

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT

podzim 2016

TRANSDUKCE

Ivana Mašlaňová

iva.maslanova@gmail.com

SYSTÉMY ZPROSTŘEDKOVANÉHO PŘENOSU DNA

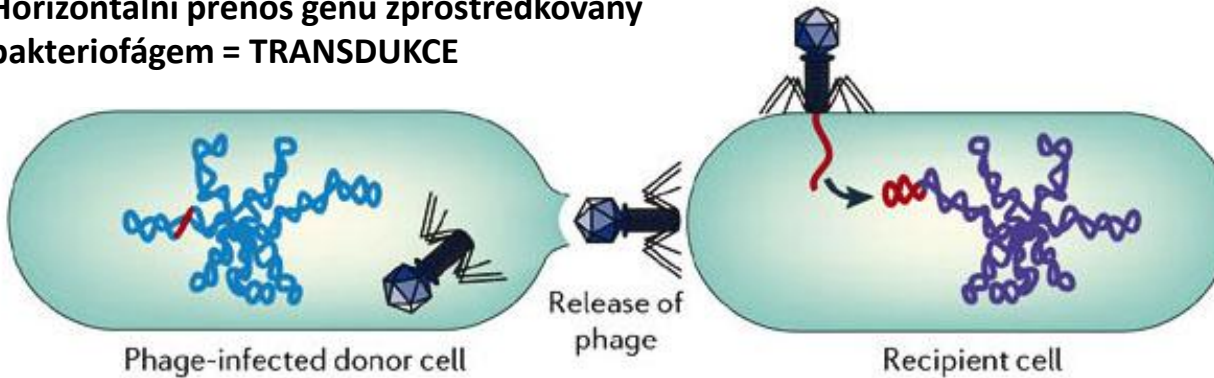
Přenos bakteriální DNA (chromozomové nebo plazmidové) bakteriofágem.

A. Transdukce

E. coli, *S. typhimurium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*

- a. Nespecifická (*P22*, *P1*, *SP β* , ϕ 11) abortivní *Jsou přenášeny libovolné geny*
- b. Specifická (fág lambda) *Jsou přenášeny jen určité geny*

Horizontální přenos genů zprostředkovaný bakteriofágem = TRANSDUKCE



B. Kapsdukce

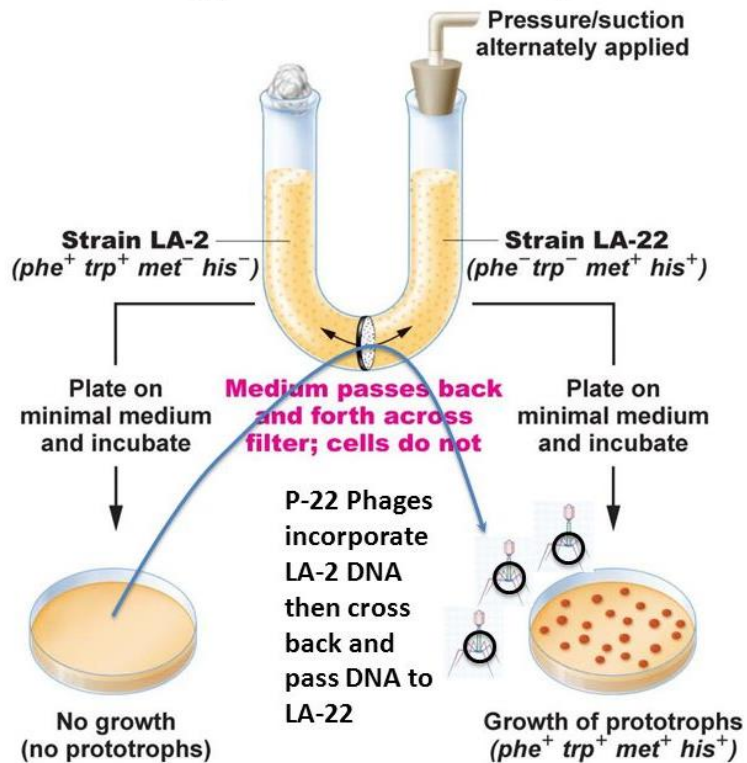
Rhodobacter capsulatus (GTA = gene transfer agent)
Methanococcus voltae (VTA = voltae transfer agents)

Objev transdukce: 1952 (Zinder a Lederberg)

Salmonella typhimurium, fág P22

- Studium auxotrofních mutant – vznik prototrofních rekombinant
- Proces není ovlivněn Dnázou
- Není nutný kontakt buněk (U-trubice)
- Přenosovým agens jsou fágy

Lederberg-Zinder experiment

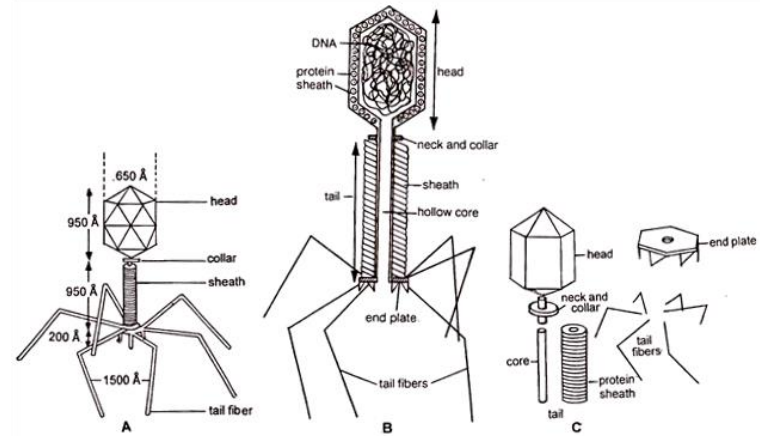


DONOR - RECIPIENT

Transdukující částice = pseudovirion

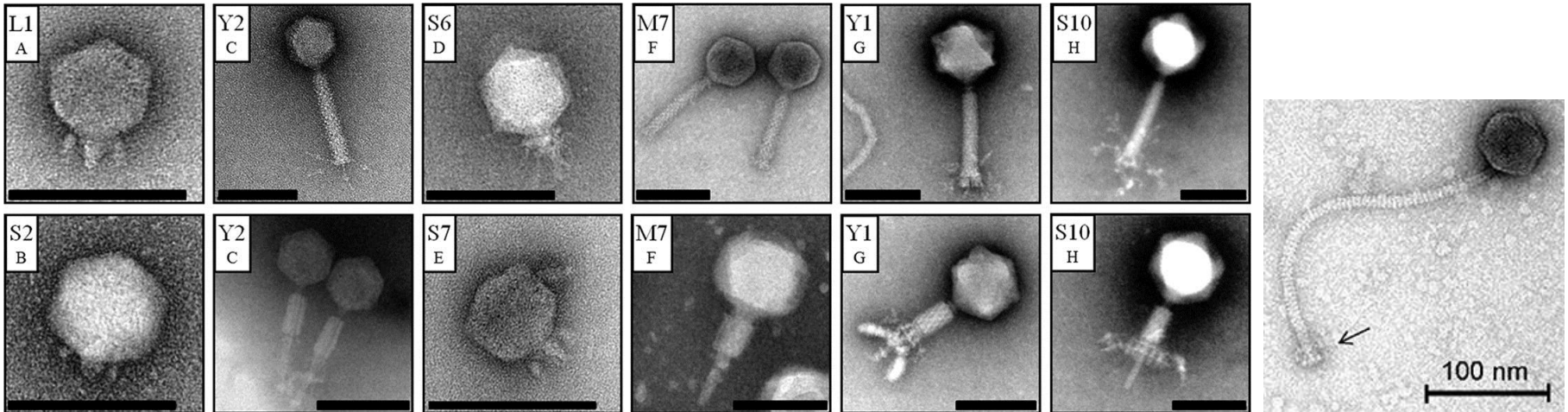
Transduktanta

- Rekombinantní – přenos chromozomové DNA
- Abortivní – přenos chromozomové DNA
- Plazmidová – přenos plazmidů



Kotransdukce = současný přenos dvou nebo více genů donora do recipienta transdukci

Bakteriofág - morfologie



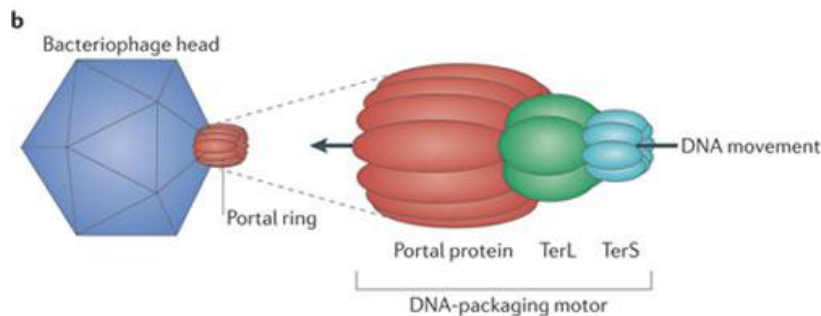
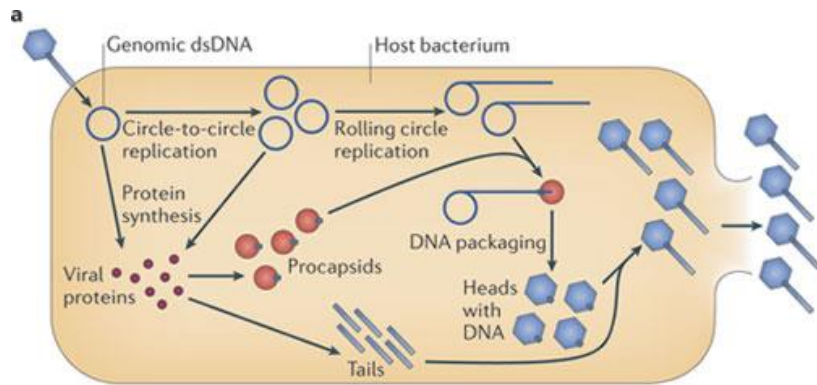
Podoviridae, Myoviridae

Siphoviridae

SESTAVOVÁNÍ FÁGOVÝCH ČÁSTIC A SBALOVÁNÍ DNA DO VIRIONŮ

Fágová dsDNA (19 – 500 kb) sbalována do prokapsidu (prohead)

- 3 hlavní proteiny tvořící prokapsid – „coat“ protein, „scaffolding“ protein a „portal“ protein
- 2 proteiny odpovědné za sbalování DNA do prokapsidu – rozpoznání DNA, přenos skrz portálový prstenec a dopravení DNA do prokapsidu



Nature Reviews | Microbiology

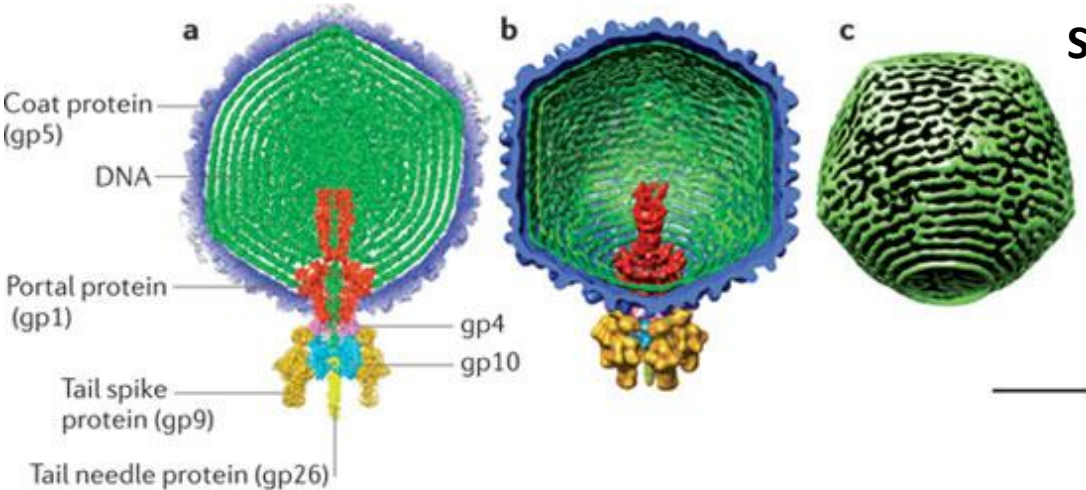
a. Lytický cyklus bakteriofága:

Adsorpce virionů na povrchové receptory buněk; vpravení lineární dsDNA do buňky; exprese ranných a pozdějších genů – syntéza fágových proteinů; replikace fágové DNA – „circle to circle“ a „rolling circle“ mechanismus; tvorba prokapsidů a bičičků; DNA sbalována do prokapsidů – zformování celých virionů.

b. DNA sbalovací „motor“:

