### **G+ (enterokoky, stafylokoky, streptokoky, streptomycety)**

- prototypem je konjugace zprostředkovaná pAD1**
- mnoho plazmidů má široké rozmezí hostitelů**

# FUNKČNÍ OBLASTI F-PLAZMIDU



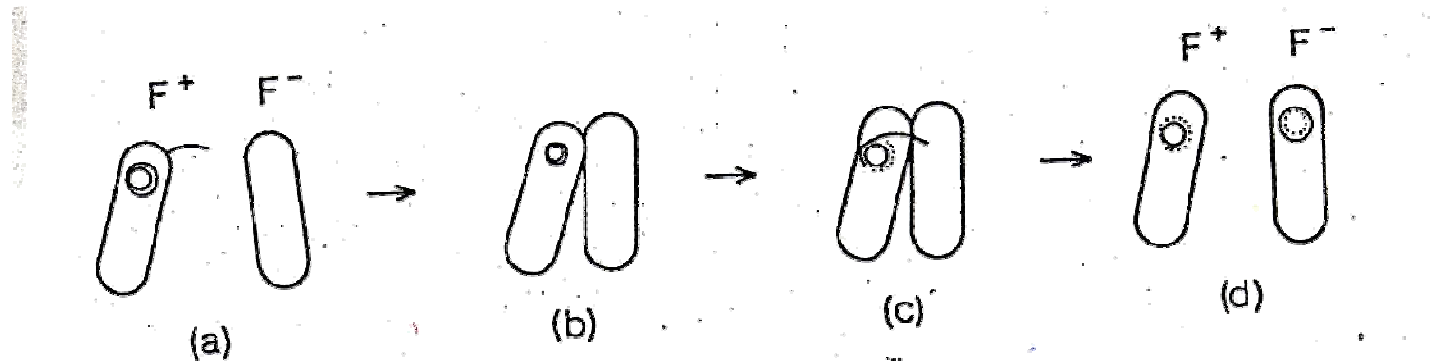
# TRANSFEROVÁ OBLAST F plazmidu

- 33 kb. Oblast obsahuje veškerou genetickou informaci nezbytnou pro přenos.
- Geny lze podle funkce rozdělit do 5 skupin:
  1. Biosyntéza a sestavování F pilusu (traA,B,C,E,F,G,H,L,K,Q,U,V,W)
  2. Stabilizace párujících se buněk (traG,N)
  3. Konjugativní metabolismus (traD,I,M,Y,Z)
  4. Regulace přenosu (traJ,finO,finP)
  5. Povrchová exkluze (traS, traT)
- **TraT = vnější membránový protein zabraňující stabilnímu spojení buněk obsahujících plazmidy**
- **TraS = protein vnitřní membrány zabraňující vstupu DNA do buňky při náhodném spojení buněk s F**

# PRŮBĚH PŘENOSU PLAZMIDOVÉ DNA PŘI KONJUGACI

## □ Stádia párování:

- Donorová buňka naváže kontakt s recipientní pomocí pilusu
- Následuje přibližování buněk depolymerizací pilusu (retrakce pilusu)
- Probíhá syntéza DNA
- Dochází k aktivní disagregaci donorových a recipientních buněk

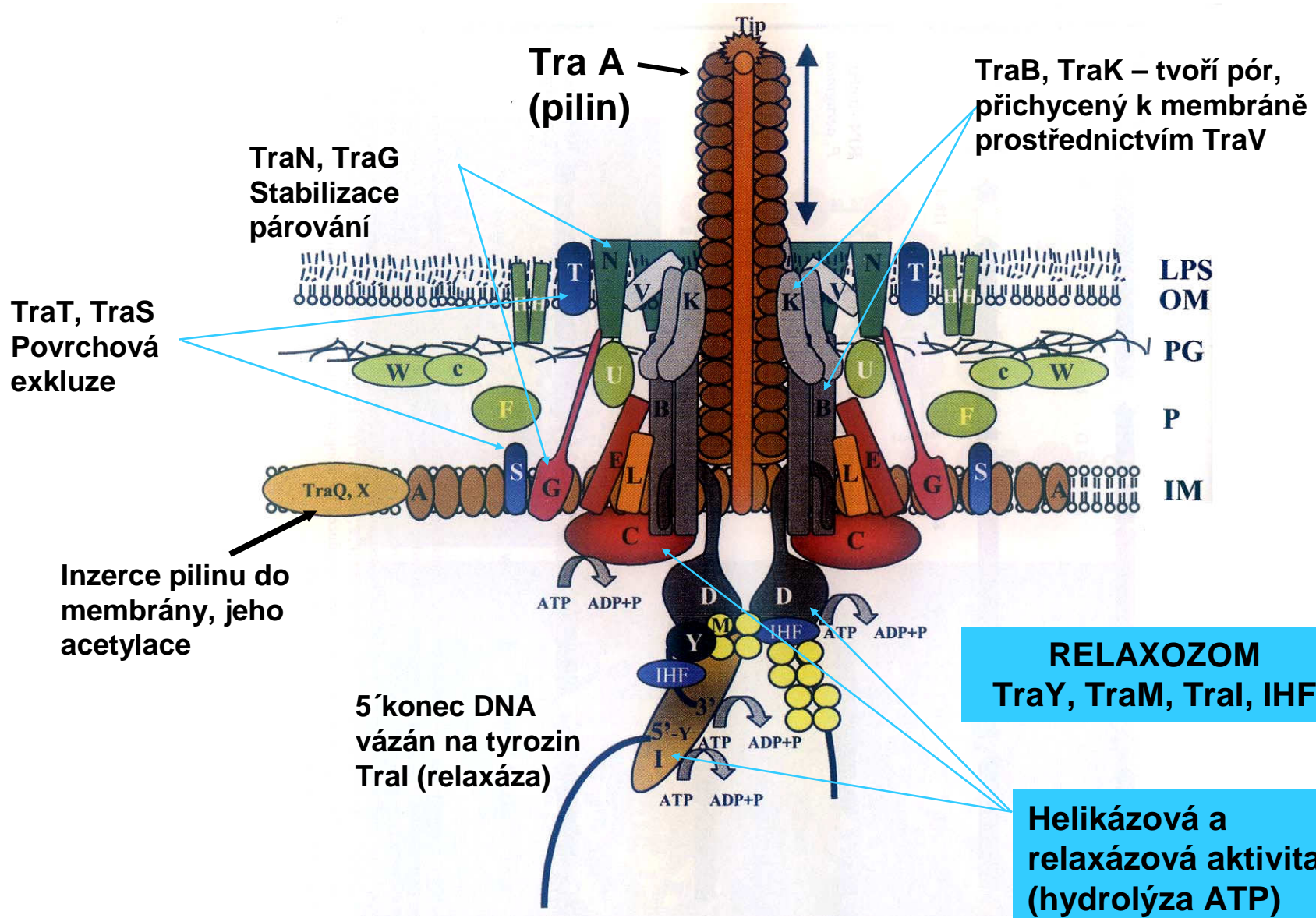


**Typická buňka F<sup>+</sup> má asi 20 pilusů – kontakt jedné donorové buňky s několika recipientními**

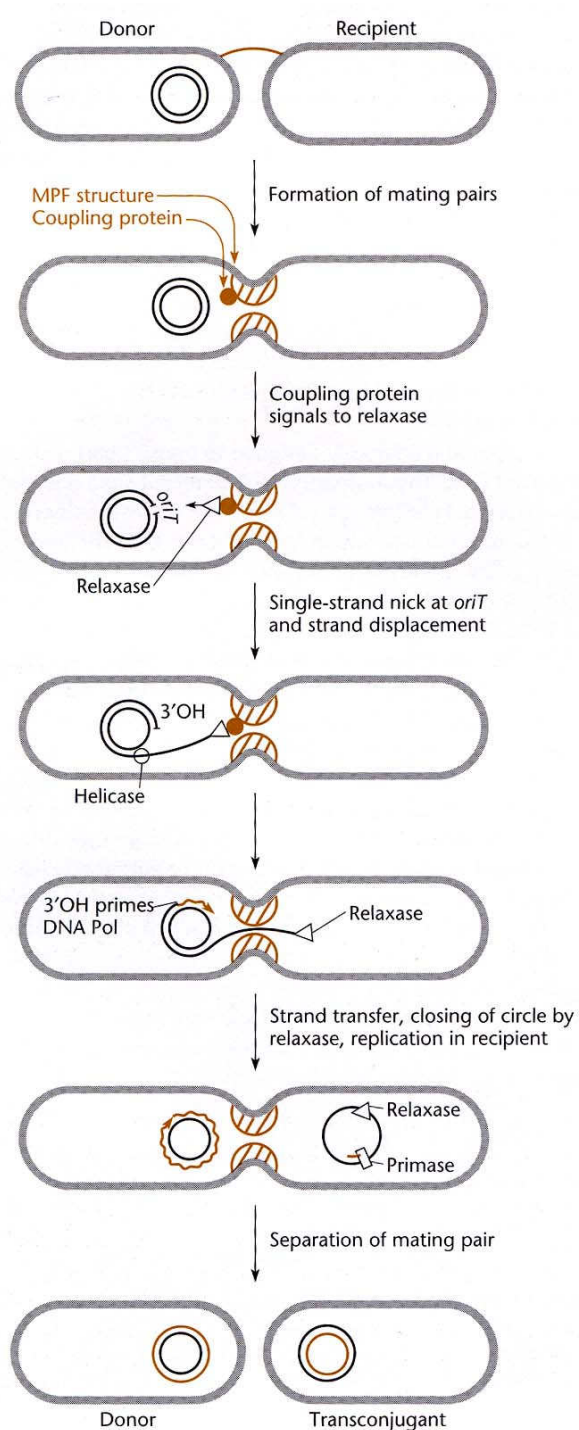
# PRŮBĚH KONJUGATIVNÍHO PŘENOSU DNA

1. Dochází k jednořetězcovému zlomu v oriT v místě nic
2. Odmotávání DNA ve směru 5' – 3'
3. Přenos jednořetězcové DNA 5' koncem do recipienta
4. V donorové buňce je doreplikován komplementární řetězec replikací otáčivou kružnicí
5. V recipientu je komplementární řetězec dosyntetizován diskontinuálně
6. Cirkularizace DNA v recipientu

# Přenosový aparát F plazmidu sestavený z informací o funkci jeho složek







Donorová buňka vytváří pilus, kterým kontaktuje recipientní buňku.

(povaha signálu není známa)

Dochází k vytvoření póru mezi oběma buňkami

Relaxáza aktivovaná „coupling“ proteiny vytvoří zlom v *oriT* na DNA

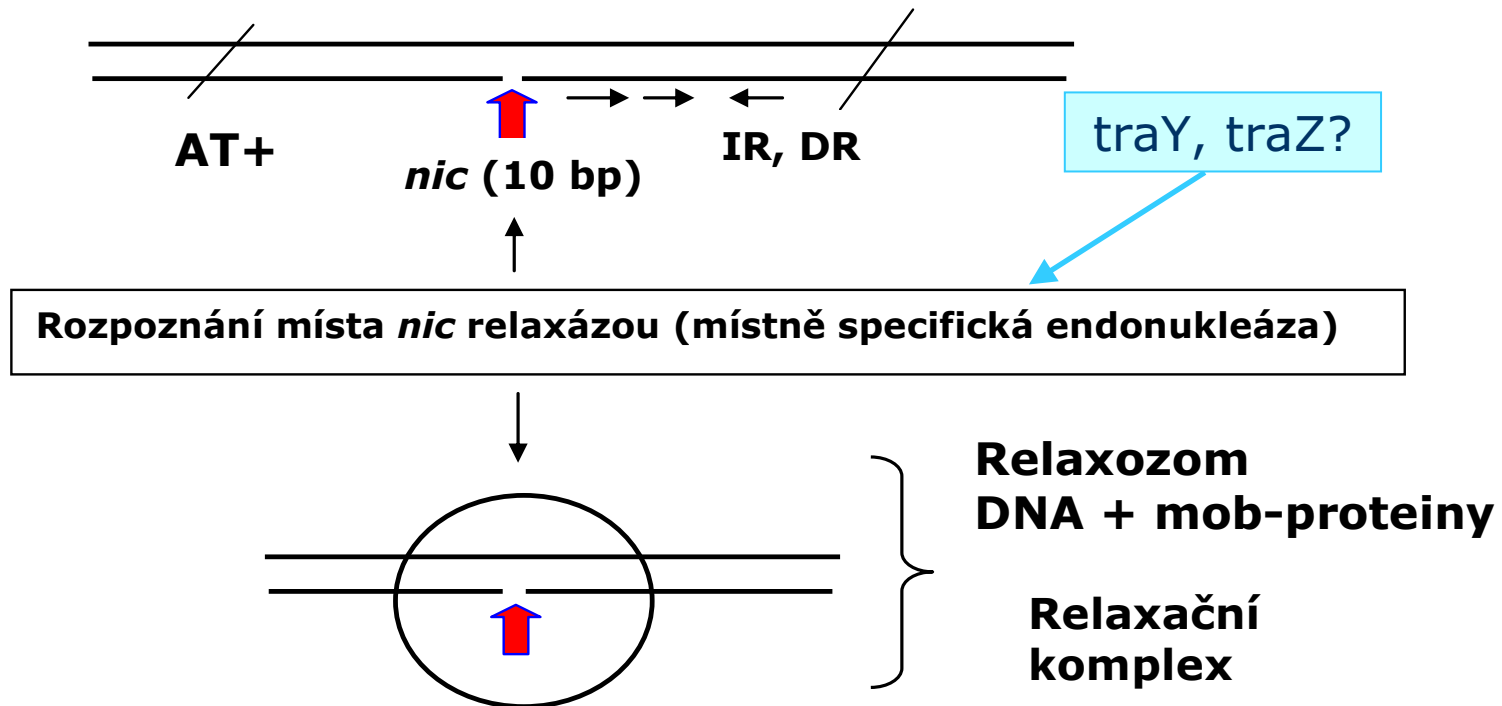
Relaxáza a DNA přecházejí do recipientní buňky, kde relaxáza DNA cirkularizuje

Primáza (kódovaná plazmidem nebo chromozomem) zahájí syntézu komplementárního řetězce

Dochází k separaci donorové buňky a transkonjuganta

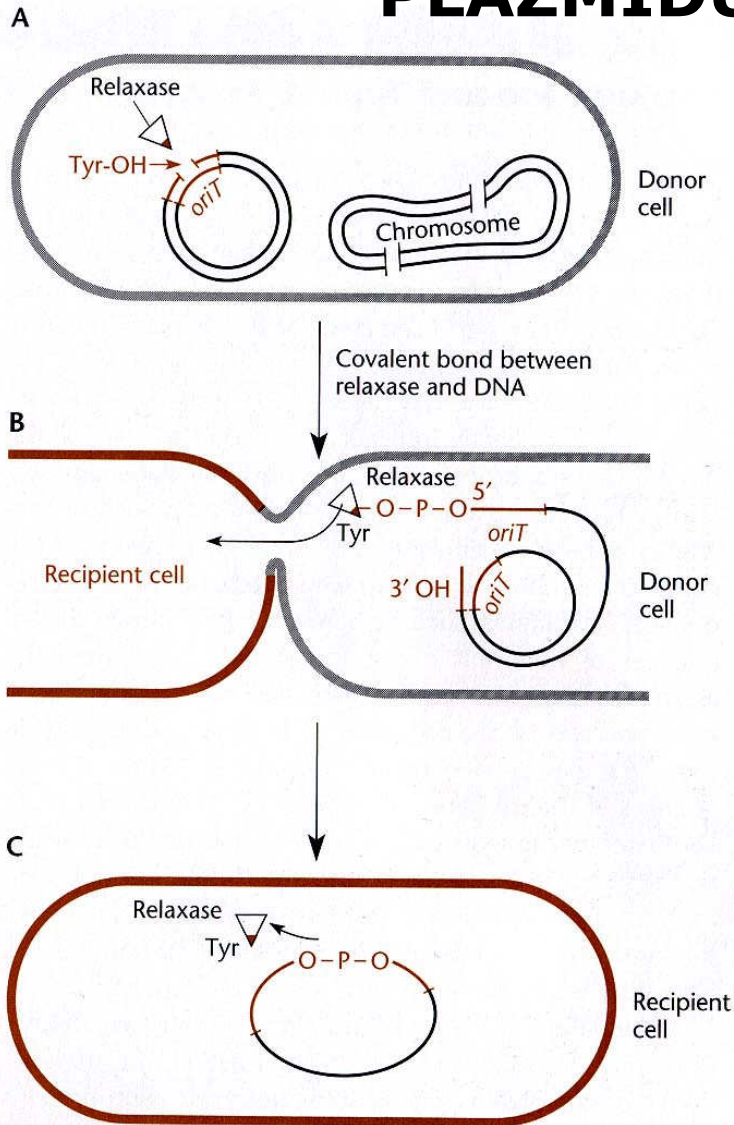
# INTERAKCE MÍSTA *NIC* S RELAXÁZOU V MÍSTĚ *ORIT*

