

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT

podzim 2016

TRANSFORMACE

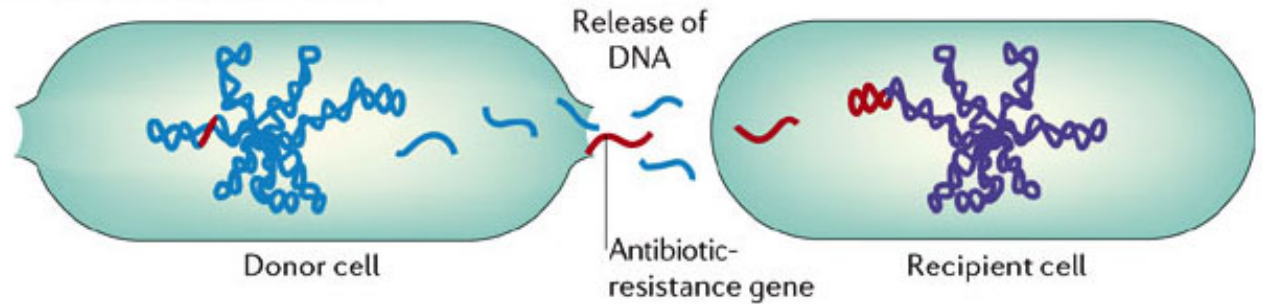
Ivana Mašlaňová

iva.maslanova@gmail.com

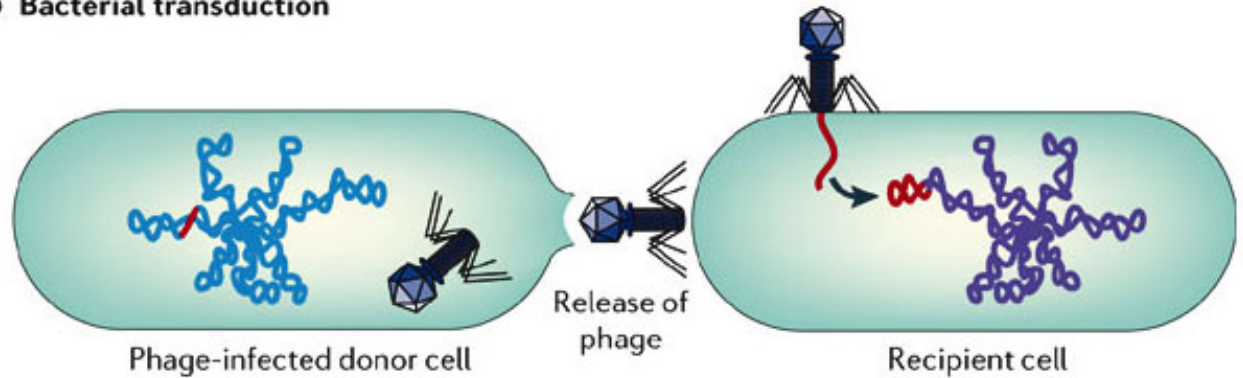
Horizontální přenos genů v populaci bakterií

- A. TRANSFORMACE
- B. TRANSDUKCE
- C. KONJUGACE

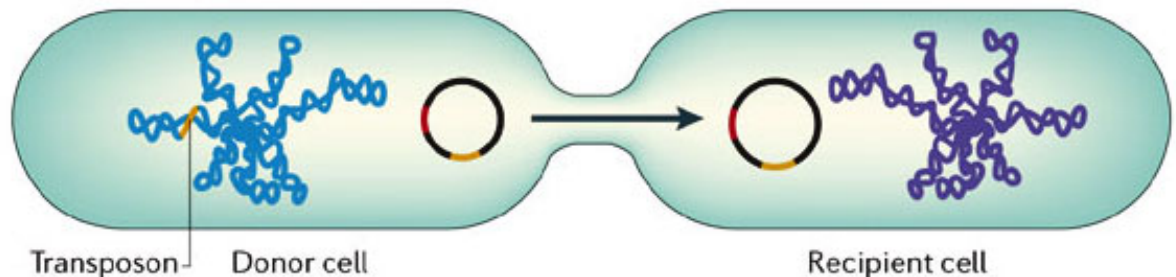
a Bacterial transformation



b Bacterial transduction



c Bacterial conjugation



TRANSFORMACE = PŘÍJEM EXOGENNÍ DNA BAKTERIÁLNÍ BUŇKOU

1928: Griffith - *Streptococcus pneumoniae*

Změny virulence nevirulentního kmene po přidání usmrcených buněk virulentního kmene.

Avirulentní R typ

– netvoří kapsuly

Virulentní S typ –

tvoří kapsuly

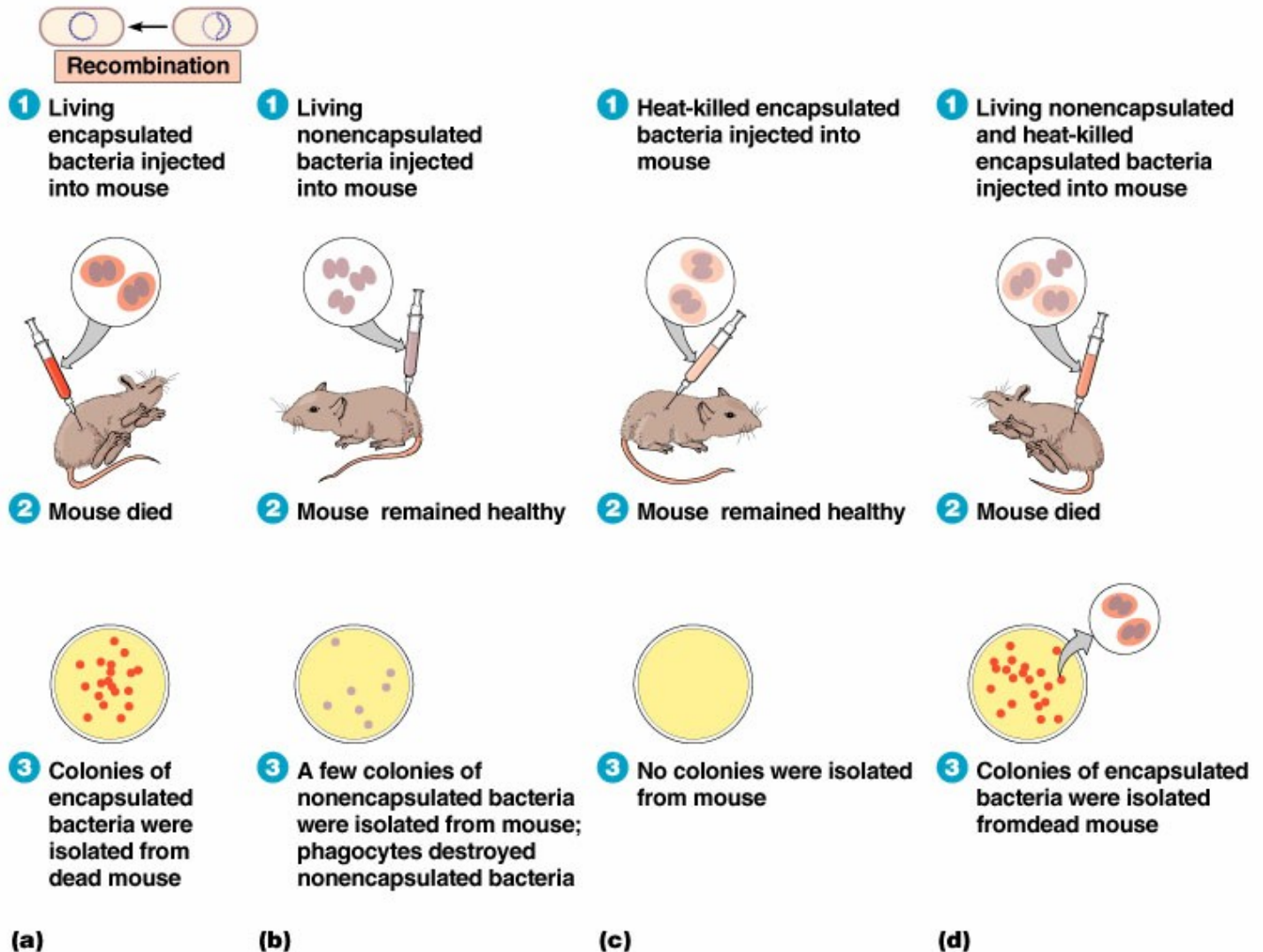
Jednosměrný

přenos

virulentního

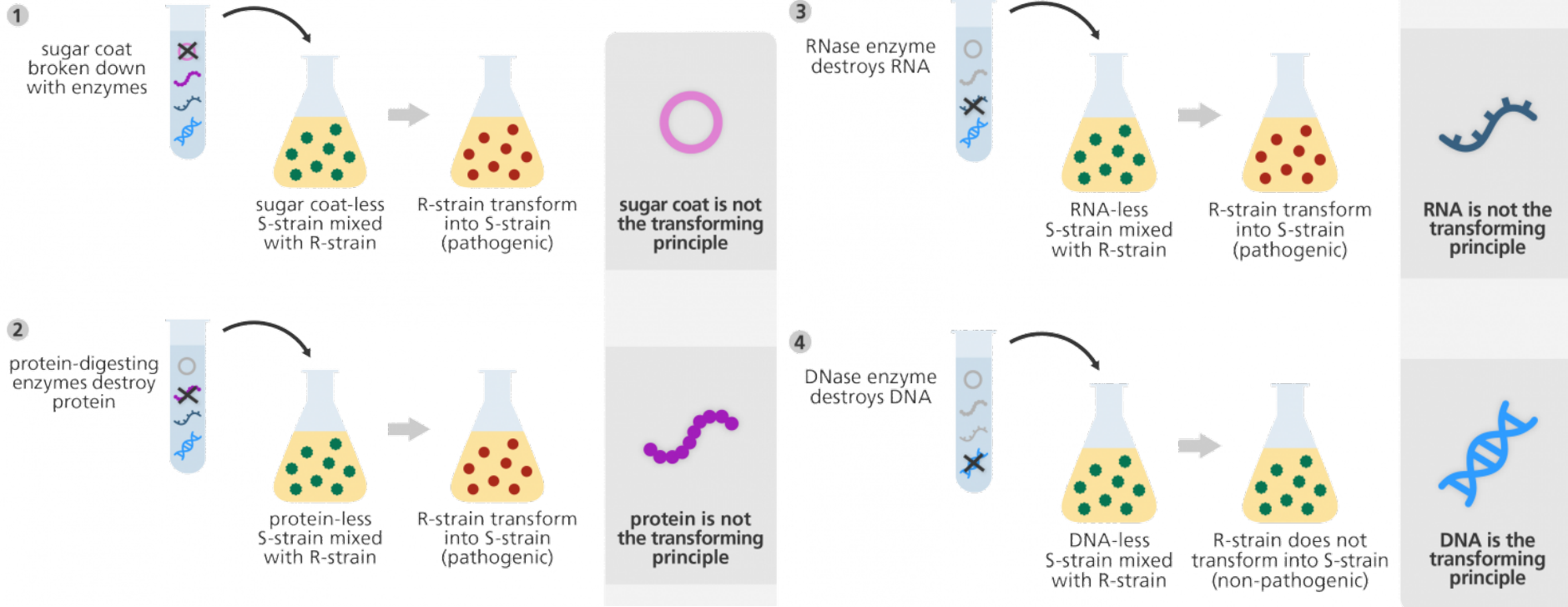
faktoru z S na R

buňky.



1944: Avery, MacLeod, McCarty

Důkaz transformující aktivity DNA *Streptococcus pneumoniae*.



Terminologie

Transformace

- u bakterií: příjem cizorodé exogenní DNA, změna vlastností
- u eukaryot: nádorová transformace

Transfekce

- u bakterií: příjem volné fágové DNA
- u eukaryot: příjem volné DNA, buněčné nebo virové

HGT transformací – jak vnitrodruhová, tak mezidruhová (determinanty rezistence *Neisserie*); tvorba hybridních genů (mozaiky – homologní rekombinace)

Úspěšnost transformace – ovlivněna aktivitou **a. mismatch-reparačních systémů, b. restriktivně-modifikačními systémy, c. přítomností rozpoznávacích sekvencí** na DNA; geny kódující tyto systémy = **speciační geny** (podíl na vzniku nových druhů)



Jak odlišíte transformaci od konjugace nebo transdukce?

TABLE 1. Transformable Organisms^a

Genera/species	Natural competence	Artificial competence
<i>Achromobacter</i>	+	N.D.
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	N.D.
<i>Anacyclis nidulans</i>	+	N.D.
<i>Bacillus</i>		
<i>subtilis</i>	+	+
<i>subtilis</i> L-form	-	+
<i>stearothermophilus</i>	+	+
<i>thuringiensis</i>	-	+
Various species	-	+
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	-	+
<i>Clostridium</i>	+	N.D.
<i>Deinococcus radiodurans</i>	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Haemophilus</i>		
<i>influenzae</i>	+	+
<i>parainfluenzae</i>	+	+
Various species	+	N.D.
<i>Magnaporthe grisea</i>	-	+
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	+	N.D.
<i>Methylobacterium organophilum</i>	+	N.D.
<i>Moraxella</i>		
<i>osloensis</i>	+	N.D.
<i>urethalis</i>	+	N.D.
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	?	+
<i>Mycoplasma</i>	-	+
<i>Neisseria</i>		
<i>gonorrhoeae</i>	+	N.D.
<i>meningitidis</i>	+	N.D.
<i>Pseudomonas</i>		
<i>aeruginosa</i>	-	+
<i>stutzeri</i>	+	?
Marine species	+	N.D.
<i>Rhizobium meliloti</i>	-	+
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	N.D.
<i>Streptococcus</i>		
<i>faecalis</i>	?	+
<i>pneumoniae</i>	+	N.D.
<i>sanguis</i>	+	N.D.
<i>Streptomyces</i>	-	+
<i>Synechococcus</i>	+	N.D.

Přirozená transformace ×
umělá transformace

Rozdíl ve schopnosti přirozeně
navodit stav kompetence.

U přirozené transformace rozdíly v
příjmu chromozomové a plasmidové
DNA.