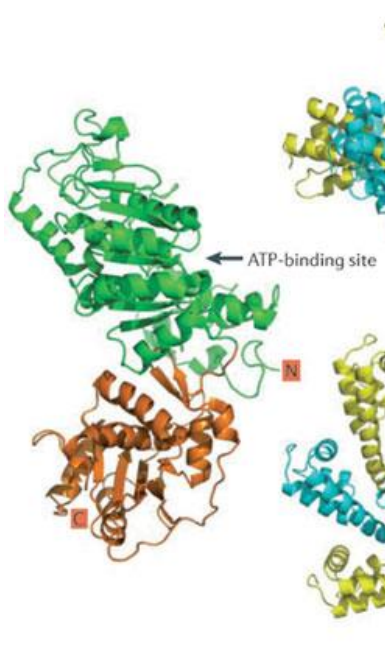
Portálový prstenec na ikosahedrání fágové hlavě; vyzba malé (TerS) a velké (TerL) podjednotky terminázy – TerS – ATPáza, TerL – DNA rozpoznávací protein

Struktura virionu P22

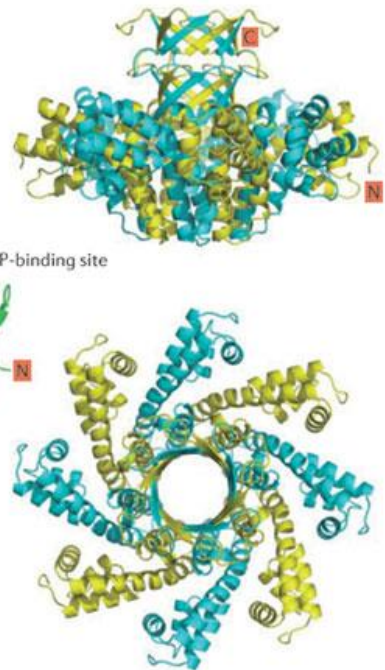


Nature Reviews | Microbiology

a TerL from phage T4



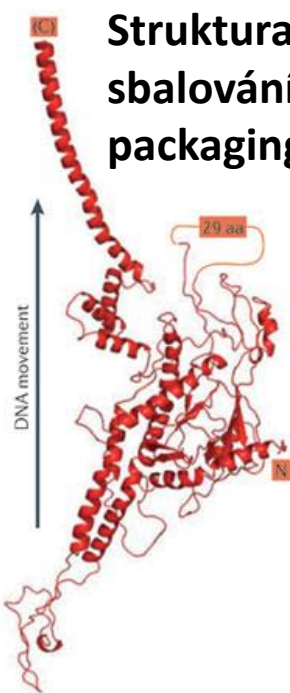
b TerS from phage Sf6



c Portal protein from phage P22



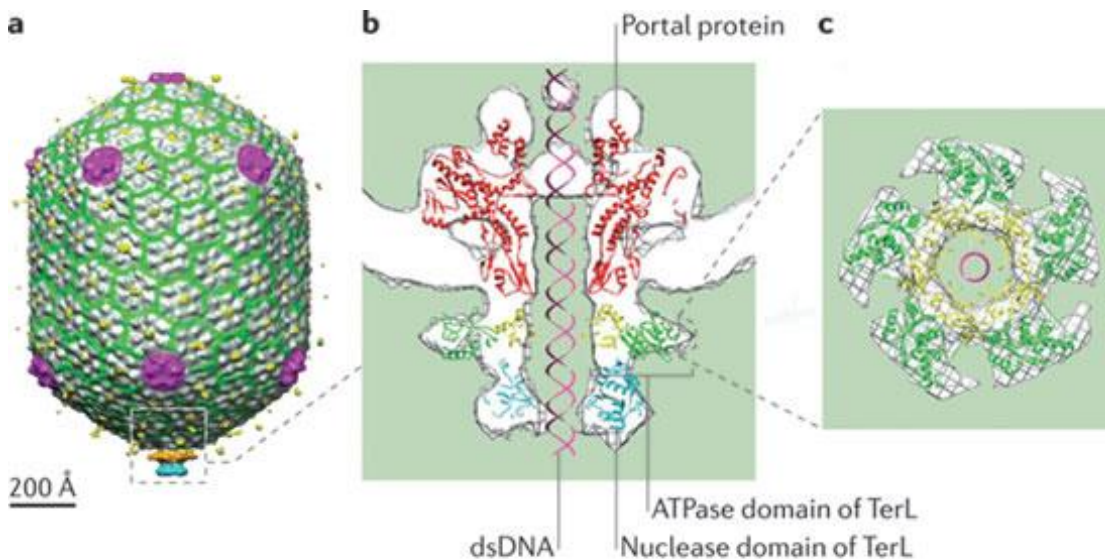
d Portal protein from phage P22



Struktura tří proteinů odpovědných za sbalování DNA do virionu – „DNA-packaging motor“

RYCHLOST SBALOVÁNÍ FÁGOVÉ DNA DOVNITŘ VIRIONŮ

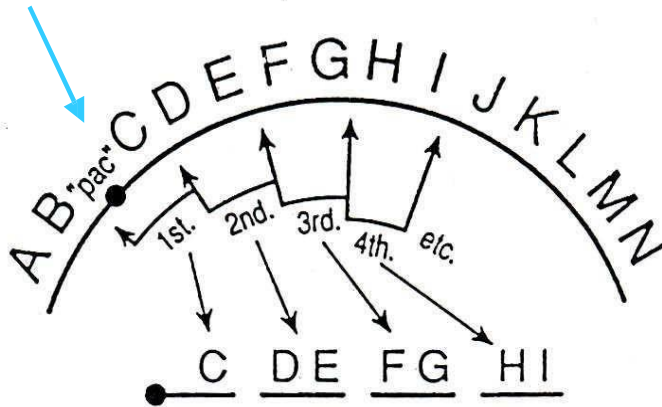
Phage	Native DNA length (kb)	Density of packaged DNA (bp per 10^5 \AA^3)*	Processivity (kb per slip) ^{†9}	Packaging speed (kb per second) ^{§11}	Motor force (piconewtons) [§]
$\phi 29$	19.3	46	>15	180	110
λ	48.5	47	>45	700	>60
T4	166	48	~13	1,800	>60



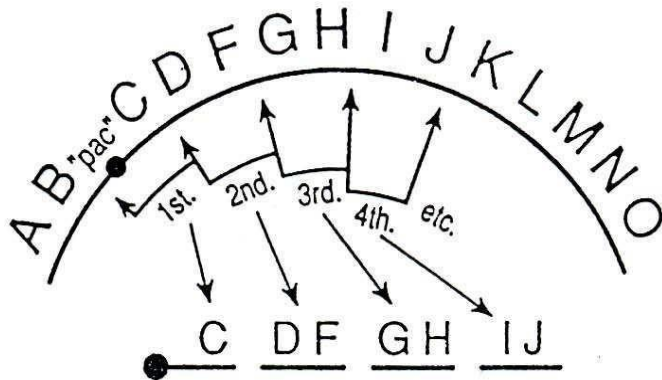
„DNA-packaging motor“ fága T4:
 „coat“ protein – bílá barva; TerL – modře; Soc – malý vnější kapsidový protein (zeleně); Hoc – vnější kapsidový protein (žlutě)

Sbalování hostitelské DNA – bakteriofág P22

„Pseudopac“ místo



A. Wild type chromosome



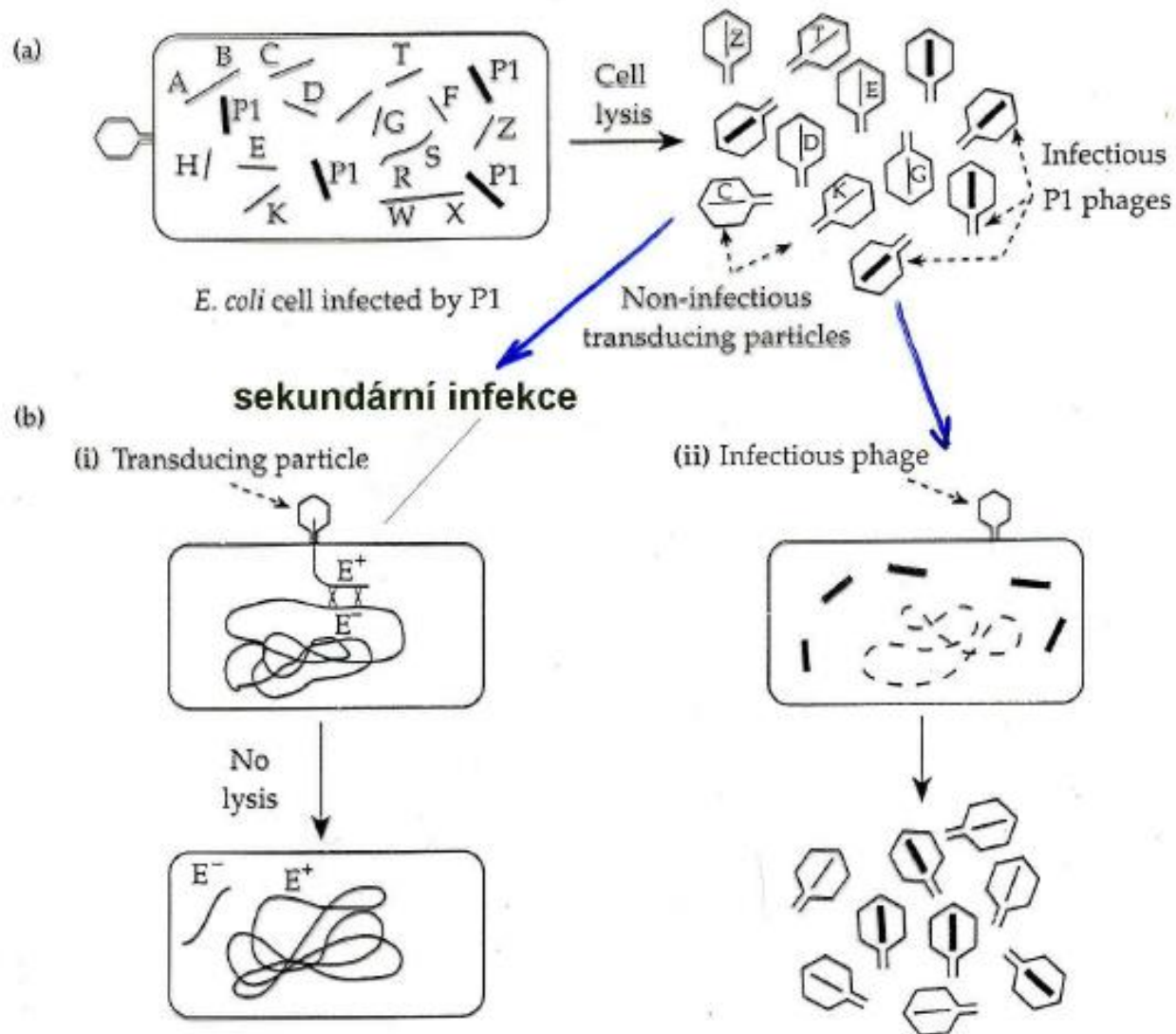
B. Chromosome deleted for E

Zabalování hostitelské DNA fágem P22 mechanismem naplňování hlaviček. A. Chromozom obsahuje "pac" místa rozpoznávaná zabalovacím aparátem fága. Zabalování začíná od místa "pac" a probíhá sekvenčně v jednom směru. B. Zabalování bakteriálního chromozomu s deletovaným genem E. Kotransdukce genů je pozměněna (delece pozměnila vzdálenost genů)

Fág P22HT = mutantní fág se sníženou nukleázovou specifitou rozpoznávající další „pseudopac“ místa

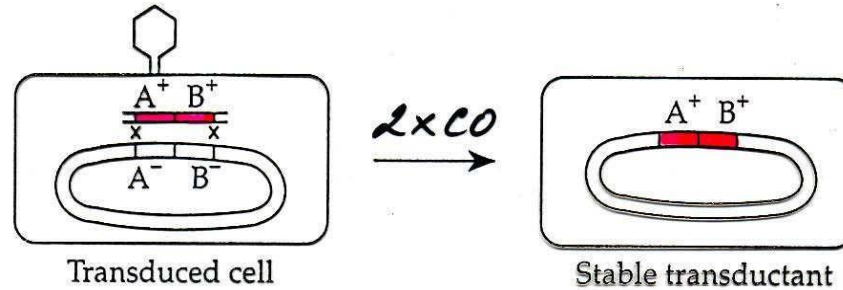
P22HT transdukuje plazmid pBR322, který není P22 přenášen