Oblast *oriT* (500 bp)



OriT lze vložit do libovolného **plazmidu**, který je pak přenesen jako F

# PŮSOBENÍ RELAXÁZY PŘI PŘENOSU PLAZMIDU KONJUGACÍ

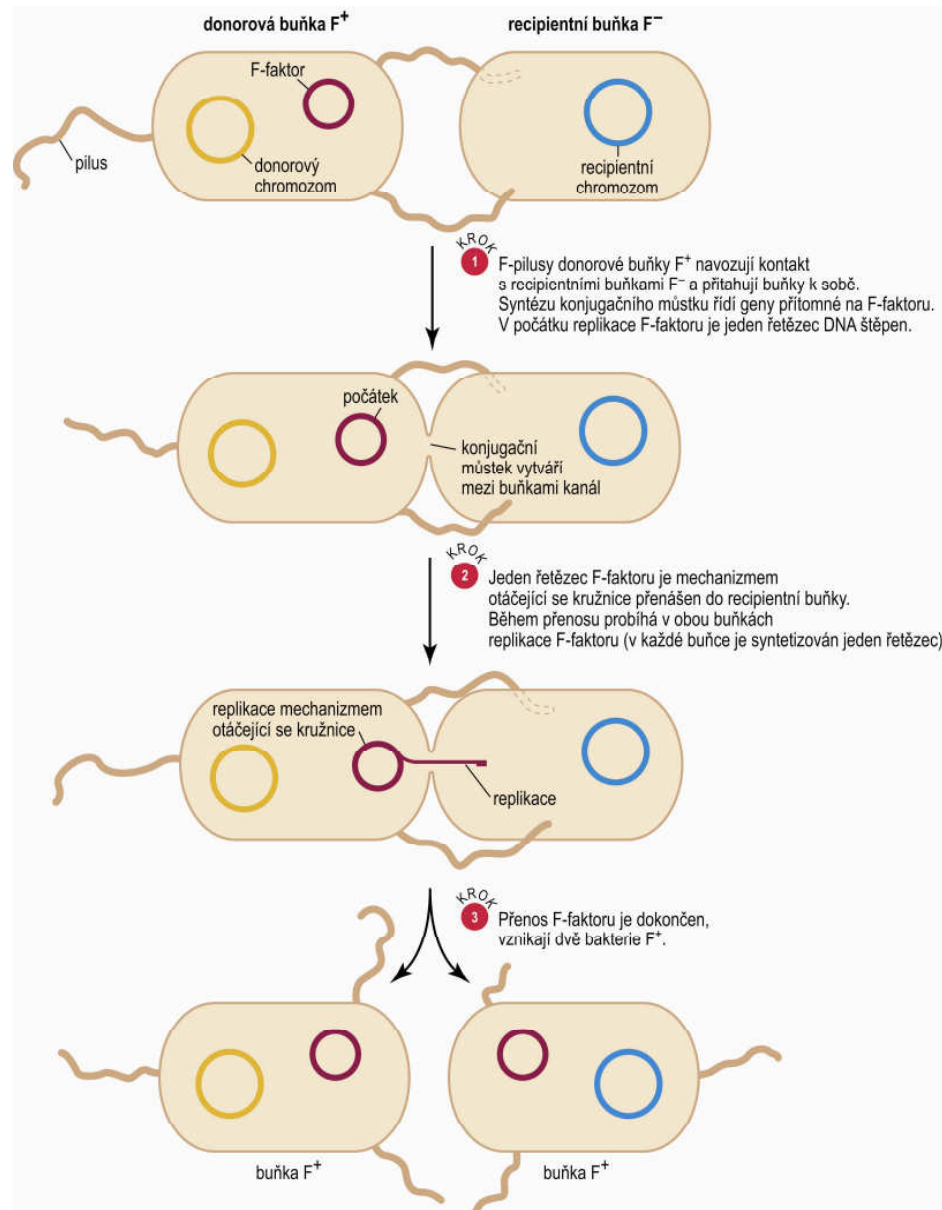


Relaxáza vytvoří zlom v místě oriT, 5' fosfát je z DNA přenesen transesterifikační reakcí na tyrozinový zbytek relaxázy

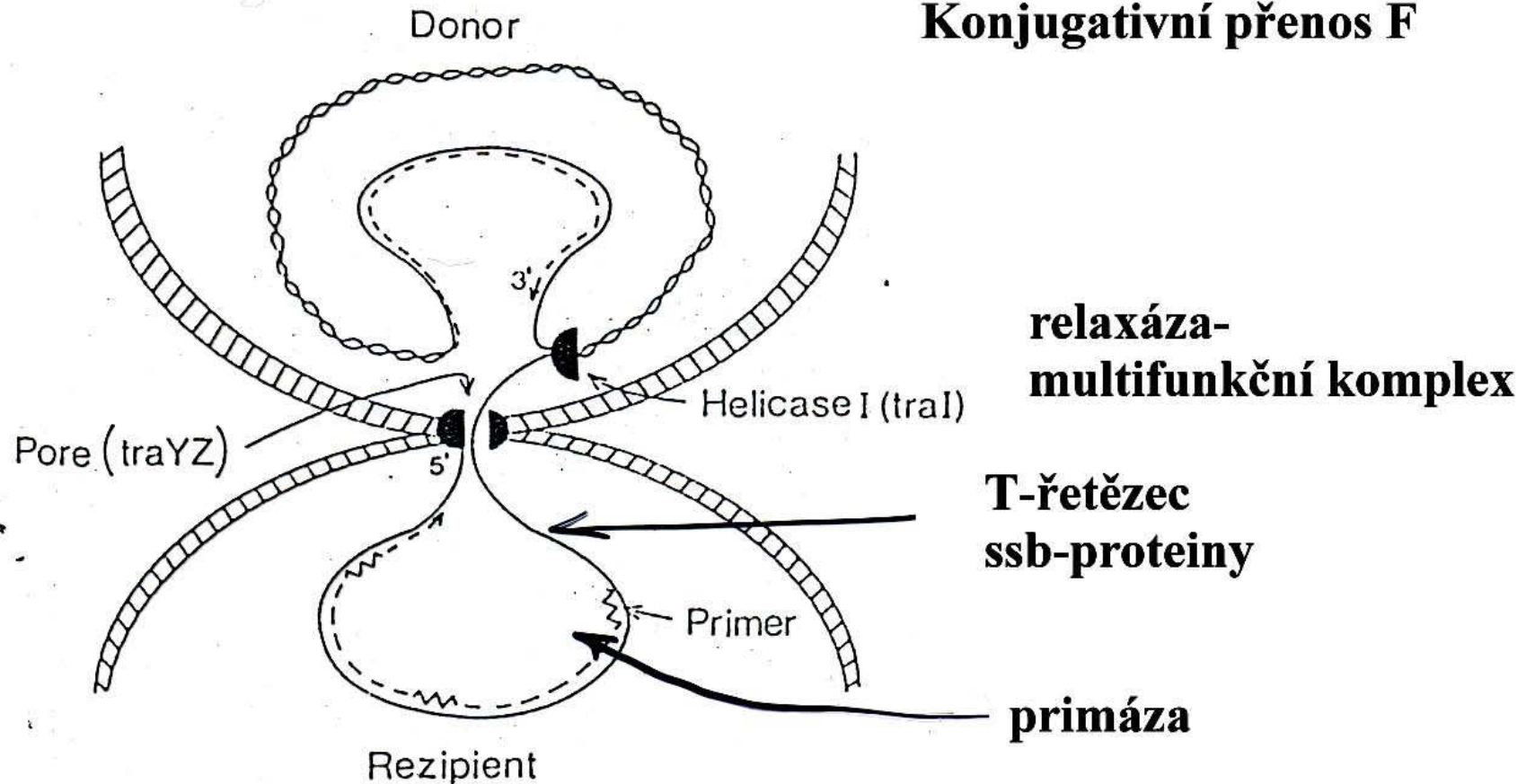
Relaxáza vstupuje do recipientní buňky a vtahuje do ní i jednořetězcovou DNA od 5' konce

Zpětnou transesterifikační reakcí je fosfát přenesen na 3' OH konec přenesené DNA, čímž se tato recirkularizuje a relaxáza se uvolní

# Přenos F-plazmidu z buňky F<sup>+</sup> do buňky F<sup>-</sup>

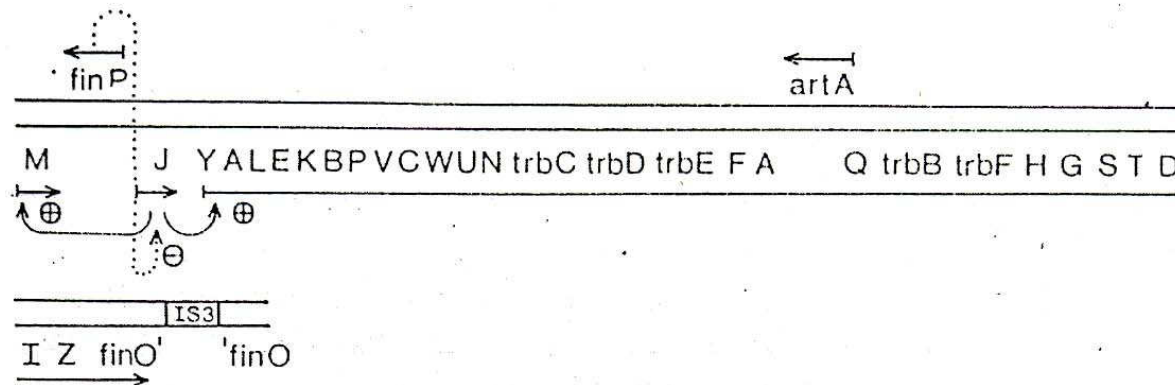


## Konjugativní přenos F



**Donor conjugal DNA synthesis (DCDS) - náhradová syntéza DNA v donorové buňce mechanismem otáčející se kružnice**

**Repliconation - syntéza komplementárního řetězce v recipientní buňce**



### Genetická regulace tra-operonu

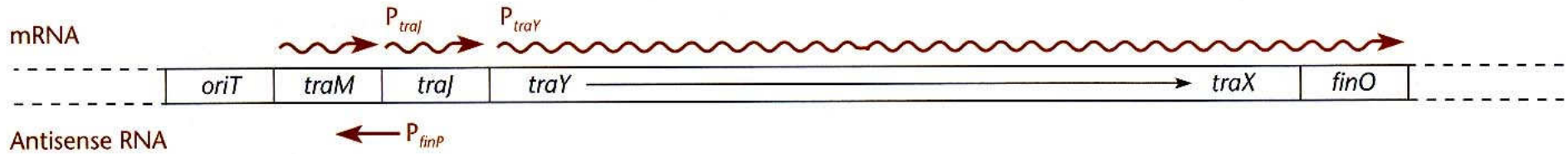
Je řízena dvěma regulačními okruhy:

1. Produkty genů *finO* a *finP* regulují expresi genu *traJ* negativně
2. Produkt genu *traJ* reguluje expresi genu *traM* a operonu *traYZ* pozitivně.

U F plazmidu je gen *finO* inaktivován IS3a.

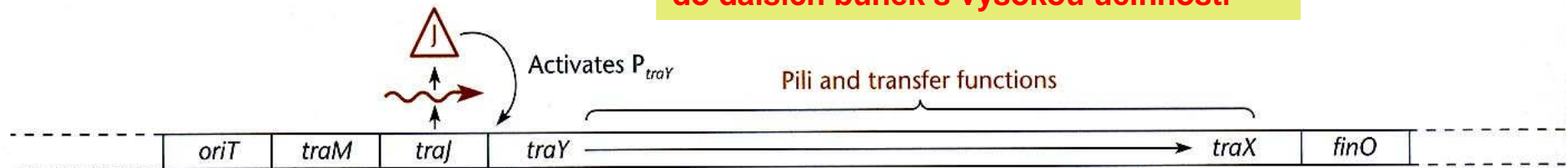
Produkty genů *finO* a *finP* reprimují transkripci genů *tra*. Zatímco gen *finO* kóduje protein, exprimuje gen *finP* krátkou RNA (u F má délku 78 b). Gen *finP* leží v oblasti genu *traJ*, je však transkribován v opačné orientaci. Přesný mechanismus zábrany exprese *traJ* není dosud znám. Pravděpodobně *finP*-RNA zabraňuje transkripci nebo/a translaci genu *traJ*. Protein *FinO* působí buď společně s *FinP*-RNA, nebo nezávisle na ní. K represí jsou však zapotřebí v každém případě oba produkty.