Přirozená transformace - příklady

TABLE 1 Bacteria active in gene transfer by transformation^a

Species isolated from terrestrial or aquatic habitats	Tf ^b	Phylum based on 16S phylogeny ^c
Protolithotrophic		
<i>Chlorobium limicola</i>	1.0×10^{-5}	Chlorobi
<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	4.3×10^{-4}	Cyanobacteria
<i>Anacystis nidulans</i>	8.0×10^{-4}	Cyanobacteria
<i>Nostoc muscorum</i>	1.2×10^{-3}	Cyanobacteria
<i>Synechocystis</i> sp. strain 6803	5.0×10^{-4}	Cyanobacteria
Chemolithotrophic		
<i>Thiobacillus thioparus</i>	$10^{-7} \times 10^{-2}$	Proteobacteria
Heterotrophic		
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	$10^{-7} \times 10^{-6}$	Actinobacteria
<i>Achromobacter</i> spp.	+ ^d	Proteobacteria
<i>Azotobacter vinelandii</i>	9.5×10^{-2}	Proteobacteria
<i>Bacillus subtilis</i>	3.5×10^{-2}	Proteobacteria
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	7.0×10^{-5}	Proteobacteria
<i>Deinococcus radiodurans</i>	2.1×10^{-2}	Deinococcus-Thermus
<i>Thermus aquaticus</i>	6.4×10^{-4}	Deinococcus-Thermus
Methylotrophic		
<i>Methylobacterium organophilum</i>	5.3×10^{-3}	Proteobacteria
Archaeobacteria		
<i>Methanococcus voltae</i>	8.0×10^{-6}	Euryarchaeota
Clinical isolates of pathogenic species		
<i>Campylobacter jejuni</i>	2.0×10^{-4}	Proteobacteria
<i>Haemophilus influenzae</i>	7.0×10^{-3}	Proteobacteria
<i>Helicobacter pylori</i>	5.0×10^{-4}	Proteobacteria
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.0×10^{-4}	Proteobacteria
<i>Neisseria meningitidis</i>	1.1×10^{-2}	Proteobacteria
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.5×10^{-6}	Firmicutes
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.9×10^{-2}	Firmicutes
<i>Streptococcus sanguis</i>	2.0×10^{-2}	Firmicutes
<i>Streptococcus mutans</i>	7.0×10^{-4}	Firmicutes

^aModified from Day (2002).

^bTf, transformation frequency (chromosomal marker transformants/viable cell).

^cBergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed.

^dTransfer recorded but no frequency reported.

Table 1

Naturally competent prokaryotes

Phylum	Species
Euryarchaeota	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> <i>Methanococcus voltae</i>
Deinococcus-Thermus	<i>Deinococcus radiodurans</i> ^a <i>Thermus aquaticus</i> <i>Thermus caldophilus</i> <i>Thermus flavus</i> <i>Thermus thermophilus</i>
Cyanobacteria	<i>Nostoc muscorum</i> <i>Synechococcus elongatus</i> ^b <i>Synechocystis</i> spp. ^c <i>Thermosynechococcus elongatus</i>
Chlorobi	<i>Chlorobium limicola</i> <i>Chlorobium tepidum</i>
Proteobacteria	Alpha <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Methylobacterium organophilum</i>

Přirozená transformace - příklady

Beta *Achromobacter* spp.
Eikenella corrodens
Kingella denitrificans
Kingella kingae
Neisseria gonorrhoeae
Neisseria meningitidis
Ralstonia solanacearum
Thiobacillus thioparus
Thiobacillus sp. strain Y

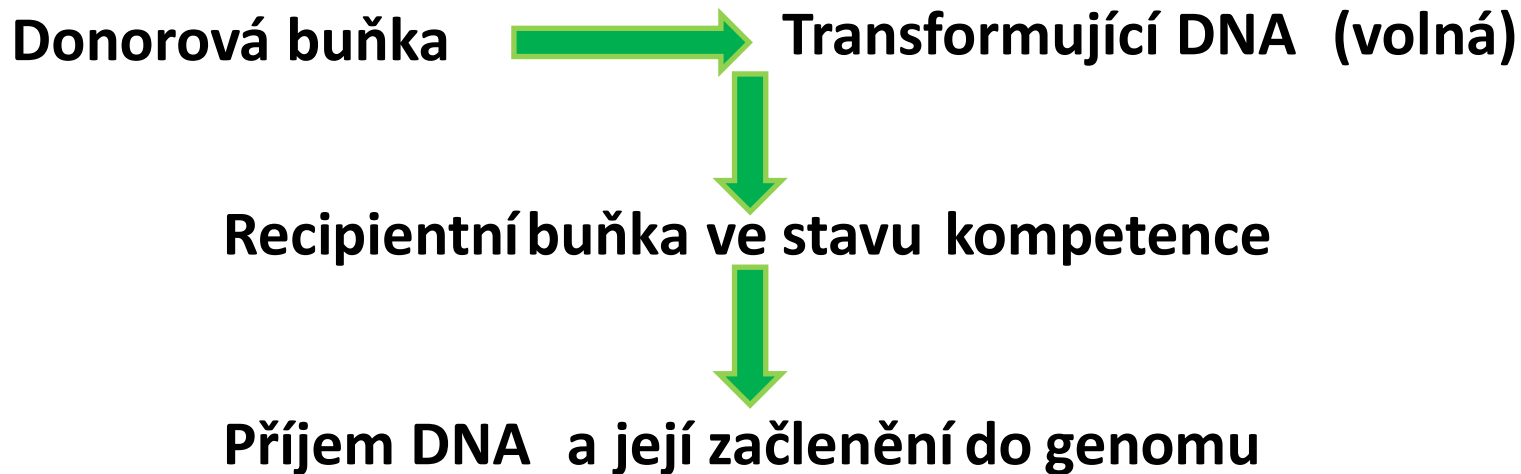
Gamma *Acinetobacter baylyi*
Acinetobacter calcoaceticus
Actinobacillus
actinomycetemcomitans
Actinobacillus
pleuropneumoniae
Aggregatibacter aphrophilus^e
Azotobacter vinelandii
Cardiobacterium hominis
Haemophilus influenzae
Haemophilus parainfluenzae
Haemophilus parasuis
Legionella pneumophila
Moraxella spp.
Pseudomonas fluorescens
Pseudomonas stutzeri and
related species
Pseudomonas spp.^f
Vibrio cholerae
Vibrio parahaemolyticus
Vibrio spp.

Přirozená transformace - příklady

Epsilon

- Campylobacter coli*
- Campylobacter jejuni*
- Helicobacter pylori*
- Bacillus amyloliquefaciens*
- Bacillus licheniformis*
- Bacillus subtilis*
- Lactobacillus lactis*
- Leuconostoc carnosum*
- Streptococcus pneumoniae*
- Streptococcus mitis*
- Streptococcus oralis*
- Streptococcus crista*
- Streptococcus infantis*
- Streptococcus gordonii*
- Streptococcus sanguinis*^g
- Streptococcus anginosus*
- Streptococcus intermedius*
- Streptococcus constellatus*
- Streptococcus thermophilus*^h

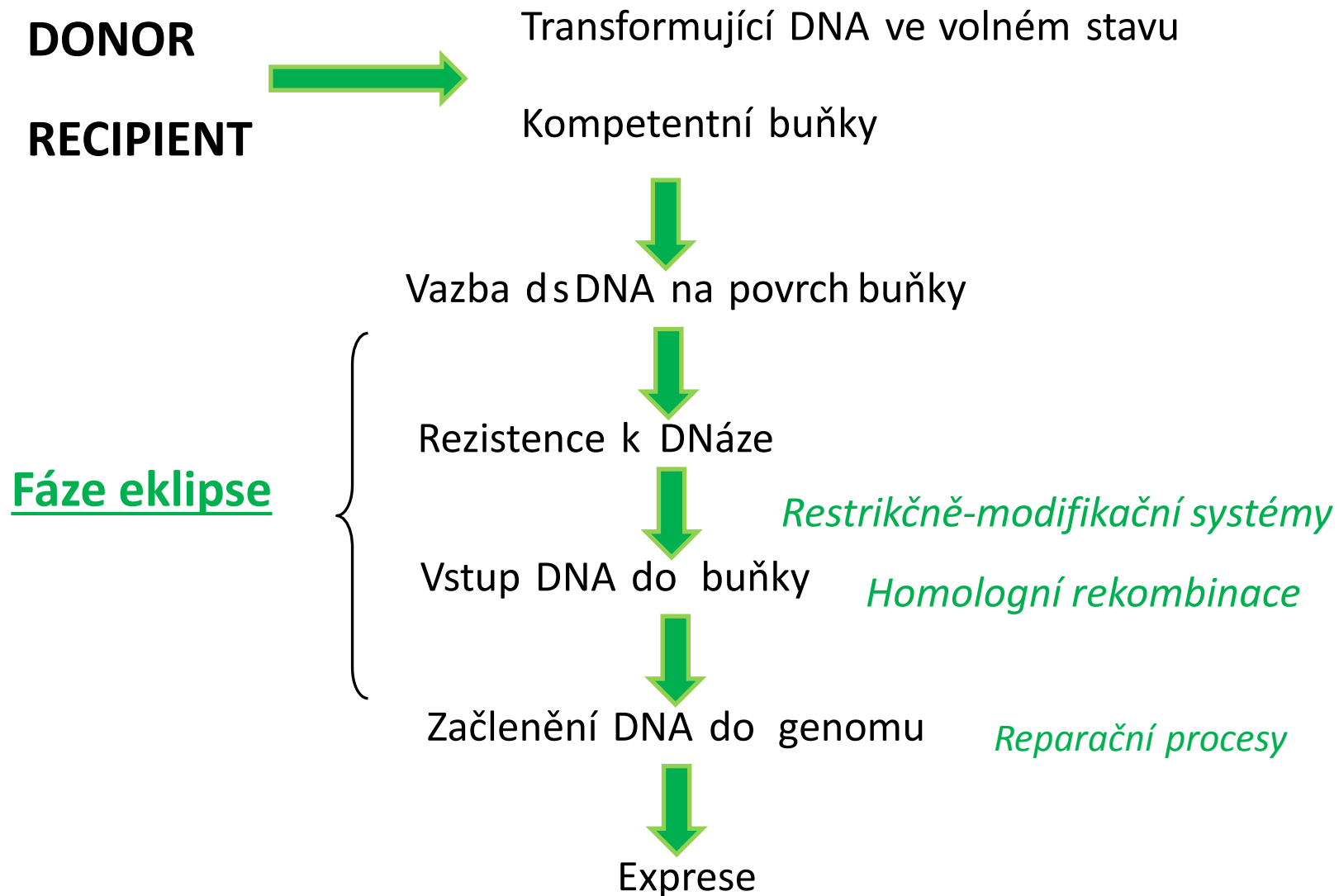
Obecné rysy přirozené transformace



1. Vazba dsDNA na povrch recipientní buňky
2. Pohyb DNA přes buněčnou stěnu a membránu
3. Degradace jednoho řetězce DNA
4. Translokace druhého řetězce DNA do cytoplasmy
5. Stabilní začlenění jednořetězcového úseku do chromozomu **homologní rekombinací (RecA+)**.

Přenos DNA transformací je citlivý k nukleázám.

Základní kroky při transformaci



Charakteristika transformující DNA

DNA: chromozomová, plazmidová, fágová (transfekce)

- **velikost:** 0,5 kb až několik desítek kbp (zhruba 5-10 genů)
- **dsDNA**, nativní stav
- konc. 1-10 mg DNA/ml kompetentních buněk
- ze 100-200 molekul DNA se inkorporuje jen jedna
- u plazmidové a fágové DNA je nutných 10 000 molekul

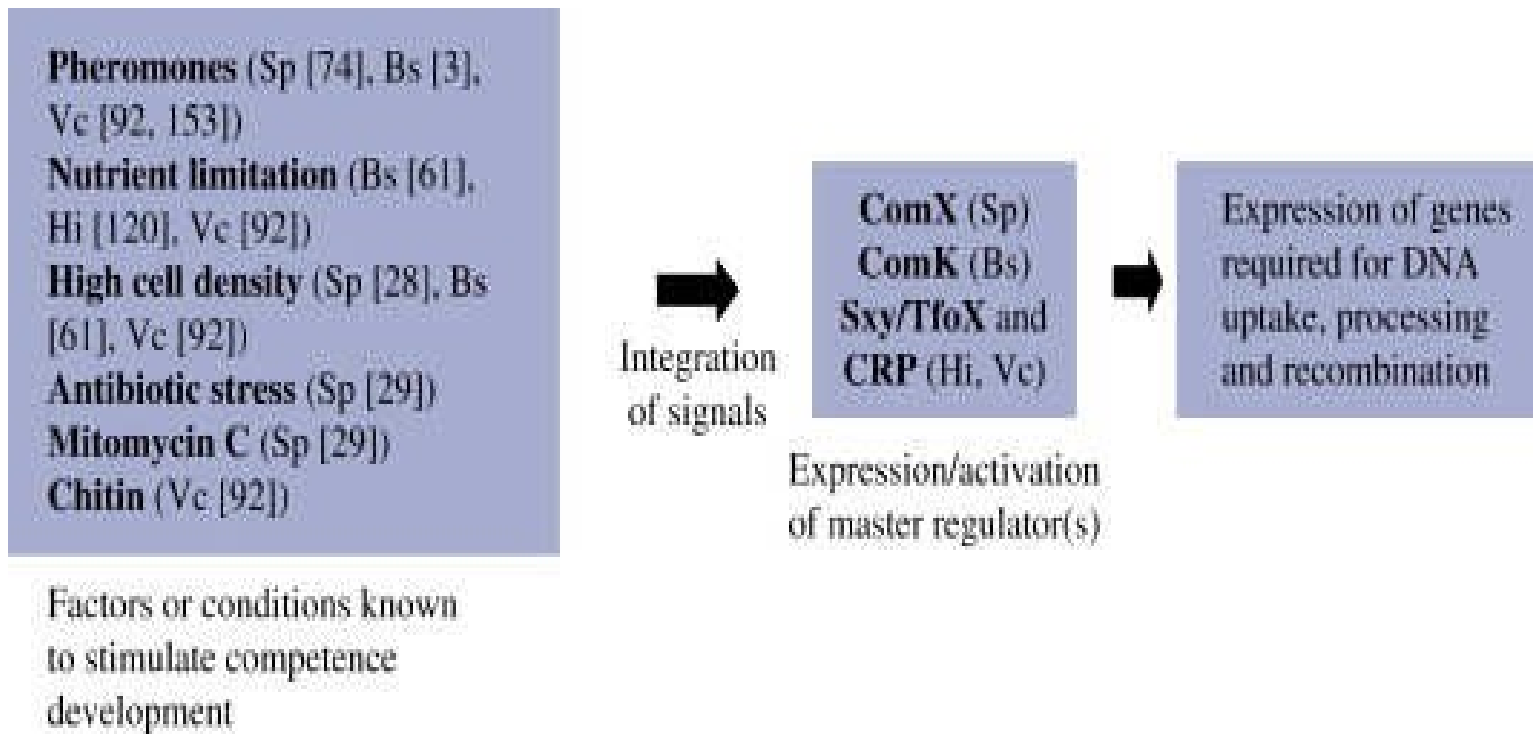
Počet receptorů na povrchu buněk pro příjem DNA:

S. pneumoniae: **80**, *B. subtilis*: **50**, *H. influenzae*: **5**

Kompetence - stav, kdy je daná bakterie schopna přijmout DNA molekuly z prostředí

KOMPETENCE

- výsledek změn v buněčné stěně - syntéza specifických proteinů
- závislost stavu kompetence na fázi růstového cyklu
- závislost na hustotě buněk v populaci (tvorba feromonů - *quorum sensing*)
- fyziologické faktory - ovlivnění složením media, teplotou a pH



Přehled faktorů nebo růstových podmínek, které mají stimulační účinek na navození kompetence u *S. pneumoniae* (Sp), *B. subtilis* (Bs), *H. influenzae* (Hi) a *V. cholera* (Vc), u nichž je regulace navození kompetence nejlépe prostudována.

