

# MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT

podzim 2018

## KONJUGACE

Ivana Mašlaňová

*iva.maslanova@gmail.com*

# KONJUGACE

## Přenos DNA zprostředkovaný konjugativními plazmidy

Pod pojmem konjugace rozumíme přenos DNA z donorové buňky do recipientní, k němuž dochází po jejich přímém kontaktu. Tento přenos je necitlivý k nukleázám.

**Donor – recipient**  **transkonjugant (konjugant)**

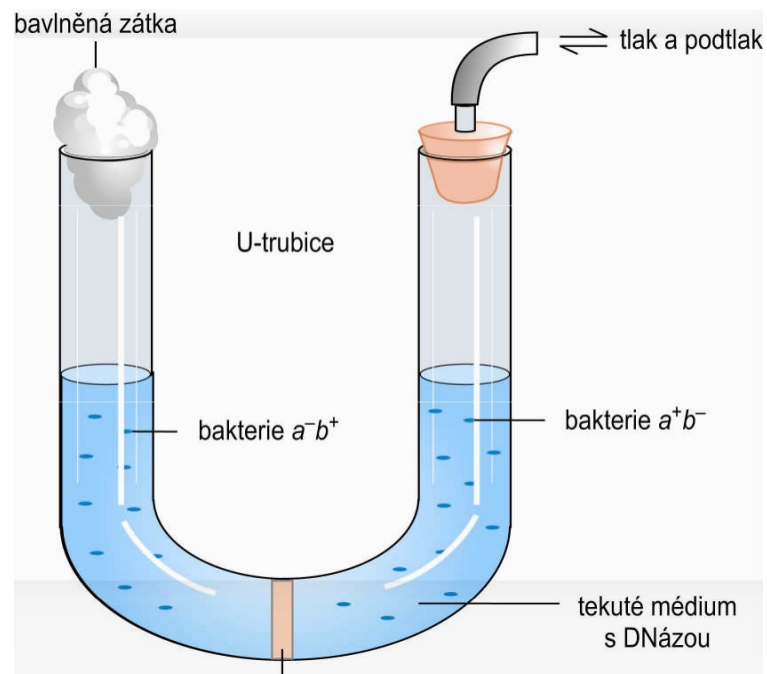
*(Exkonjuganti - v rámci téhož druhu, transkonjuganti - v rámci různých druhů)*

## Přenášené typy elementů (DNA):

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

# KONJUGACE - HISTORIE

1947 – Joshua Lederberg, Edward Tatum – konjugace u *E. coli*, neznali přesnou podstatu konjugace



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

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

(Davies, 1950)

Když se má v novém systému prokázat, že jde o konjugaci, musí se vyloučit alternativní způsoby přenosu, tj. **transformace** a **transdukce**. Pro vyloučení transformace se přidá DNáza, pro vyloučení transdukce se k recipientním buňkám přidá filtrát ze suspenze donorových buněk. Proces konjugace se liší u grampozitivních a gramnegativních bakterií.

# 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

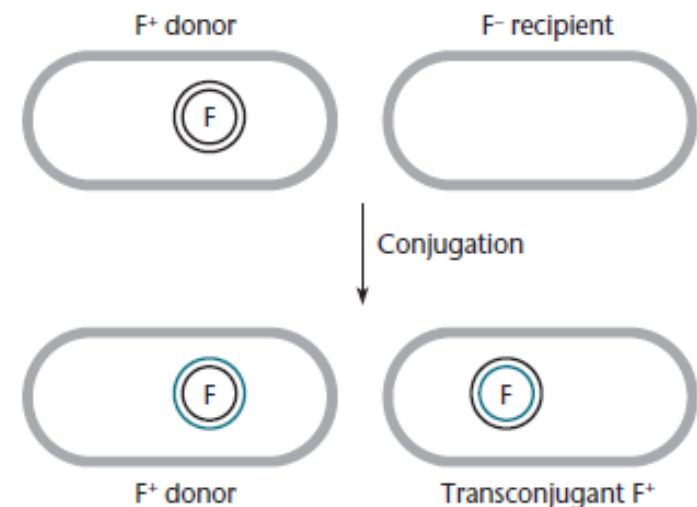


# Konjugace u G-

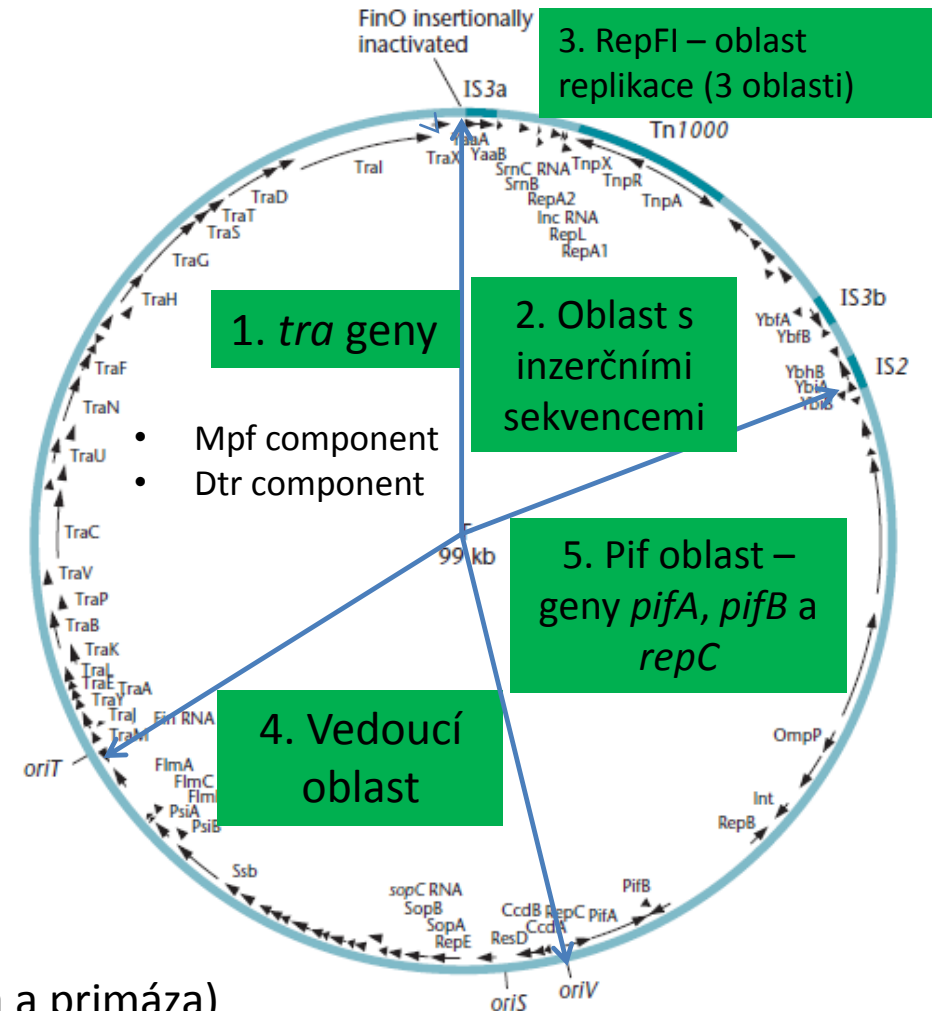
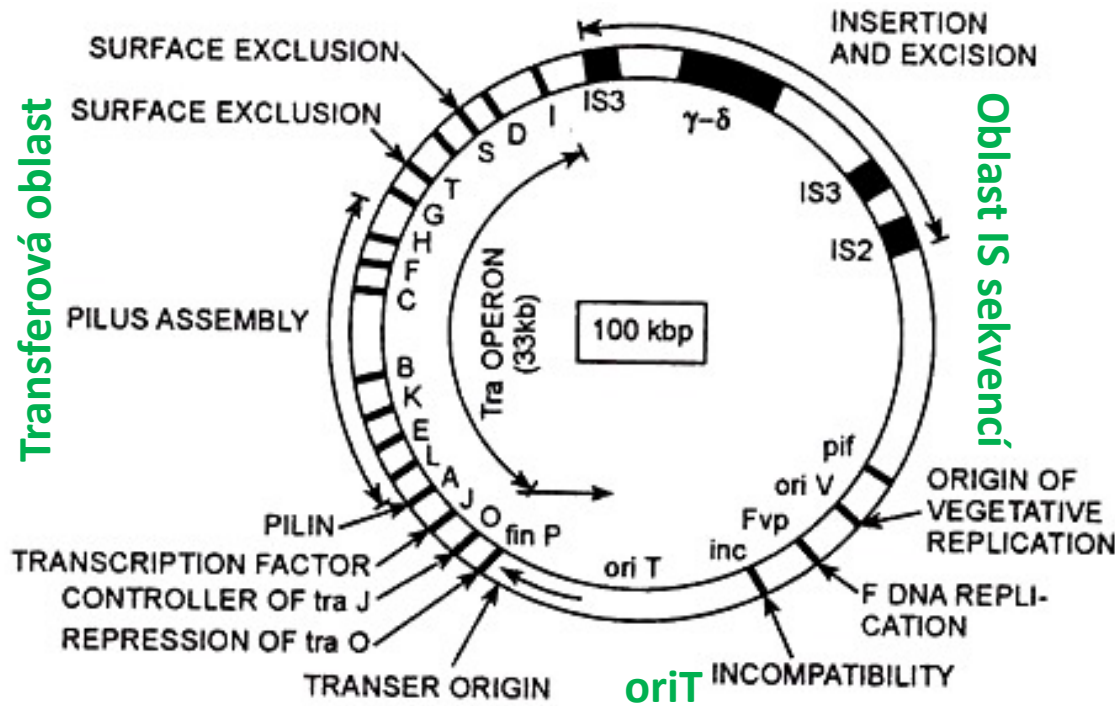
Nejvíce informací bylo získáno studiem přenosu **F plazmidu** a dalších plazmidů ze skupiny IncF u *E. coli*.

Konjugace u konjugativních plazmidů je zprostředkována geny *tra*:

- tvorba pilusů, na vnější straně buněk, nezbytné pro kontakt donorové a recipientní buňky. Pilusy: **flexibilní** (ohebné) a **neohebné** (tuhé)
- plazmid tvoří flexibilní pilusy - používá se tekuté medium
- neohebné pilusy – používá se pevný podklad
- inkubaci přes noc - buňky smyty a přeneseny na selekční medium, kde vyrostou transkonjuganty (exkonjuganty).



# FUNKČNÍ OBLASTI F-PLAZMIDU



TraA – pilin

TraQ – transport pilinu

TraS, T – zábrana spojení F+ buněk (povrchové exkluze)

TraN, G – stabilizace párů

TraY, Z – zlom v oriT

TraD – průchod DNA membránou donora

**Dtr component** = DNA transfer and replication (relaxáza a primáza)

**Mpf component** = „mating-pair formation“ – většina genů

*Samopřenositelné plasmidy vs. Mobilizovatelné plasmidy*

**Table 5.1** Some F plasmid genes and sites

Function	Protein, site, or antisense RNA
Vegetative replication	Origin RepFIA/ <i>oriV</i> site (RepC, RepE) Origin RepFIB/ <i>oriS</i> site (RepB) Origin RepFIC/inactivated origin [RepA2, RepL, Inc (RNA), RepA1]
Regulation of conjugation	FinO, FinP (RNA), TraJ
Mating pair formation (Mpf component)	TraA, TraB, TraC, TraD, TraE, TraF, TraG, TraH, TraK, TraL, TraN, TraP, TraQ, TraV, TraW, TraX
DNA transfer and replication (Dtr component)	<i>oriT</i> site, TraI, TraM, TraU, TraY
Plasmid SOS inhibition	PsiA, PsiB
Surface exclusion	TraS, TraT
Plasmid partitioning	SopA, SopB, <i>sopC</i> site
Postsegregational killing	SrnC (RNA) and SrnB CcdA and CcdB FlmA, FlmC, FlmB (RNA)
Exclusion of T7	PifA, PifB
Transposon functions	IS3a (YaaA, YaaB) Tn1000 (TnpX, TnpR, TnpA) IS3b (YbfA, YbfB) IS2 (YbhB, YbiA, TbiB)
Known function, but unknown relation to conjugation	OmpP, Int, ResD, SsB

# F plazmid

3 počátky replikace:

1. *oriV* – theta replikace
2. *oriS* – není nutný pro životaschopnost, přerušen inzercí Tn1000 – stabilizace F plazmidu
3. *oriT*

Oblast *tra* – dvě komponenty – *Dtr* a *Mpf*

*Dtr*: geny pro přenos DNA a replikaci

*Mpf*: geny pro velkou s membránou asociovanou strukturu - pilus

## TRANSFEROVÁ OBLAST F plazmidu

Oblast obsahuje veškerou genetickou informaci nezbytnou pro přenos (33 kb). Asi 60 genů.