### A Genetic organization of *tra* region



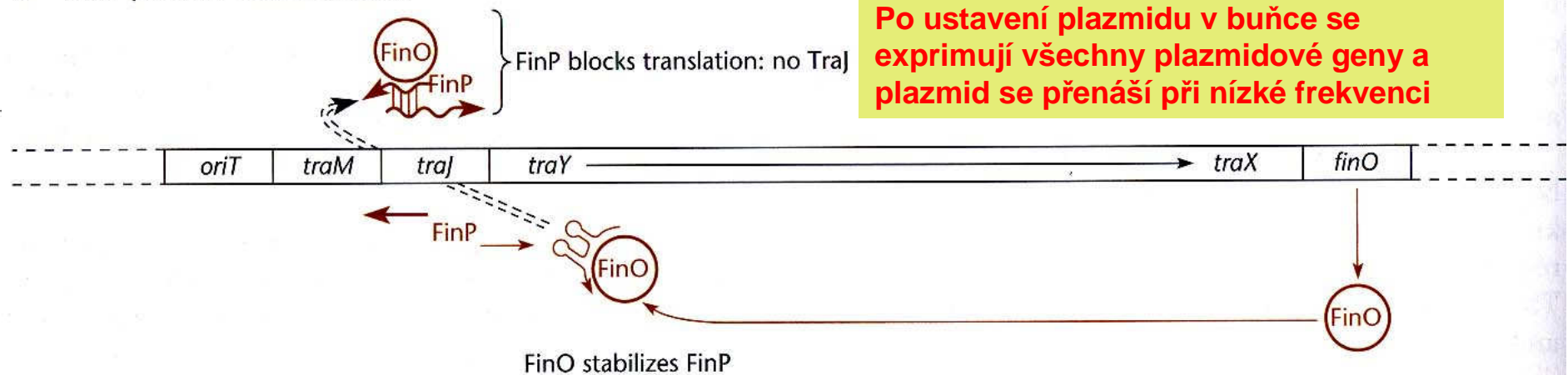
### B Immediately after entry into cell

**Nově vzniklý konjugant přenáší plazmid do dalších buněk s vysokou účinností**

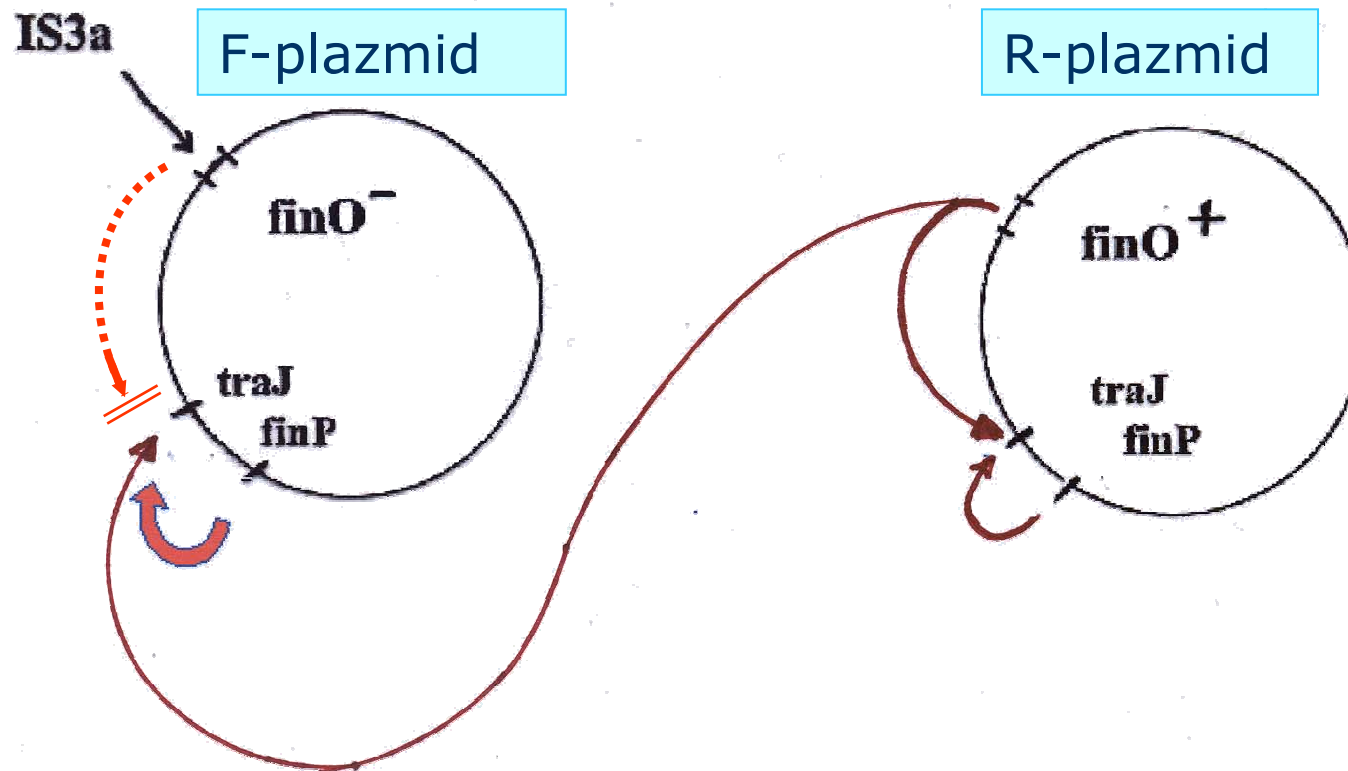


### C After plasmid establishment

**Po ustavení plazmidu v buňce se exprimují všechny plazmidové geny a plazmid se přenáší při nízké frekvenci**



## Inhibice fertility

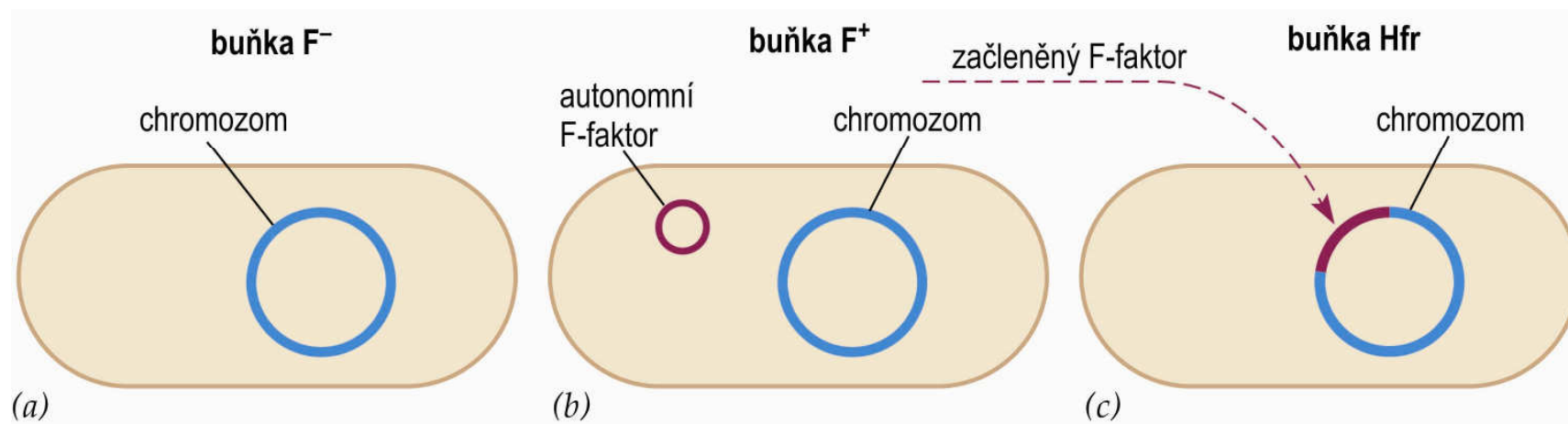


***finO* = negativní regulátor --- represor**  
***finP* = negativní regulátor --- antisense RNA**

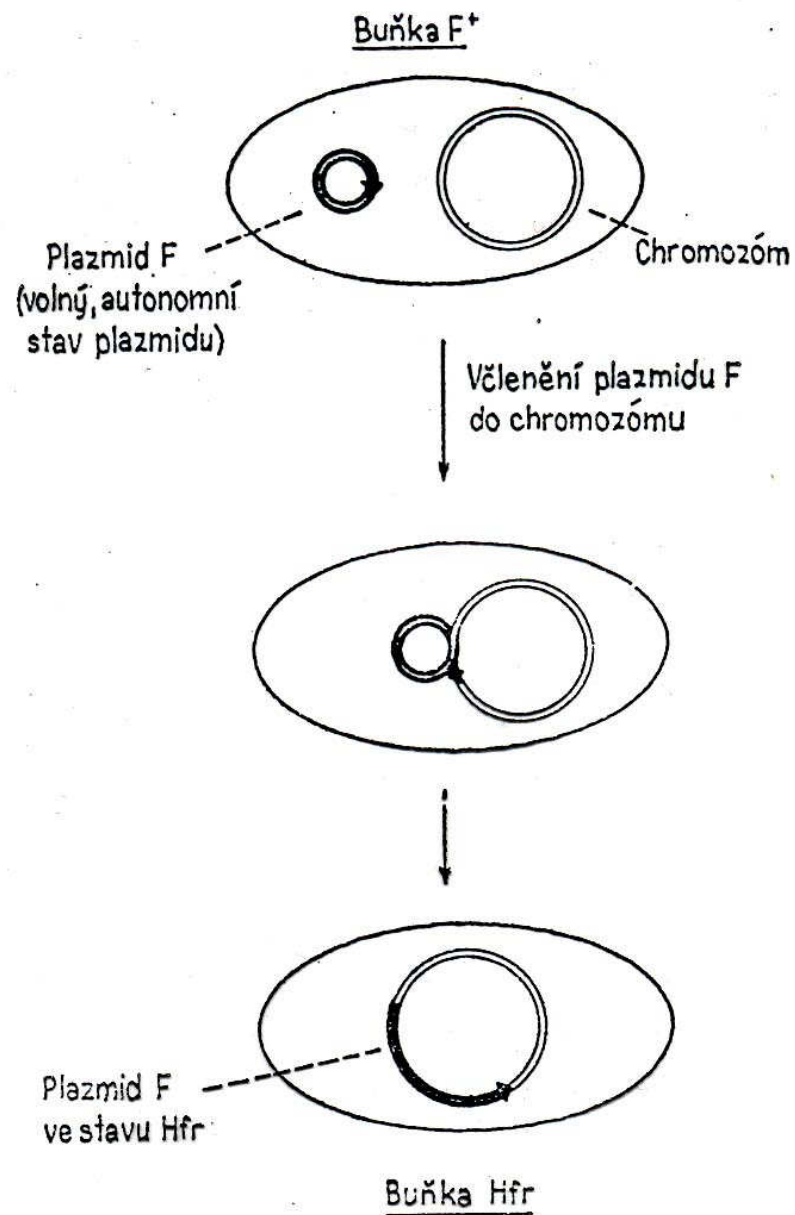
**F = drd = derepressed mutant plasmid**



## Charakter buněk F<sup>-</sup>, F<sup>+</sup> a Hfr



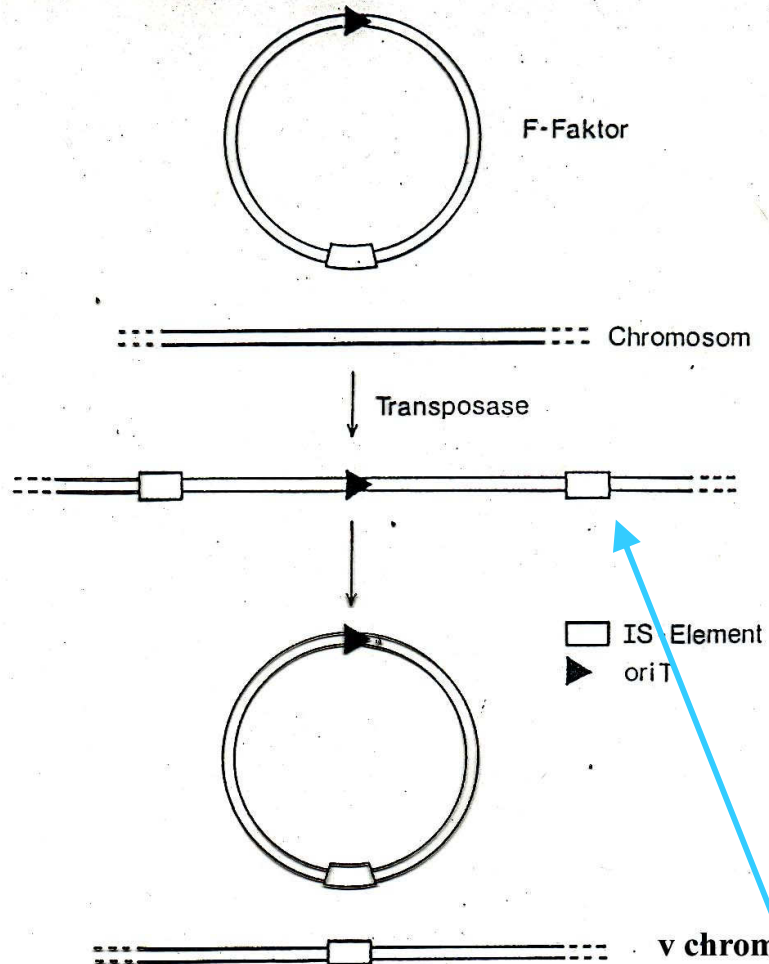
## Vznik buněk Hfr začleněním F do chromozomu