Nejčastějšími faktory jsou **nedostatek živin** (Bs, Hi and Vc) nebo jiné formy stresu (Sp).

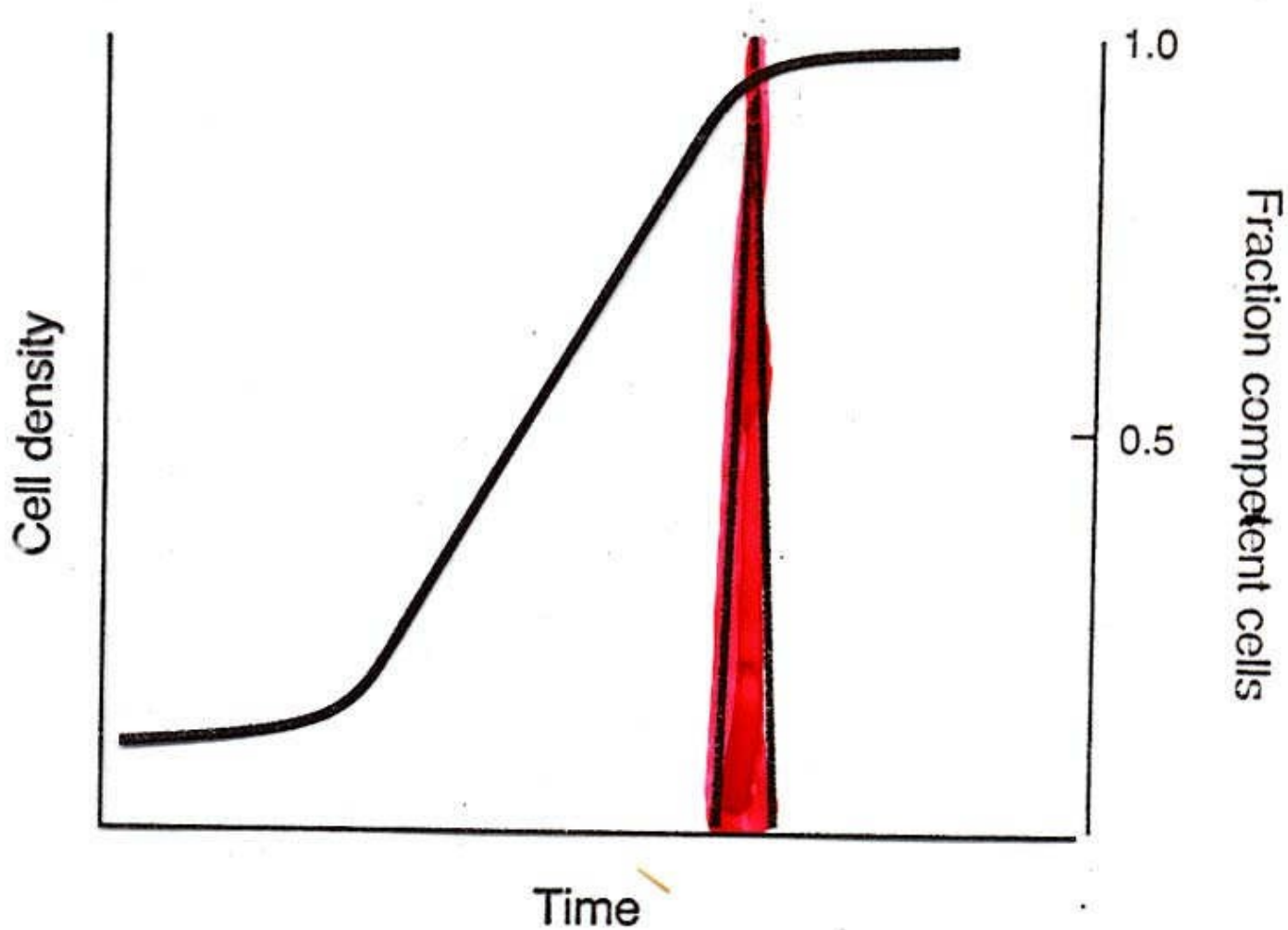
U Sp, Bs a Vc jsou používány systémy **feromony zprostředkovaného quorum sensing**, které zajišťují, že kompetence je navozena při vysoké koncentraci buněk.

Stav kompetence - STREPTOKOKY

- vyžadováno **kompletní medium**
- dochází k syntéze **faktorů kompetence** - asi 16 proteinů (bazické proteiny, nízká m.h., podobají se fágovým proteinům a reagují s receptory buněčné membrány pro příjem DNA)
- mění se **morfologie** buněk - dlouhé řetízky
- aktivují se **autolyziny** - částečná lyze buněčné stěny
- stav kompetence trvá jen **několik minut**, ale šíří se v celé populaci
- **quorum-sensing**: koordinovaná exprese genů podle aktuálního lokálního množství bakterií produkujících signální molekuly) – **využití reportérových genů**

Streptococcus pneumoniae

Interval kompetence



NAVOZENÍ KOMPETENCE U *B. SUBTILIS* (G+)

- pozdní **stacionární fáze** – účast Mg⁺⁺ k aktivaci specifických nukleáz (17 kD endonukleáza)
 - **zpomalení syntézy DNA** (jedna kopie chromozomu)
 - **syntéza nových polypeptidů** (analogy proteinů pro sporulaci, stres aj)
 - exprese genů pro **reparaci DNA** (SOB)
 - **stav kompetence trvá několik hodin**
- } Využití reportérových genů

V populaci *B. subtilis* je kompetentních asi 10% buněk – bistable state

NAVOZENÍ KOMPETENCE U *H. INFLUENZAE* (G-)

- regulováno **interně**, ve vhodném mediu až 100% buněk ve stavu kompetence
- tvorba **transformazomů** a specifických povrchových proteinů
- **blokáda buněčného dělení**

TRANSPORTNÍ A POMOCNÉ PROTEINY

K překonání buněčné stěny (fyzikální a elektrostatická bariera) je vyžadován značný počet proteinů.

Několik proteinů má klíčovou úlohu, ostatní jsou pomocné:

A) **PSCT** proteiny: skupina proteinů úzce spjatá s povrchovými aktivitami: **pilus, sekrece, kompetence a twitching** (trhavý pohyb). Knockout (**Tn**) těchto genů vede k dramatickému snížení transformovatelnosti.

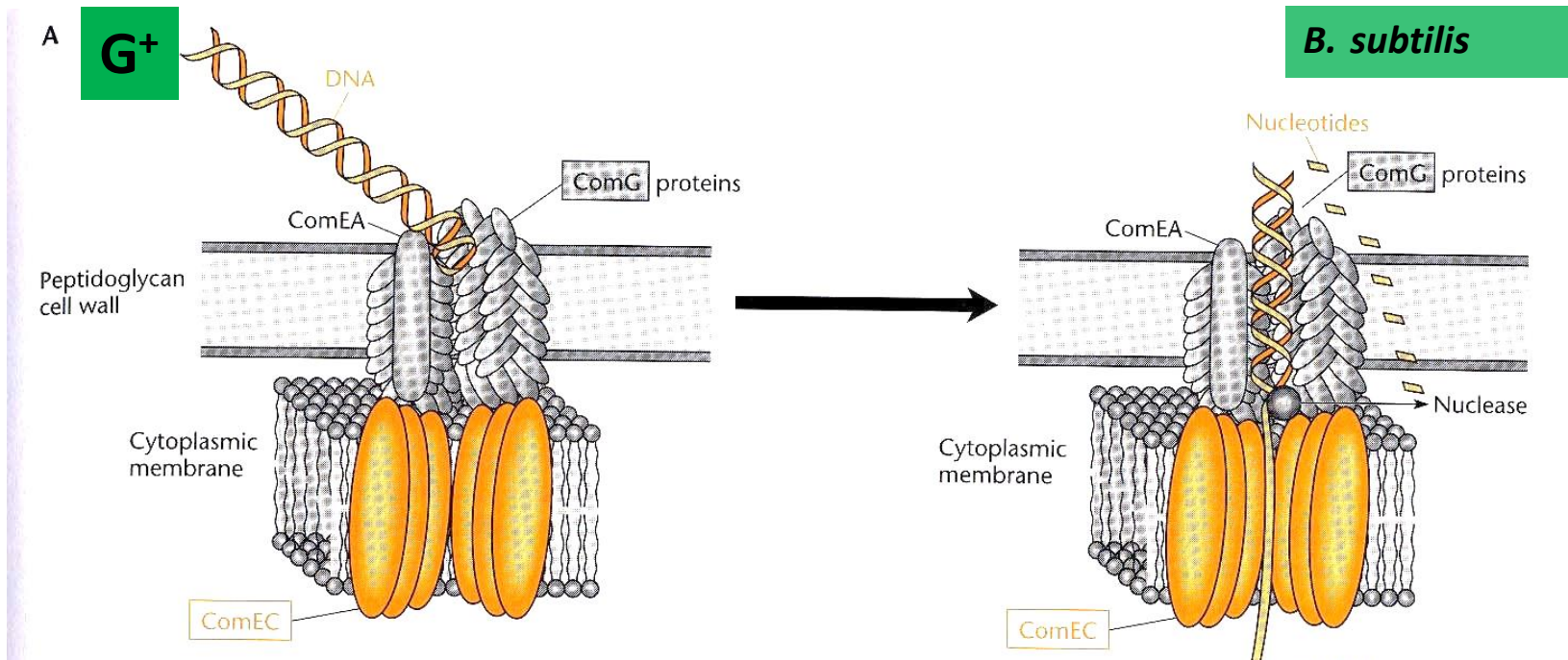
B) Další proteiny patří mezi **Com** (Bs) a jsou analogické u různých druhů: **ComEA** – vazba a transport přes stěnu, **ComG** zvyšuje porozitu, a řada dalších interagujících proteinů např. **Por** (periplazmatický protein u Hi), který je esenciální pro přenos – asi zajišťuje optimální terciární strukturu některého z faktorů kompetence.

Další proteiny fungují analogicky jako SSB proteiny.

C) **Nukleázy** – U Bs a Sp – štěpí navázanou DNA, a nukleáza EndA u Sp štěpí pak jeden řetězec od 5' konce a ta vstupuje 3' koncem do cytoplazmy.

D) **SSB-proteiny** – stabilizace ssDNA, vazba RecA

SYSTÉMY NAVOZOVÁNÍ KOMPETENCE PRO PŘÍJEM DNA U G+ A G- BAKTERIÍ

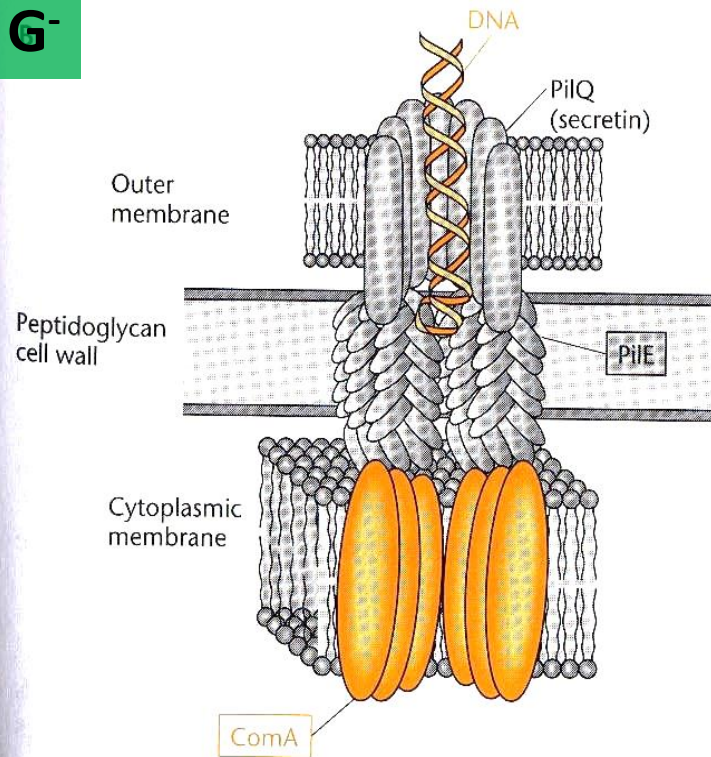
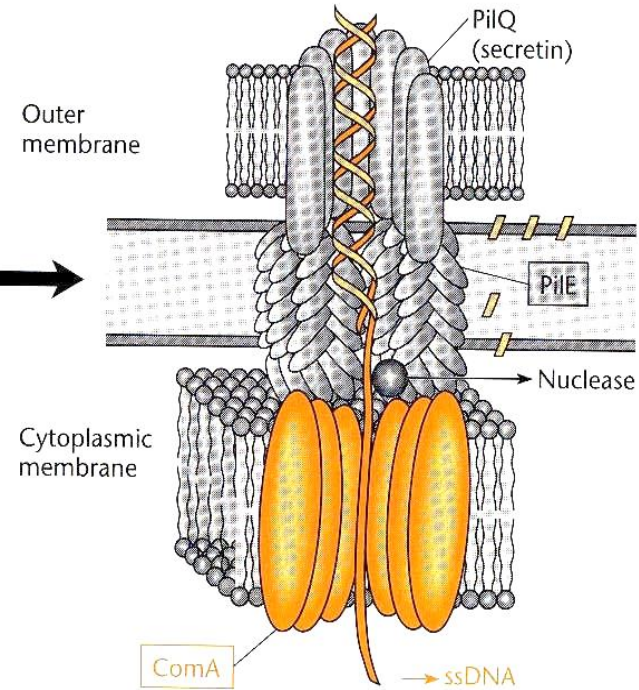


ComEA – proteinový receptor pro dsDNA

ComG – analog proteinu PilE u *Neisseria*, **pseudopilus**

EndA – endonukleáza, tvorba ssDNA u *S. pneumoniae*, u *B. subtilis* nebyl identifikován analog)

ComEC – tvorba transmembránového tunelu pro ssDNA, vyžaduje ATP (ComFA – *B. subtilis*; PilT – *Neisseria*)