NESPECIFICKÁ TRANSDUKCE



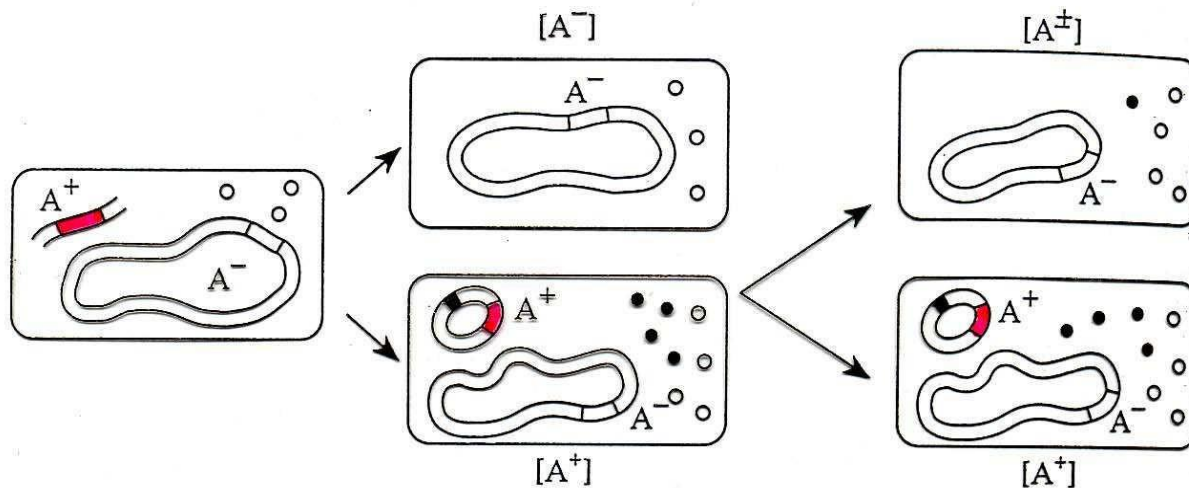
NESPECIFICKÁ A ABORTIVNÍ TRANSDUKCE

(a) Vytváření rekombinantních transduktant



Proces je závislý na RecA

(b) Abortivní transdukce



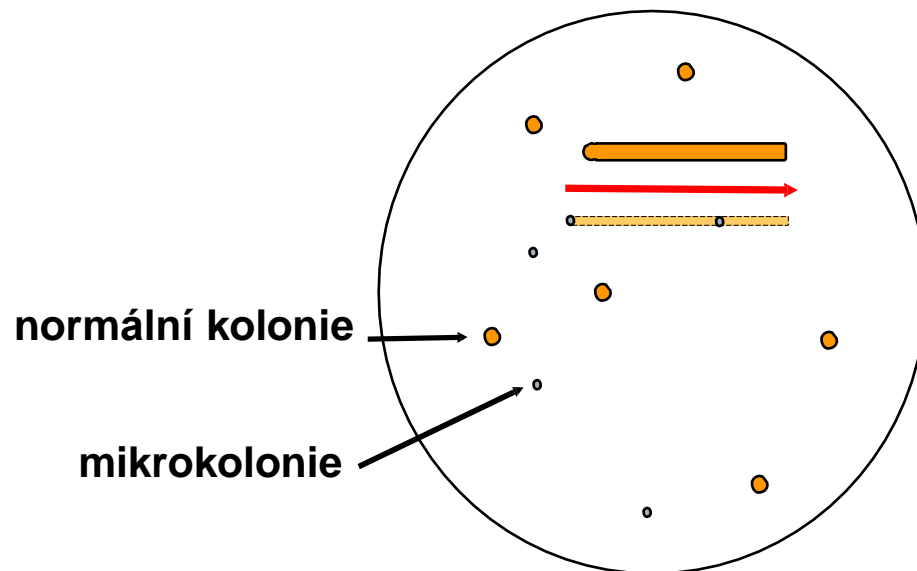
Rekombinantní transduktanta – **normální kolonie**

Abortivní transduktanta – **mikrokolonie**

ODLIŠENÍ REKOMBINANTNÍCH A ABORTIVNÍCH TRANSDUKTANT



Transduktanty na selekčním médiu

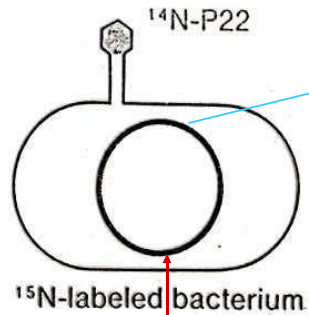


Mikrokolonie – po přeočkování na novou selekční misku – ztráta fenotypu

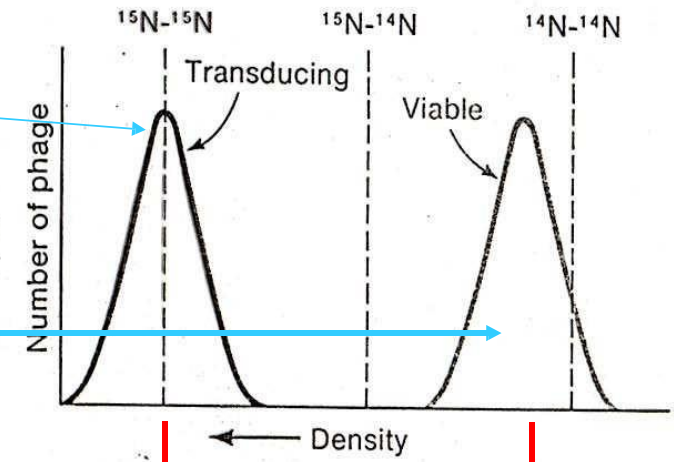
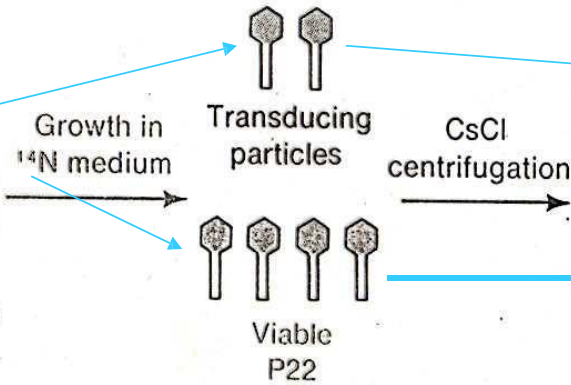
CHARAKTERISTIKA NESPECIFICKY TRANSDUKUJÍCÍCH FÁGŮ

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
od zlomů na DNA ←		
% of transducing particles in lysate	1	2
% of transduced DNA recombined into chromosome	1–2	1–2

EXPERIMENTÁLNÍ DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI BAKTERIÁLNÍ DNA V TRANSDUKUJÍCÍCH ČÁSTICÍCH FÁGA P22 (při nespecifické transdukcii)



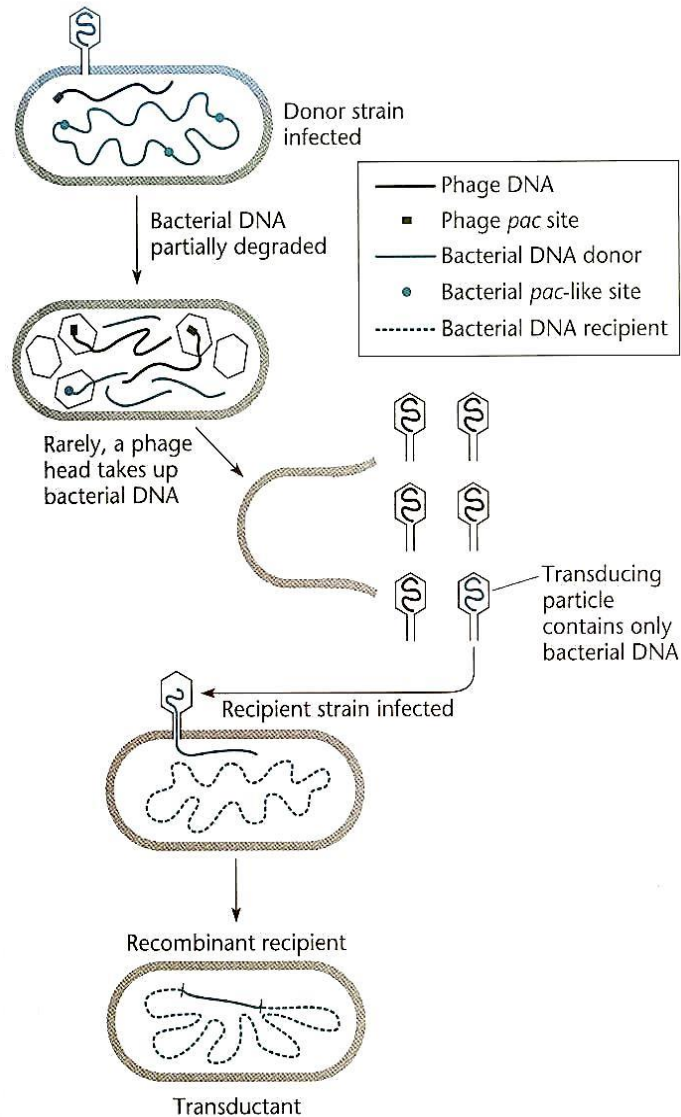
**Chromozom
naznačen ^{15}N**



**Dávají vznik
transduktantům**

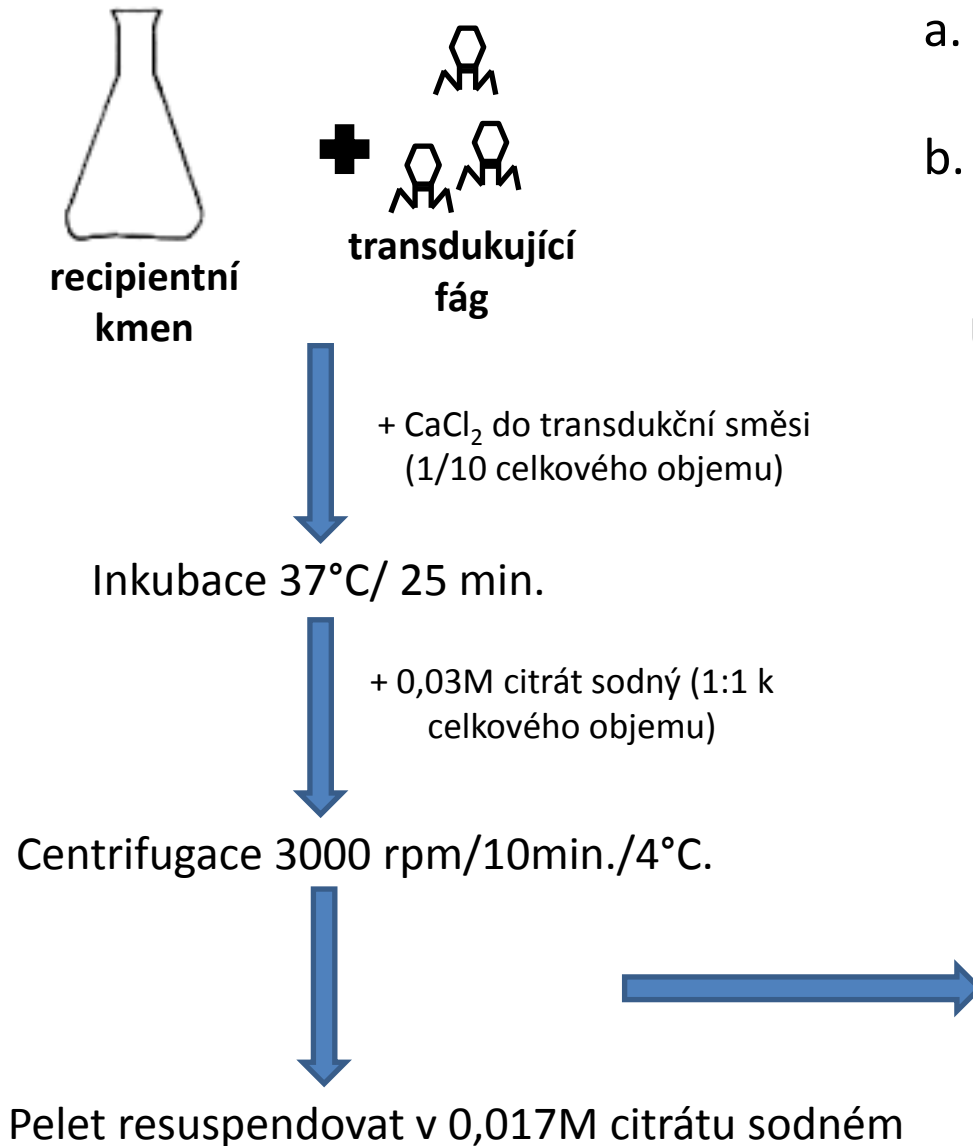
Lyzují buňky

OBEČNÁ TRANSDUKCE – VZNIK TRANSDUKUJÍCÍCH ČÁSTIC



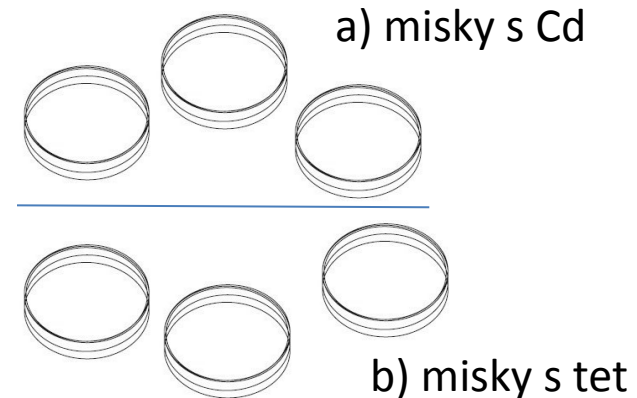
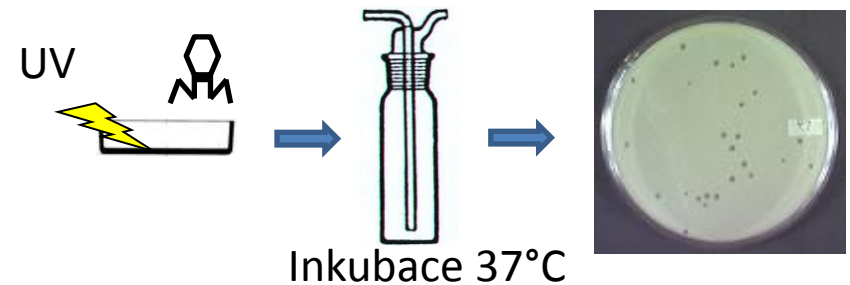
1. Infikování **donorového kmene** fágovými částicemi
2. Bakteriální **DNA degradována**
3. Sestavení pseudokapsidů, **plnění DNA do virionů** (rozpoznání *pac* místa na fágové DNA nebo pseudo-*pac* místa na bakteriálním chromozomu)
4. Fágové potomstvo **infikuje nového hostitele** (recipienta); **transdukující viriony** obsahují pouze bakteriální DNA
5. **Rekombinace transdukované** bakteriální DNA s DNA recipientní buňky