# ZPŮSOBY ZAČLENĚNÍ F PLAZMIDU DO CHROMOZOMU

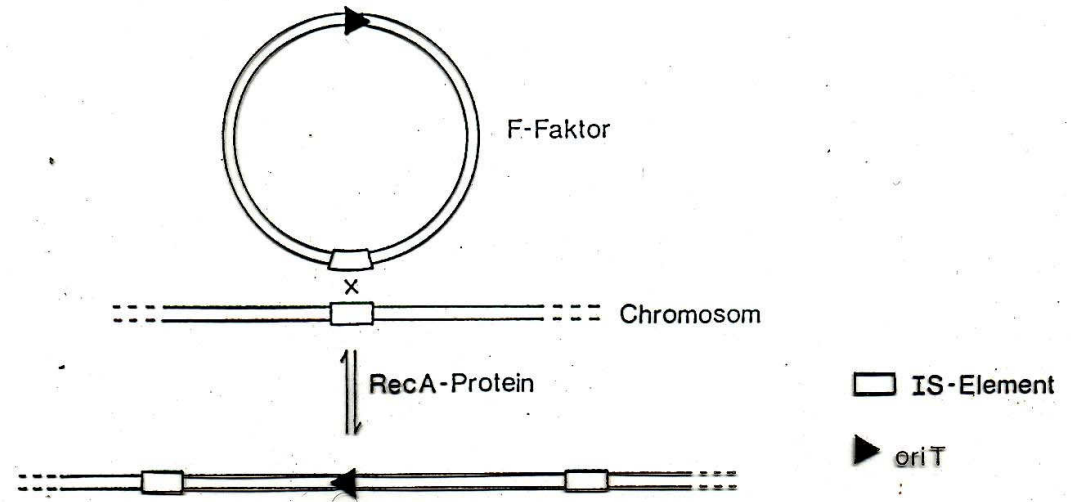
integrace nezávislá na RecA

transpozice

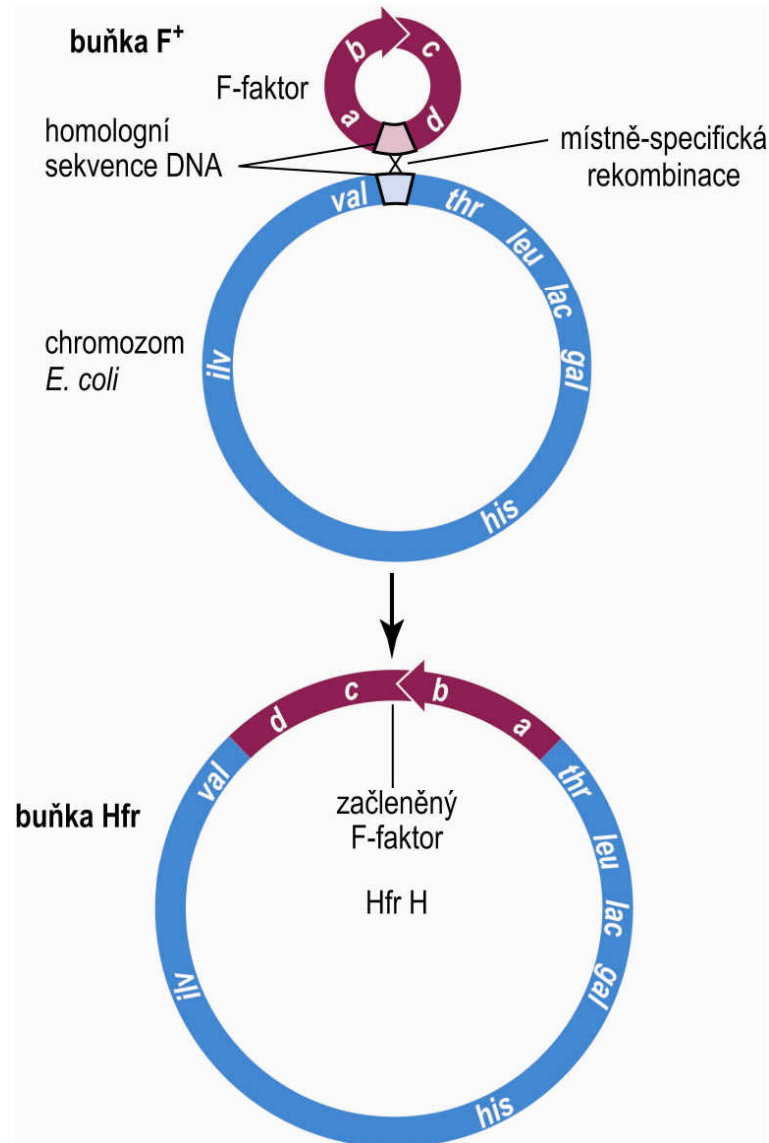


integrace závislá na RecA

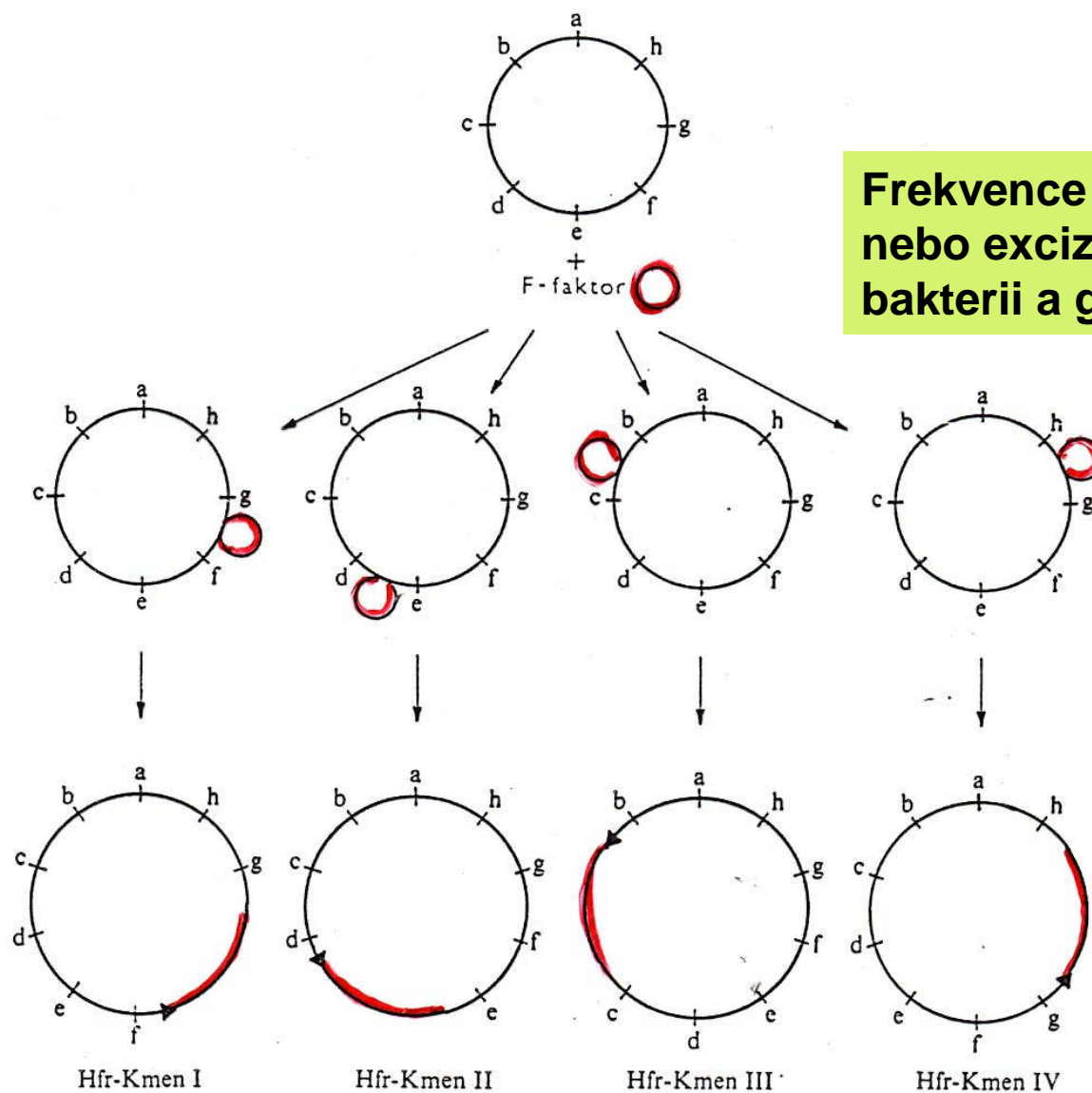
homologní rekombinace



## Vznik buňky Hfr (HfrH) začleněním F-plazmidu do chromozomu *E. coli*

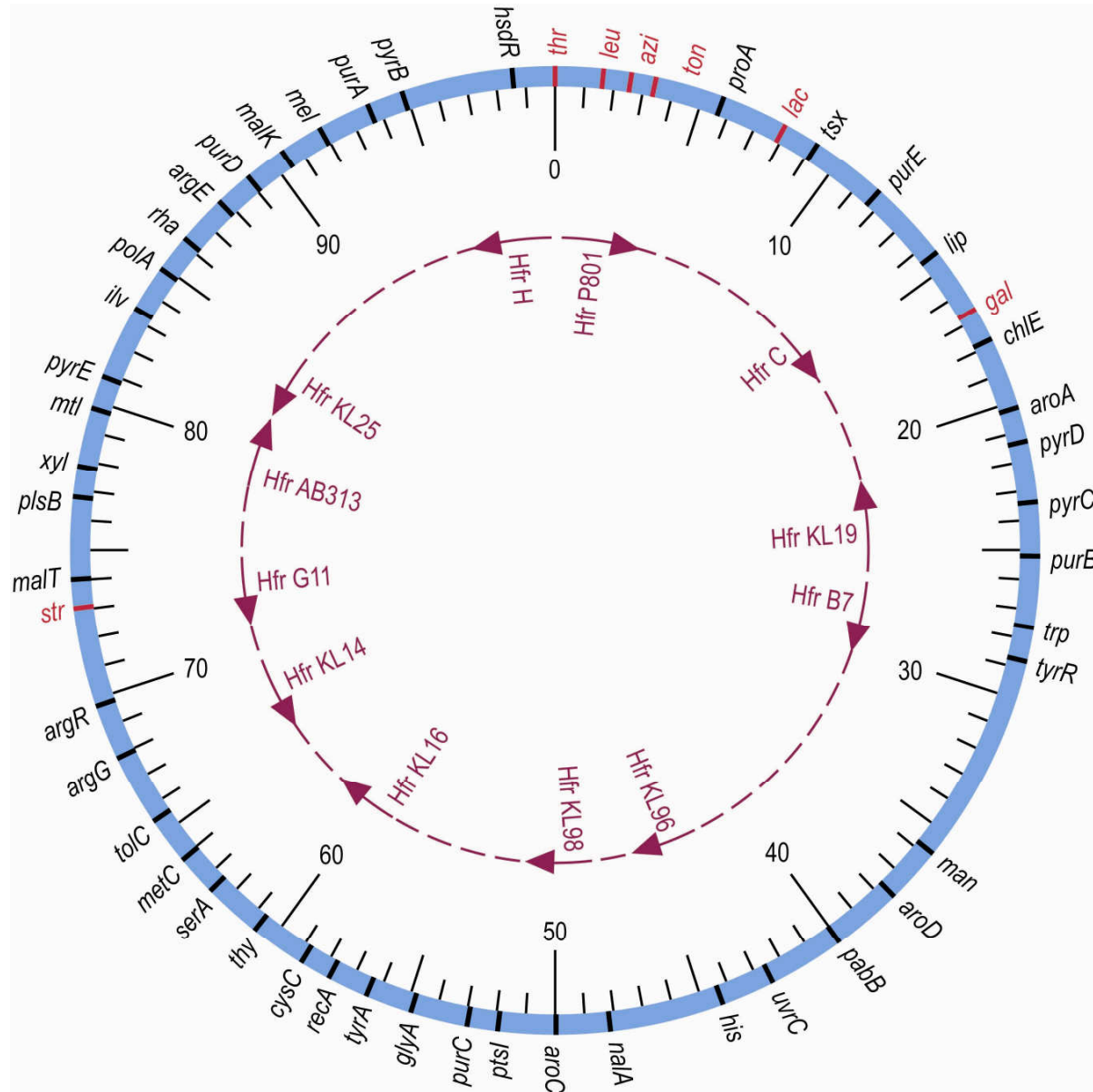


## Vznik kmenů Hfr začleněním F plazmidu do různých míst chromozomu E. coli. Začlenění probíhá v místech IS.



Obr. 64. Mechanismus vzniku různých typů Hfr-kmenů (viz text)

## Místa začlenění F-plazmidu do chromozomu *E. coli*



TABULKA 35

POŘADÍ GENŮ NA CHROMOZÓMU NĚKTERÝCH KMENŮ Hfr.

Podle Stenta (1971)

Kmen Hfr	Pořadí přenosu genů
HfrH	O-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly-str-mal-xyl-mtl-ile-met-thi
Hfr1	O-leu-thr-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro-ton-azi
Hfr2	O-pro-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac
Hfr3	O-pur-lac-pro-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal
Hfr4	O-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro-ton-azi-leu-thr
Hfr5	O-met-thi-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly-str-mal-xyl-mtl-ile
Hfr6	O-ile-met-thi-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly-str-mal-xyl-mtl
Hfr7	O-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mtl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro

Přenos genů probíhá v definovaném pořadí, může probíhat v obou směrech, a probíhá konstantní rychlostí 45 kb/minutu. Celý chromozom *E. coli* se přenes za 100 minut.

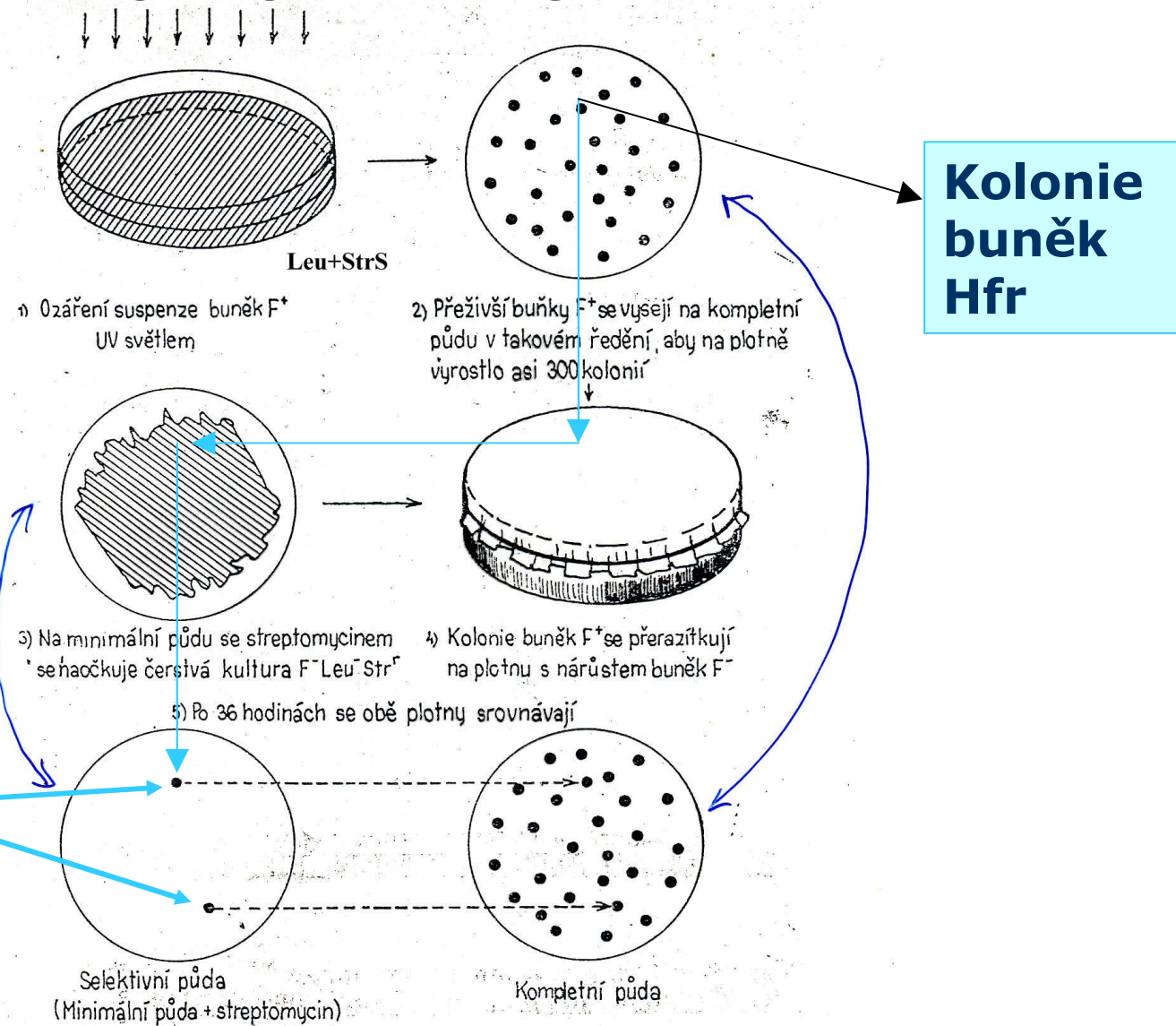
Sledování frekvence rekombinant při použití různých kmenů Hfr