**Geny lze podle funkce rozdělit do 5 skupin:**

- a. Biosyntéza a sestavování F pilusu (*traA,B,C,E,F,G,H,L,K,Q,U,V,W*)
- b. Stabilizace párujících se buněk (*traG,N*)
- c. Konjugativní metabolismus (*traD,I,M,Y,Z*)
- d. Regulace přenosu (*traJ,finO,finP*)
- e. Povrchová exkluze (***traS, traT***)

**TraT** = vnější membránový protein zabraňující stabilnímu spojení buněk obsahujících plazmidy

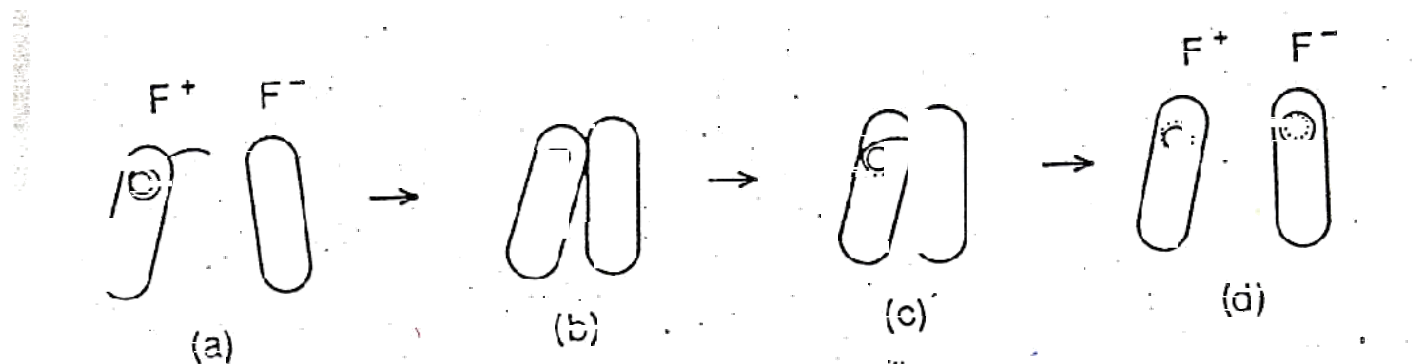
**TraS** = protein vnitřní membrány zabraňující vstupu DNA do buňky při náhodném spojení buněk F+

**Fenokopie F-** = buňky F+, které neexprimují *tra* geny. Lze je připravit např. hladověním.

# PRŮBĚH PŘENOSU PLAZMIDOVÉ DNA PŘI KONJUGACI

## Stádia párování:

1. Donorová buňka naváže kontakt s recipientní pomocí pilusu
2. Následuje přibližování buněk depolymerizací pilusu (retrakce pilusu)
3. Probíhá syntéza plazmidové DNA – chromozom se nereplikuje
4. Dochází k aktivní disagregaci donorových a recipientních buněk



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

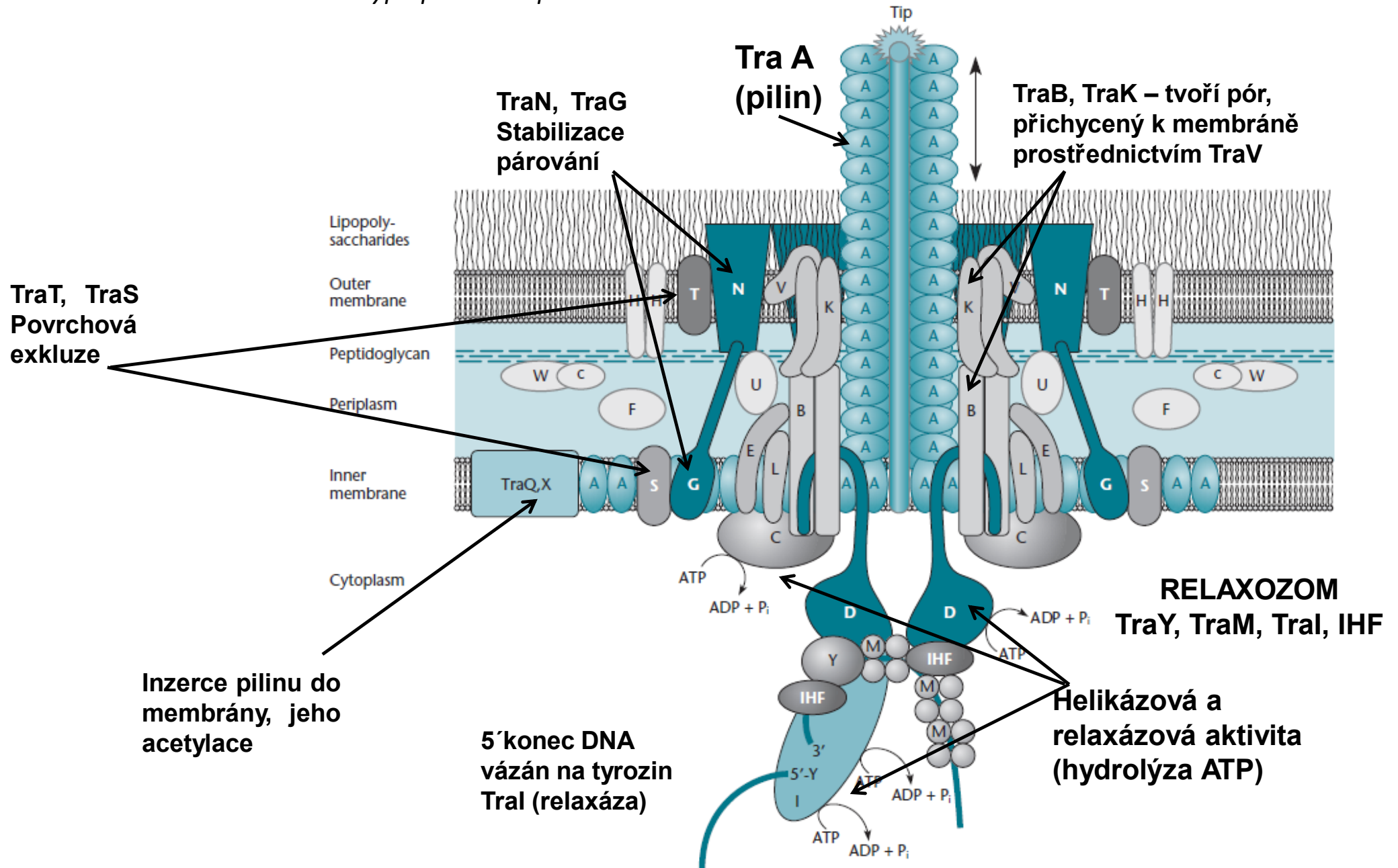
# PRŮBĚH KONJUGATIVNÍHO PŘENOSU DNA

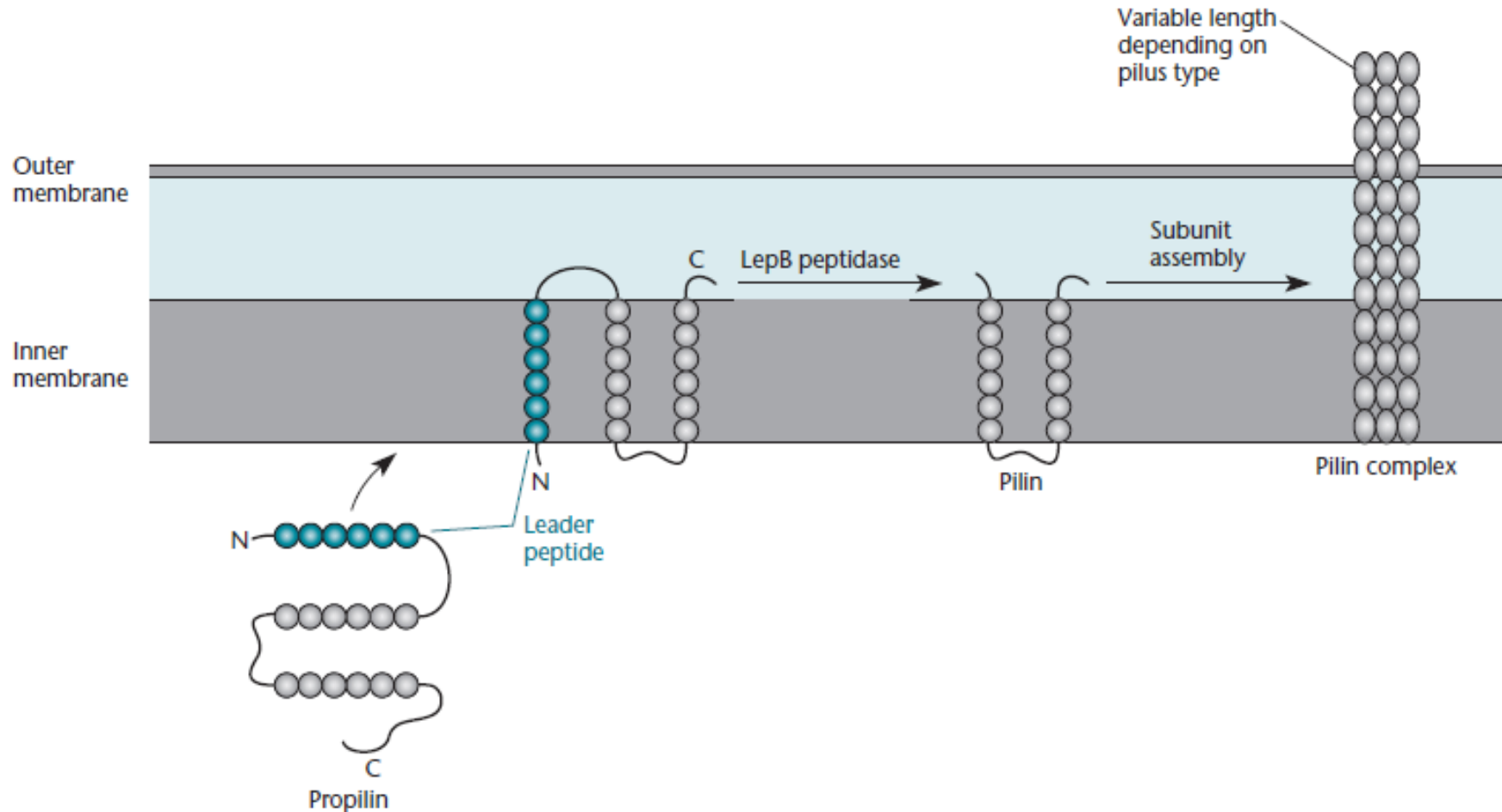
- Dochází k jednořetězcovému zlomu v *oriT* v místě *nic*
- Odmotávání DNA ve směru 5' → 3'
- Přenos jednořetězcové DNA 5' koncem do recipienta
- V donorové buňce je doreplikován komplementární řetězec replikací otáčivou kružnicí
- V recipientu je komplementární řetězec dosyntetizován diskontinuálně
- Cirkularizace DNA v recipientu (v případě přenosu plazmidu)

# Typy pilusů u G- bakterií

Rozlišují se **flexibilní** (ohébné, např. u F plazmidu) a **neohebné** (tuhé) pilusy (např. plazmid PKM101).

*Plazmid Col1b-P9 - tvorba obou typů pilusů dle prostředí*

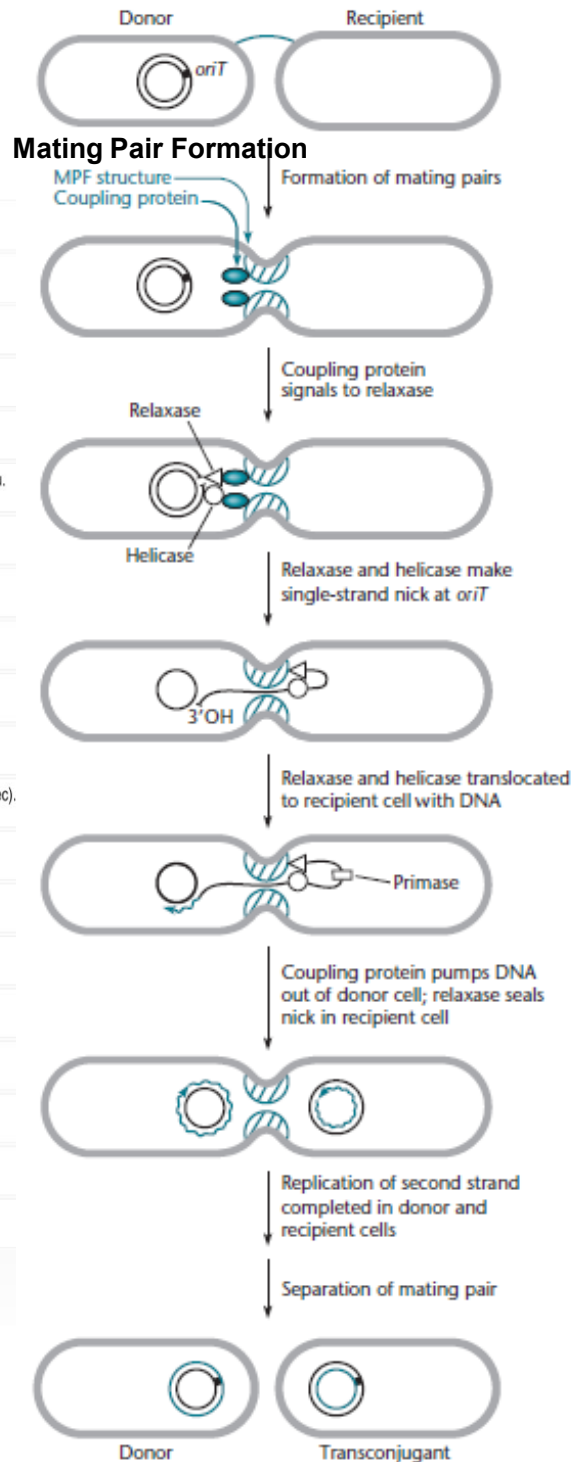
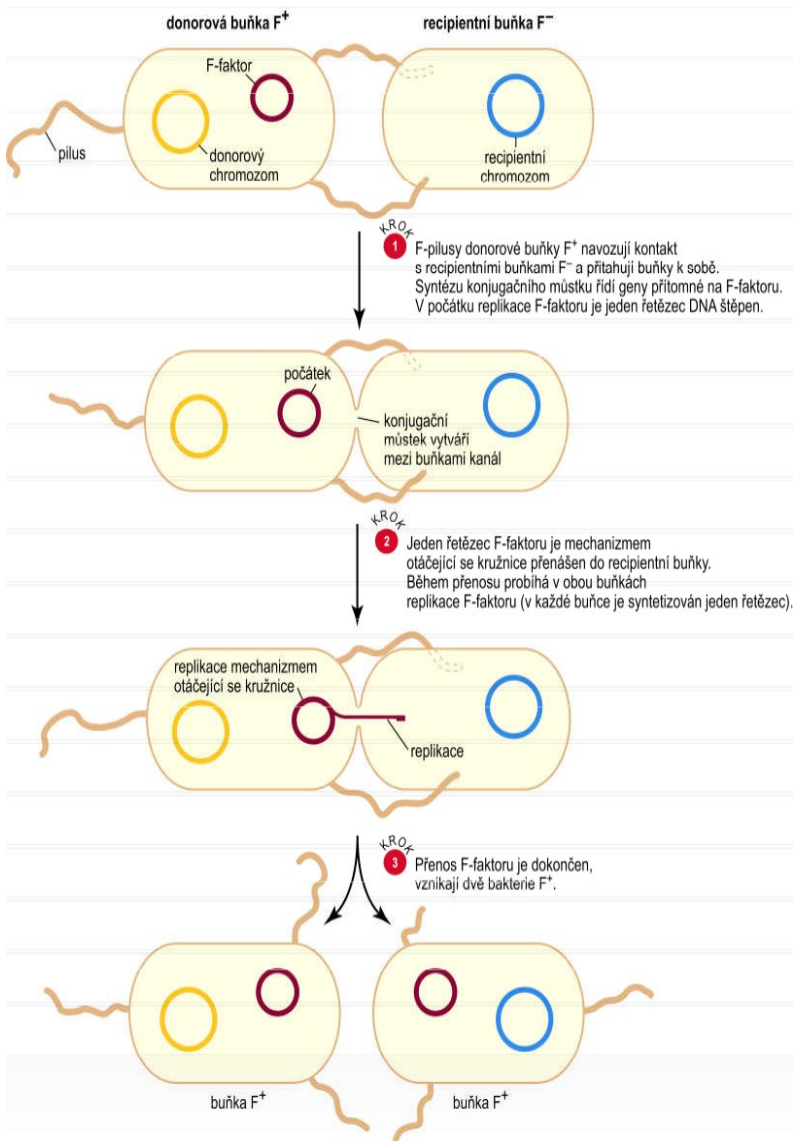




## Sestavování pilu na povrchu buňky

Propilin transportován do vnitřní membrány – LepB peptidáza – Pilin – tvorba Pilinového komplexu





Donorová buňka vytváří pilus, kterým kontaktuje recipientní buňku.