POSTUP TRANSDUKCE



Příprava fágového lyzátu:

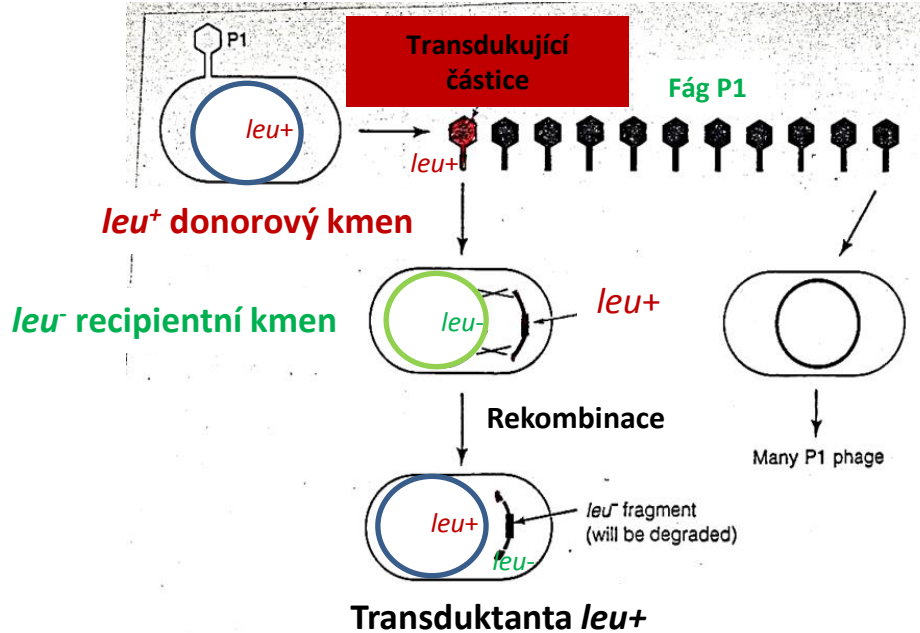
- Indukce z donorového kmene UV-zářením nebo mitomycinem C
- Pomnožením fágového lyzátu na donorovém kmeni



STANOVENÍ FREKVENCE TRANSDUKCE

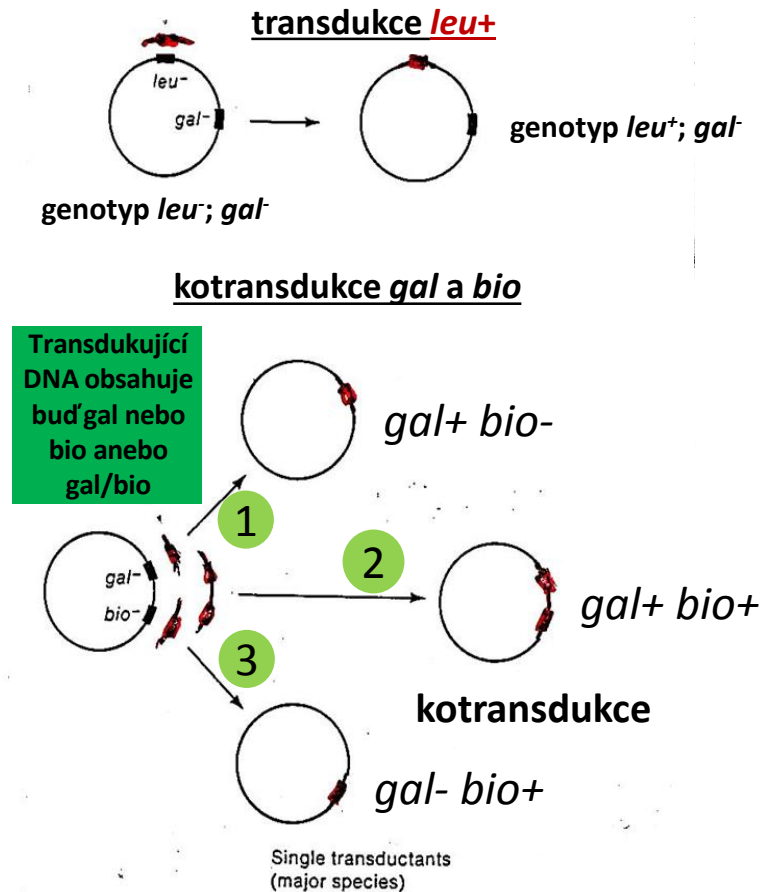
- **$A = y / p$**
- **y = počet transduktant pro daný znak v 1 ml transdukční směsi**
- **p = počet virionů (PFU/ ml)**
- **Parametry ovlivňující frekvenci transdukce**
 - velikost genomu fága
 - počet virionů uvolněných z jedné buňky (fágový výnos)
 - aktivita RM systémů v recipientní buňce
 - účinnost procesu rekombinace v recipientní buňce
 - velikost plazmidu

TRANSDUKCE JEDNOTLIVÝCH GENŮ



závislost na RecA systému

KOTRANSDUKCE DVOU GENŮ



Frekvence kotransdukce = 0-100%, v závislosti na vzdálenosti markerů (referenčního a sledovaného)

Výhoda: délka transdukovaných fragmentů je ve srovnání s transformací přesněji definována (nízké hodnoty MOI)

VÝPOČET VZDÁLENOSTI GENŮ Z FREKVENCE KONTRASDUKCE

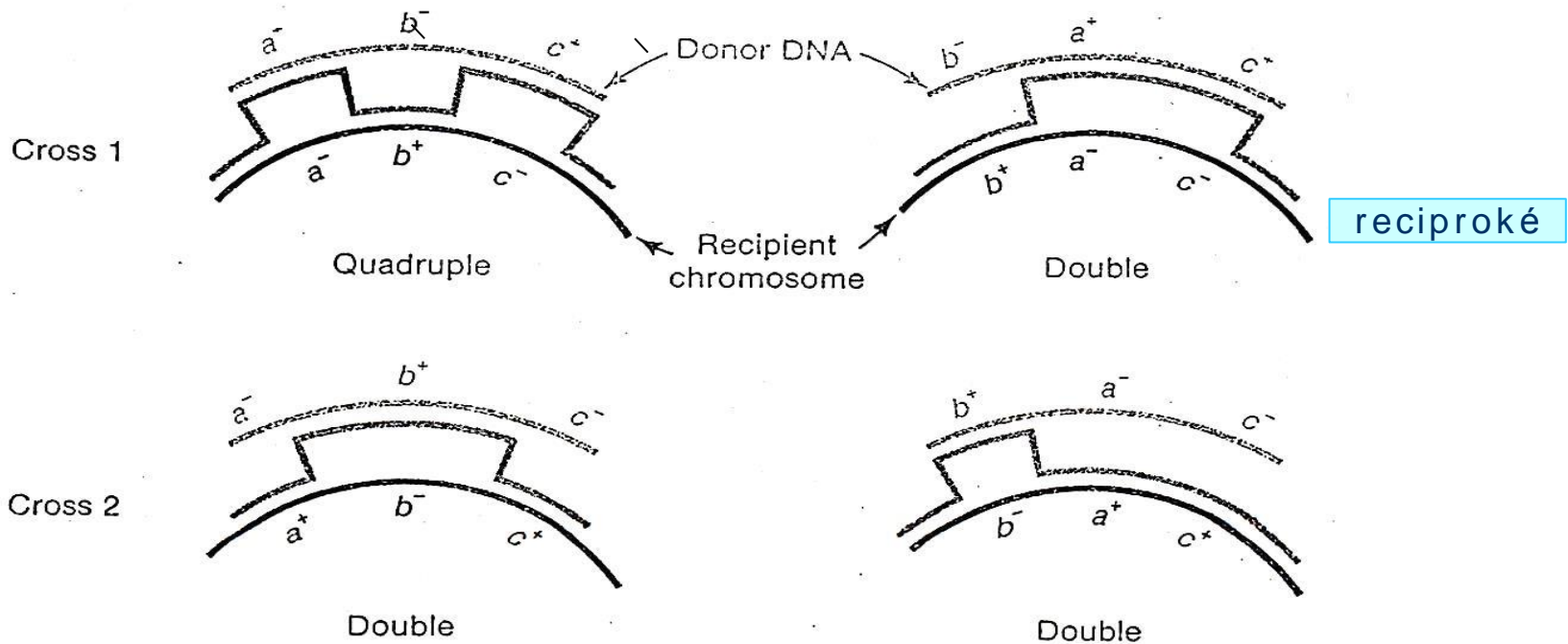
$$C = (1 - d/L)^3$$

C = frekvence kontrasdukce

d = vzdálenost markerů (min)

L = velikost transdukovaného fragmentu (min)

VYUŽITÍ RECIPROKÉHO KŘÍŽENÍ PRO STANOVENÍ POŘADÍ GENŮ A, B, C



Selection for $a^+b^+c^+$ in all crosses

Expected results: $(a^+b^+c^+)_1 \ll (a^+b^+c^+)_2$

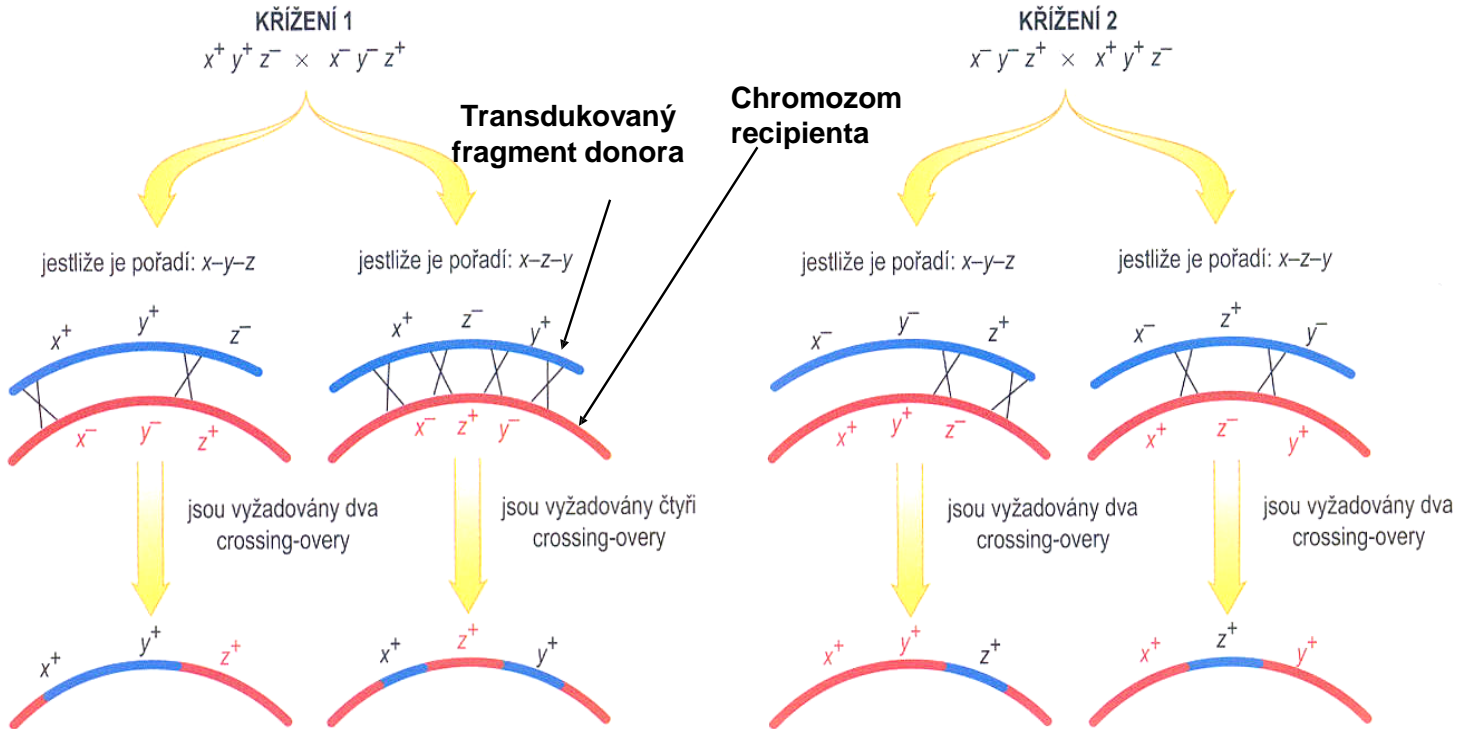
$(a^+b^+c^+)_1 \approx (a^+b^+c^+)_2$

Frekvence kontransdukcce

$a-b = 90\%$, $a-c = 33\%$, $b-c = 32\%$ (pořadí může být $a-b-c$ nebo $b-a-c$)