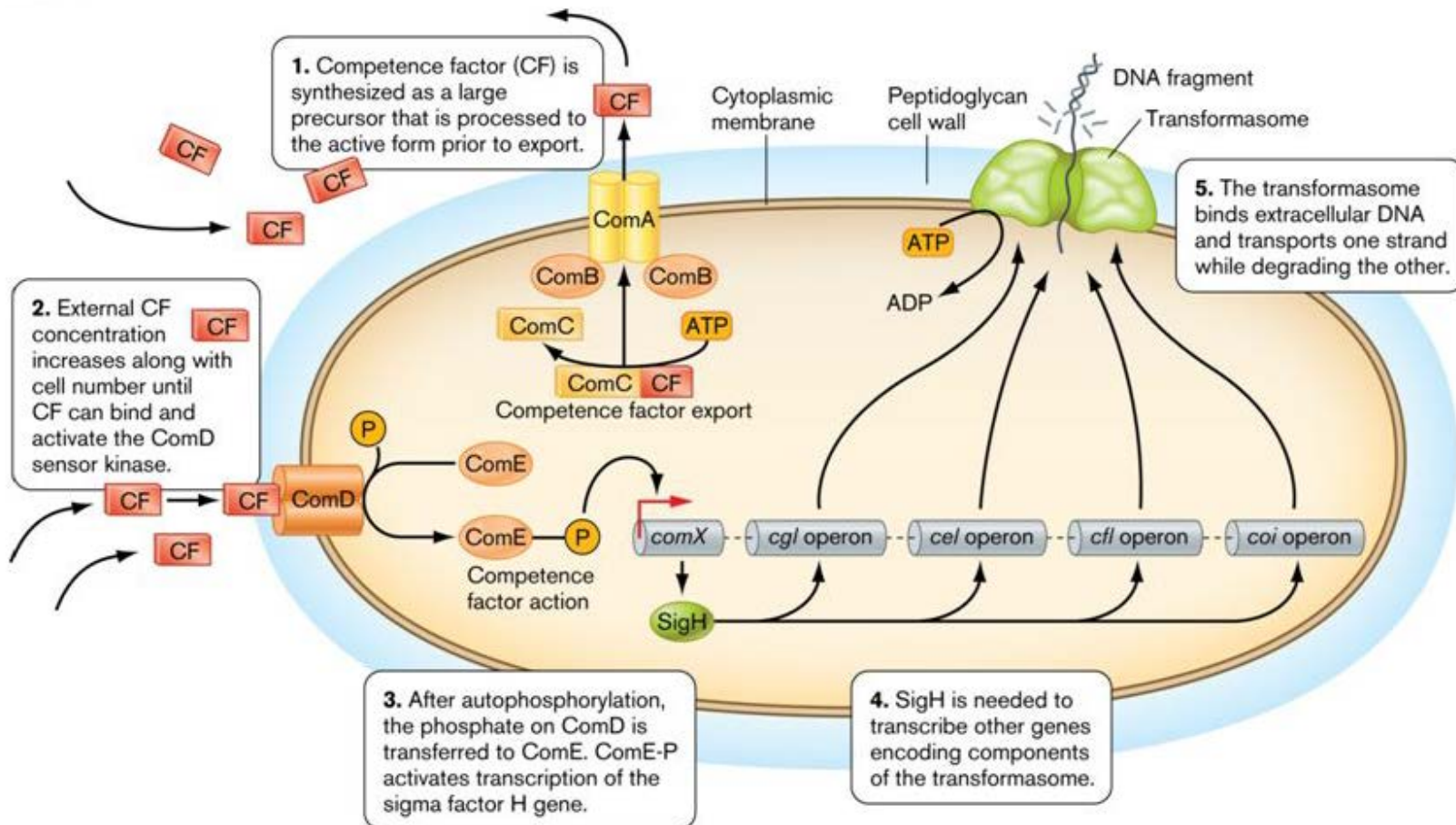
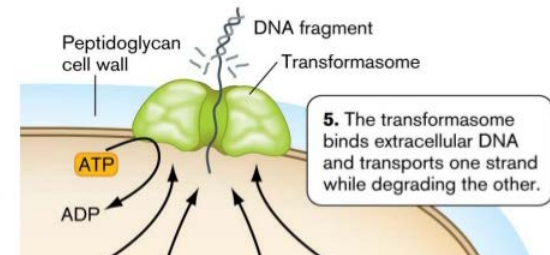
G⁻***N. gonorrhoeae***

U **G⁻** musí hydrofilní DNA překonat hydrofóbní vnější membránu před vlastním vstupem do buňky přes cytoplazmatickou membránu.

Systém na vnější membráně – 12-14 kopií sekrečních proteinů – **PilQ** (*Neisseria*) – přenos dsDNA; **ComA** – pro přenos ssDNA – degradace nukleázou = pilus systém IV; sekreční systém II. typu – význam v patogenitě

Transformazomy – vezikuly vázající dsDNA, přeprava přes vnější membránu do buňky

G⁻: transformazom



Transformazomy u *H. influenzae*

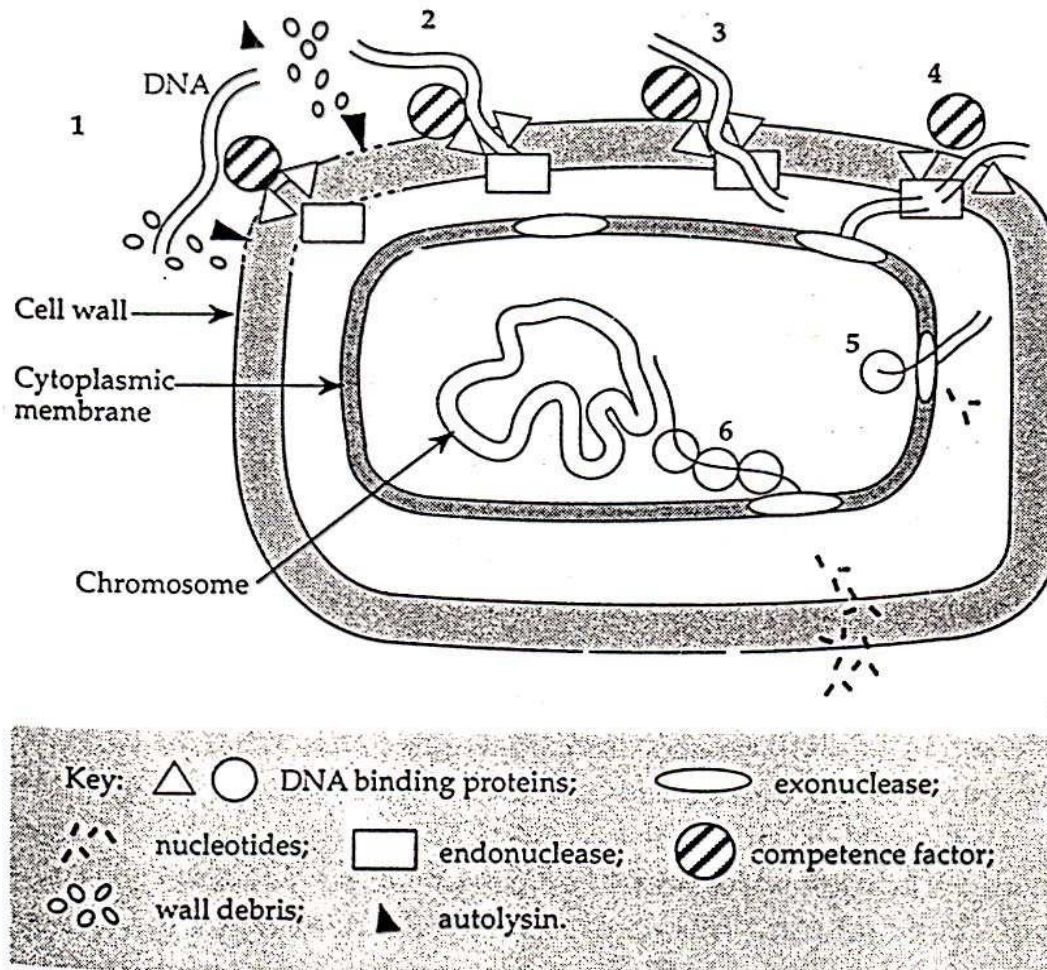
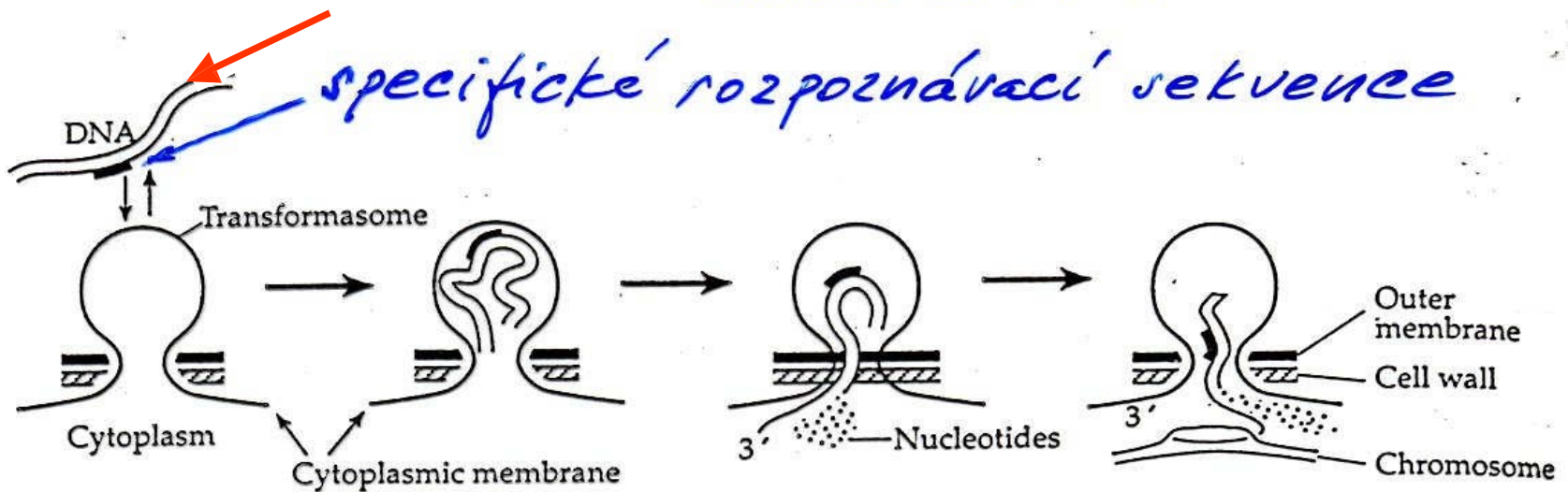


Fig. 10.4 Schematic representation of the steps leading to DNA entry during transformation of a Gram-positive bacterium. Stages 1 to 6 indicate a time sequence.

TRANSFORMAZOMY U *H. INFLUENZAE*

Specifická rozpoznávací sekvence na DNA : **AAGTGC GG TCA** (USS = uptake signal sequence; DUS = DNA uptake sequence; u *N. gonorrhoeae*: **GCCGTCTCAA**)

AAGTGC GG TCA



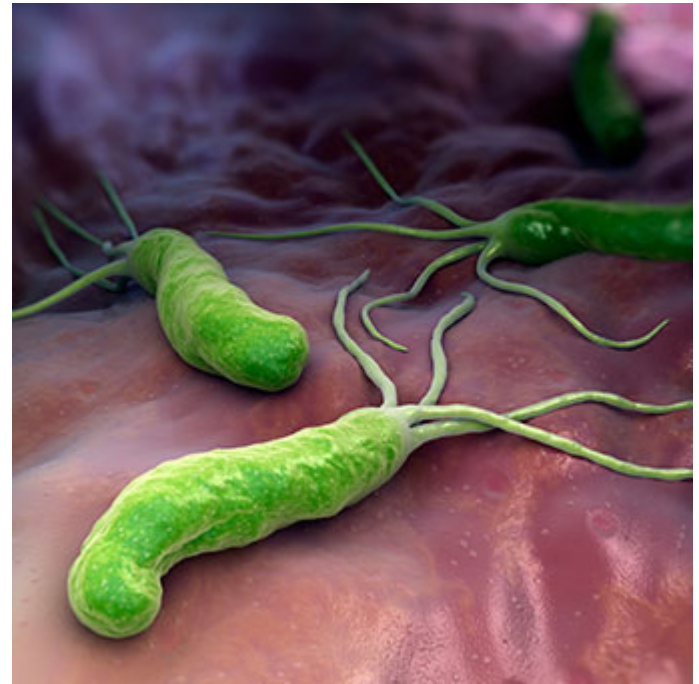
Počet sekvencí na chromozomu = 734+ a 731-;

H. influenzae má 62% AT, takže by se statisticky očekávalo jen 8 míst, a ne 1465 (sekvence je bohatá na GC).

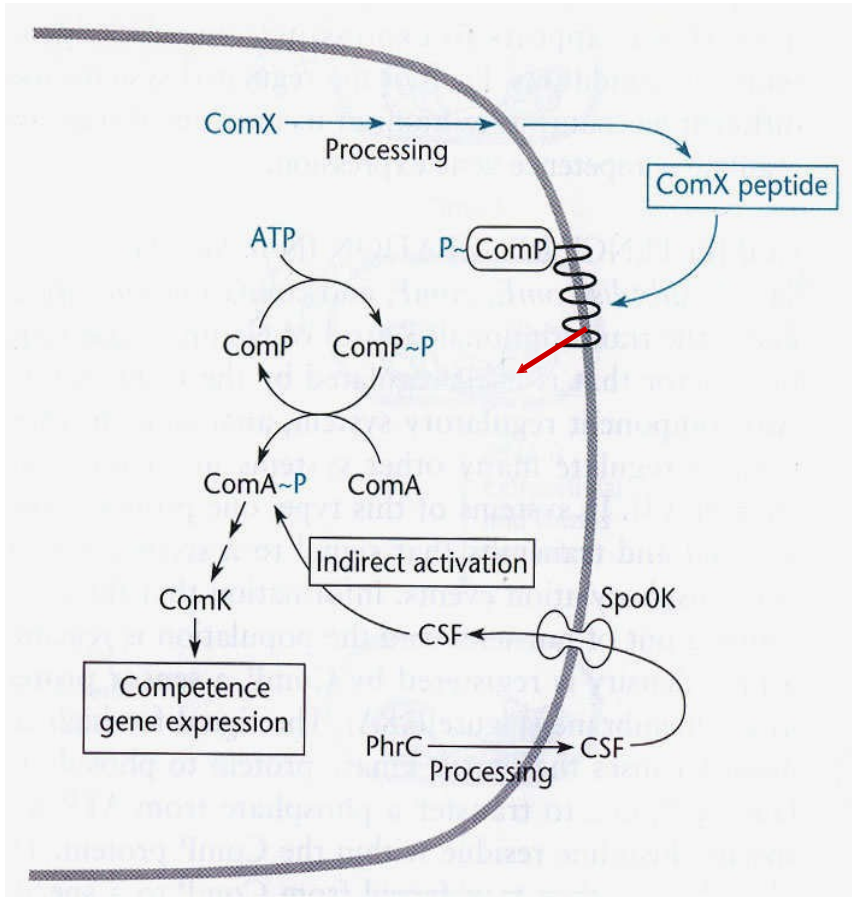
61% těchto sekvencí se nachází v ORF, každá zhruba na 1 248 bp.