(povaha signálu není známa)

Dochází k vytvoření póru mezi oběma buňkami

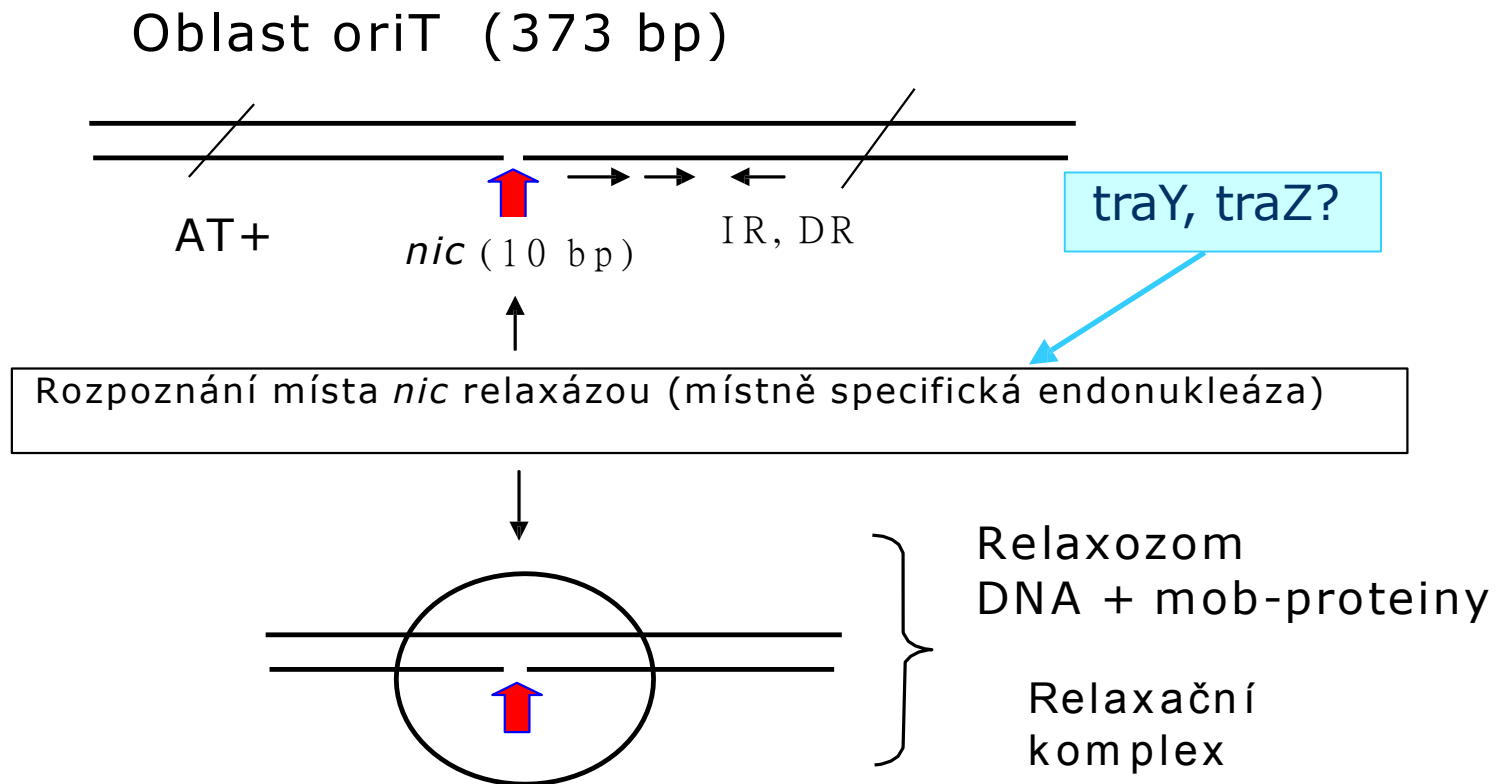
Relaxáza aktivovaná „**coupling**“ **proteiny** vytvoří zlom v **oriT** na DNA

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

**Primáza** (kódovaná plazmidem nebo chromozomem) zahájí syntézu komplementárního řetězce (tvorba RNA-primeru)

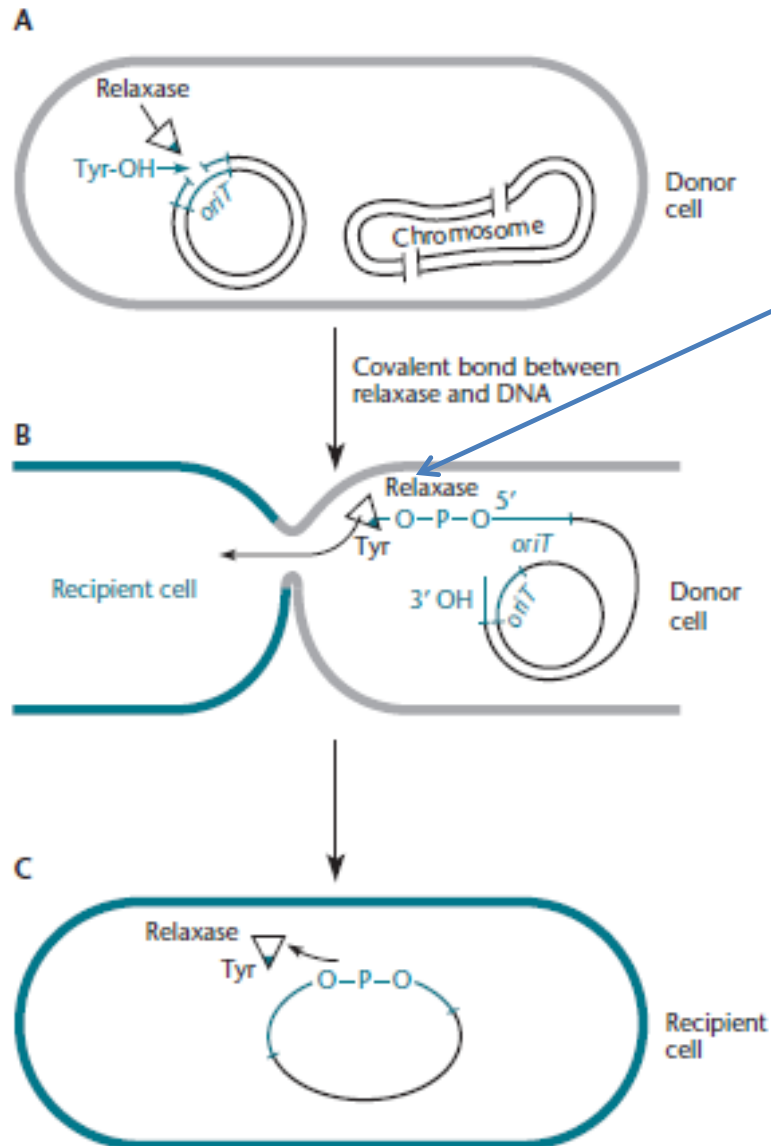
Dochází k separaci donorové buňky a transkonjuganta

# INTERAKCE MÍSTA *NIC* S RELAXÁZOU V MÍSTĚ *oriT* plazmidu *F*



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

# PŮSOBENÍ RELAXÁZY PŘI PŘENOSU PLAZMIDU KONJUGACÍ



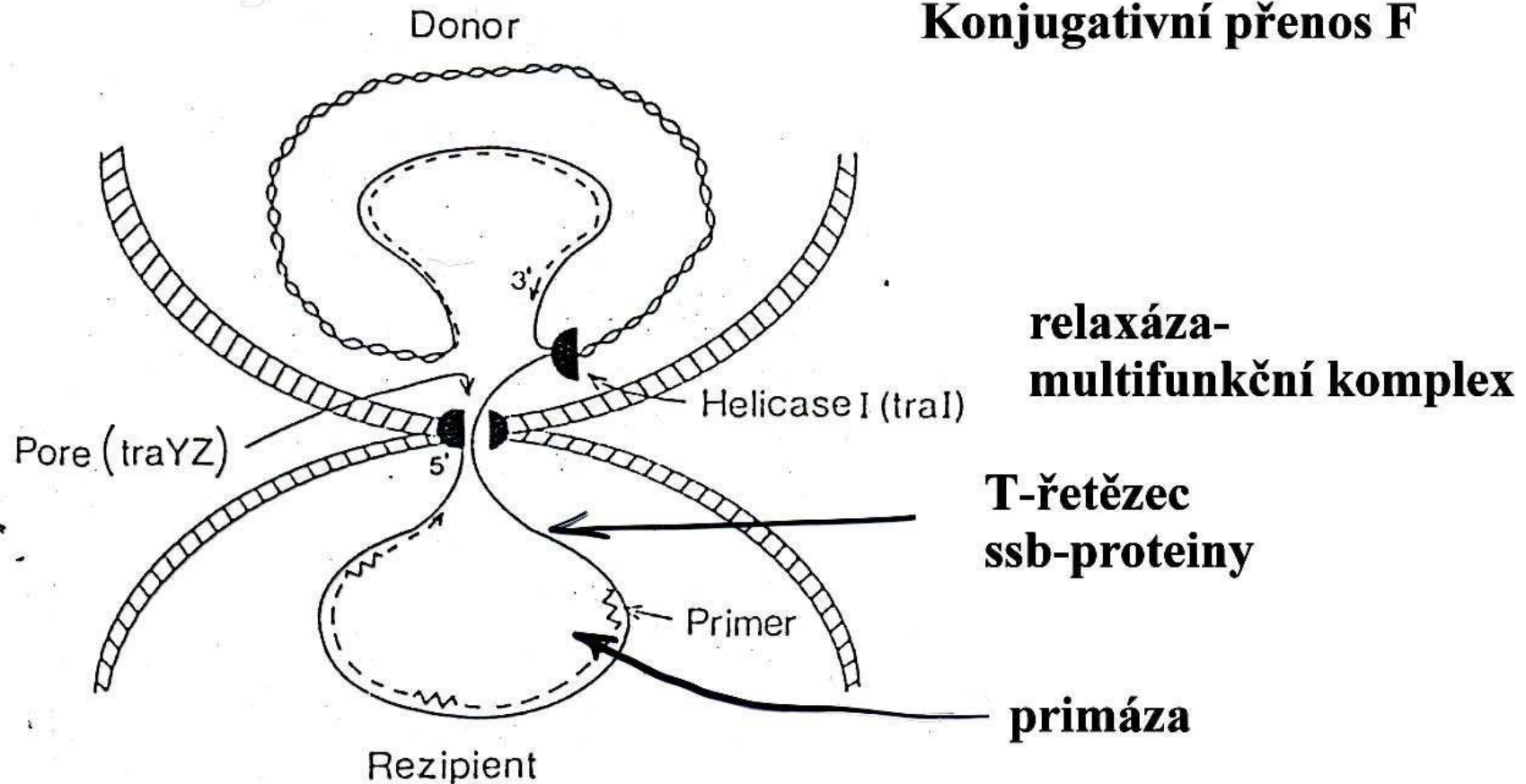
Relaxáza vytvoří zlom v místě *oriT*, 5' fosfát je z DNA přenesen transesterifikační reakcí na tyrozinový zbytek relaxázy

TraM protein se váže na ss zlom a rozšíří mezeru na 200 bp ve směru 5-3. Na tuto mezeru se váže protein Tral (helikáza I), která vytváří další rozmotávání za spotřeby ATP. Tak se rozmotá asi 1200 bp. Jednořetězce jsou stabilizovány vazbou SSB proteinů

Relaxáza vstupuje do recipientní buňky a vtahuje do ní i jednořetězcovou DNA od 5' konce (T-řetězec)

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

## 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 - **diskontinuální syntéza**

# Genetická regulace tra-operonu

**Je řízena dvěma regulačními okruhy:**

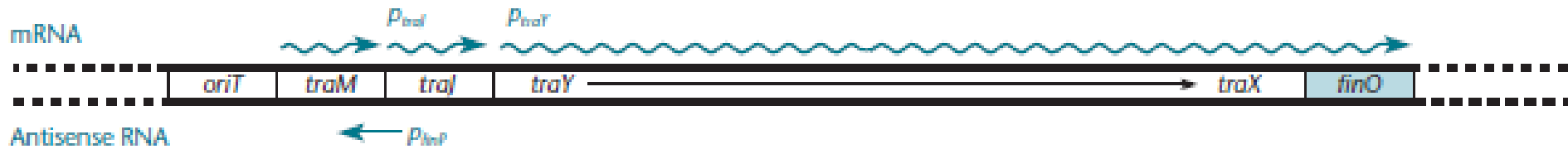
1. Produkty genů *finO* a *finP* regulují expresi genu *traJ* **negativně**
2. Produkt genu *traJ* reguluje expresi genu *traM* a *traYZ* operonu **pozitivně**.