# IZOLACE KMENŮ HFR

$F^+ = \text{Leu}^+ \text{Str}^S$

$F^- = \text{Leu}^- \text{Str}^R$

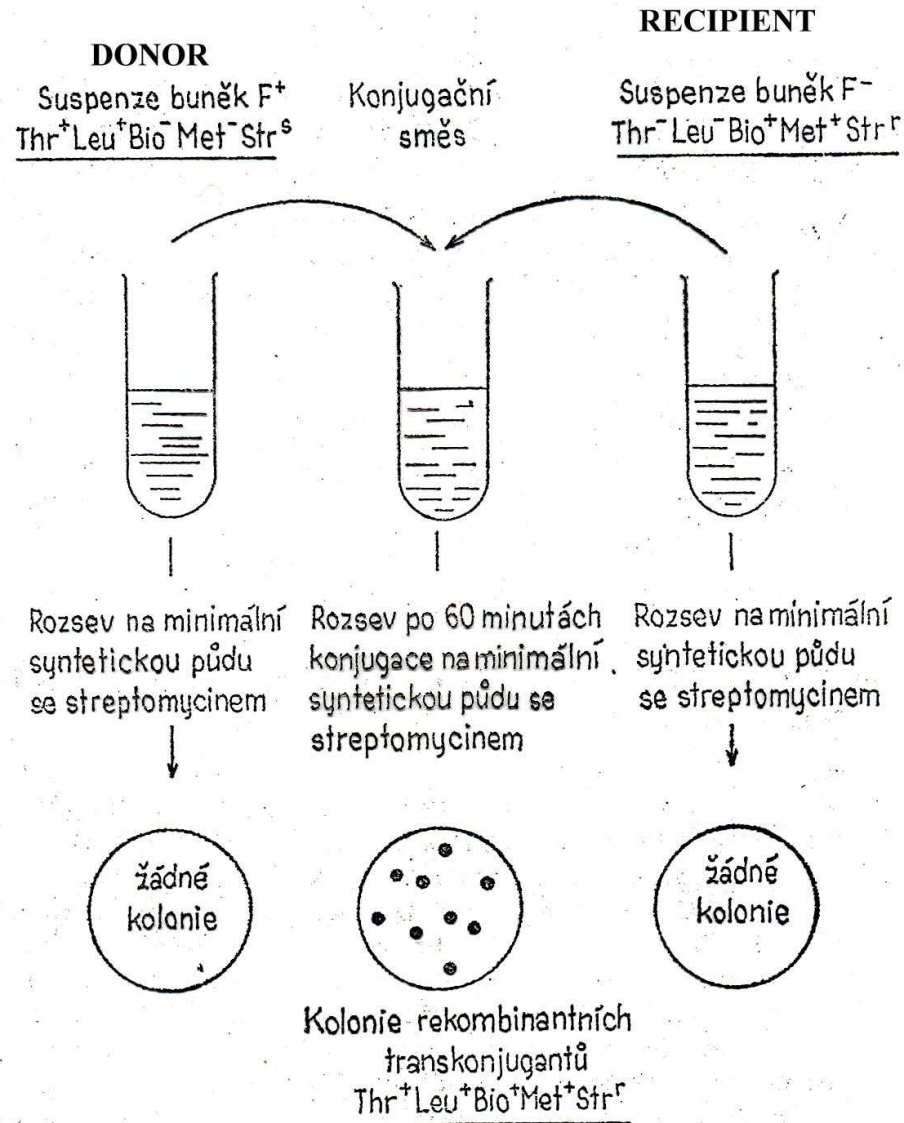
Rekombinanty  
=  $\text{Leu}^+ \text{Str}^R$



Místa na minimální půdě vyznačující se hustým nárůstem představují rekombinanty  $\text{Leu}^+ \text{Str}^R$ , které vznikly konjugací buněk  $F^-$  s buňkami Hfr přenesenými na plotnu razítkem



### Křížení kmene F+ a F-

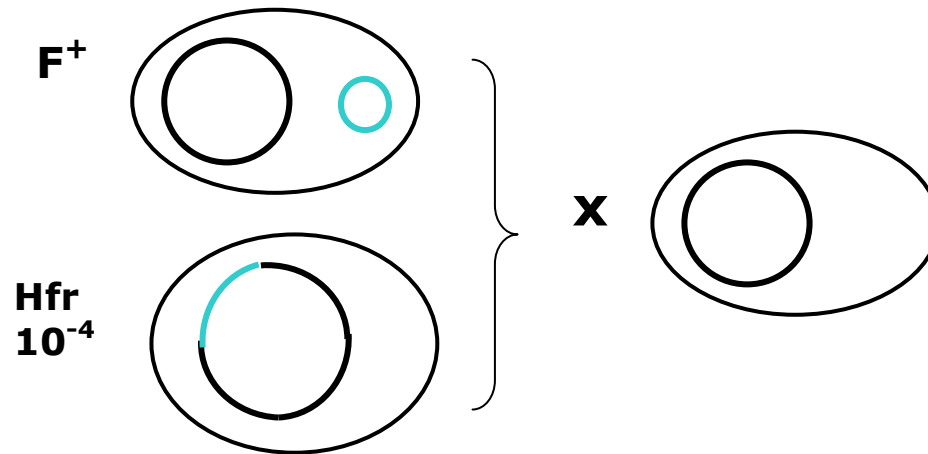


Za vznik rekombinantů jsou zodpovědné buňky Hfr

# Křížení kmenů $F^+$ x $F^-$

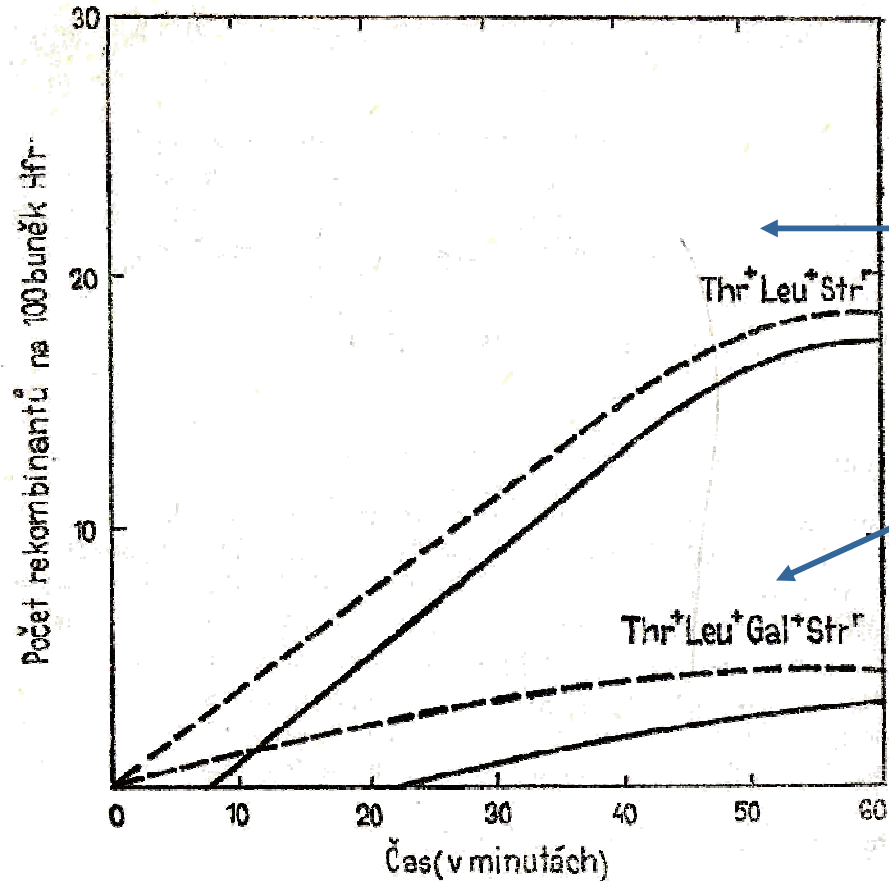
Populace buněk  $F^+$

buňky  $F^-$



1. V populaci buněk  $F^+$  je nízká proporce buněk Hfr, v nichž je  $F^-$  plazmid začleněn do různých míst chromozomu
2. Volný  $F^-$  plazmid se přenáší do  $F^-$  buněk za vzniku buněk  $F^+$
3. Z buněk Hfr se přenáší část chromozomu do  $F^-$  buněk za vzniku rekombinant
4. Dochází k superinfekci rekombinant  $F^-$  plazmidem, v důsledku čehož výsledné rekombinanty obsahují  $F^-$  plazmid

Kinetika přenosu markerů při přerušované a nepřerušované konjugaci; - - - - - nepřerušovaná k., - - - - - přerušovaná k.



Po přenosu do recipientní buňky mají všechny geny stejnou pravděpodobnost začlenění do chromozomu (vyjma prvních 1-2')

Geny přenášené jako první (vysoká pravděpodobnost přenosu)

Geny přenášené později (nízká pravděpodobnost přenosu)

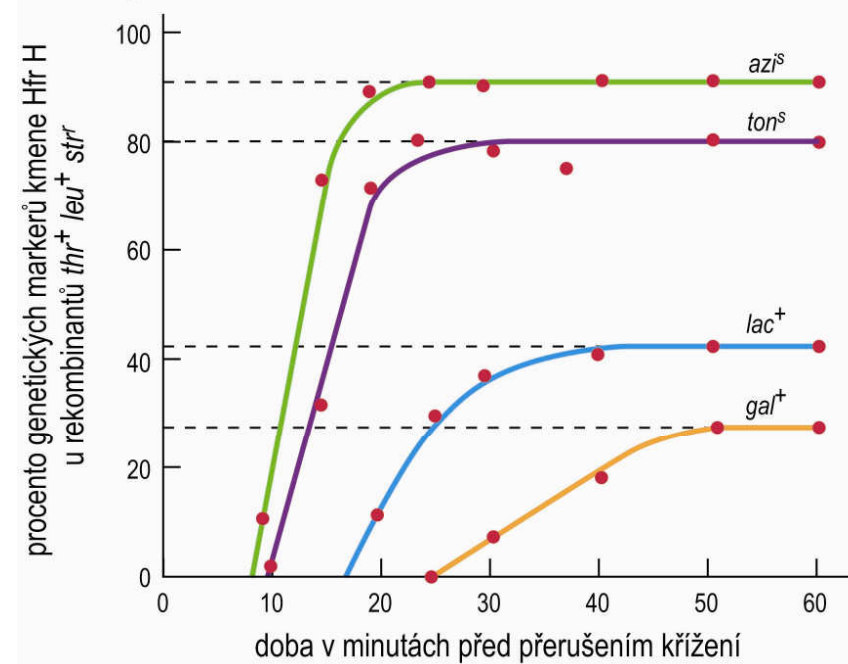
Křivky vycházejí ze sledování průběhu konjugace v populaci



Geny, které se nezačlení

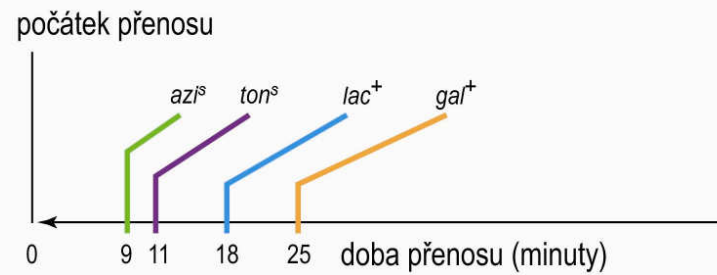
# Výsledky a interpretace pokusu s přerušovanou konjugací

## shrnutí výsledků



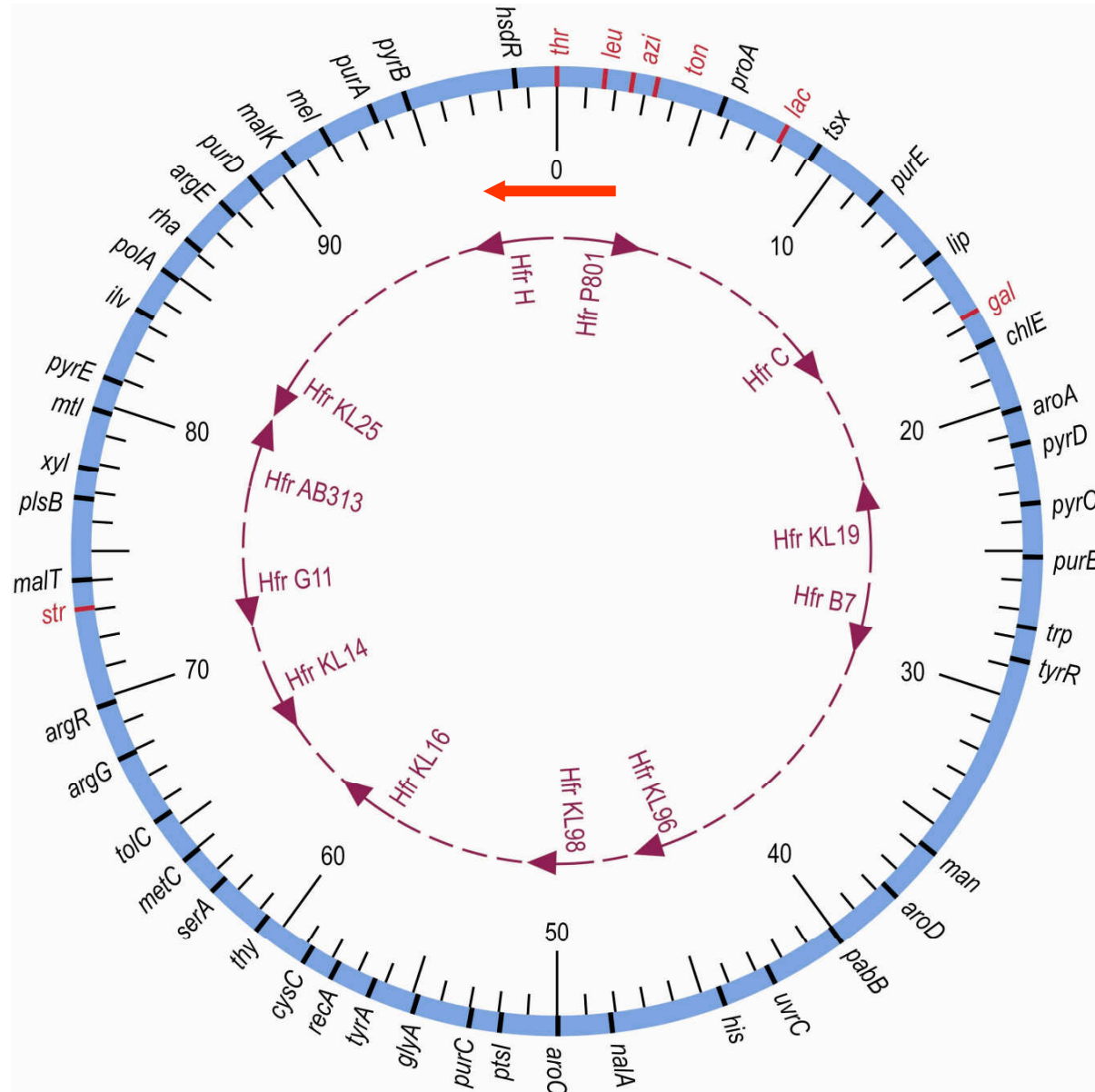
(a)

## interpretace výsledků



(b)

## Místa začlenění F-plazmidu do chromozomu *E. coli*



### Konkrétní příklad nepřerušované konjugace

Křížení:

HfrH Leu<sup>+</sup>Pro<sup>+</sup>Lac<sup>+</sup>Gal<sup>+</sup>Trp<sup>+</sup>Str<sup>s</sup> x F<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup>Pro<sup>-</sup>Lac<sup>-</sup>Gal<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Str<sup>r</sup>

Selekce jednotlivých kategorií rekombinantů se provede na minimální půdě se streptomycinem a doplněné takto:

<u>REKOMBINANTI</u>	<u>Půda</u>	<u>FREKVENCE REKOMBINANTŮ</u>
1. Leu <sup>+</sup> Str <sup>r</sup>	: + pro, glu, trp	0,20
2. Pro <sup>+</sup> Str <sup>r</sup>	: + leu, glu, try	0,15
3. Lac <sup>+</sup> Str <sup>r</sup>	: + leu, pro, lac, trp	0,13
4. Gal <sup>+</sup> Str <sup>r</sup>	: + leu, pro, gal, trp	0,078
5. Trp <sup>+</sup> Str <sup>r</sup>	: + leu, pro, glu	0,044