SYSTEMY NAVOZOVÁNÍ KOMPETENCE PRO PŘÍJEM DNA G- BAKTERIÍ – Sekreční systém typu IV – *Helicobacter pylori*

- Identifikace ortologických proteinů k proteinům VirB –
konjugační systém *A. tumefaciens*



Regulace vývoje stavu kompetence pomocí quorum sensing u *B. subtilis*

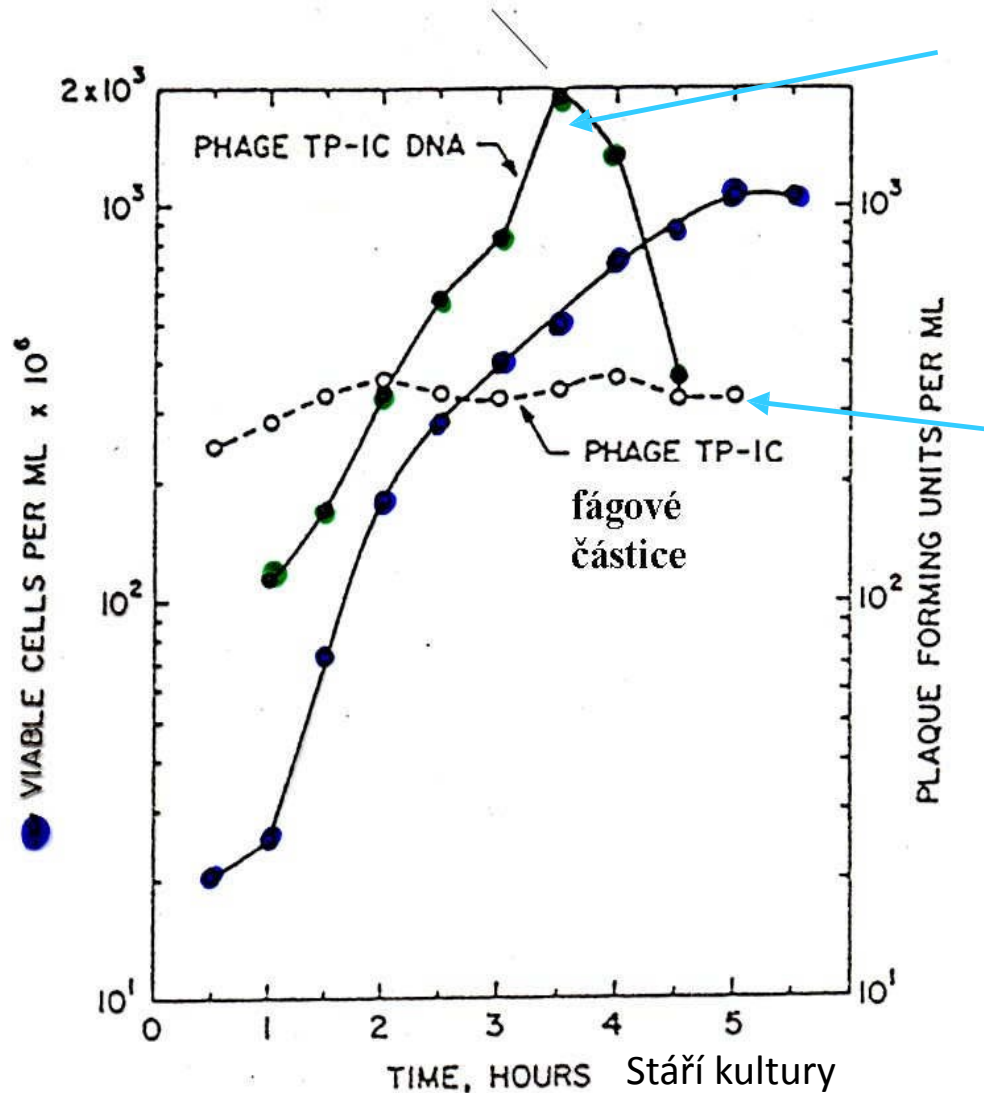


Protein **ComP** (senzor) kontroluje koncentraci feromonu **ComX**, po jeho zachycení se sám fosforyluje a přenáší fosfát na **ComA** (protein- regulátor zprostředkující odpověď) – fosforylovaný **ComA-P** působí jako transkripční aktivátor několika genů zodpovědných za kompetenci

Feromony pro kompetenci = malé peptidy sekretované buňkami, jejichž hladina odpovídá koncentraci buněk v populaci.

Jsou vytvářeny jako prekurzory, jako hotové jsou uvolňovány do prostředí a naředovány, takže vysoké koncentrace je dosaženo pouze při vysokém počtu buněk.

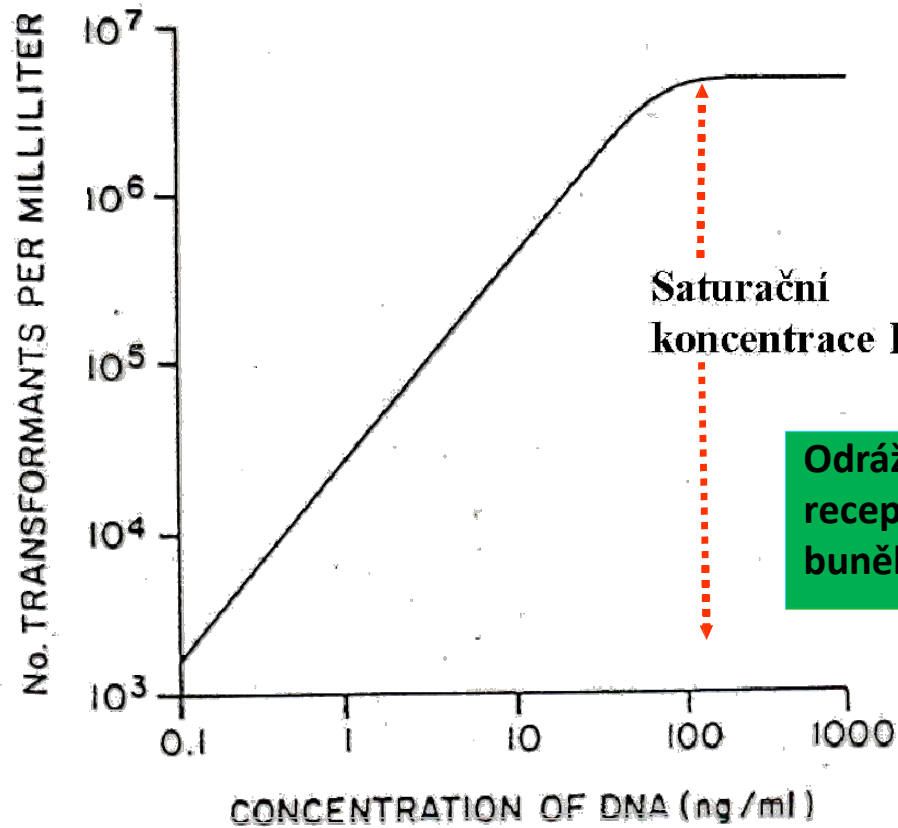
Detekce optimálního stavu kompetence



Zvyšování počtu plak při stejné koncentraci fágové DNA indikuje stav kompetence.

Počet plak po infekci buněk fágovými částicemi se během růstu kultury výrazně nemění

Stanovení saturační koncentrace DNA



Odráží omezený počet receptorů na povrchu buněk.

Procesy po vstupu DNA do buňky

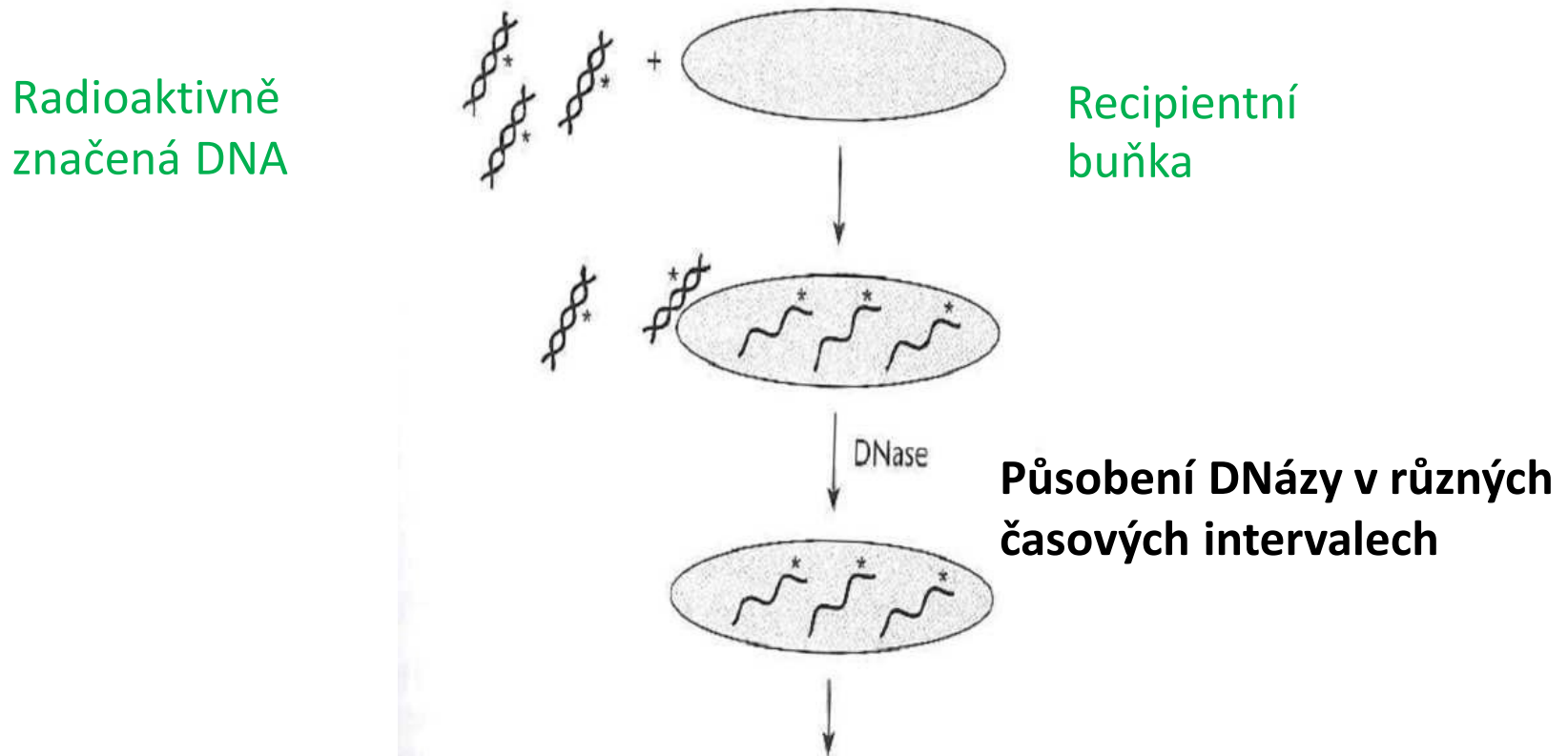
- ssDNA – vysoká citlivost k degradaci, vazba SSB proteinů (DNA replikace)
- ssDNA – substrát pro RecA protein – rekombinace transformované DNA
- RecA – homologní rekombinace transformované ssDNA s host DNA
- Délka ssDNA inkorporované do chromozomu cca 8,5 – 12 kb – ověřeno kotransformací genetických markerů

Modely přirozené transformace

- a. Efektivita příjmu DNA
- b. Specifita příjmu DNA
- c. Genetický důkaz příjmu ssDNA

a. Efektivita příjmu DNA

Stanovení účinnosti příjmu DNA při transformaci

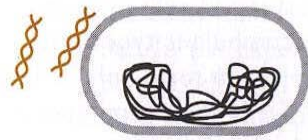


Nanesení na filtr, promytí a stanovení radioaktivity DNA v buňkách – **DNA, která nebyla přijata, je rozložena DNázou a prochází filtrem**

b. Specifita příjmu DNA – specifické sekvence pro příjem DNA u *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*

Genetický test pro ověření stavu DNA při transformaci

1. DNA Arg+ je přidána k recipientním buňkám Arg-

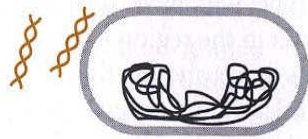


Časový interval I. **0 min**

Časový interval II. **2 min.**

Časový interval III. **15 min**

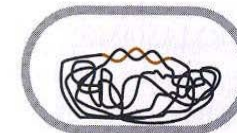
2. V různých časových intervalech je přidána DNAáza



DNA je extracelulární a je degradována

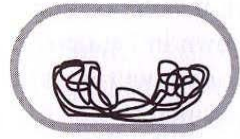


DNA v buňce je jednořetězcová a nemůže se vázat na recipientní buňku



DNA je začleněna do chromozomu a je dvouřetězcová

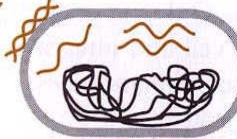
3. Extrakce DNA a její přidání k buňkám Arg-



Transformanty **nevznikají**



Transformanty **nevznikají**



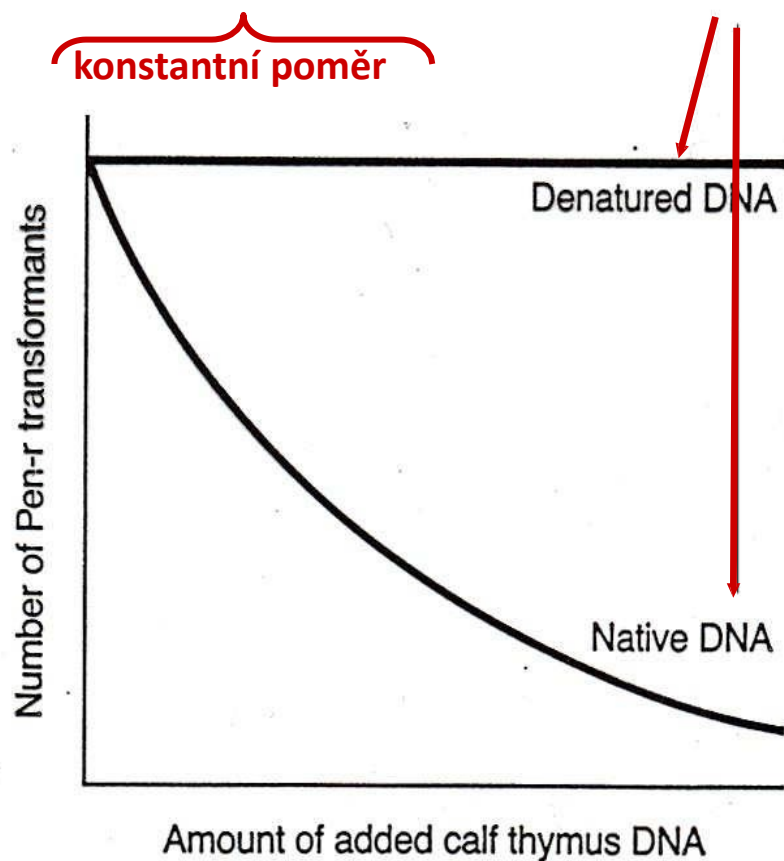
Transformanty **Arg+ vznikají**

Fáze eklipse = časový interval, kdy nelze DNA z povrchu buněk odmyt ani ji v buňkách prokázat