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

TraJ = transkripční aktivátor – protein nutný pro RNA syntézu



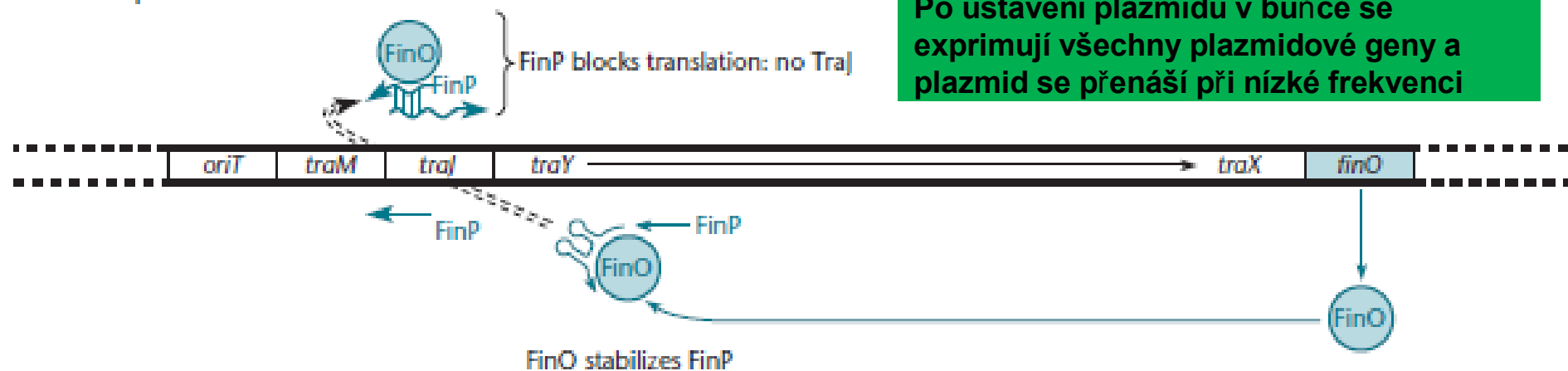
B Immediately after entry into cell

Nově vzniklý konjugant přenáší plazmid do dalších buněk s vysokou účinností

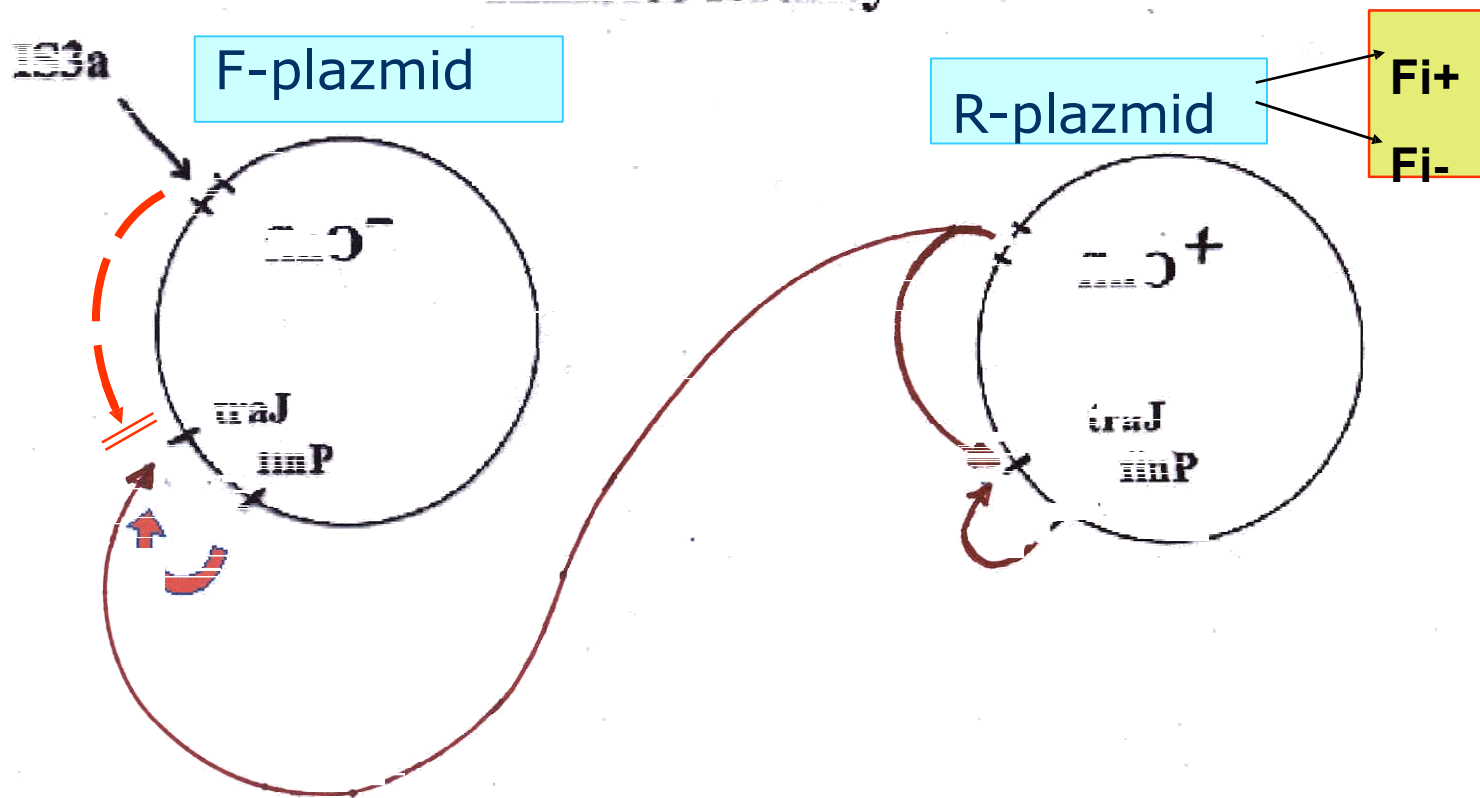


C After plasmid establishment

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



## Inhibice fertility

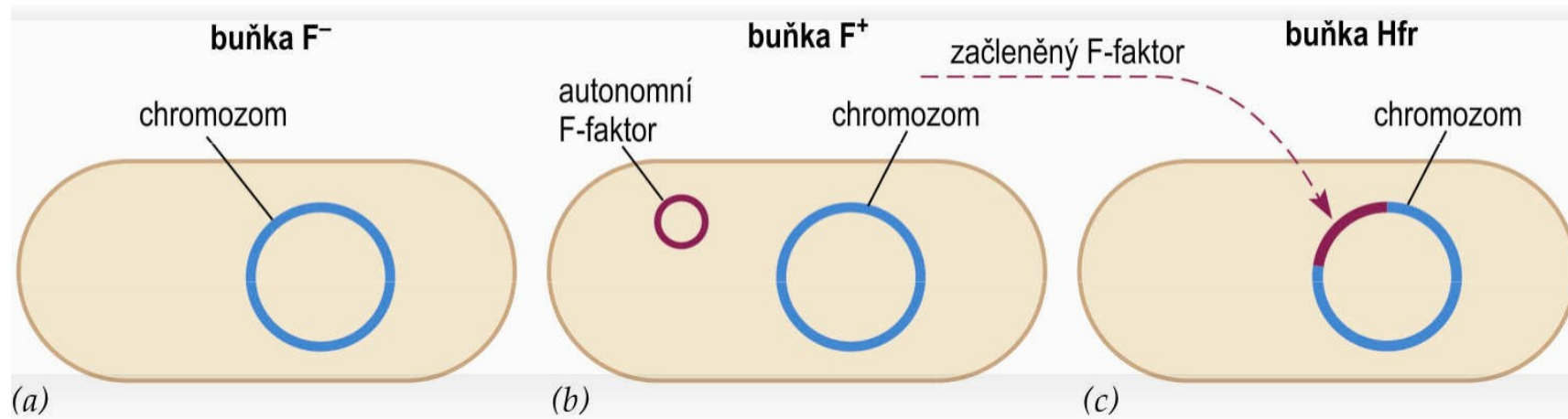


$\text{finO}$  = negativní regulátor --- represor

$\text{finP}$  = negativní regulátor --- antisense RNA

$\text{F} = \text{crd} = \text{derepressed mutant plasmid}$

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



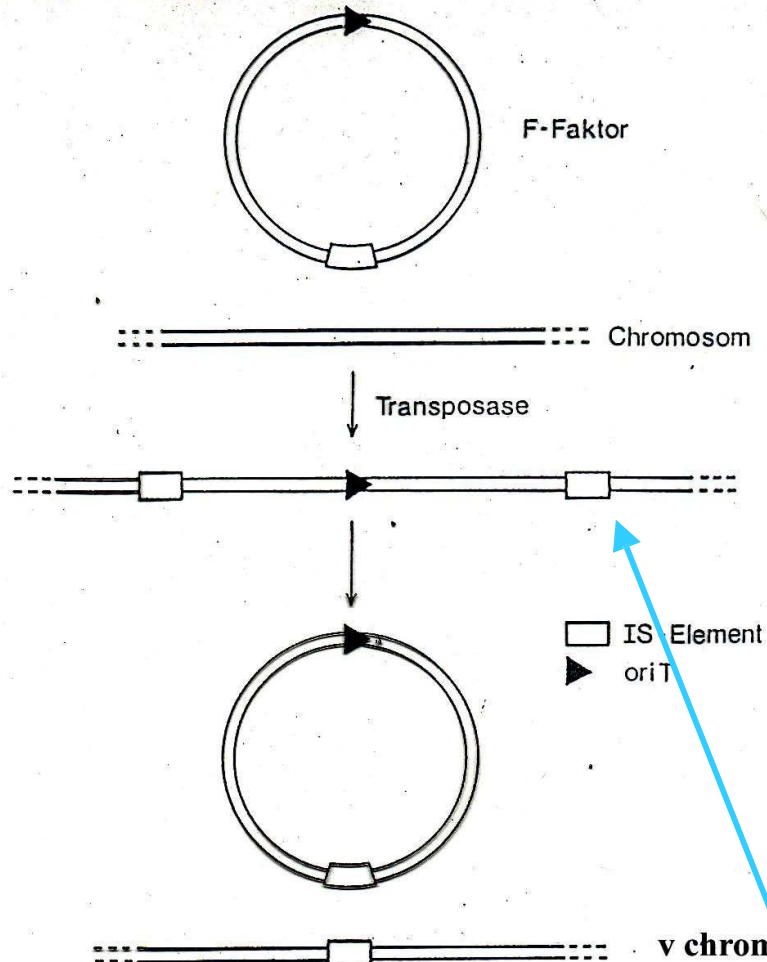


# ZPŮSOBY ZAČLENĚNÍ F PLAZMIDU DO CHROMOZOMU

V chromozomu přítomnost IS2 a IS3 elementů – možnost homologní rekombinace, frekvence integrace nebo excize  $10^{-4}$