Jelikož frekvence $a^+b^+c^+$ je v křížení 1 mnohem nižší než v křížení 2, musí být pořadí $a-b-c$ ($P4 \times CO \ll P2 \times CO$)

Mapování genů bakterií pomocí transdukcce: stanovení pořadí těsně vázaných genů třibodovým křížením s využitím parciálních diploidů

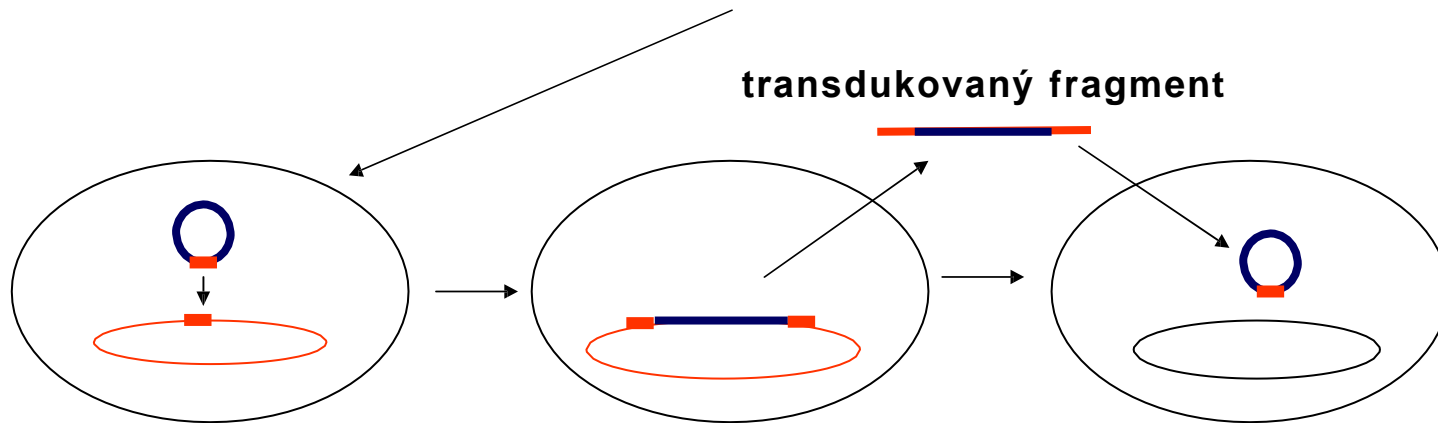


Jestliže je pořadí $x-y-z$,
bude četnost rekombinantů
 $x^+ y^+ z^+$ zhruba stejná
při křížení 1 a 2.

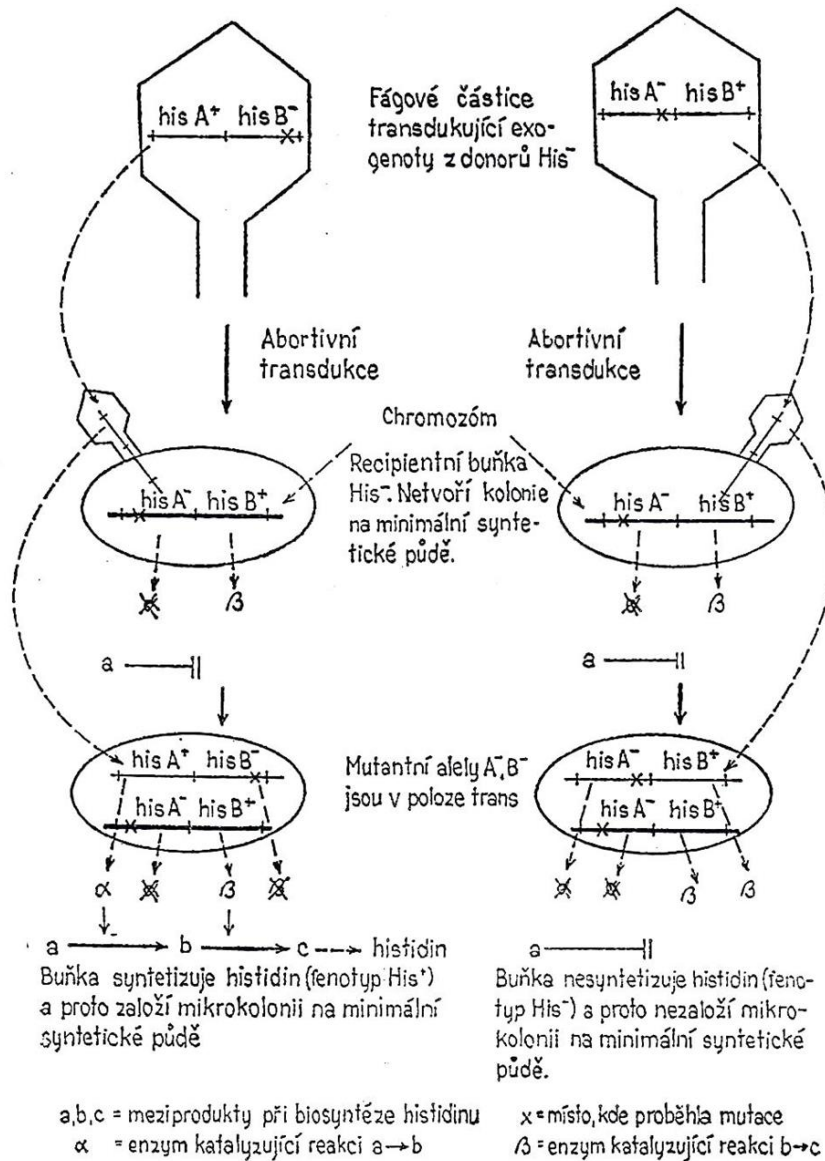
Jestliže je pořadí $x-z-y$,
bude četnost rekombinantů
 $x^+ y^+ z^+$ při křížení 1
mnohem nižší než při křížení 2.

TRANSDUKCE PLAZMIDŮ

- **transdukce plazmidů větších než je genom fága:**
„transduction shortening“ - zachování počátku replikace + deletovaná část plazmidu
- **transdukce plazmidů menších než je genom fága:**
zabalování části konkatemerů (replikačních intermediátů - multimerů)
- **transdukce vektorů odvozených z plazmidů:**
interakce s homologními geny na chromozomu donora, v recipientní buňce cirkularizace



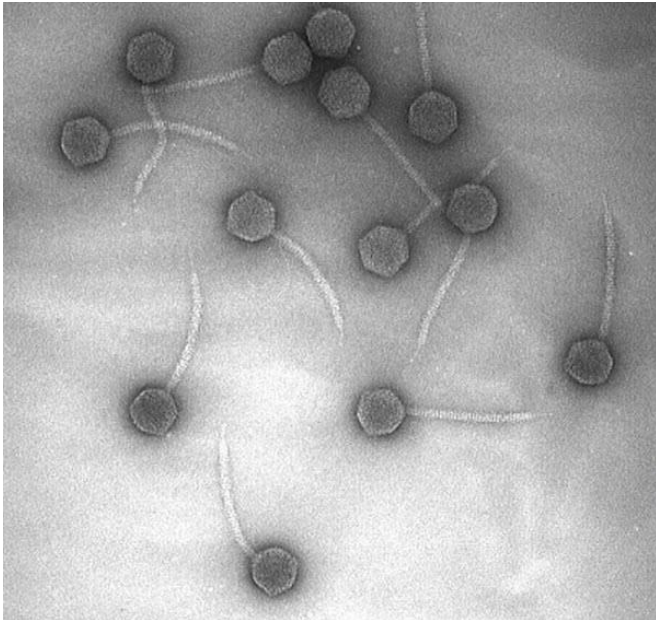
TEST INTERGENOVÉ KOMPLEMENTACE (CIS-TRANS TEST) REALIZOVANÝ ABORTIVNÍ TRANSDUKČÍ



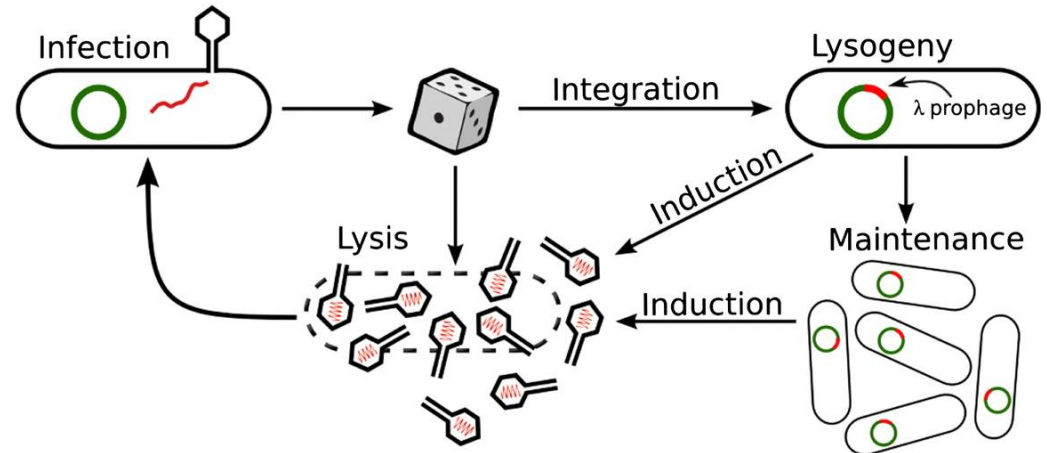
SPECIFICKÁ TRANSDUKCE

Specifická (specializovaná) transdukcce je založena na indukci integrovaného profága. Transdukována může být jen specifická a omezená oblast bakteriálního chromozomu, která přiléhá k inzerčnímu místu profága.

Modelovým systémem je transdukcce zprostředkovaná fágem lambda u *E. coli*.



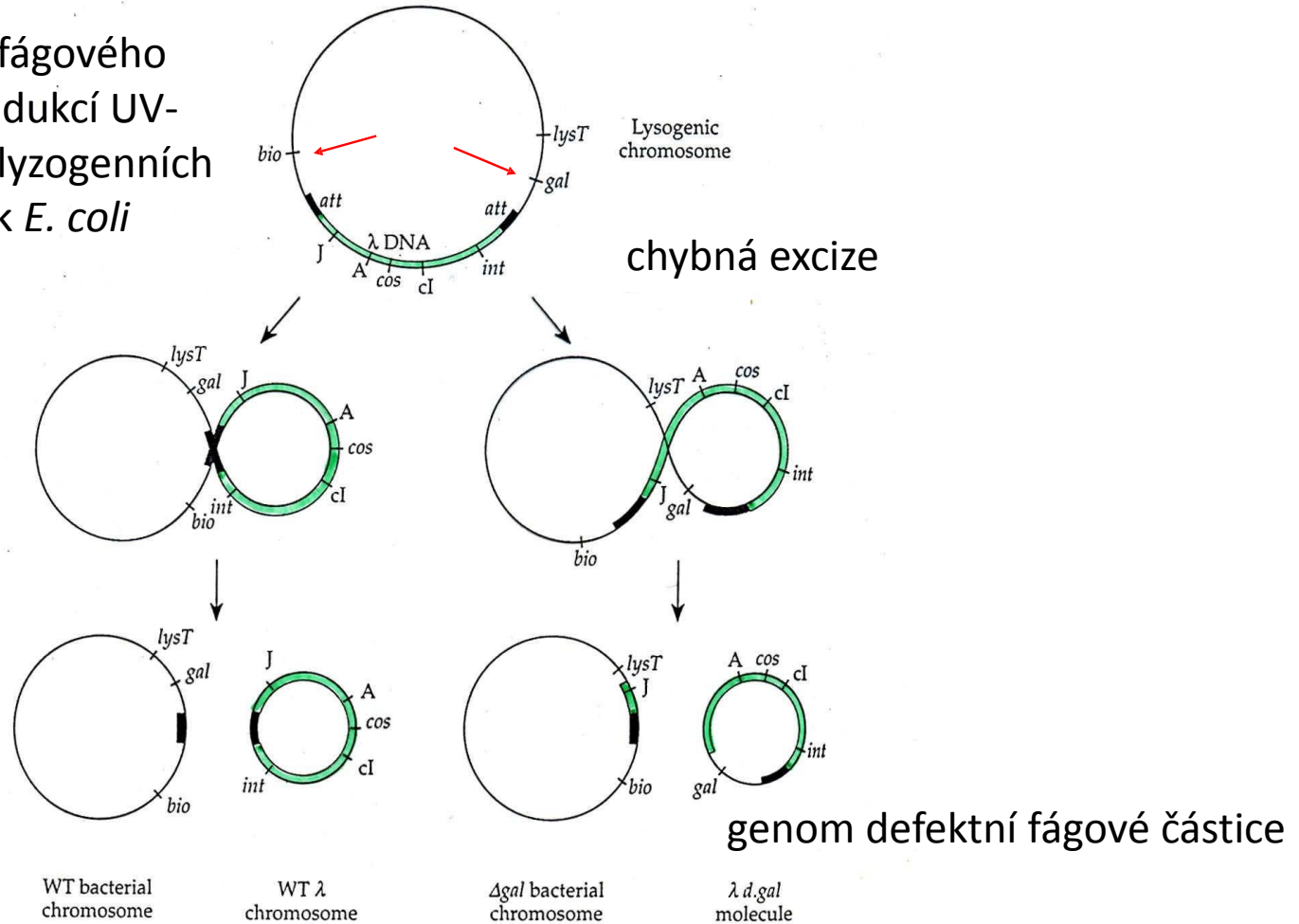
Life cycle of phage λ



VZNIK TRANSDUKUJÍCÍCH ČÁSTIC FÁGA λ PŘI SPECIFICKÉ TRANSDUKCI

Frekvence vzniku transdukujících částic = 10^{-6} (na jeden virion lambda)