Příjem DNA buňkou

vzájemná kompetice mezi molekulami exogenní DNA

Buňka PenS + DNA (PenR) + DNA brzlíku

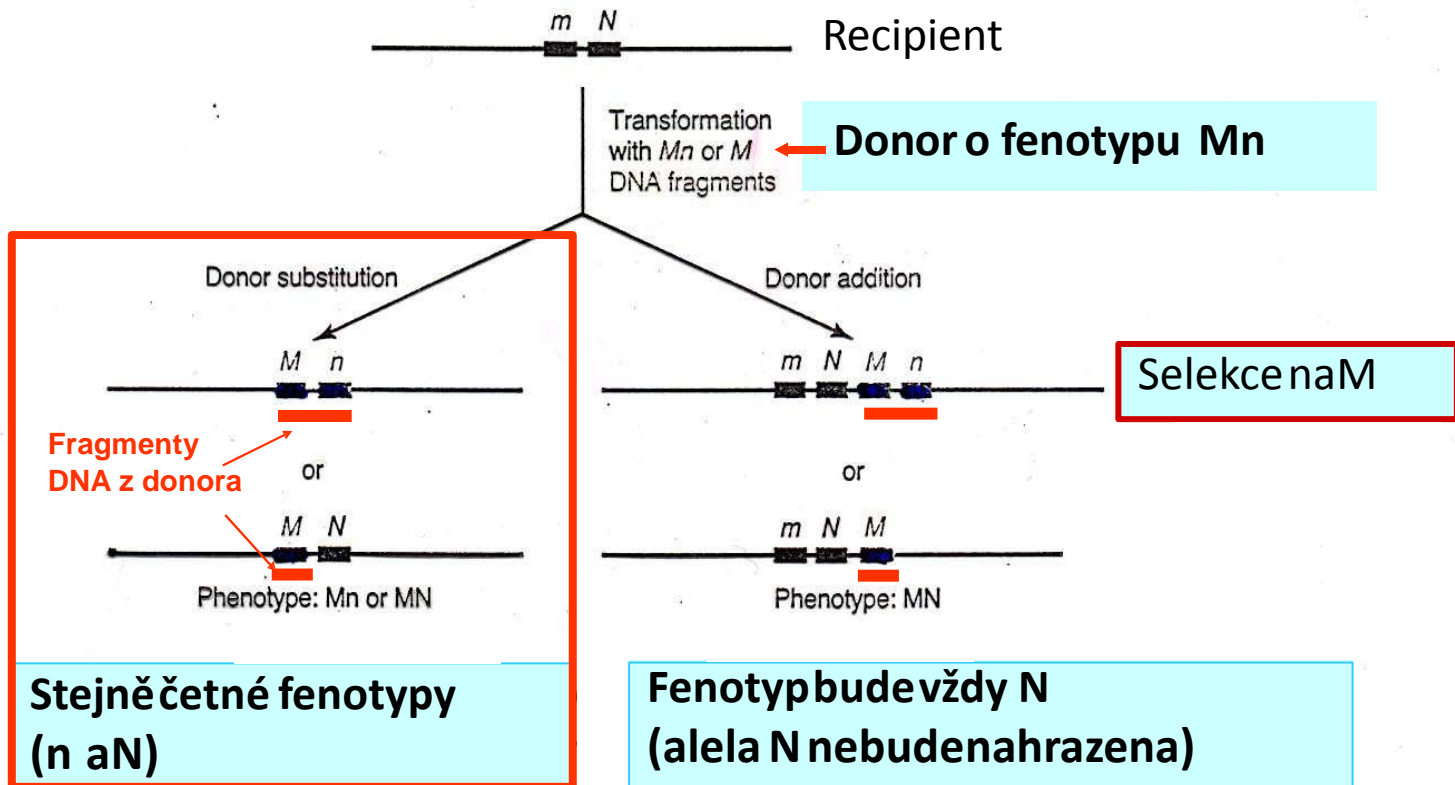


Denaturovaná DNA z brzlíku neovlivňuje příjem DNA (PenR), nativní DNA ano a snižuje tak výsledný počet transformantů.

Experimentální stanovení způsobu začlenění exogenní DNA do genomu recipientní buňky

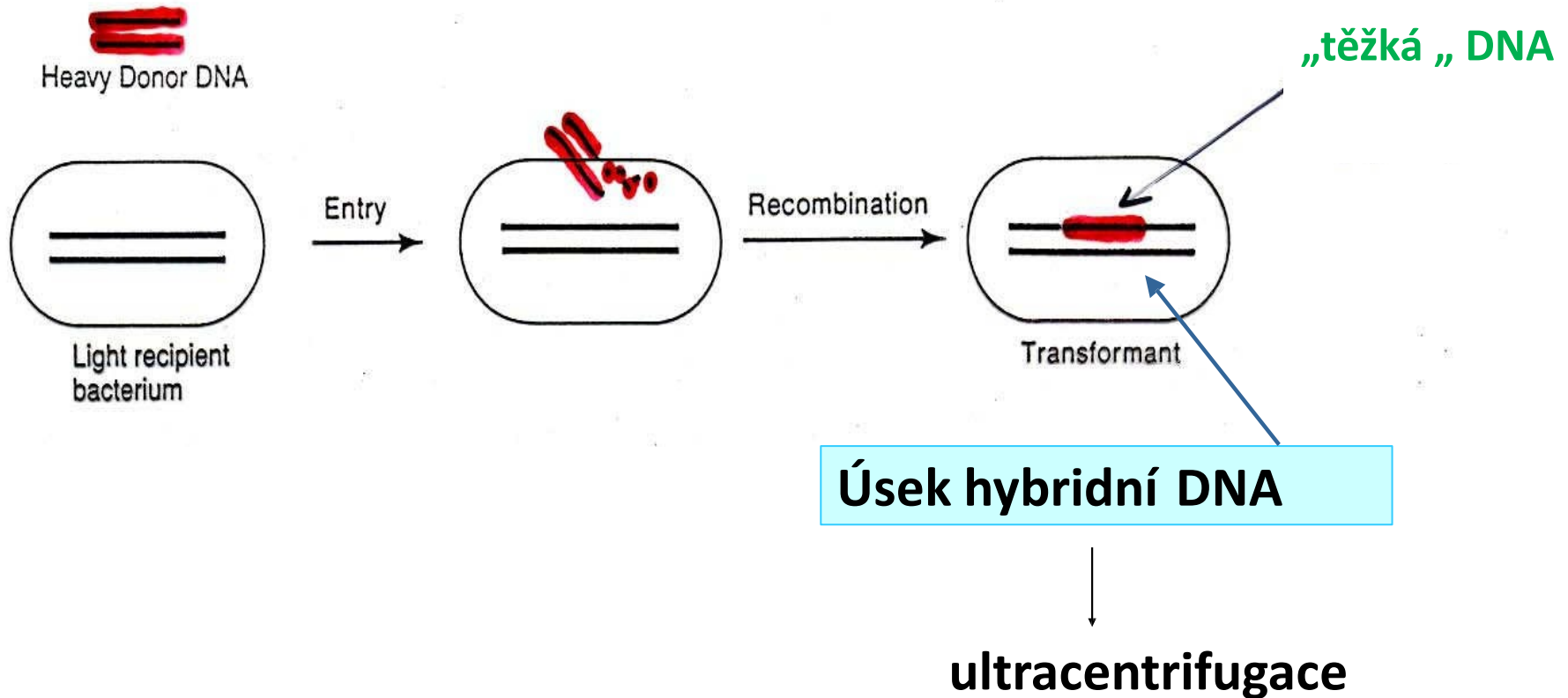
Těsně vázané markery Ma N

m, n = citlivost k antibiotiku
M, N = rezistence k antibiotiku



Experimentální důkaz začlenění jednořetězcového úseku donorové DNA do chromozomu recipientní buňky

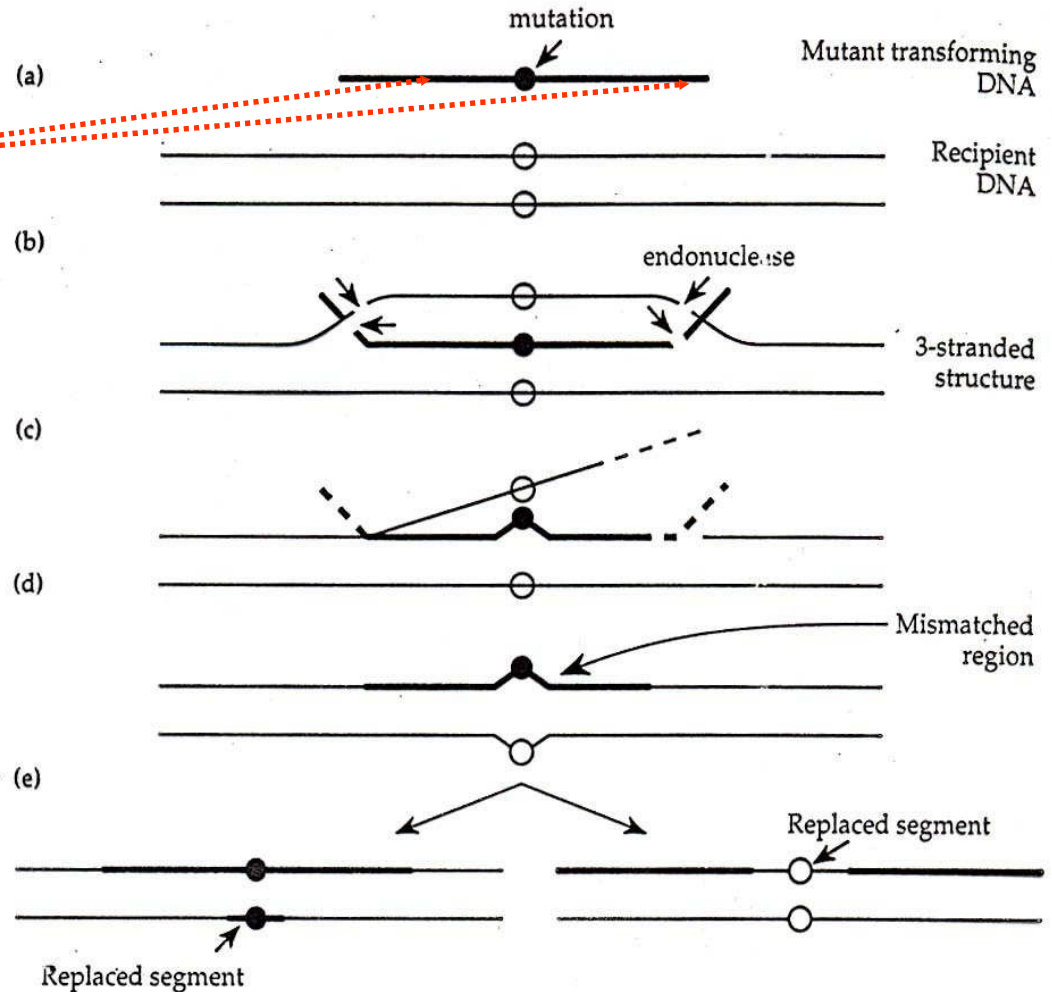
BACTERIAL TRANSFORMATION



Sekvence s vysokým stupněm homologie

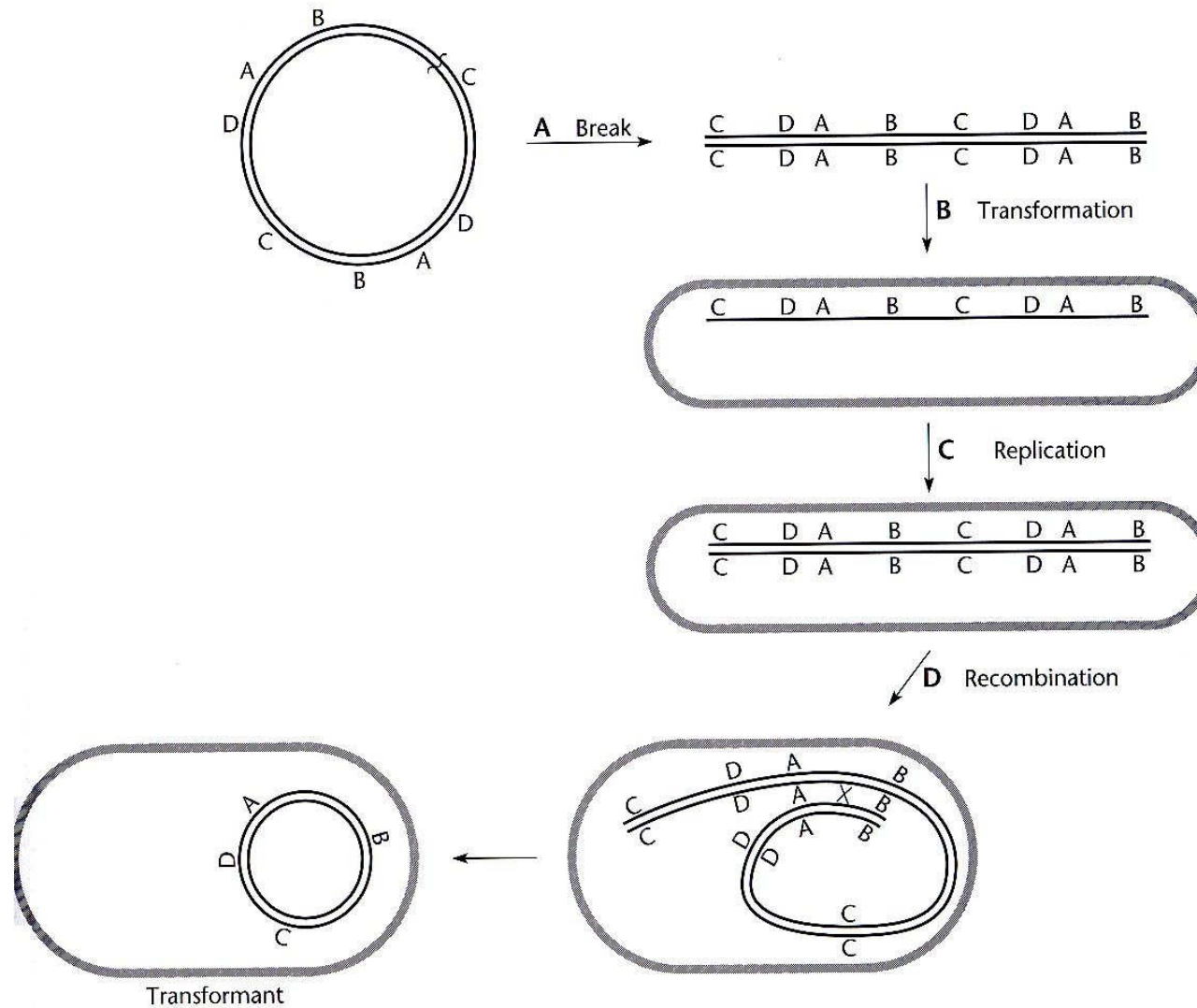
Integrace transformující DNA do homologního regionu recipientní buňky a „mismatch repair“ přenášené alely:

- Zpárování homologních oblastí dvou DNA molekul
- Lokální odvinutí dvouvláknové DNA
- Naštěpení duplexní oblasti endonukleázou.
- Doplnění mezer polymerázou a spojení zlomů ligázou.
- Oprava „mismatch“ na druhém řetězci.