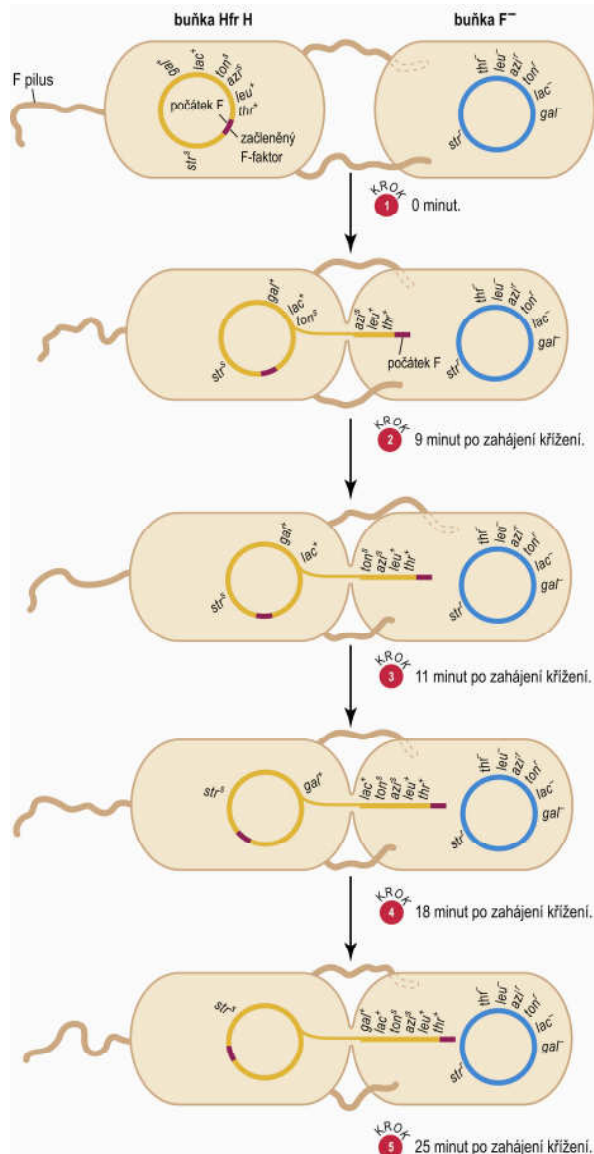
**FREKVENCE REKOMBINANTŮ =  $\frac{\text{počet rekombinantů daného typu}}{\text{počet buněk Hfr}}$**

**Odvozené pořadí genů na chromozomu kmene HfrH:**

**O-leu-pro-lac-gal-trp**

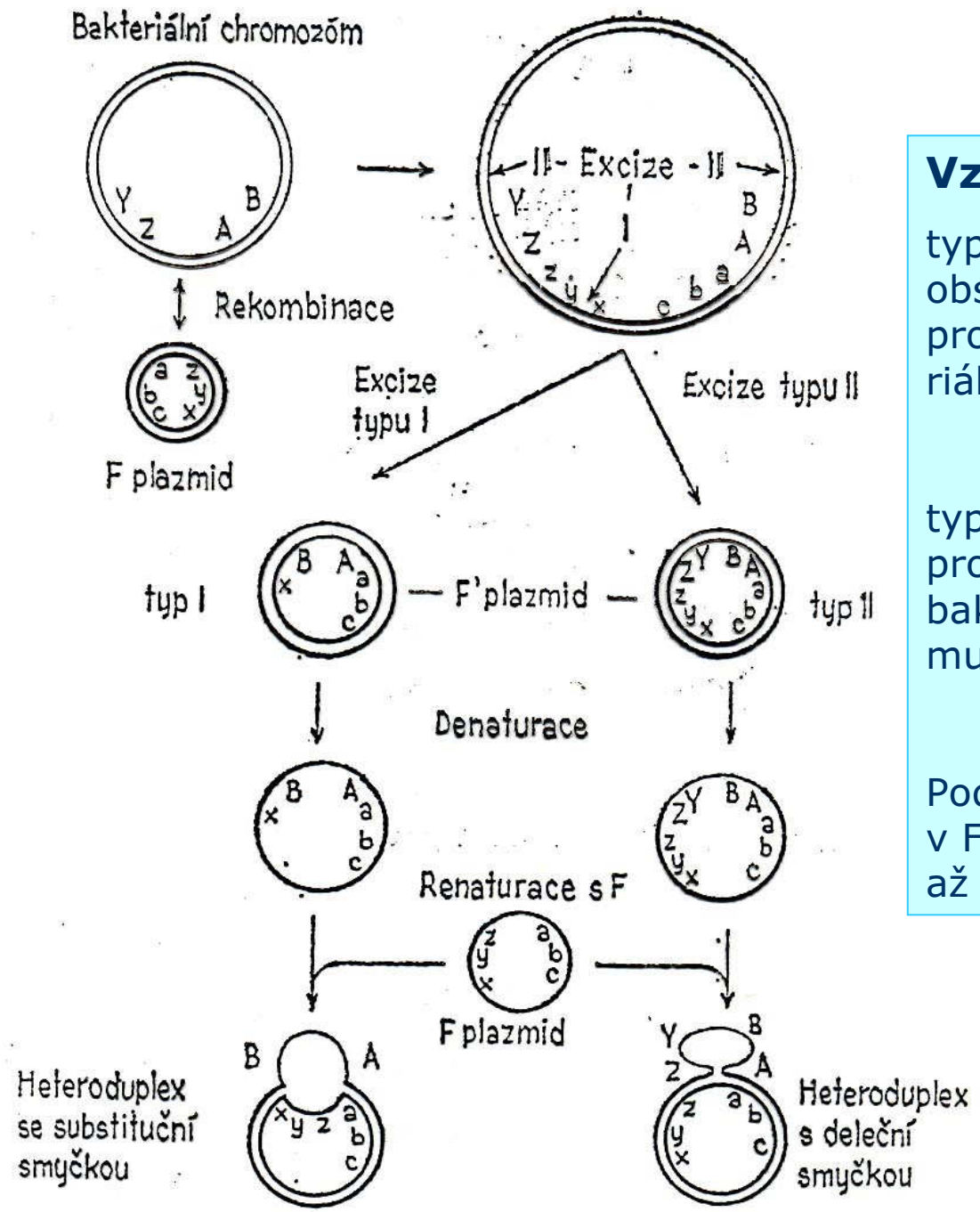
**Donorové a recipientní buňky se smíchají, inkubují 60 minut a vysejí na plotny**

# Křížení přerušovanou konjugací



## Charakteristika přenosu:

1. Přenos začíná od *oriT* na F-plazmidu
2. Chromozomální geny jsou přenášeny v lineárním pořadí od *oriT*
3. Doba přenosu genů je úměrná jejich vzdálenosti od *oriT*
4. Pravděpodobnost přenosu genů klesá s jejich vzdáleností od *oriT*
5. Pravděpodobnost začlenění genů přenesených z donora do chromozomu recipienta je pro všechny geny stejná



**Vznik plazmidů F'**

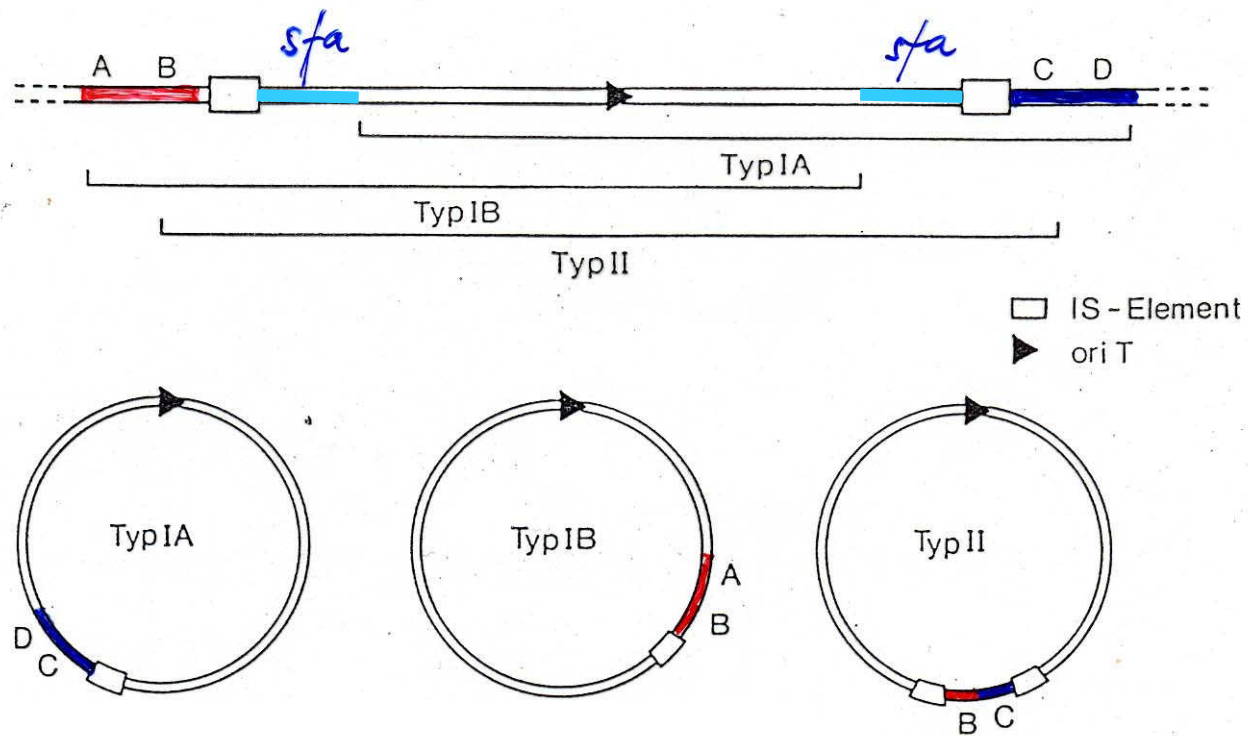
typ I (IA n. IB) - plazmid obsahuje distální nebo proximální část bakteriálního chromozomu

typ II - plazmid obsahuje proximální i distální část bakteriálního chromozomu

Podíl chromozomové DNA v F' plazmidu může činit až 30%



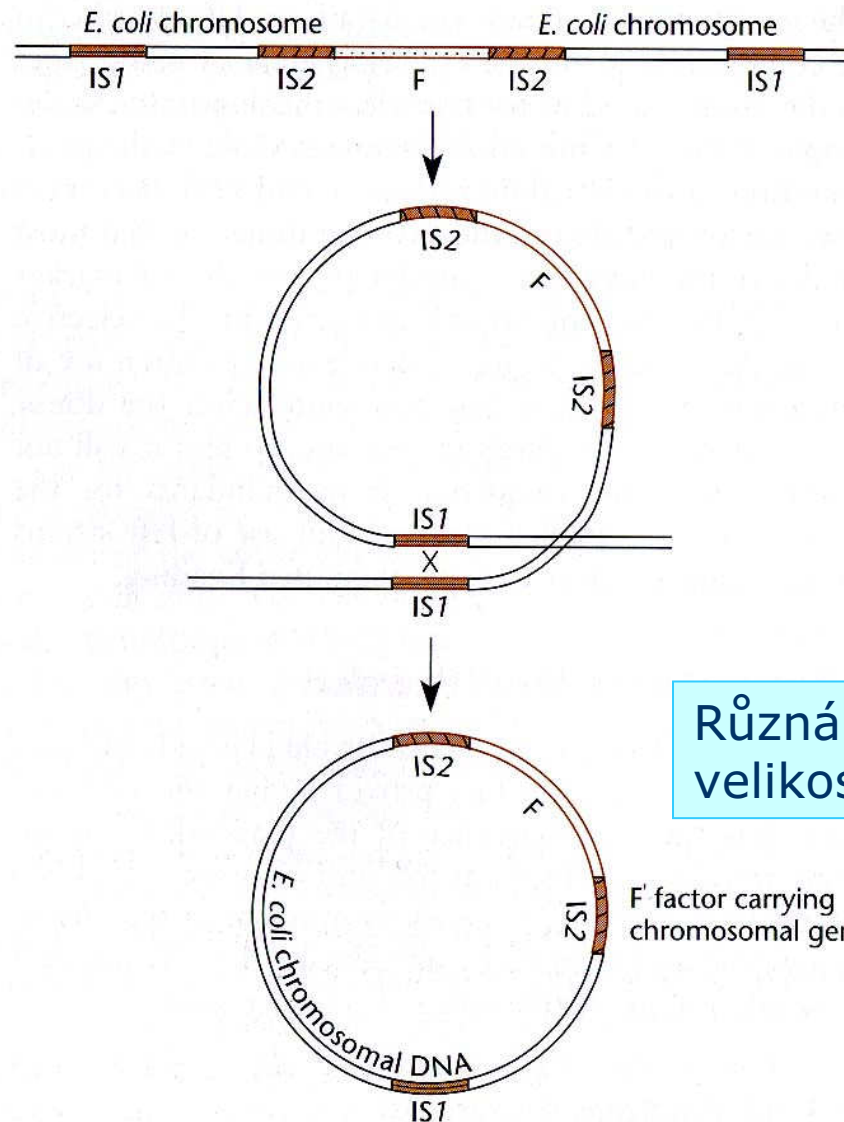
## Vznik plazmidů F'



v chromozomu zůstává část F plazmidu

**Sex factor affinity**

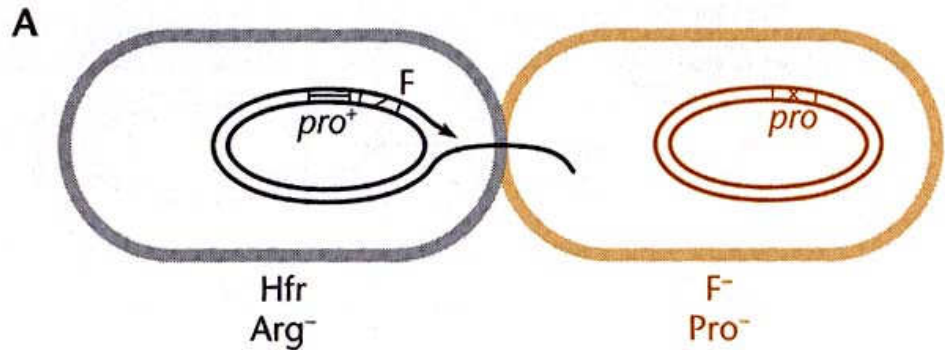
# VZNIK F' PLAZMIDŮ HOMOLOGNÍ REKOMBINACÍ MEZI IDENTICKÝMI IS ELEMENTY



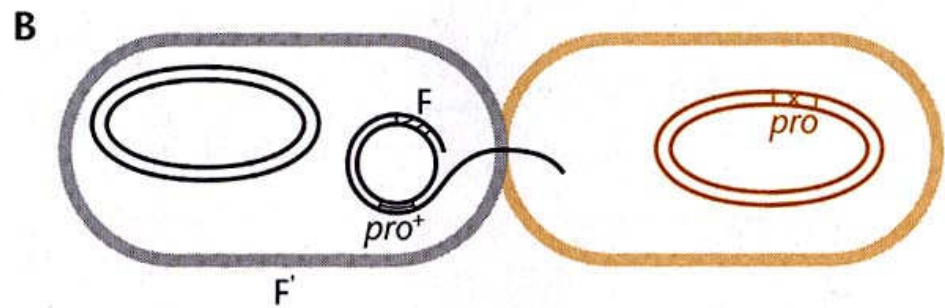
Různá konstituce a velikost F' plazmidů

F' factor carrying chromosomal genes

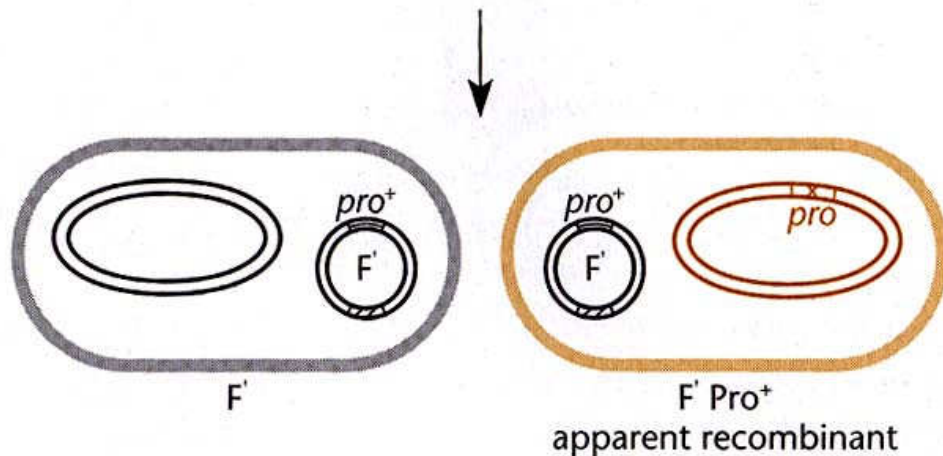
# SELEKCE F' PLAZMIDU NA ZÁKLADĚ ČASNÉHO PŘENOSU **pozdního** MARKERU



A. Kmen Hfr přenášejí gen *pro* jako pozdní marker. Při křížení s kmenem F<sup>-</sup> bude gen *pro* přenášen zhruba po 60 minutách.