Získání fágového lyzátu indukci UV-světlem z lyzogenních buněk *E. coli*

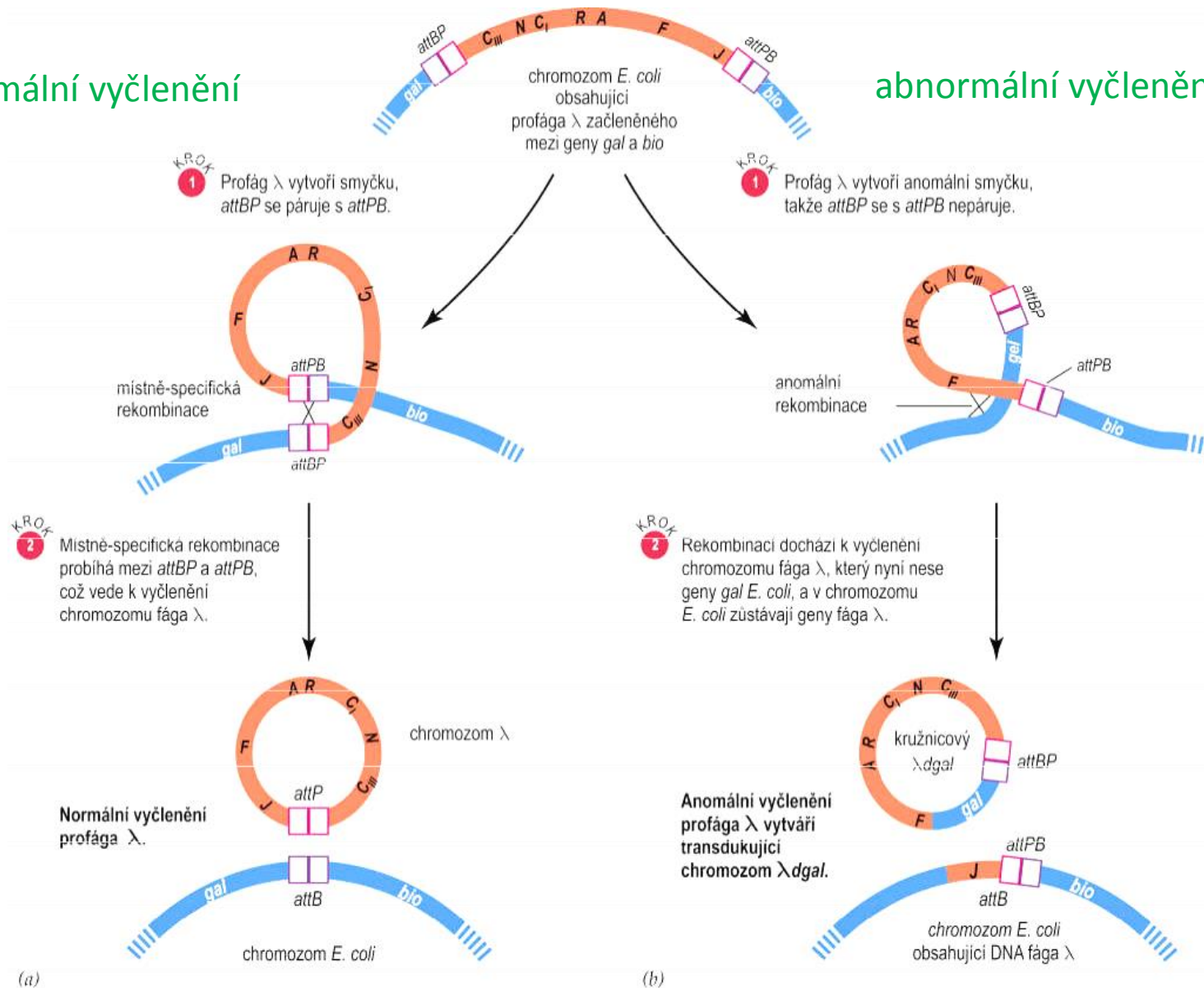


Min.požadavek Ld gal: *cos* + ori Lpgal

MOŽNÉ ZPŮSOBY VYČLENĚNÍ PROFÁGA LAMBDA

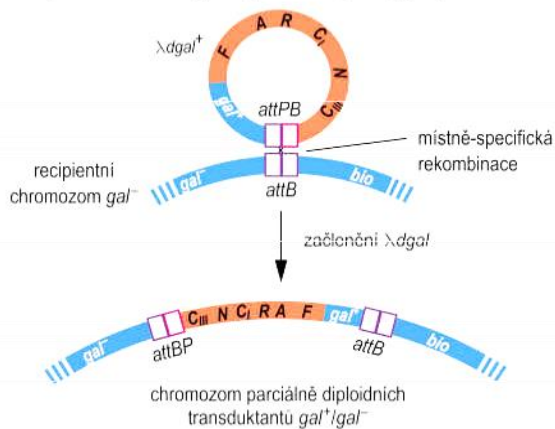
normální vyčlenění

abnormální vyčlenění



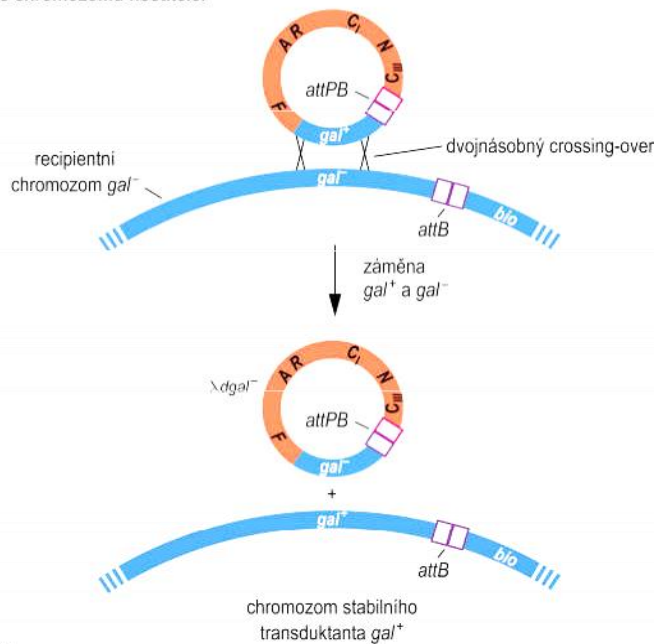
Rekombinace v recipientních buňkách gal- infikovaných transdukujícím fágem λ dgal+

Začlenění λ dgal⁺ v místě attB vytváří parciální diploidy gal⁺/gal⁻.



(a)

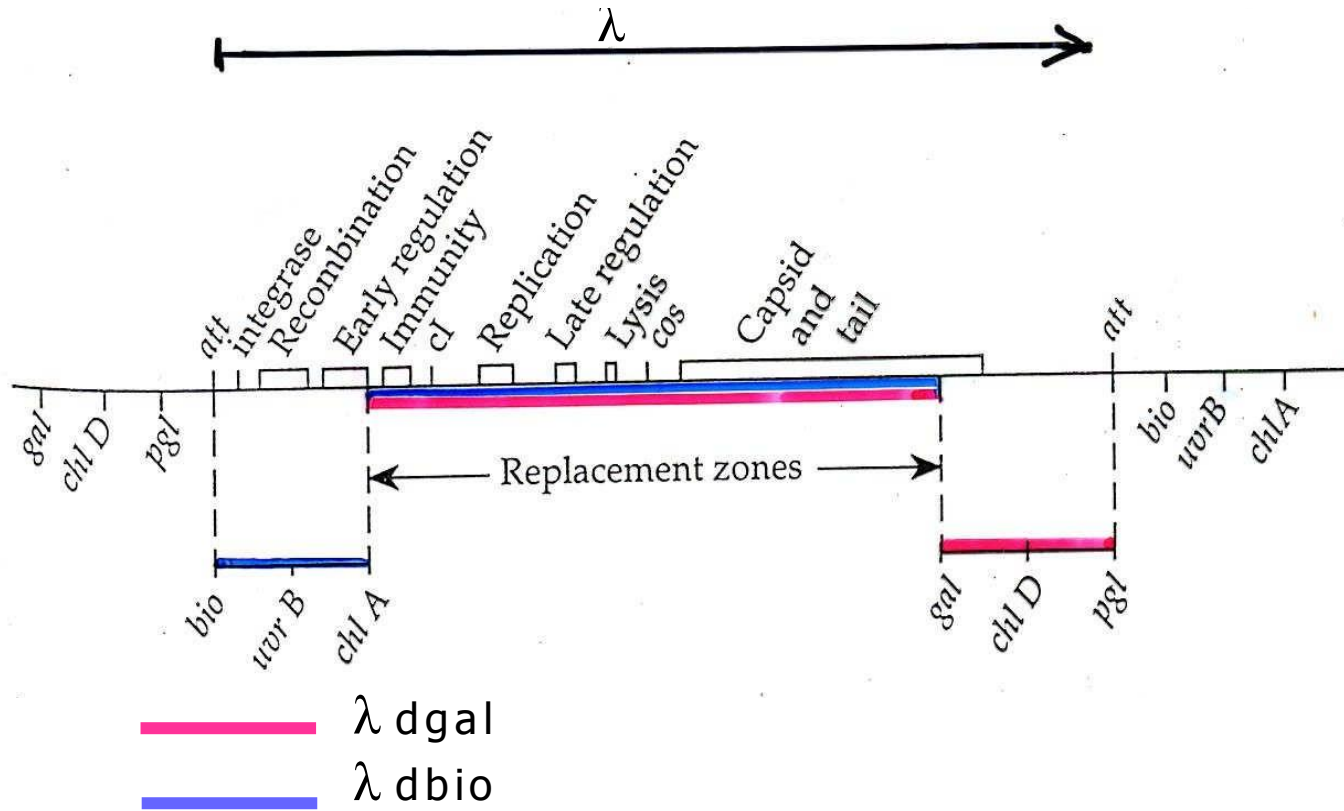
Dvojnásobný crossing-over vede k začlenění alely gal⁺ fága λ dgal⁺ do chromozomu hostitele.



(b)

GENOM TRANSDUKUJÍCÍ FÁGŮ

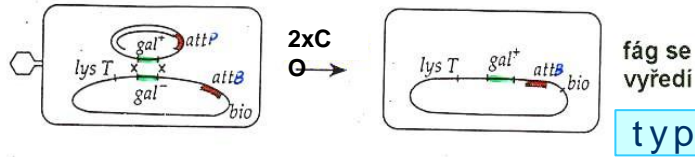
λ dgal a λ dbio



Po delecí *att* na bakteriálním chromozomu mohou být využita sekundární místa *att* - pak dochází k transdukci jiných oblastí chromozomu.