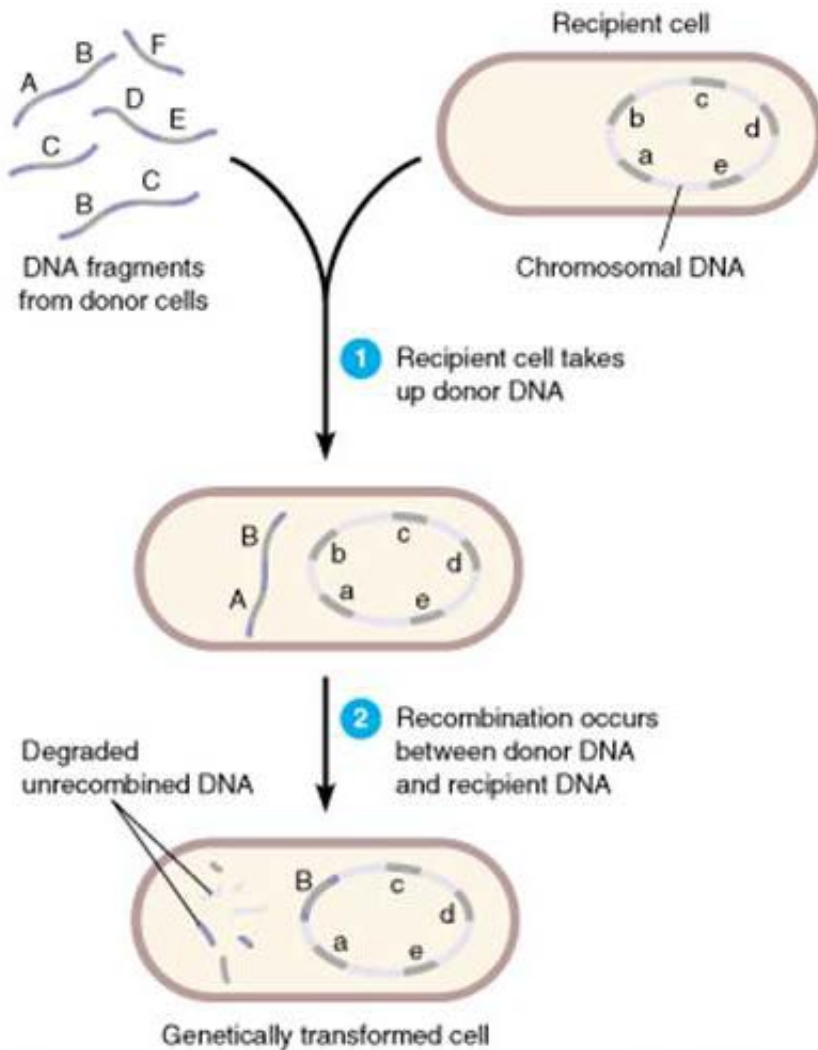
mutantní vs. „wild-type“ fenotyp

TRANSFORMACE DIMERNÍMI MOLEKULAMI PLAZMIDOVÉ DNA



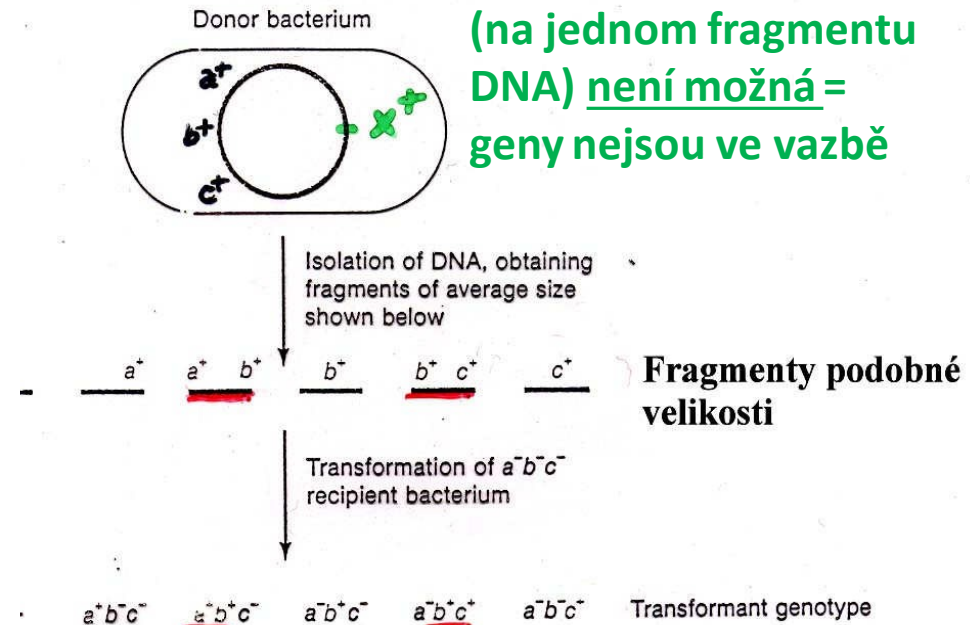
Mapování genů pomocí transformované DNA

Dva geny se budou přenášet společně, pokud jsou tak blízko sebe, že mohou být na stejném fragmentu DNA = **kotransformace**



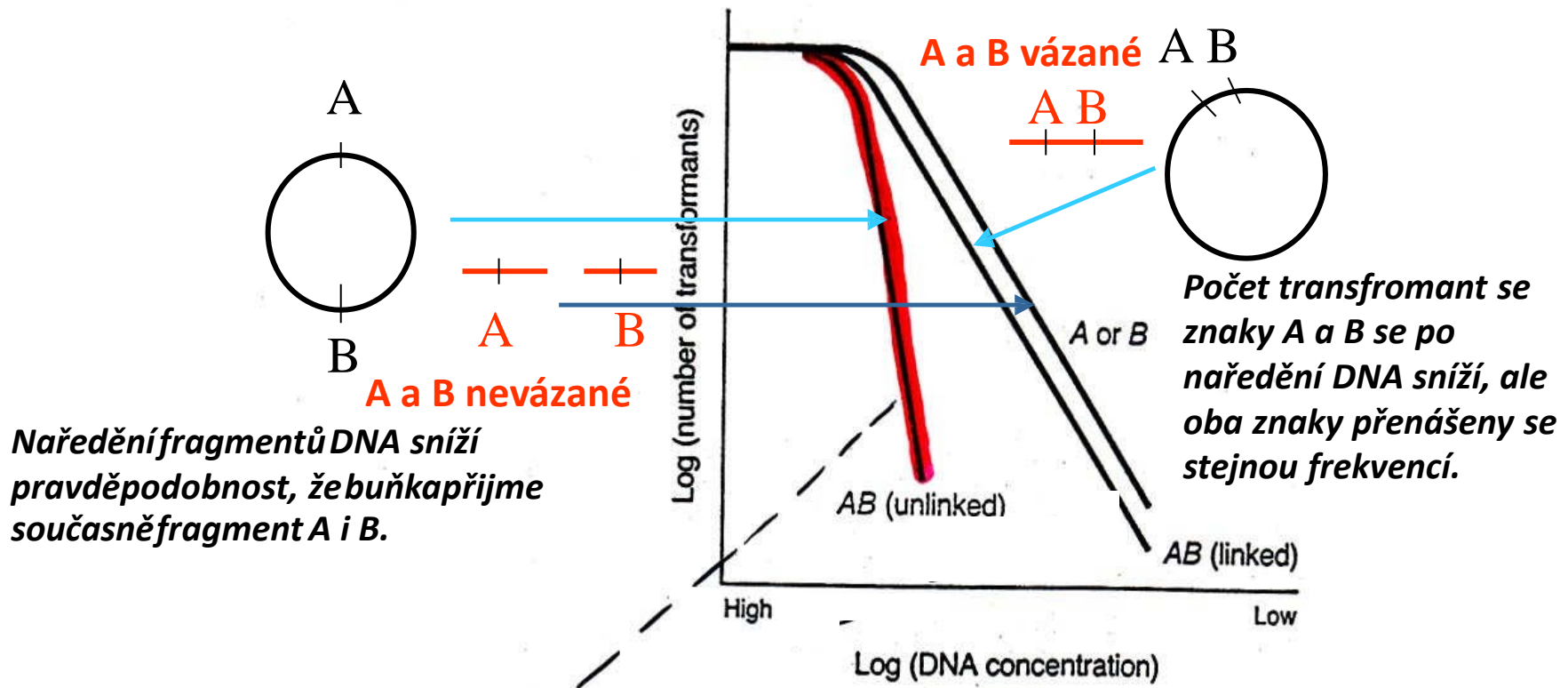
Mapování genů pomocí transformace

Kotransformace genů *a*, *b* nebo *c* s genem *x* (na jednom fragmentu DNA) není možná = geny nejsou ve vazbě



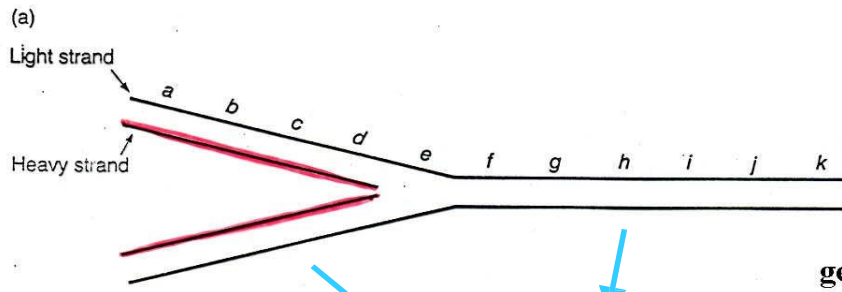
Kotransformanty *a*⁺*b*⁺*c*⁺ nebo *a*⁺*b*⁻*c*⁺ nevznikají.

ZŘEĎOVACÍ TEST NA KOTRANSFORMACI

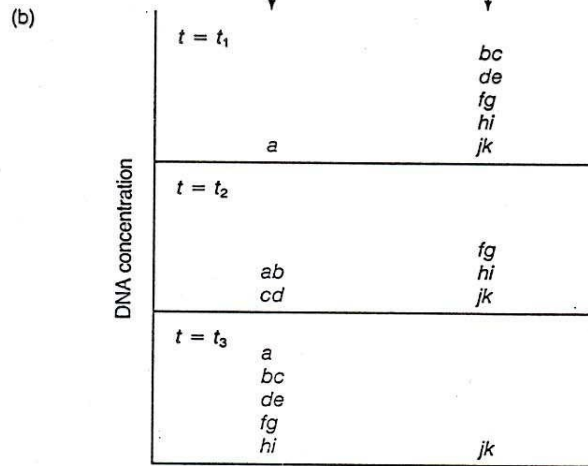


Pokles frekvence kotransformace znaků A a B je v obou případech odlišný

MAPOVÁNÍ GENŮ U *B. SUBTILIS* S VYUŽITÍM TRANSFORMACE



germinace spor
v prostředí s
těžkou vodou



Separace DNA ultracentrifugací v CsCl

- replikovaná DNA je hybridní
- posun markeru z lehké DNA na hybridní DNA odpovídá jeho vzdálenosti od *ori*

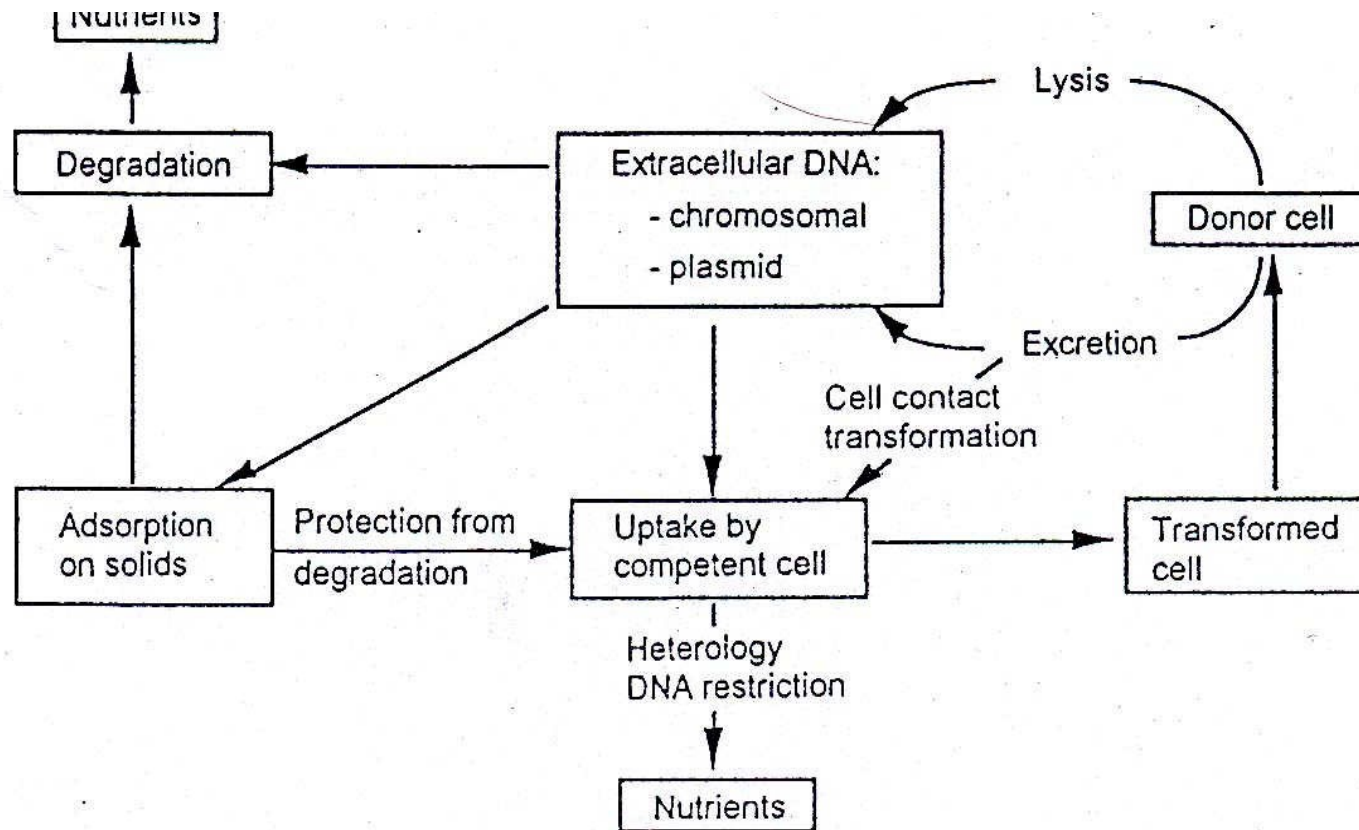
markery z
dříve se
replikující
oblasti

DNA použita
k transformaci

markery z
později se
replikující
oblasti

Stanovení markerů
u transformantů

Schéma přenosu genů volnou DNA ve vodném prostředí



DNA v prostředí:

mořská voda, sedimenty, půda - z buňky uvolňovaná při sporulaci nebo při lýzi buněk, ale i při běžné kultivaci

Množství vysokomolekulární DNA: mikrogramy na 1 gram sedimentů

Osud DNA: hydrolýza, avšak na nosičích (křemen, jíly, huminové kyseliny) je chráněna před nukleázami.