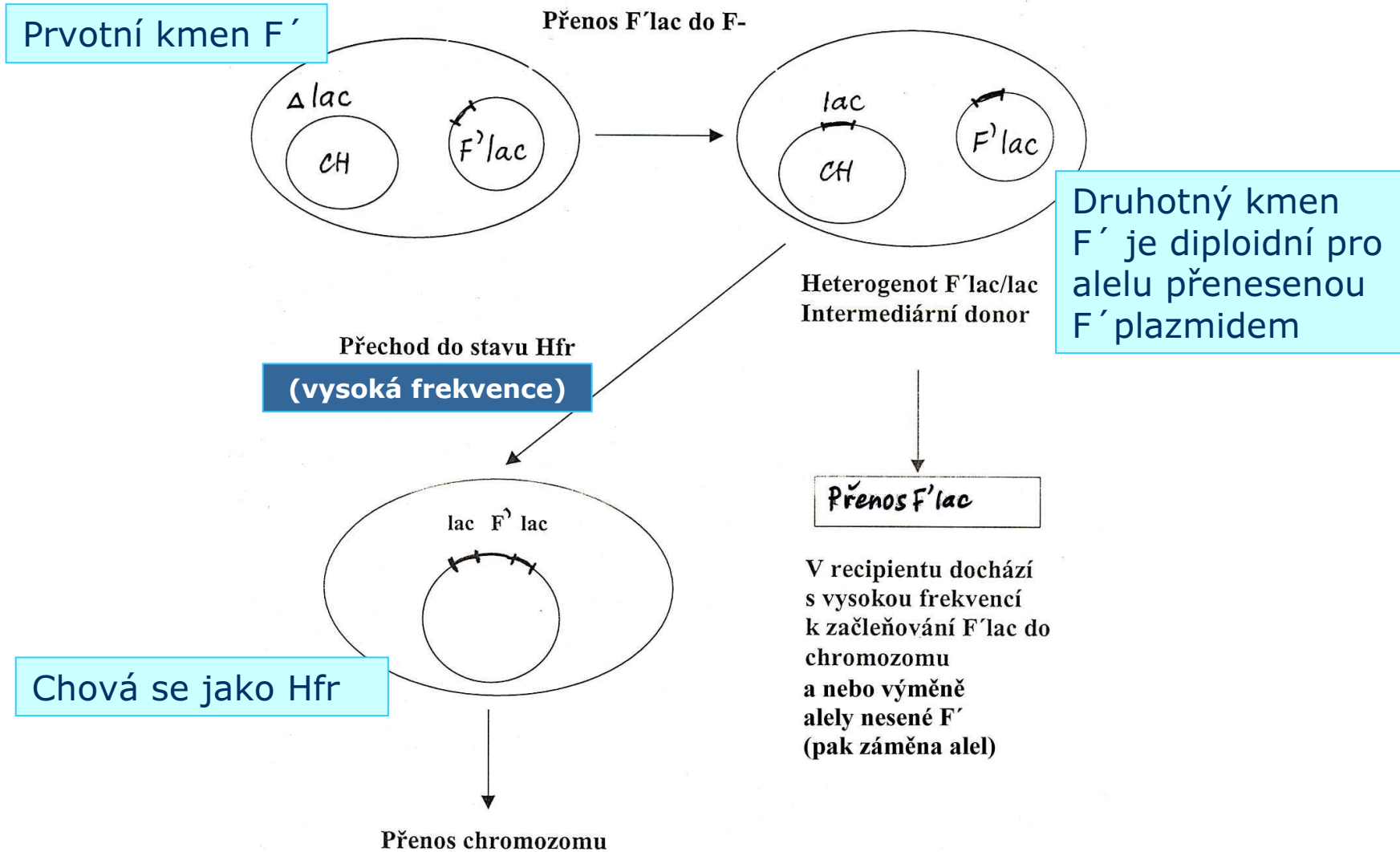


B. Vznik F' plazmidu se začleněným genem *pro*. Při křížení s kmenem F<sup>-</sup> bude F' *pro* přenesen během 5 minut. Výsledný **zdánlivě rekombinantní** kmen bude schopen gen *pro* dále přenášet při vysoké frekvenci

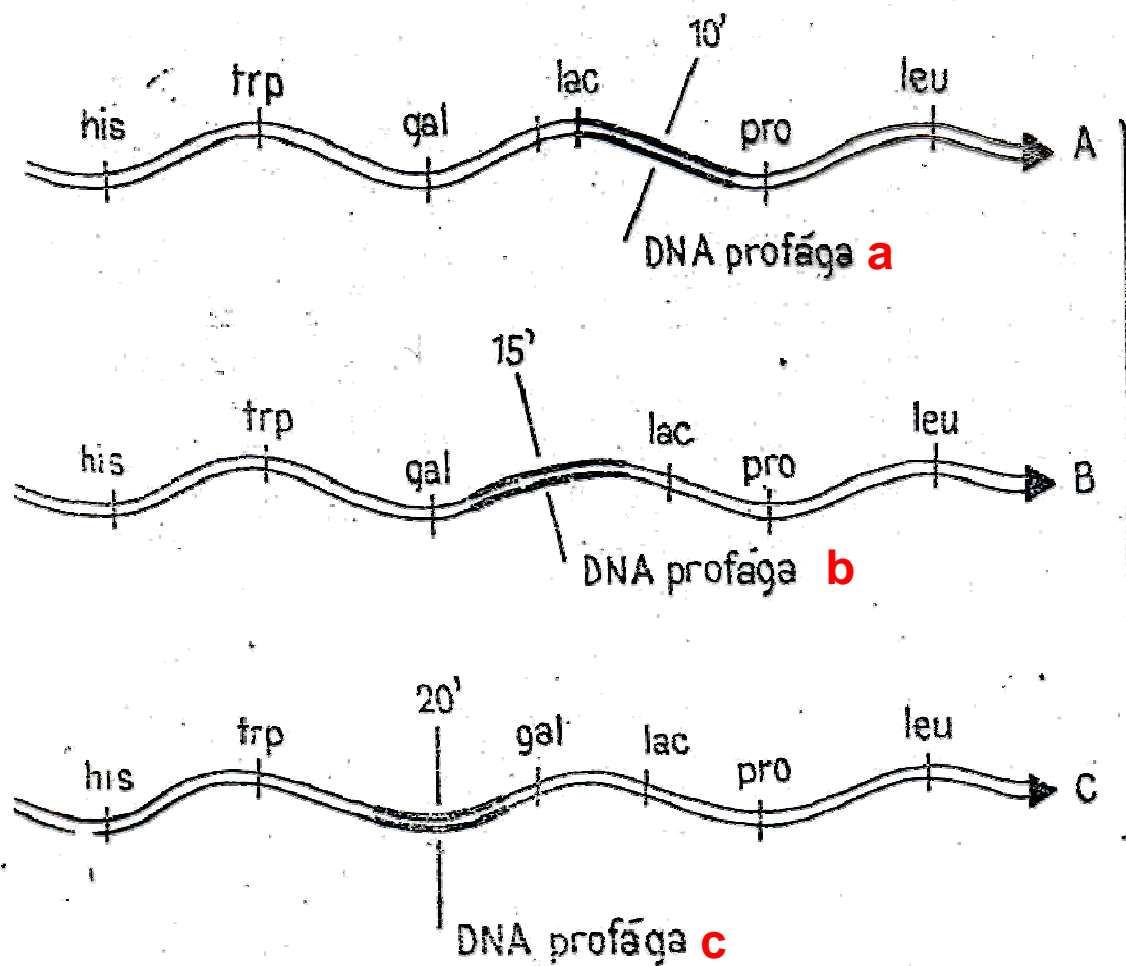


**Další možnost:  
použití recipienta  
recA<sup>-</sup>**

# VZNIK DRUHOTNÝCH KMENŮ F'



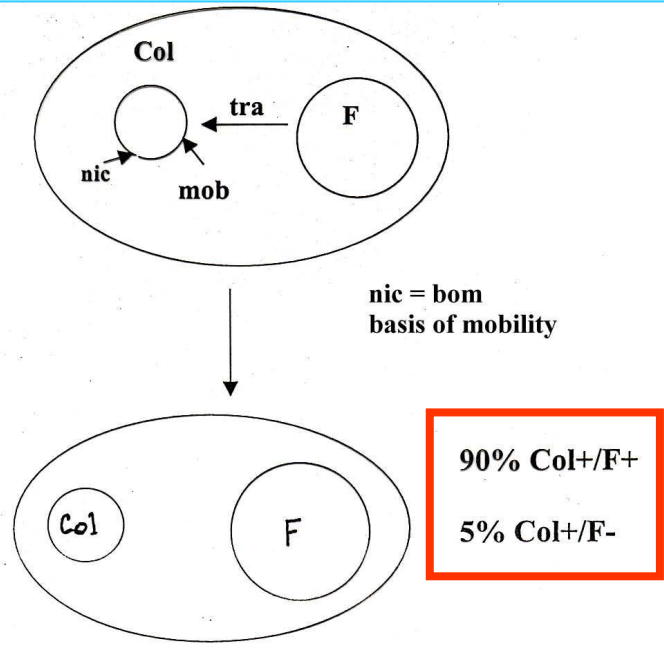
# ZYGOTICKÁ INDUKCE



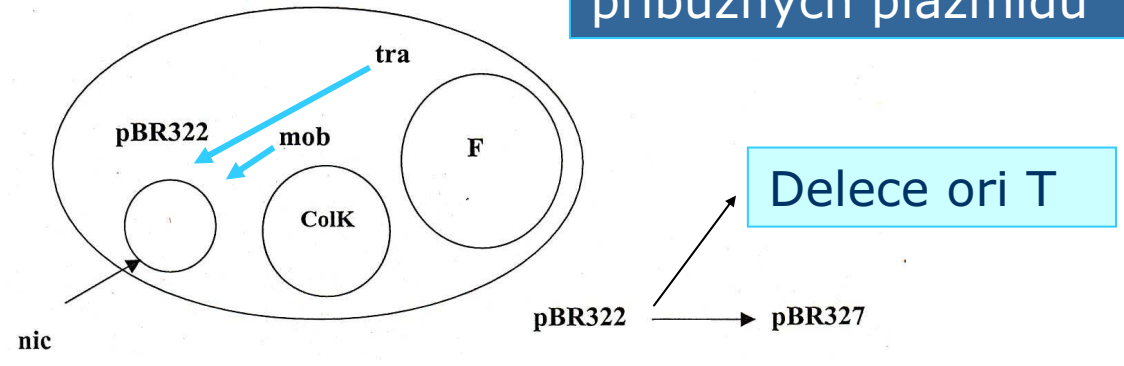
Chromozómy kmene  
Hfr H s různým  
umístěním profága

# MOBILIZACE NEKONJUGATIVNÍCH PLAZMIDŮ DONACÍ

- Nedochází k fyzickému kontaktu plazmidů

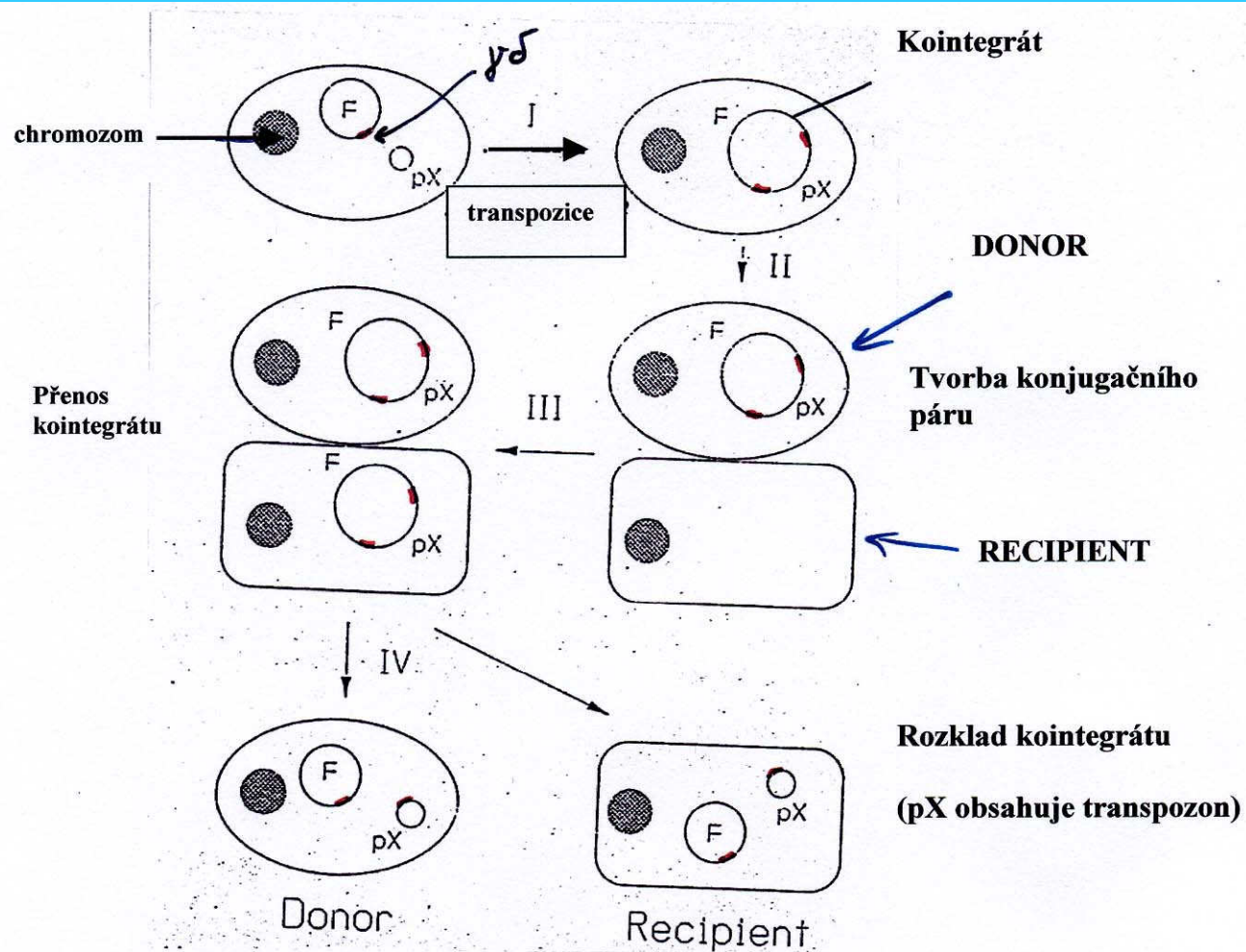


Mobilizace prostřednictvím příbuzných plazmidů



# Mobilizace plazmidů kondukci

- dochází k fyzickému kontaktu obou plazmidů



pX = plazmid nemobilizovatelný donací

***Salmonella***: mají řadu svých plazmidů, často fin+. Po jejich odstranění se do salmonely vnesly F plazmidy.

U *S. typhimurium* se F včleňuje jen do jednoho místa (místo sfa, jehož původ není znám)

***Pseudomonas***: divergentní skupina druhů a kmenů, má řadu konjugačních systémů, samopřenositelných nebo mobilizovatelných. Plazmid FP2 může mobilizovat chromozom v jednom směru z jediného chromozomového místa. Byly popsány jiné plazmidy, mobilizující od jiných míst. Mechanismus mobilizace není znám.