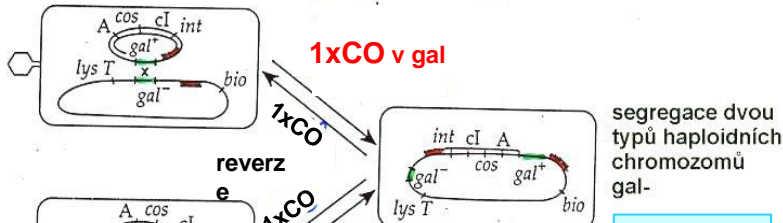
Různé rekombinační události při specifické transdukcii

(a) homologní rekombinace

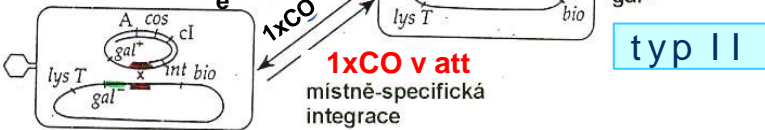


typ I

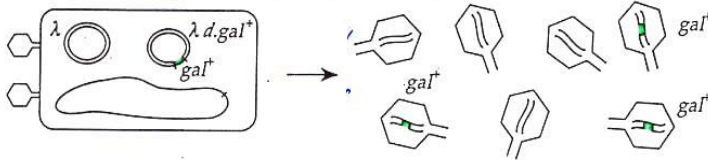
(b) reverzní rekombinace v merodiploidní rekombinantě



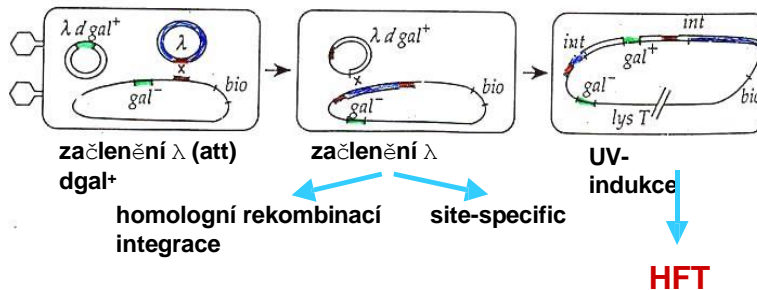
(c)



(d) vytvoření lytického lyzátu HFT (při vysoké MOI)



(e) vytvoření dvojnásobně lyzogenního merodiploida



Nízká
multiplicita
infekce

Vysoká
multiplicita
infekce

Infekce nelyzogenních buněk fágem dgal+
 Asi 0,001% buněk získá gal+

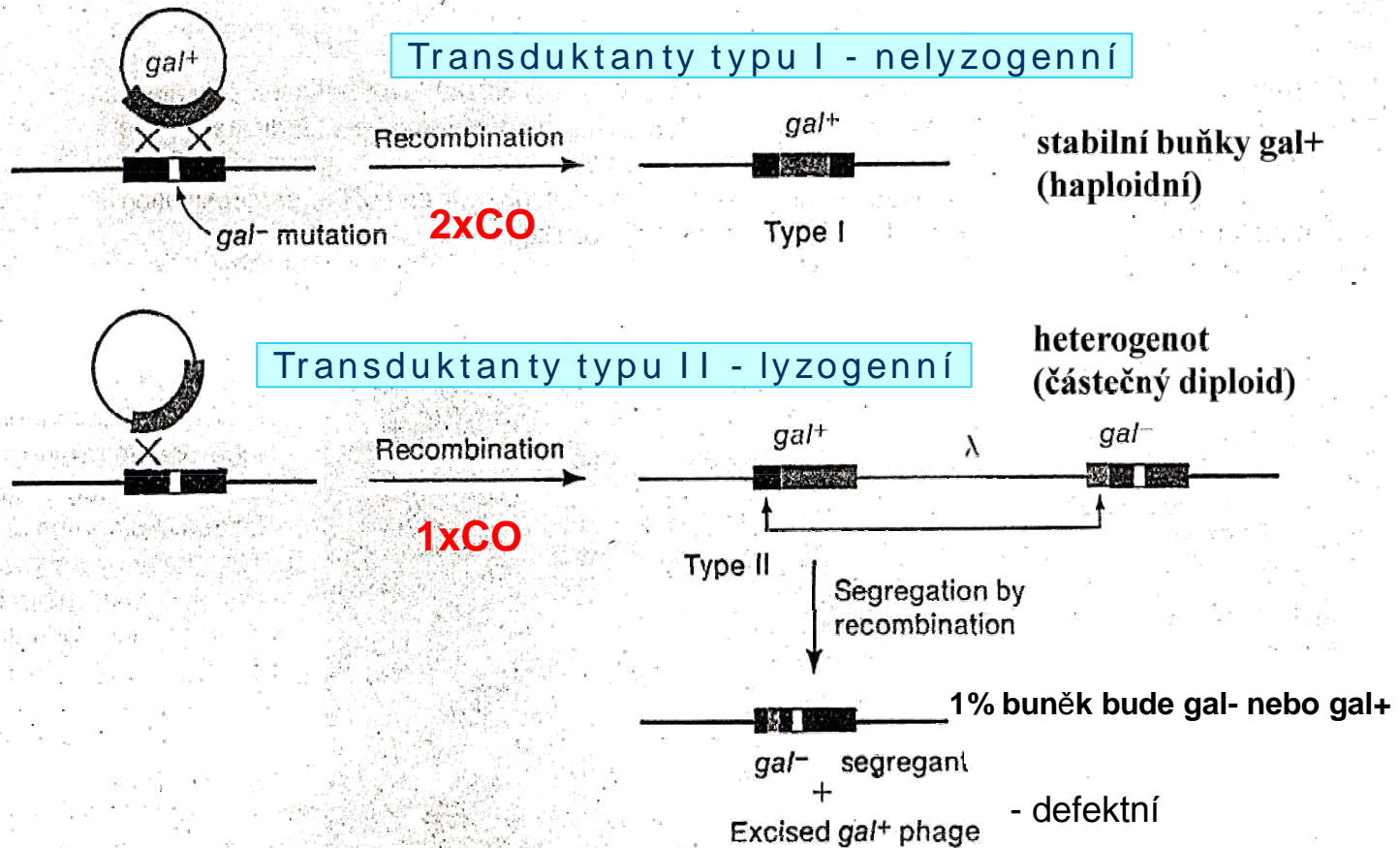
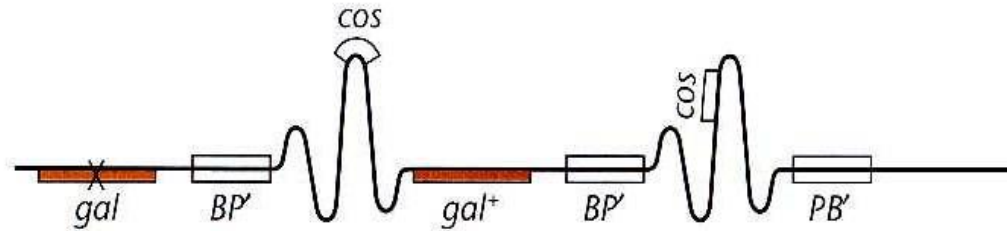


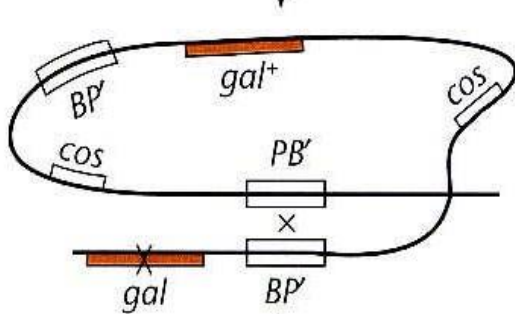
Figure 18-9. Production of type I and type II λgal transductants and segregation of *gal*⁻ cells from a type II cell.

VZNIK LYZÁTŮ TRANSDUKUJÍCÍCH S VYSOKOU FREKVENCÍ (LYZÁT HFT)

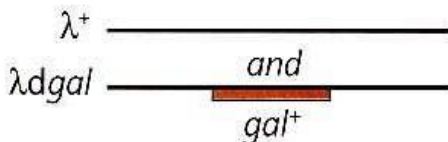


Dvojnásobně
lyzogenní kmen
($\lambda + \lambda$ dgal)

Indukce UV světlem



Excize a zabalení fágových
genomů



Lyzát HFT (50% částic je
transdukujících)

VYUŽITÍ TRANSDUKCE

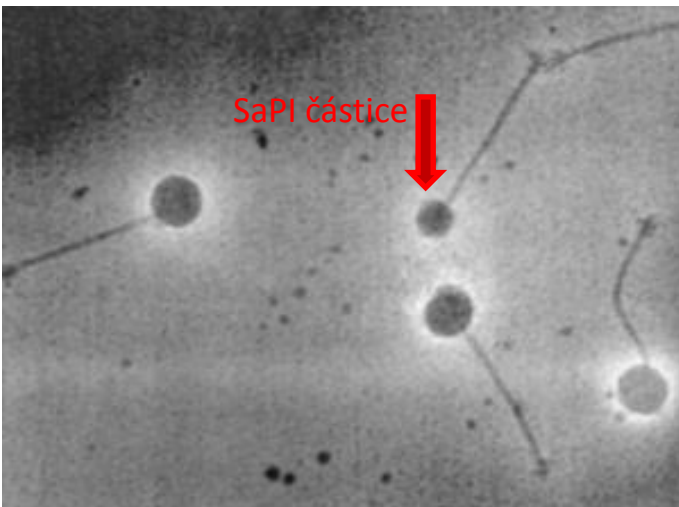
- Analýza specifických oblastí bakteriálního genomu (gal operon)
- Mapování genů
- Charakterizace transpozonů – heteroduplexní analýza
- Analýza fágových genomů při konstrukci vektorů (odvozených z fága lambda)
- HGT: Objasnění evoluce bakteriálních genomů

- DNA ve fágové částici je chráněna před působením nukleáz
- Řada fágů má široké rozmezí hostitelů (P1 – infikuje G- bakterie)
- Mohou být přenášeny plazmidy nebo transpozony s širokým rozmezím hostitelů, chromozomové geny jen v případě homologie

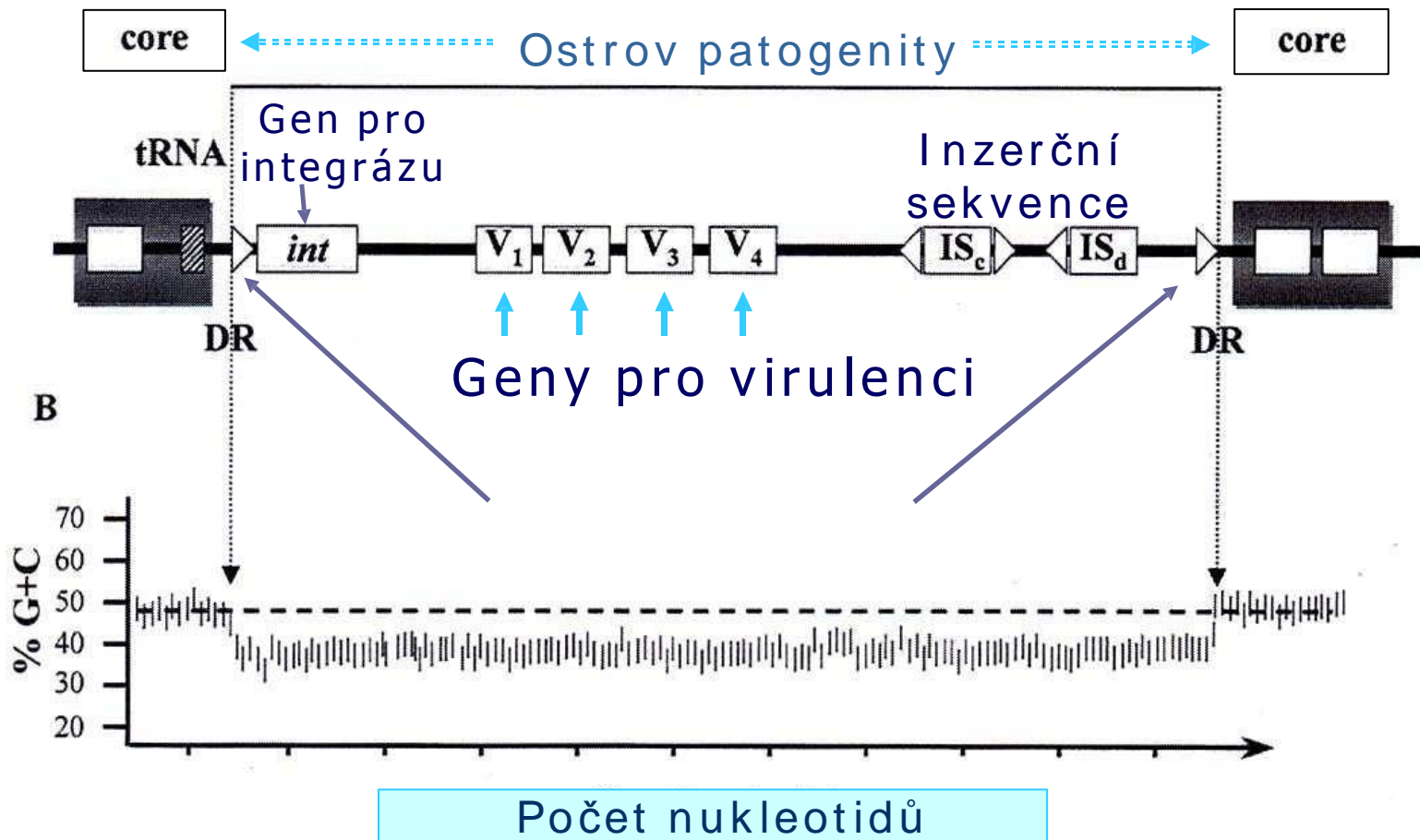
Přenos (transdukce) ostrovů patogenity u *S. aureus*

SaPI1: 15 kb ostrov patogenity u *S. aureus*, nesoucí gen *tst* zodpovědný za syndrom toxického šoku (TSST1) - (horečka, exantém, hypotenze, olupování kůže).