BIOLOGICKÉ FUNKCE PŘÍJMU DNA

1. Regulace genové exprese

Např. u *neisserií*: variace antigenních vlastností - Exprese pilinových genů je regulována intrachromozomovou rekombinací mezi rezidentními silentními pilinovými geny a pilinovým expresním lokusem nebo **integrací silentního genu na vstupující donorové extrachromozomové DNA** (po autolýze buněk) za tvorby intragenní minikazety.

2. Protekce buněk před bakteriofágy

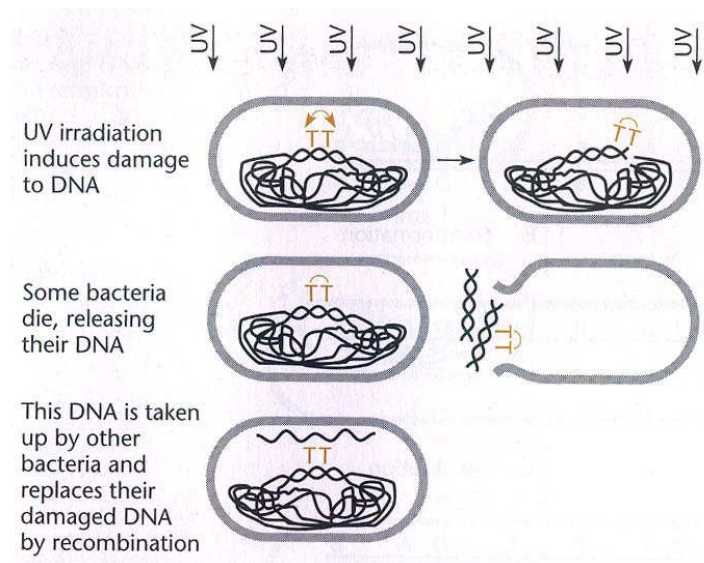
Různé kmeny *S. pneumoniae* mají RM systémy *DpnI* a *DpnII* kodované alternativními kazetami ve stejném lokusu na chromozomu. Oba systémy rozpoznávají stejnou cílovou sekvenci, která se však liší stavem metylace. Fágy propagované na jednom kmeni jsou restringovány na druhém a naopak. **Transformací DNA z donorového kmene změní** recipientní kmen díky homologní rekombinaci svůj RM systém.

3. DNA reparace

Vstupující homologická **DNA je použita pro rekombinační reparaci lézí na DNA přítomných na chromozomu recipienta.** Transformace vede ke zvýšenému přežívání kompetentních (sexuálních) buněk ve srovnání s nekompetentními (asexuálními) buňkami po ozáření UV světlem.

4. Zdroj živin a energie

(rozklad DNA extracelulárními nukleázami, příjem složek DNA, např. nukleotidů specifickými dráhami) – Rozklad jen jednoho řetězce.



UMĚLE NAVOZENÁ TRANSFORMACE

A) Transformace u *E. coli*: Ovlivnění propustnosti buněčné stěny divalentními ionty (Ca, Mg, Rb) a dimetylsulfoxidem - změna integrity a organizace lipopolysacharidové vrstvy, vystavení buněk nízké teplotě, hladovění. Vstupující plazmidy zřejmě nejdříve interagují se specifickými kanály v povrchu stěny buněk (počet kanálů 10 do 200). Teplotní šok 42- 45°C indukuje faktory zvyšující kompetenci. **Přijímání DNA je neselektivní, do buněk mohou vstupovat i zcela nepříbuzné plazmidy.**

Účinnost transformace plazmidů je vysoká, chromozomové DNA nízká (mutace podjednotky D RecBCD-nukleázy zvyšuje účinnost příjmu lineární chromozomové dsDNA). Tato nukleáza degraduje lineární DNA od jejích konců. Alternativně lze použít „recombineering“, což jsou rekombinační systémy fágů. DNA se vnese do buněk exprimujících tento systém, jehož složkou je protein, který inhibuje RecBCD.

B) Transformace zprostředkovaná PEGem. Postup pro G+, které nemají přirozenou kompetenci.

Bakterie zbaveny enzymaticky peptidoglykanové vrstvy, přeneseny do osmoticky stabilního média, přidavek PEG – fúze membrán, precipitace DNA.

Regenerace buněk.

C) Elektroporace

D) Biolistická metoda

Přenos plazmidových vektorů do hostitelských buněk

Transformace:

- bakterie uvedeny do stavu kompetence (u *E.coli* působením chloridu vápenatého za nízké teploty)
- po přidání DNA a krátkém zahřátí na 42 °C) přechází transformující DNA do buněk

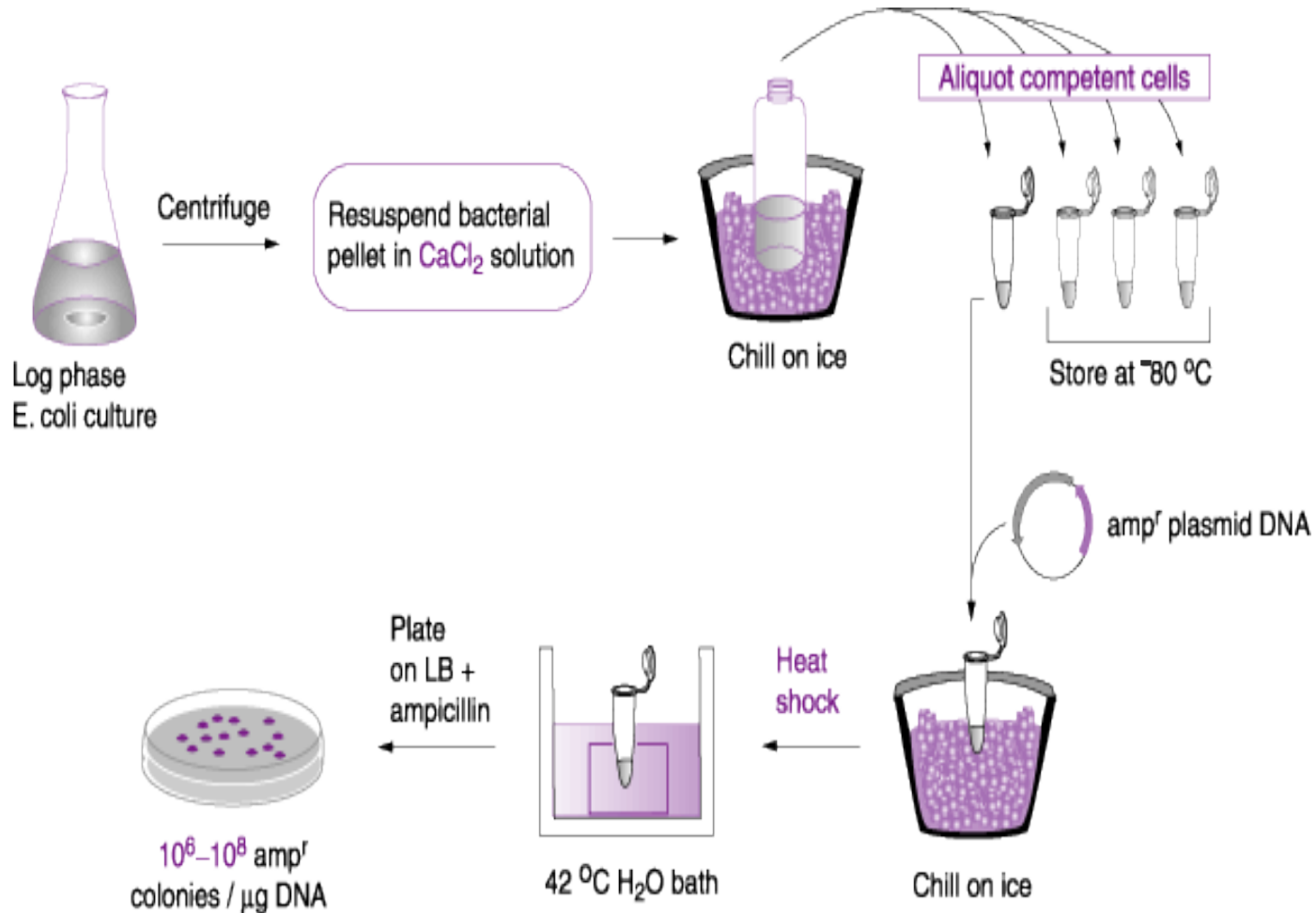
Elektroporace:

- buňky jsou vystaveny krátkému elektrickému impulsu o vysokém napětí – v buněčné stěně vznikají póry, kterými exogenní DNA vstupuje do buněk

Transformace bakteriálních buněk

- závislá na stavu kompetence buněk
- u některých bakterií se stav kompetence objevuje přirozeně (*S. pneumoniae*)
- u *E.coli* se připravuje uměle - promytím buněk ledovým CaCl_2
 - přidání DNA
 - mírný teplotní „šok“ (2 min, 42°C)
 - krátká inkubace v růstovém médiu (zotavení bakterií, exprese selekčního markeru)

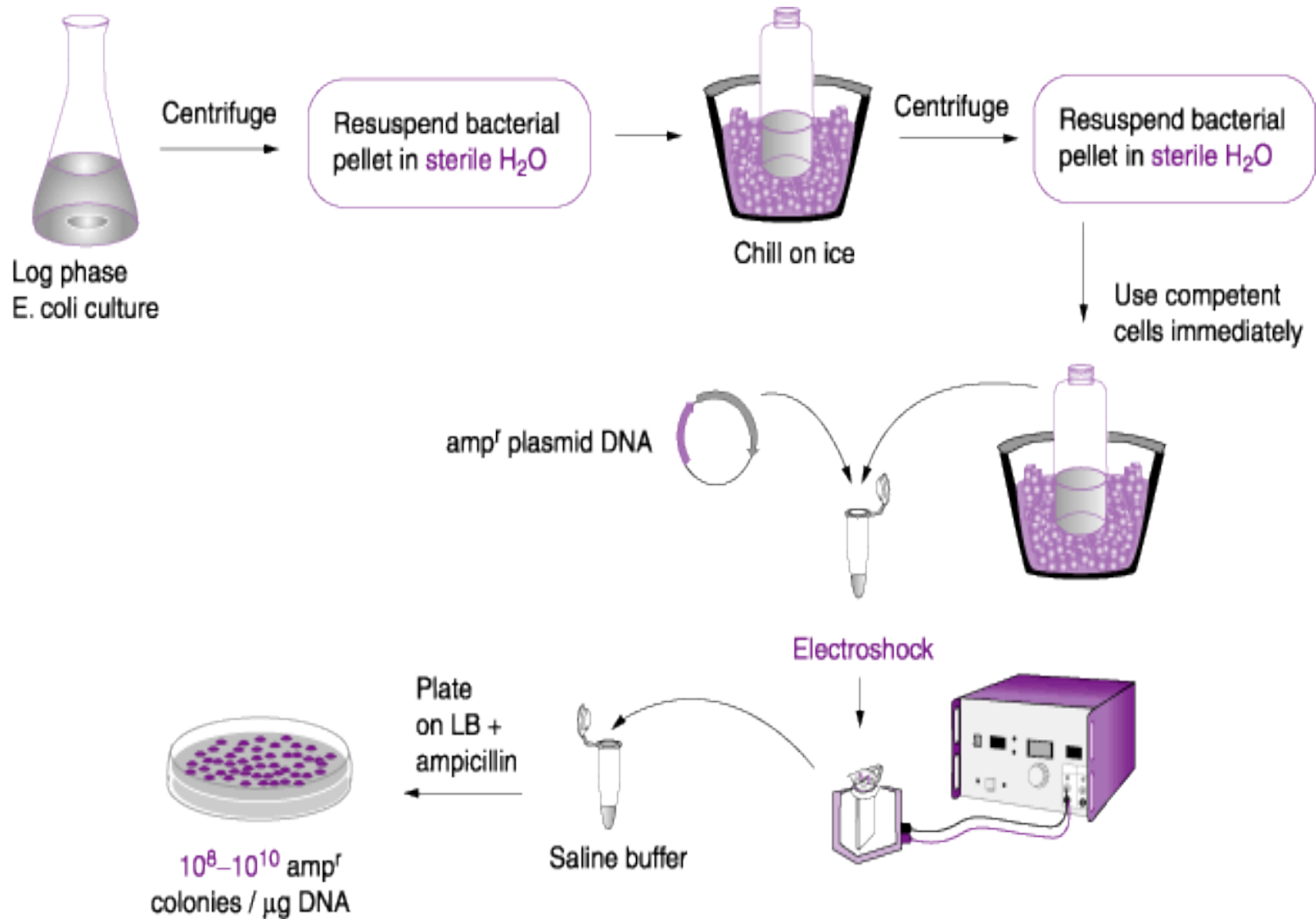
Transformace tepelným šokem s využitím CaCl_2



Transformace bakterií elektroporací

- Promytí buněk vodou (odmytí elektrolytů z růstového média)
- krátký elektrický puls o vysokém napětí
- dočasné otvory v buněčném obalu
- vstup DNA do buňky

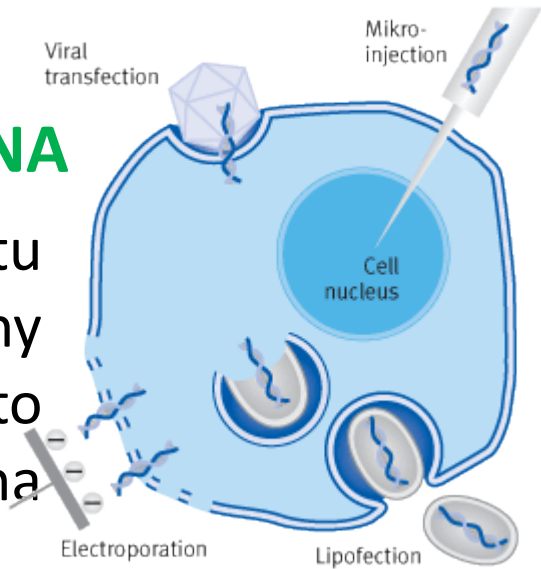
Transformace elektroporací



Transfekce fágovou DNA

Do buněk je přenášena fágová DNA nebo RNA

Detekce úspěšné transfekce se provádí na nárůstu buněk citlivých k fágu, k nimž byly přidány transfekované buňky pokud došlo k transfekci, tyto buňky uvolňují fágové částice infikující buňky na misce.



U určitých fágů transfekce nevede k reprodukci fágů, neboť k úspěšné reprodukci jsou zapotřebí některé proteiny přítomné uvnitř fágových kapsidů, které jsou při normální infekci injikovány spolu s DNA do cílových buněk:

RNA-polymeráza pro transkripci fágových genů;

RNA replikáza u RNA fágů.