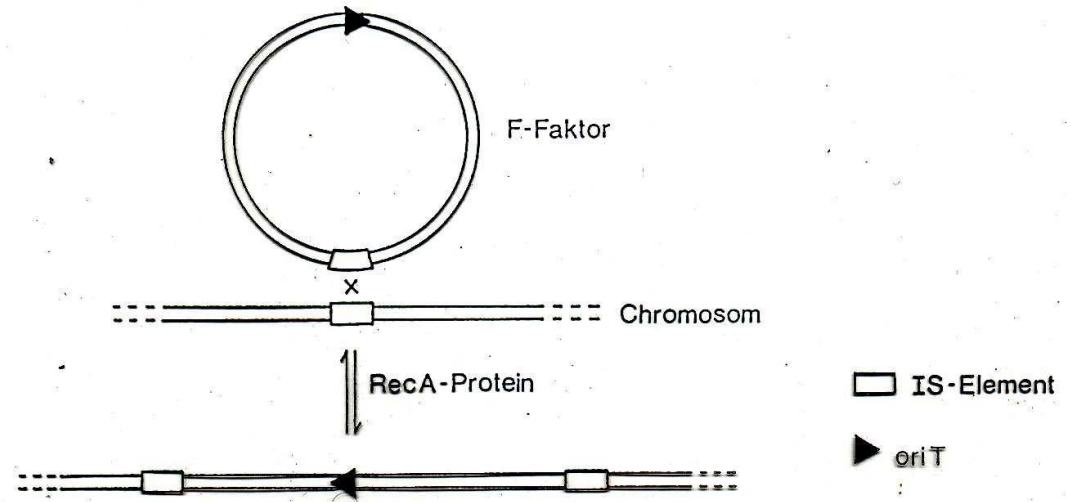
integrace nezávislá na RecA

transpozice

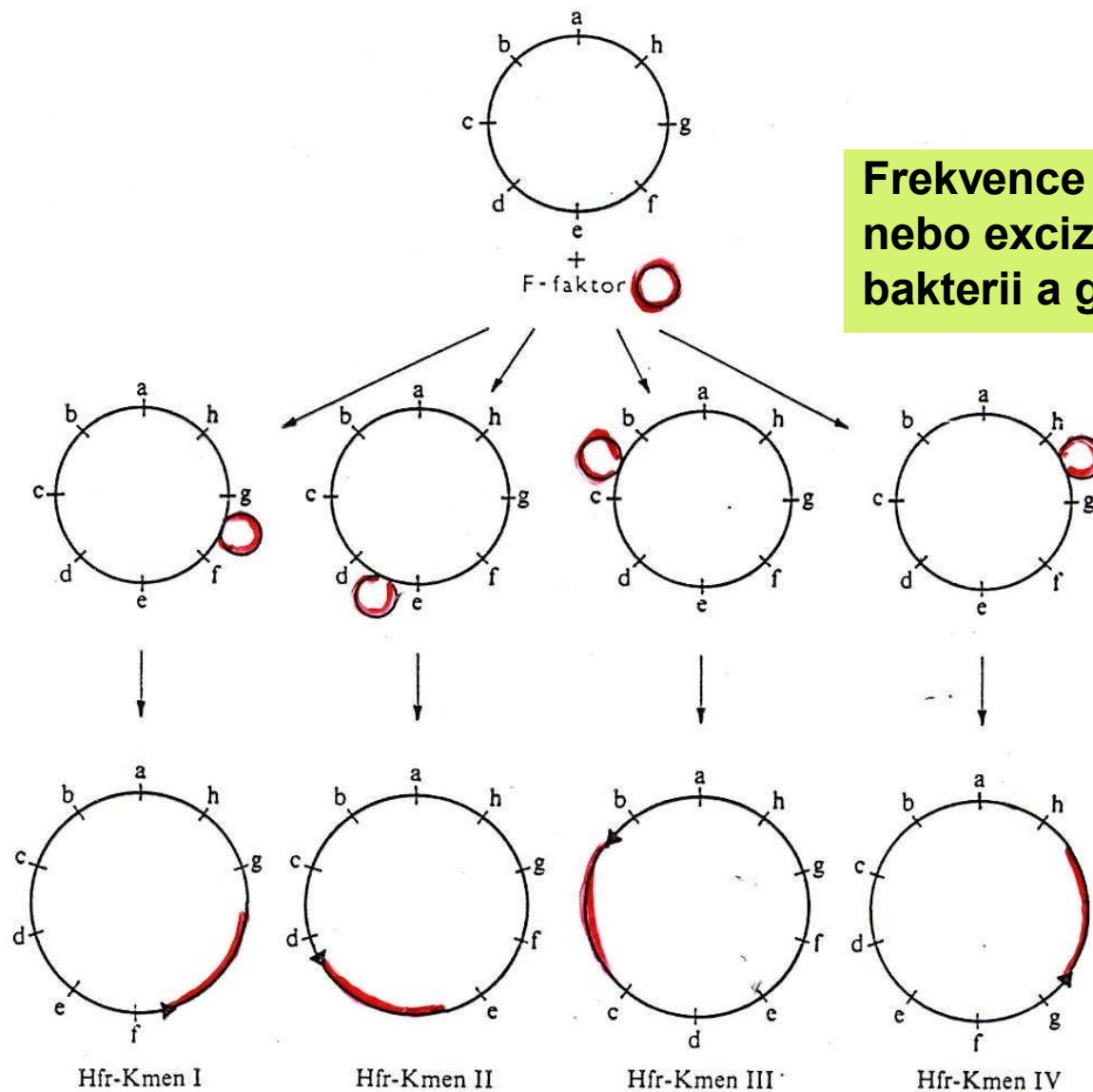


integrace závislá na RecA

homologní rekombinace

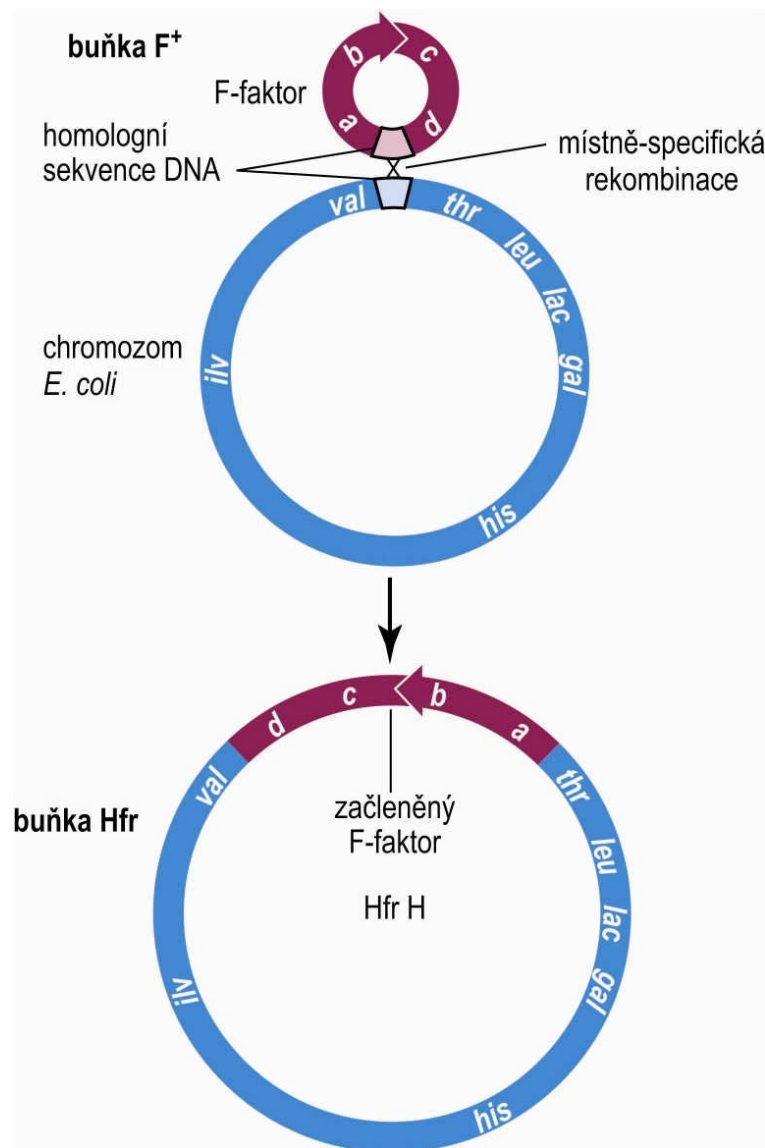


## Vznik kmenů Hfr začleněním F plazmidu do různých míst chromozomu E. coli. Začlenění probíhá v místech IS.



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

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

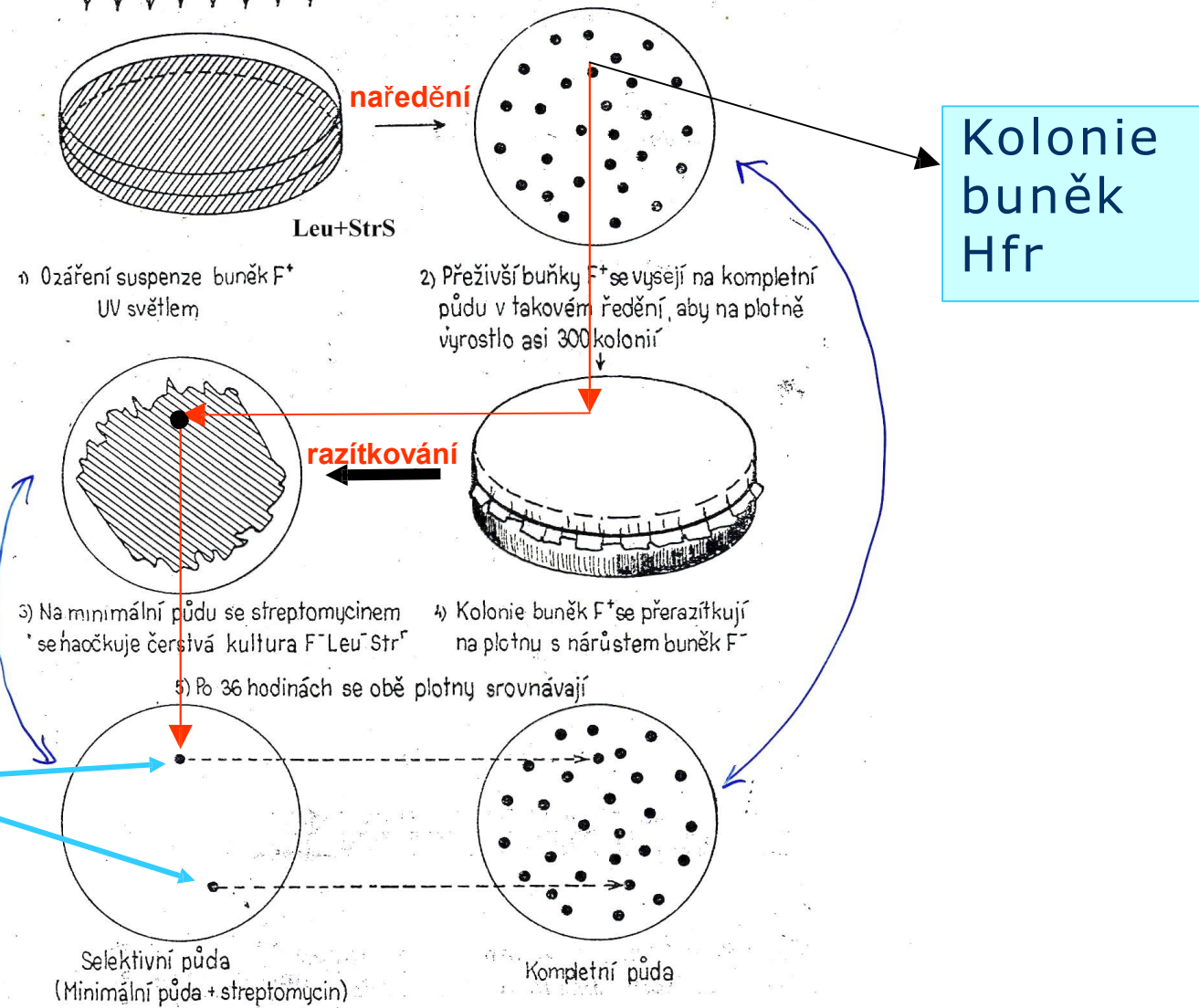


# IZOLACE KMENŮ HFR

F+ = Leu+ StrS

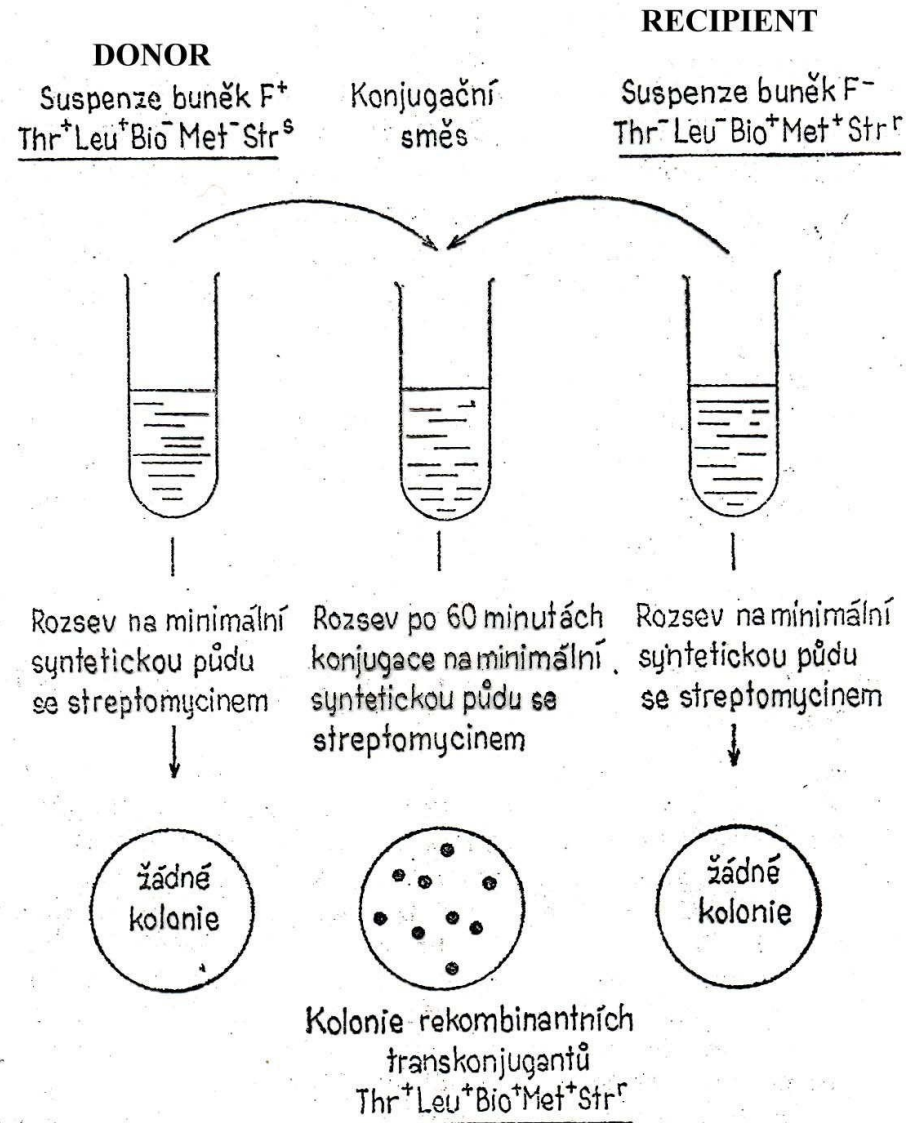
F- = Leu- StrR

Rekombinanty  
= Leu+ StrR



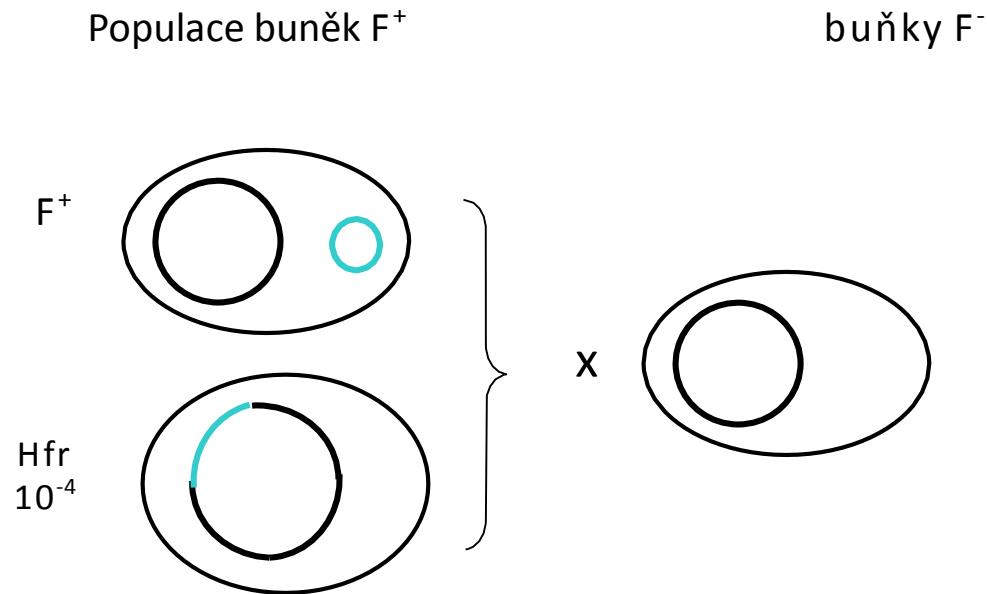
Místa na minimální půdě vyznačující se hustým nárůstem představují rekombinanty Leu<sup>+</sup>Str<sup>r</sup>, které vznikly konjugací buněk F<sup>-</sup> s buňkami Hfr přenesenými na plotnu razítkem