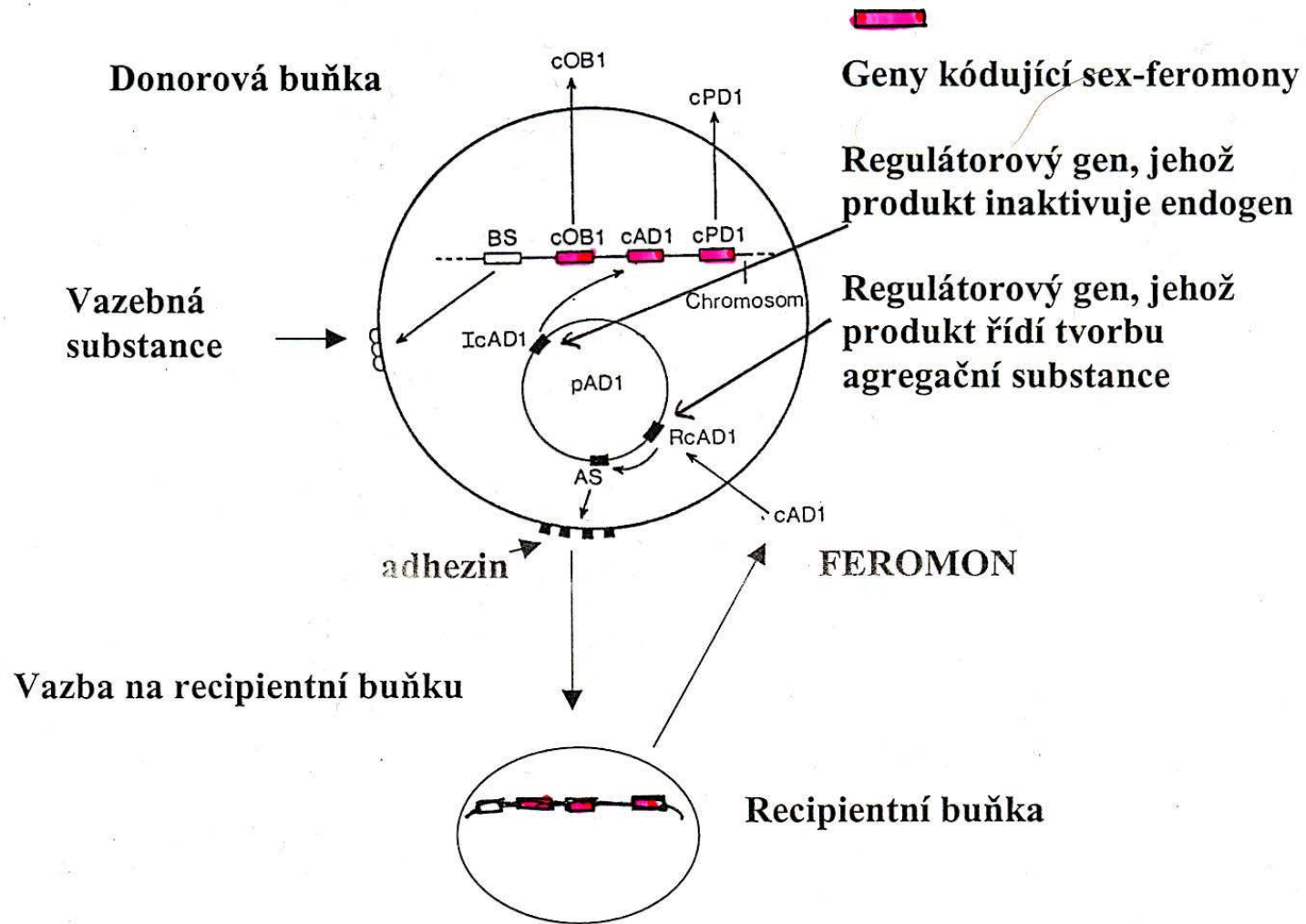


## Konjugace u G+ bakterií

Konjugační přenos je znám u mnoha rodů: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* a *Streptomyces*.

Podobně jako u G- bakterií mohou být plazmidy přenášeny i mezi rody a druhy.

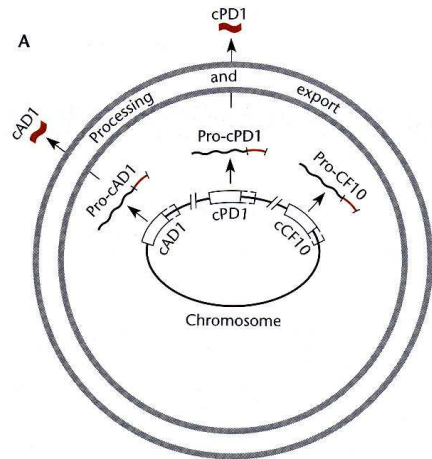
# Model konjugativního přenosu plazmidů u *Streptococcus faecalis*



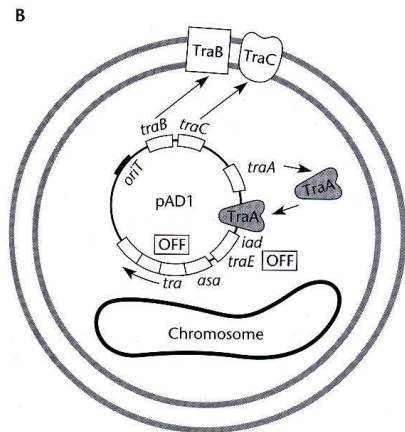
## sex-feromony streptokoků

Plasmid	Größe (kb)	Sex-Pheromon
pAD1	59,6	cAD1
pOB1	71	cOB1
pPD1	54	cPD1
pAM $\gamma$ 1	60	cAM $\gamma$ 1
pAM $\gamma$ 2	~ 60	cAM $\gamma$ 2
pAM $\gamma$ 3	~ 60	cAM $\gamma$ 3
pAM373	36	cAM373
pCF10	54	cCF10

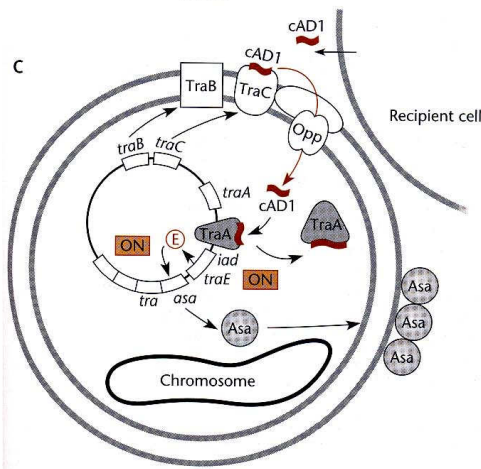
- \* Jeden kmen může tvořit více druhů feromonů a získávat tak různé plazmidy.
- \* Plazmidy nesou geny pro tvorbu virulenčních faktorů a rezistence k antibiotikům
- \* Plazmidy mohou být přenášeny do jiných druhů bakterií (*Staphylococcus*)



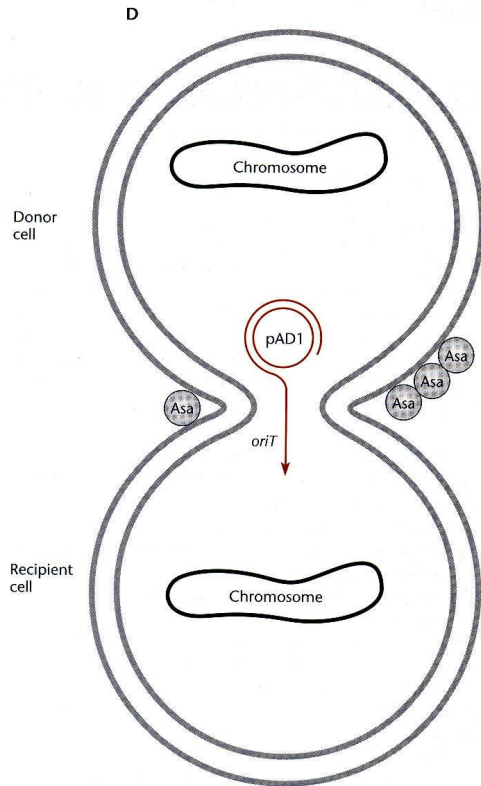
**A. Recipientní buňka tvoří feromony: geny pro feromony jsou umístěny na chromozomu. Feromony vznikají odštěpením signálních sekvencí z proferomonů při jejich exportu z buňky. „Quorum sensing“**



**B. Donorová buňka: nese plazmid exprimující protein TraA (repressor), který reprimuje transkripci tra genů vyjma traC, který kóduje povrchový protein TraC (receptor) zachytávající feromon.**

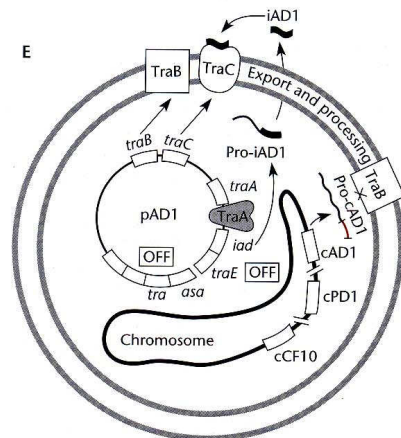


**C. Indukce párování. Feromon se váže na TraC na povrchu donora a vstupuje do buňky, kde se váže na repressor TraA, tím jej inaktivuje a navozuje tvorbu TraE, který pak aktivuje expresi tra genů včetně genu asa kódujícího agregační substanci (Asa)**



**D. Přenos plazmidu. Donorová a recipientní buňka navážou kontakt a plazmid se přenes za vzniku transkonjuganta.**

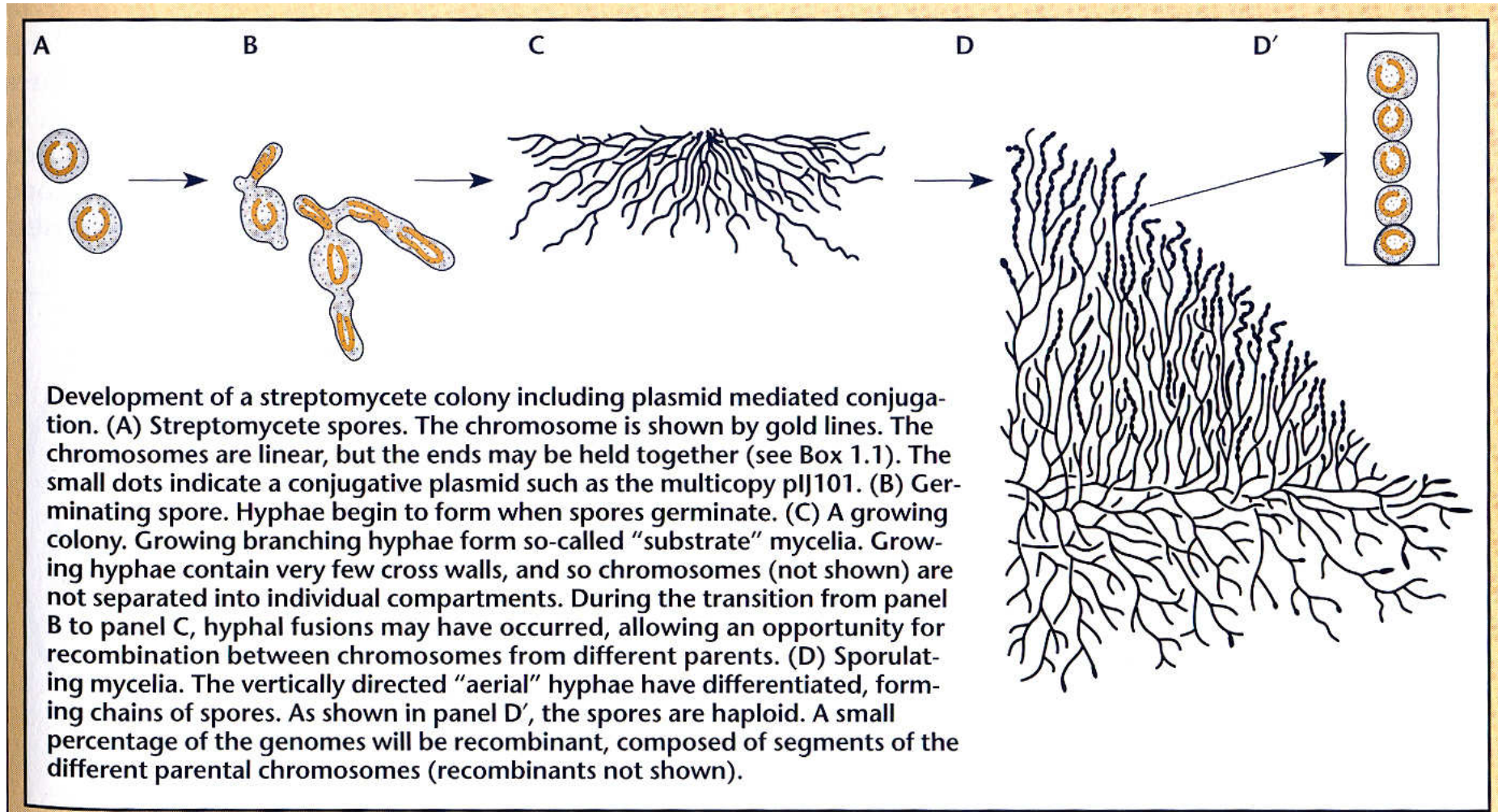
**E. V recipientní buňce (transkonjugantu) se přestává vytvářet zralý feromon. Inhibitorový peptid iAD1 se váže na TraC a zabraňuje párování dvou donorových buněk. TraB je inhibitorový protein, který brání exkreci feromonu.**



**Mechanismy zábrany příjmu homologního plazmidu:**

1. Tvorba povrchových proteinů - exkluze vstupu
2. Tvorba peptidů (iAD1) zabraňujících vazbě feromonu
3. Tvorba proteinů (TraB) - zábrana úpravy proferomonu a jeho exkrece

# KONJUGACE U STREPTOMYCET



# **SPECIFICKÉ RYSY KONJUGATIVNÍHO PŘENOSU U STREPTOMYCET**

- Konjugace nevyžaduje plazmidově-kódované geny pro kontakt buněk (hyf)
- Není známo, zda přenos plazmidů nebo chromozmové DNA vyžaduje jednořetězcový zlom, a zda se přenáší jednořetězec
- Chromozomy se přenášejí obousměrně, aniž v nich je plazmid začleněn: není pozorován gradient přenosu chromozomových genů
- Plazmid pIJ101 kóduje jen jeden Tra-protein, který asi napomáhá přenosu DNA mezi hyfy. Po přenosu se plazmid velmi rychle v hyfech šíří.

**Letální zygoza – inhibice růstu recipientních buněk, do nichž byl konjugací přenesen plazmid – v okolí kolonie tvořené donorovou buňkou vznikají nas nárůstu recipientních buněk pocky (pocks)**