SaPI1 je mobilizován fágem 80 α . Když fág 80 α infikuje buňky *S. aureus* nesoucí SaPI1, vyčleňuje se ostrov z chromozomu a replikuje se pomocí proteinů fágového replikačního aparátu. Geny ostrova způsobí, že fág 80 α vytváří menší hlavy, které pak zabalují přednostně DNA ostrovů spíše než vlastní fágovou DNA. Když vytvořený „pseudofág“ infikuje další buňku, je DNA ostrova injikována do buňky, kde se začleňuje do chromozomu pomocí svého vlastního *Int* proteinu.



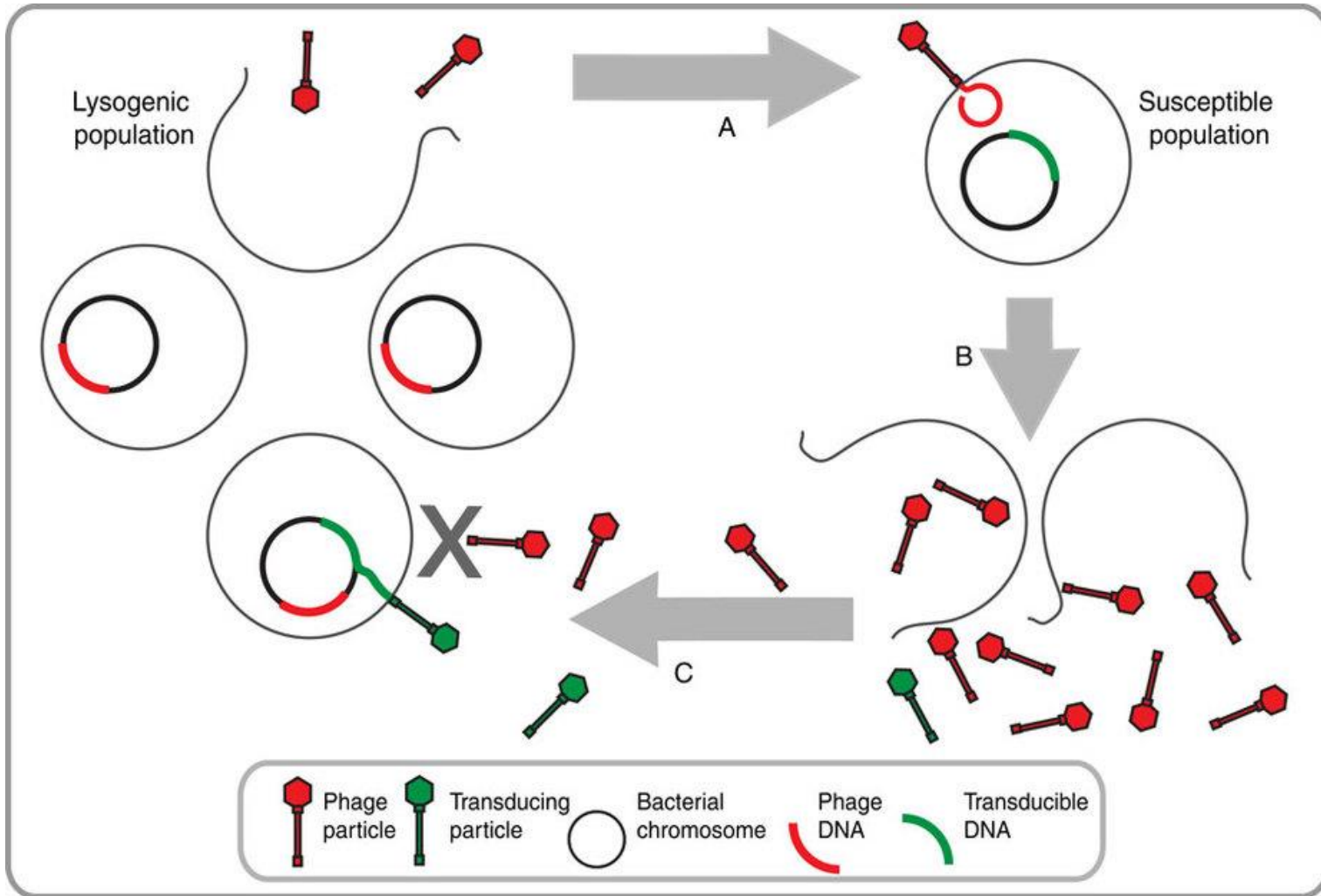
OBEČNÁ STRUKTURA OSTROVŮ PATOGENITY



VÝZNAČNÉ RYSY OSTROVŮ PATOGENITY

- Nesou **jeden** nebo **několik genů** pro virulenci
- Jsou přítomny **jen u patogenních kmenů** daného druhu
- Představují relativně **velké úseky genomu** (10 – 200 kb)
- Mají **odlišný obsah GC** a jiné využívání kodonů
- Jsou často umístěny **poblíž genů pro tRNA** (kotvy pro inzerci cizí DNA)
- Jsou často spojeny s **mobilními genetickými elementy**.
- Často jsou ohraničeny DR (16-130 bp) - rozpoznávací místa pro enzymy zajišťující integraci a excizi mobilních elementů (integráza nebo transponáza)
- Jsou často **nestabilní a jsou deletovány** s různými frekvencemi.
- Mají **mozaikovitou strukturu** – jsou složené z elementů, které se během evoluce v různé době a z různých zdrojů akumulovaly do určitých míst.

MODEL AUTOTRANSDUKCE



LYZOGENNÍ KONVERZE

Změna vlastností kmene po infekci fágem, který ve svém genomu nese geny zodpovědné za změnu fenotypu hostitele (faktory virulence nebo toxiny).

Příklady:

Fág lambda: *E. coli* – rezistence k séru, schopnost přežít v makrofágách

Fág ϕ 361 (příbuzný fágu lambda): *E. coli* – Shiga toxin

Fág β : *Corynebacterium diphtheriae* – difterický toxin (záškrt)

Fág CTX ϕ : *Vibrio cholerae* – toxin cholery

Fágy u *S. aureus*: fibrinolysin, enterotoxin

Fágy beta-hemolytických streptokoků sk.A: erytrogenní toxiny

Fág u *Clostridium botulinum*: botulotoxin

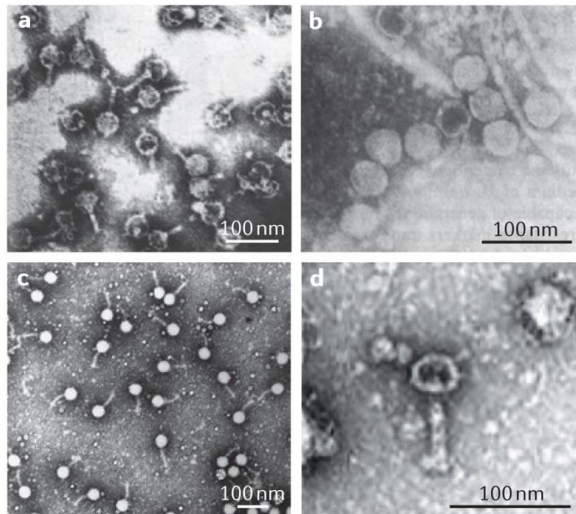
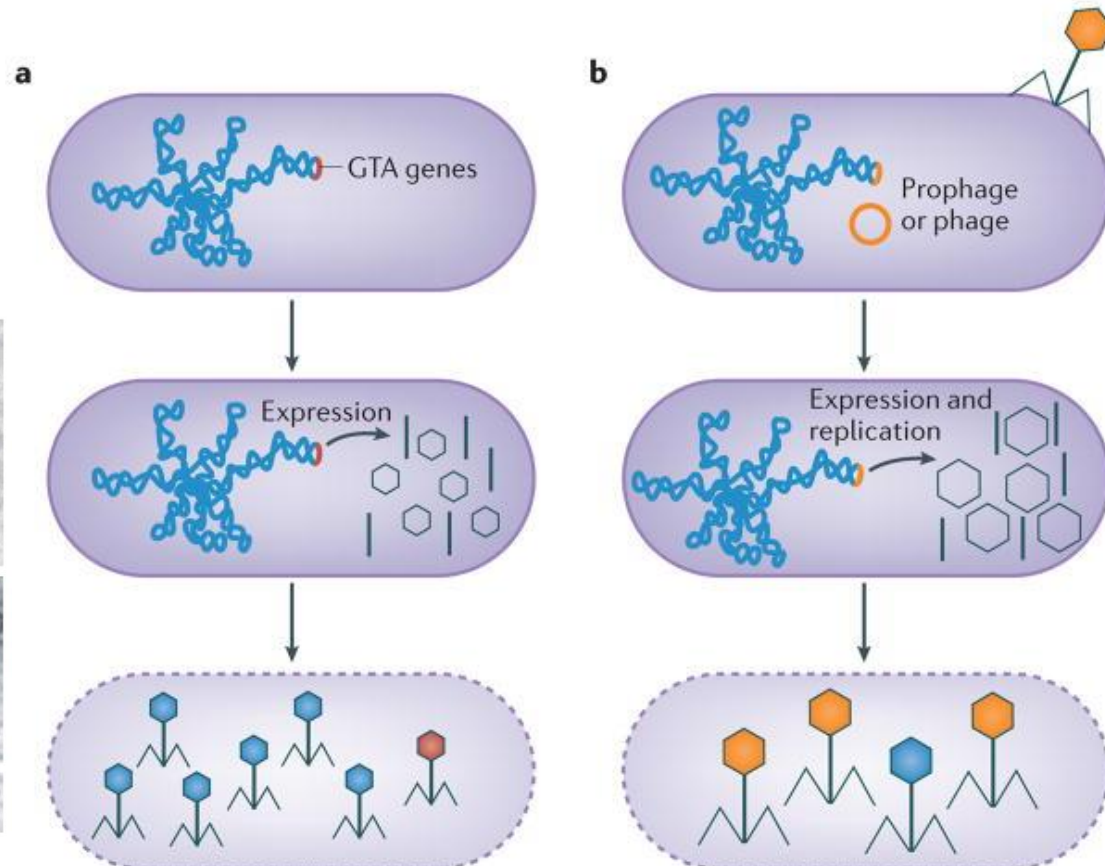
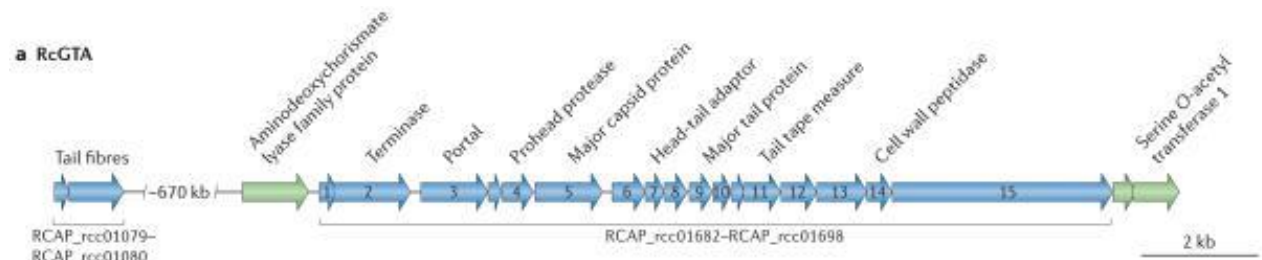
Fág u *Clostridium tetani*: tetanotoxin

Fág u *Salmonella*: změny somatických antigenů

Kapsdukce - *Rhodococcus capsulatus*

8 proteinů, průměr hlavy 30 nm, bičičk 30-50 nm. Nebyly identifikovány fágy příbuzné s GTA.

Rhodobacter capsulatus	
Domain:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Alphaproteobacteria
Order:	Rhodobacterales
Family:	Rhodobacteraceae
Genus:	Rhodobacter
Species:	<i>R. capsulatus</i>



PARAMETRY PŘENÁŠENÉ DNA KAPSDUKCÍ

- velikost přenášené DNA = 1,5-2 kb (až 5 kb)
- DNA je heterogenní, tj. je bakteriální
- přenos až 3-4 genů na jednu částici GTA
- 10^5 GTA/ml pro daný marker
- přenos všech chromozomových markerů
- frekvence rekombinant $10^{-4/-5}$ /marker/buňku
- frekvence „kotransferu“ genů $F = 1 - (d/L)^2$
- (d = vzdálenost markerů, L = délka přenášeného úseku DNA)

Přenos je regulován bakteriálními geny, které indukují expresi strukturních genů GTA během specifické růstové fáze buněk

Další GTA – *Silicibacter pomeroyi* aj. mořský bakterioplankton - počet genů kódujících kapsid, bičík, portál, zabalování DNA
= zhruba 15 genů podobných GTA u R.c.

Úloha GTA v evoluci mořských bakterií

Roseovarius nubinhibens, Reugeria mobilis

- GTA přenášejí geny mezi různými druhy mořských bakterií
- Frekvence přenosu genů = 6.7×10^{-3} až 4.7×10^{-1} jsou tisíckrát až milionkrát vyšší než frekvence přenosu transformací nebo transdukcí.
- Umělý přenos genů AntR v uzavřených nádobách s mořskou vodou – až 47% bakterií získalo tyto geny a integrovalo je do svého genomu
- Stejný způsob přenosu genů i mezi klinickými kmeny?

GTA = „promiscuous little bastards“