### Křížení kmene F+ a F-



Za vznik rekombinantů jsou zodpovědné buňky Hfr

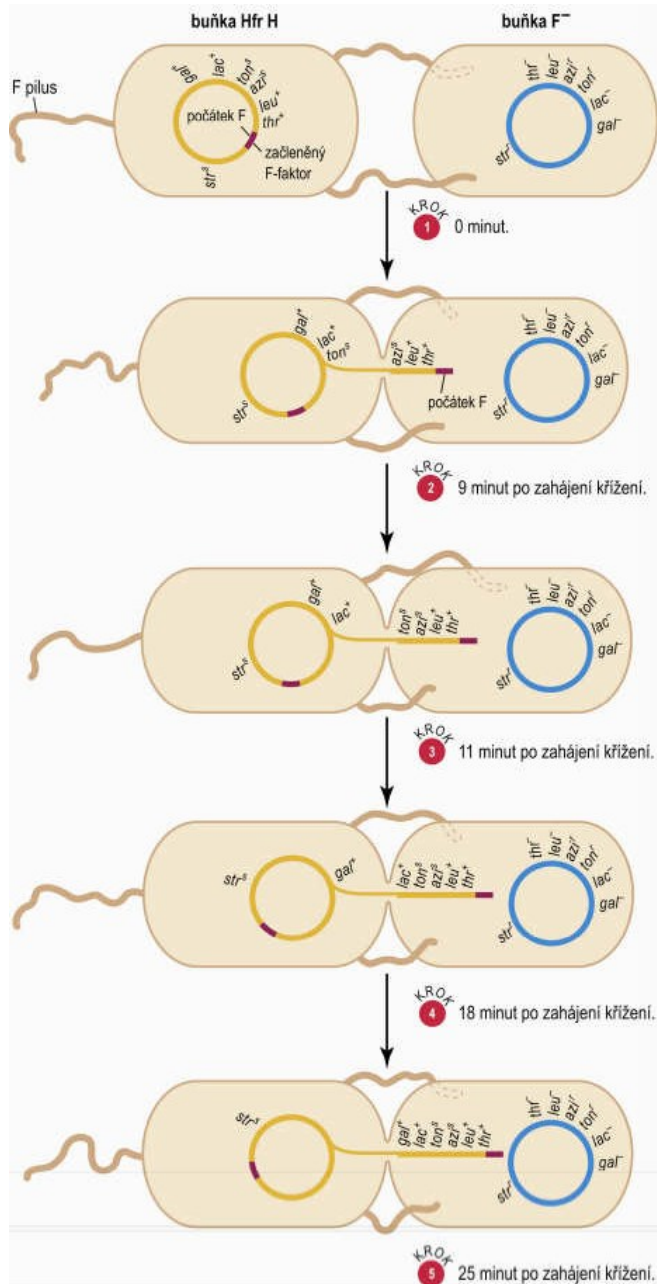
# Křížení kmenů $F^+ \times F^-$



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



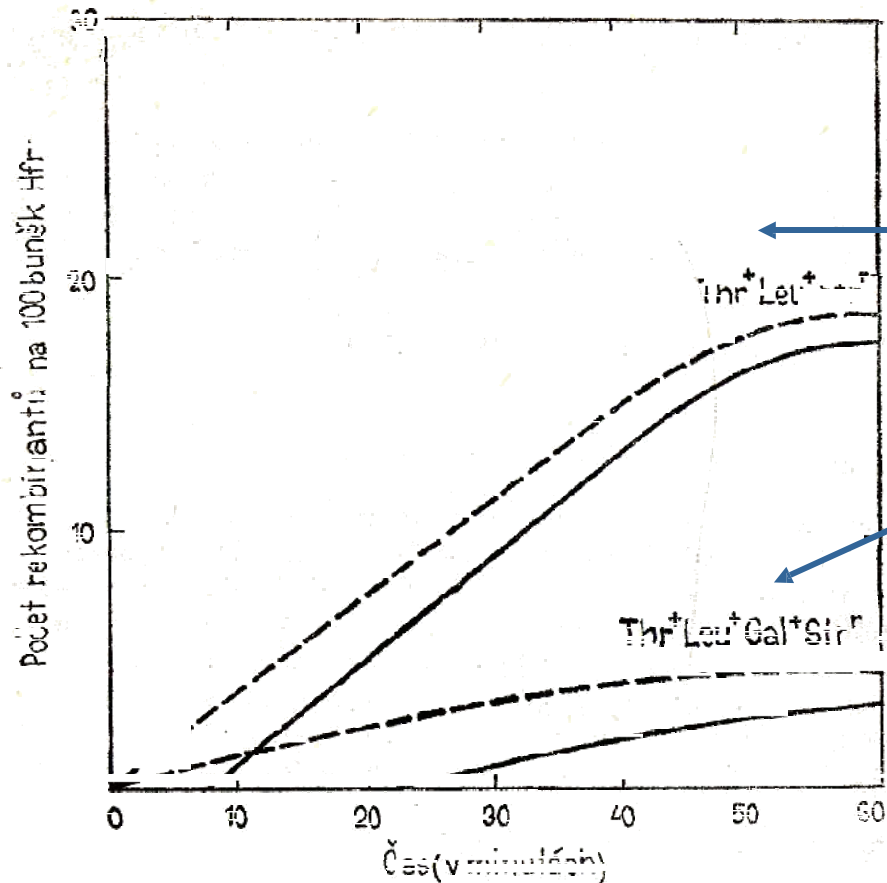
# Křížení přerušovanou konjugací



## 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 přenesené geny stejná

Analýza 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 thr a leu přenášené jako první (vysoká pravděpodobnost přenosu)

Gen gal a další přenášené později (nízká pravděpodobnost přenosu)

Křivky vycházejí ze sledování průběhu konjugace v populaci

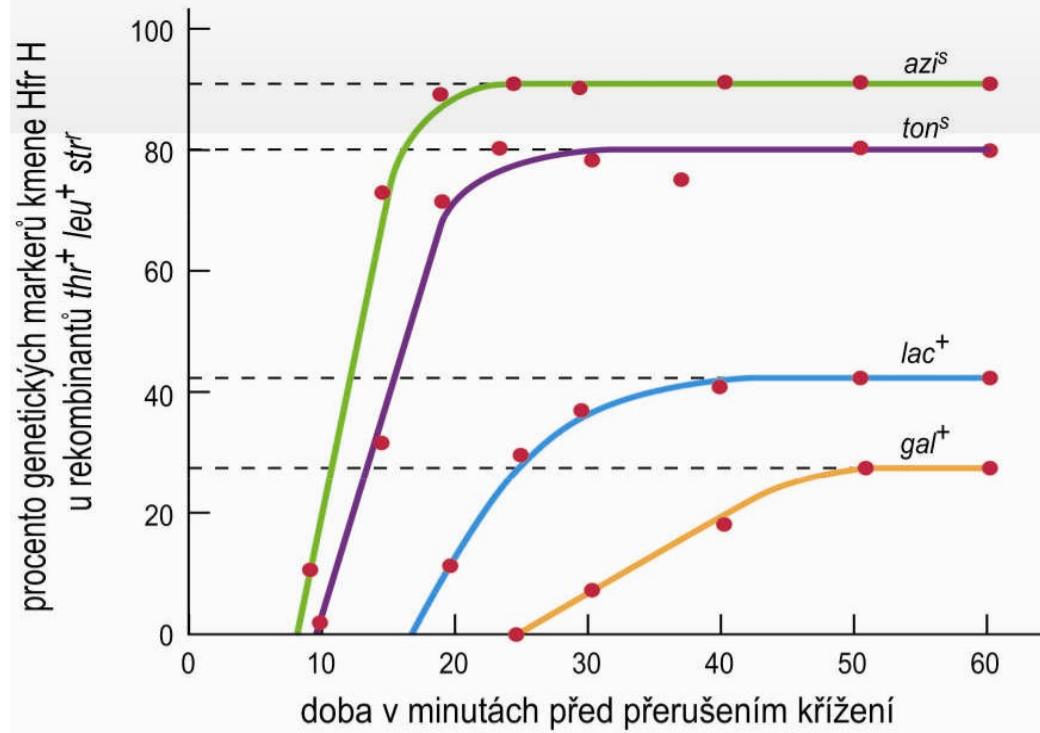


Geny, které se nezačlení



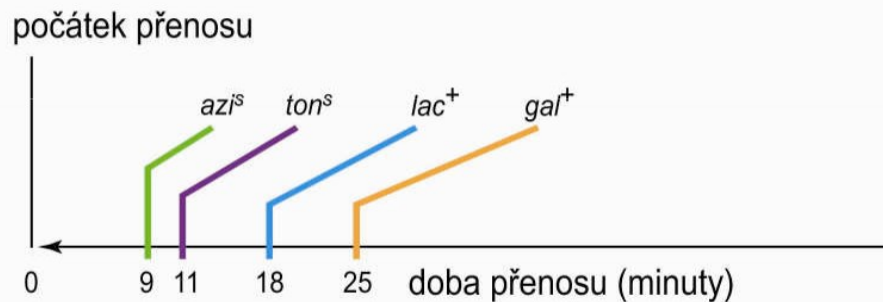
# Četnost neselektovaných markerů u rekombinantů *thr+* *strR* při přerušované konjugaci jako funkce časového intervalu, v němž bylo křížení přerušeno

## shrnutí výsledků

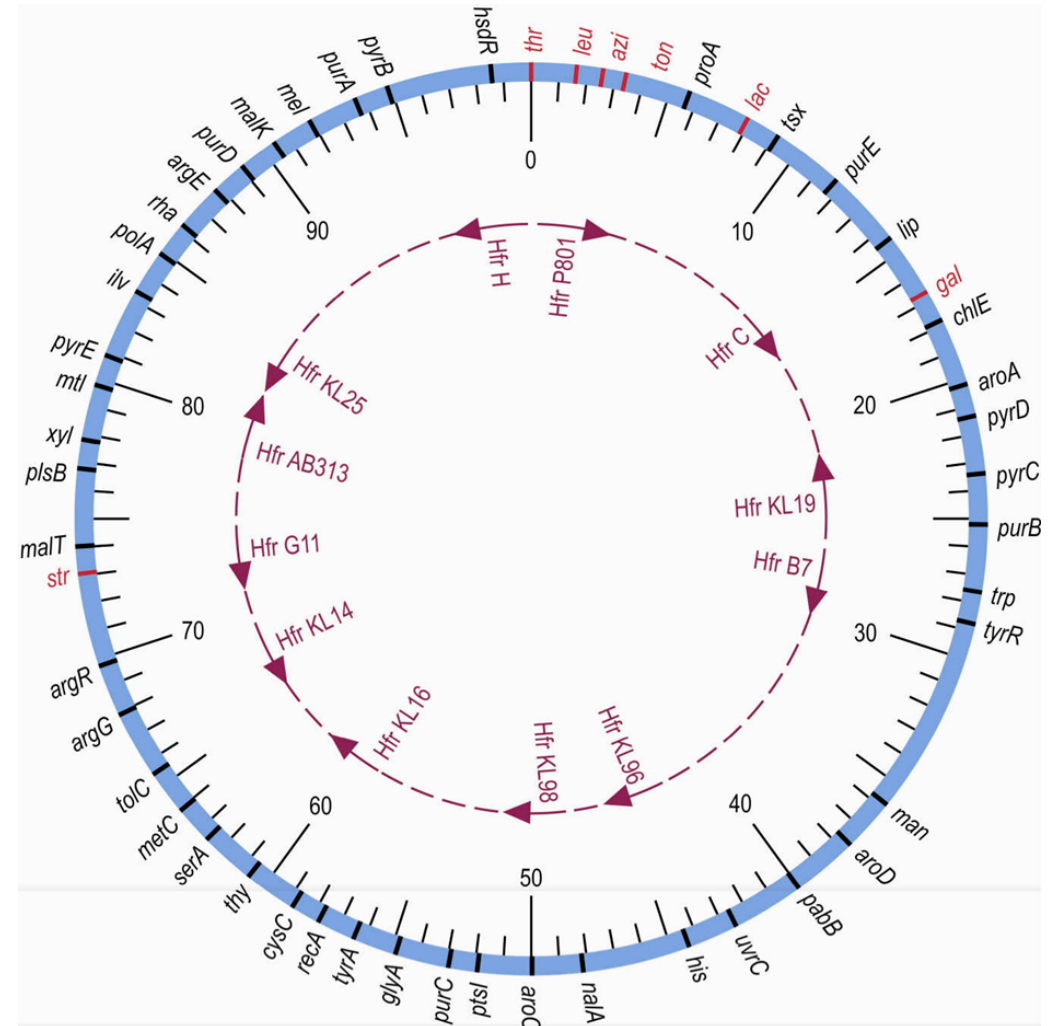


(a)

## interpretace výsledků



(b)



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

Sledování frekvence rekombinantů při použití různých kmenů Hfr

### Konkrétní příklad nepřerušované konjugace

Křížení:

HfrH<sup>+</sup> 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, lak, 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

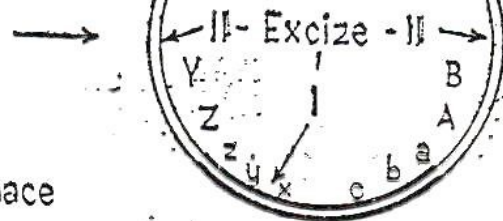
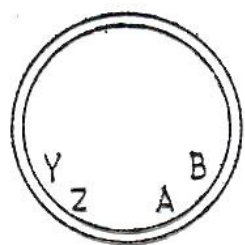
$$\text{FREKVENCE REKOMBINANTŮ} = \frac{\text{počet rekombinantů daného typu}}{\text{počet buněk Hfr}}$$

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

Bakteriální chromozóm



Rekombinace

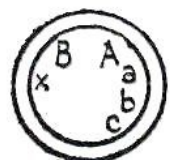


F plazmid

Excize typu I

Excize typu II

typ I

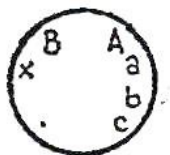


F' plazmid

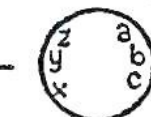
typ II



Denaturace

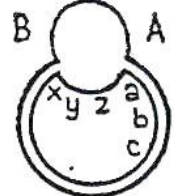


Renaturace s F

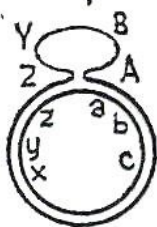


F plazmid

Heteroduplex se substituční smyčkou



Heteroduplex s deleční smyčkou



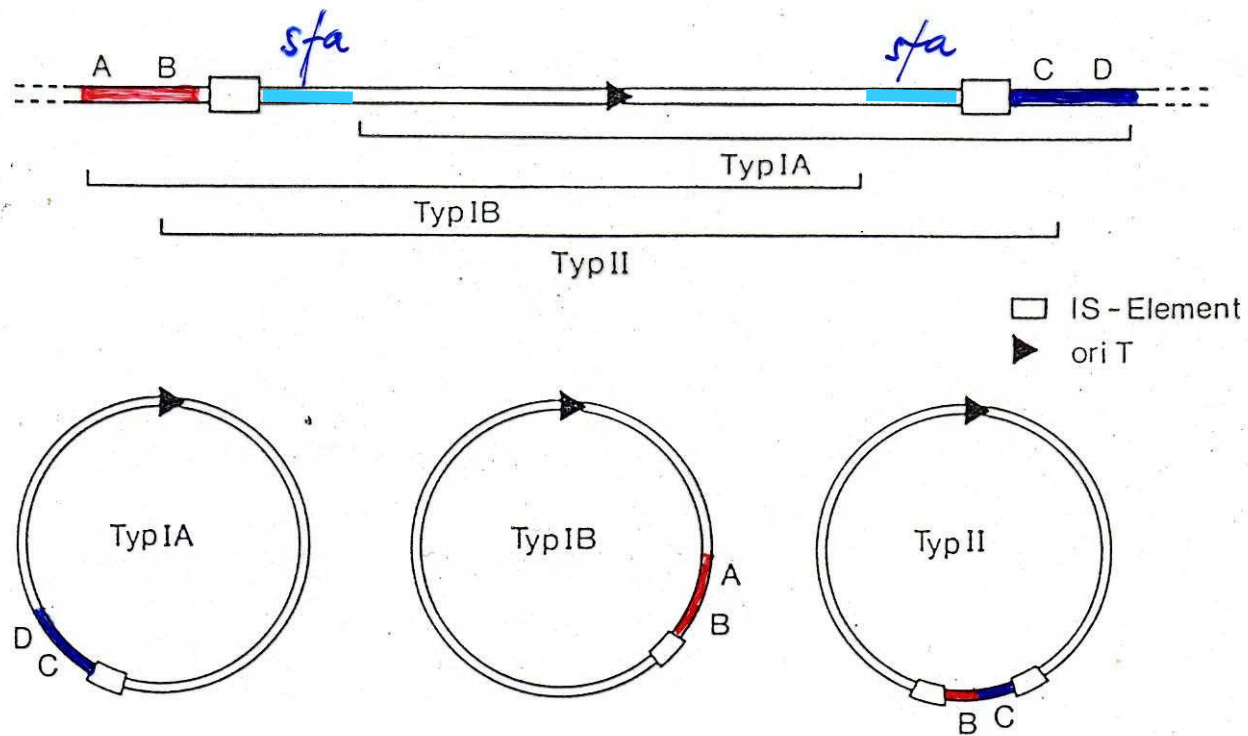
## Vznik plazmidů F'

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%

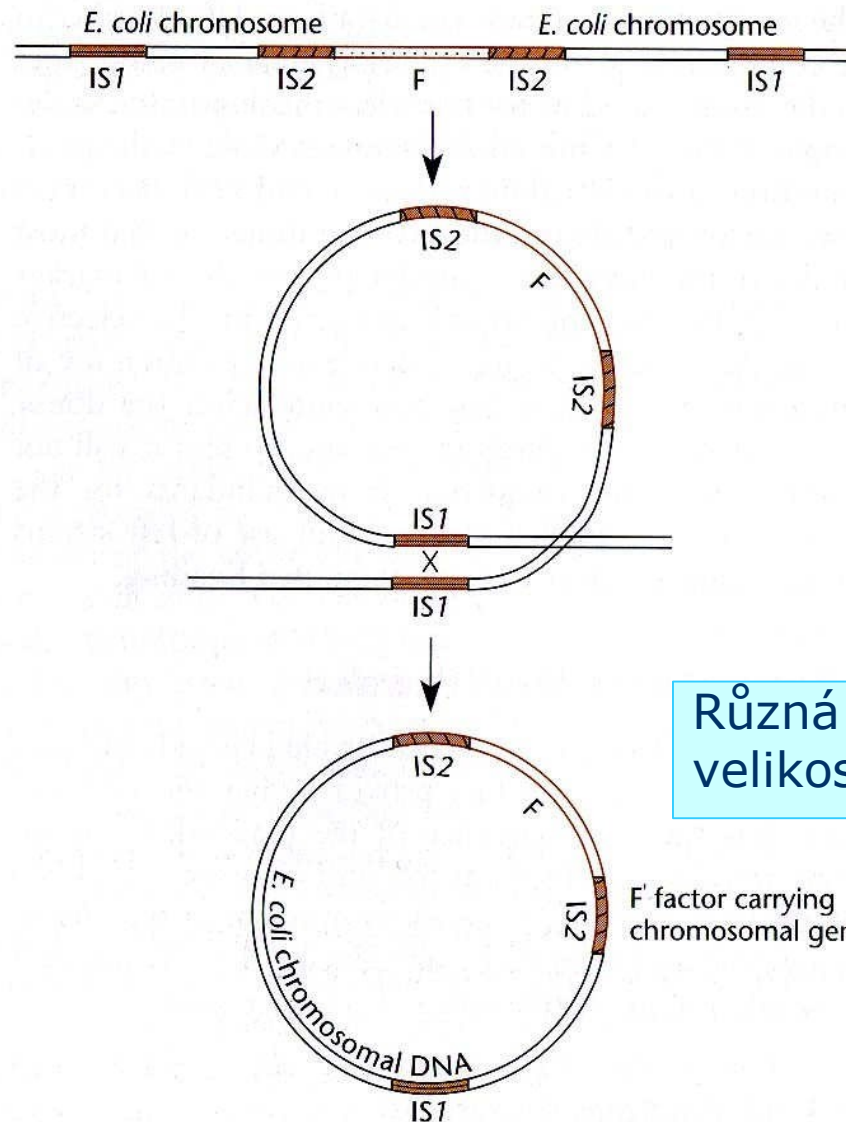
## Vznik plazmidů F'



v chromozomu zůstává část F plazmidu

sfa = Sex factor affinity

# VZNIK F' PLAZMIDŮ HOMOLOGNÍ REKOMBINACÍ MEZI IDENTICKÝMI IS ELEMENTY

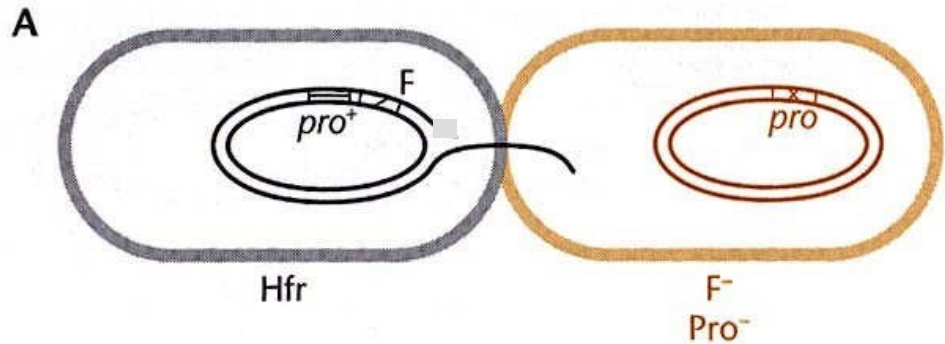


Různá konstituce a velikost F' plazmidů

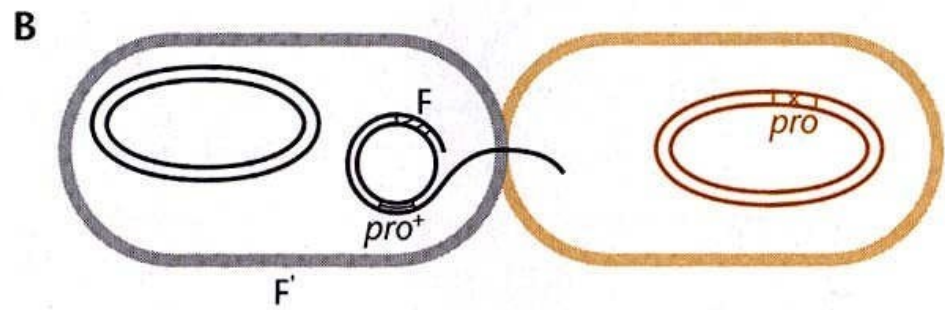
F' factor carrying chromosomal genes



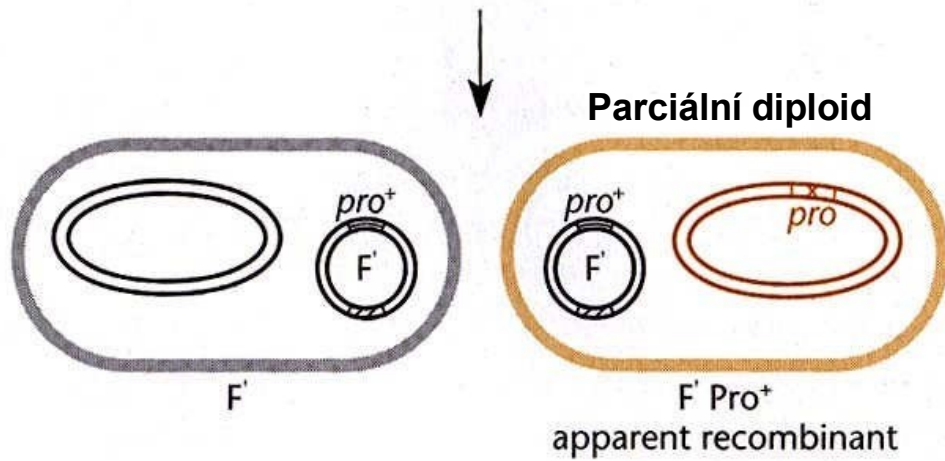
# SELEKCE F' PLAZMIDU NA ZÁKLADĚ ČASNÉHO PŘENOSU **pozdního** MARKERU



A. Kmen Hfr přenáší gen *pro* jako pozdní marker. Při křížení s kmenem F- bude gen *pro* přenesen zhruba po 60 minutách.



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

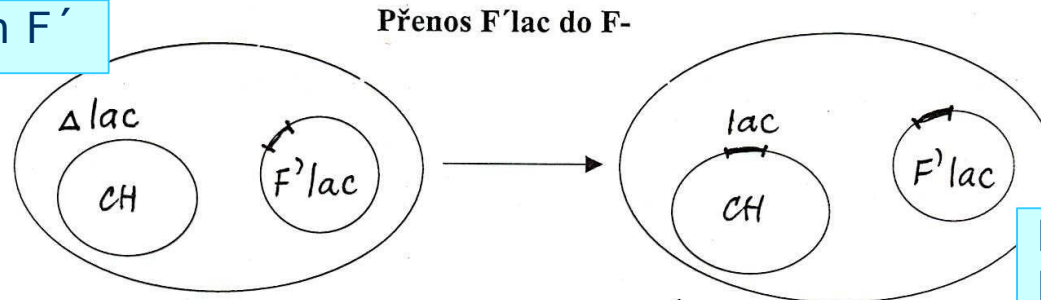


**Další možnost:  
použití recipienta  
 $recA^-$**

**Citliví k fágu M13**

# VZNIK DRUHOTNÝCH KMENŮ F'

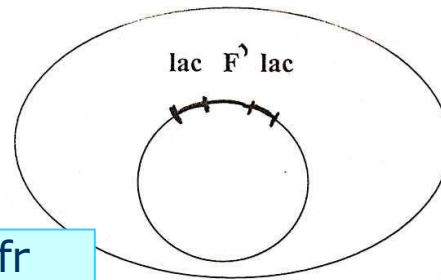
Prvotní kmen F'



Druhý kmen F' je diploidní pro alelu přenesenou F' plazmidem

Heterogenot F' lac/lac  
Intermediární donor

Přechod do stavu Hfr  
(vysoká frekvence)



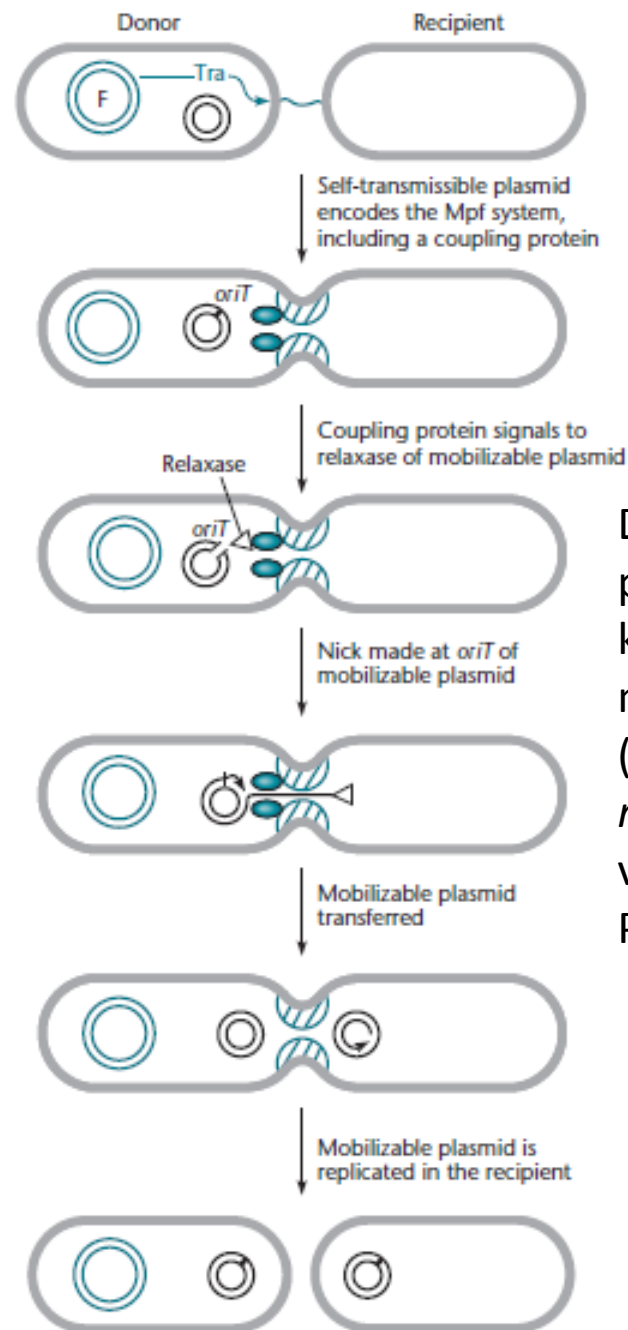
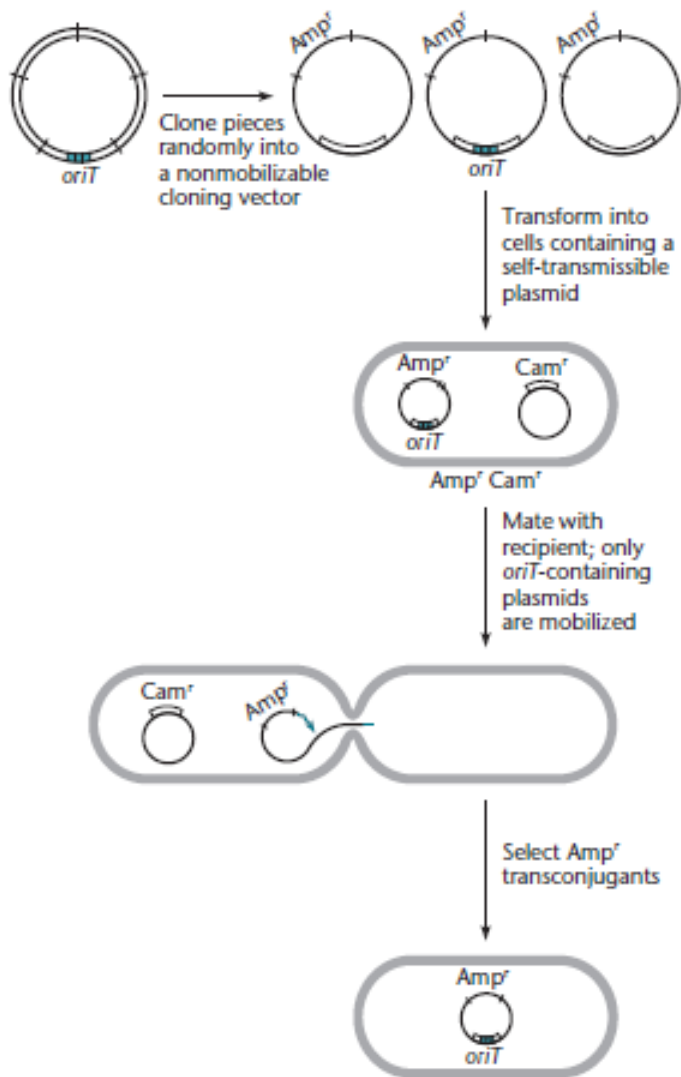
Chová se jako Hfr

Přenos F' lac

V recipientu dochází s vysokou frekvencí k začleňování F' lac do chromozomu a nebo výměně alely nesené F' (pak záměna alel)

Přenos chromozomu

# MOBILIZACE



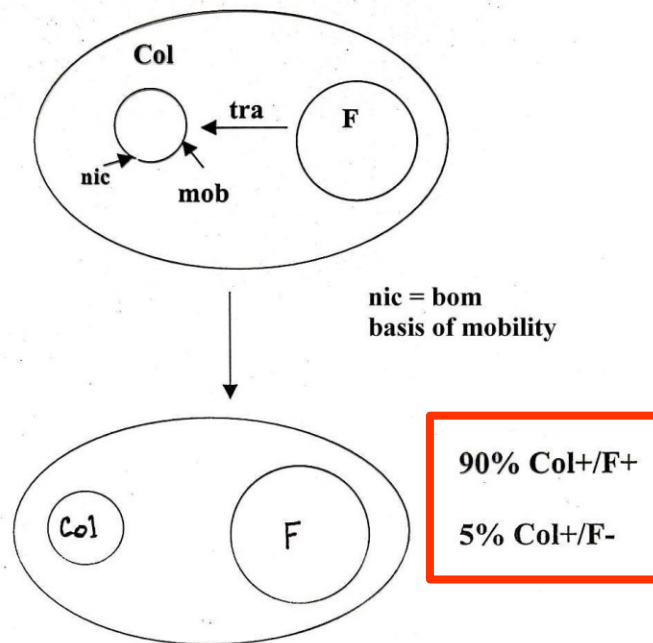
Donorová buňka obsahuje dva plazmidy. F plazmid s *tra* geny – kontakt a přenos; a mobilizovatelný plazmid (modře).  
*mob* geny – jednořetězový zlom v *oriT*  
Přenos obou plazmidů.

Identifikace *oriT* na plazmidu.  
Části plazmidu klonovány do nepřenositelného vektoru s vhodným selekčním markerem (*Amp*).

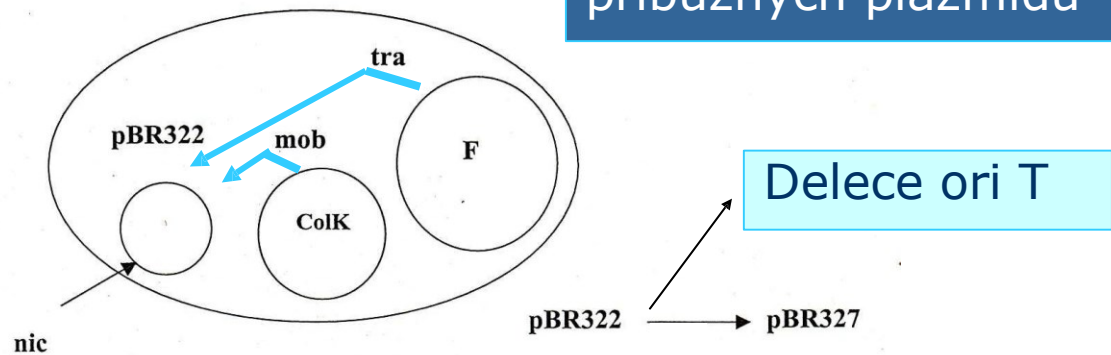


# MOBILIZACE NEKONJUGATIVNÍCH PLAZMIDŮ DONACÍ

Nedochází k fyzickému kontaktu plazmidů

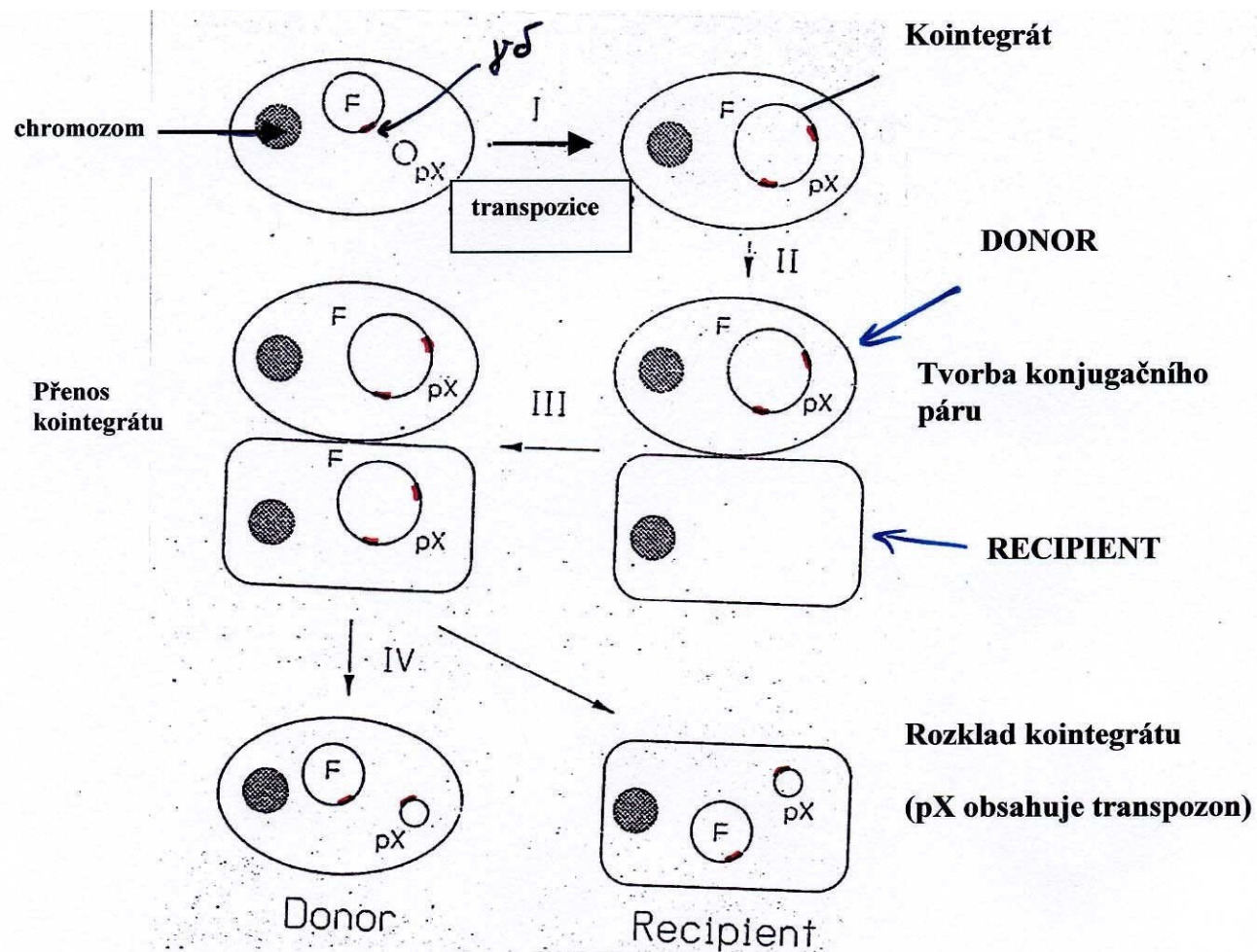


Mobilizace prostřednictvím příbuzných plazmidů



# 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<sup>+</sup> 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. Plazmidy stejně jako u G- kódují vlastní relaxázu a *oriT*. Plazmidy kódují geny pro postsegregační usmrcování buněk a partitioning. Kódují virulentní determinanty a geny pro ATB rezistenci, obsahují transpozony. Poskytují selekční výhodu hostitelským buňkám.

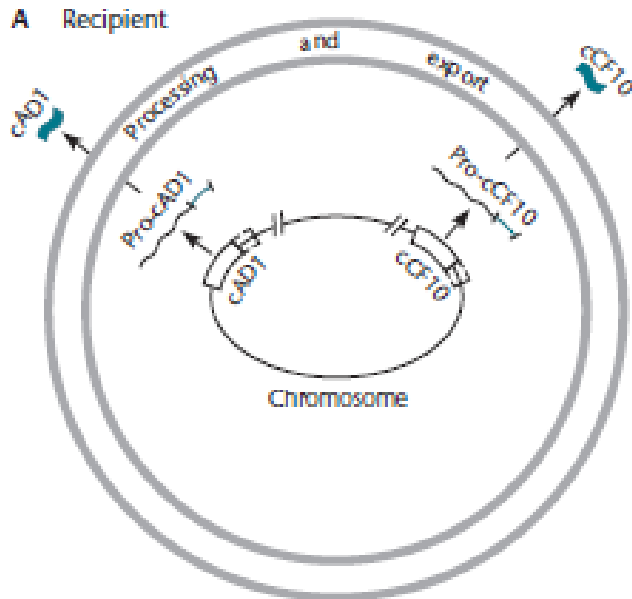
Hlavní rozdíl v Mpf systému (chybějící vnější membrána u G+).

Recipientní buňky produkují feromonům podobné látky – kontakt s donorovou buňkou.

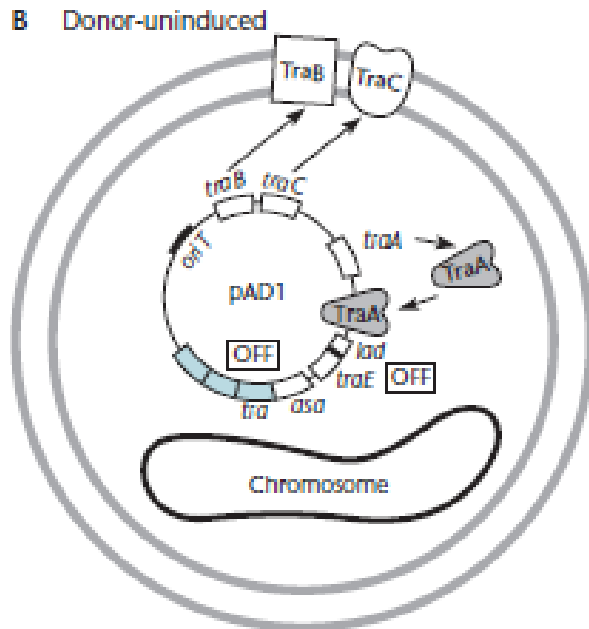
FEROMONY = malé peptidy stimulující párování buněk, exprese *tra* genů

Zisk plazmidu vede k zastavení exprese genů pro FEROMONY.

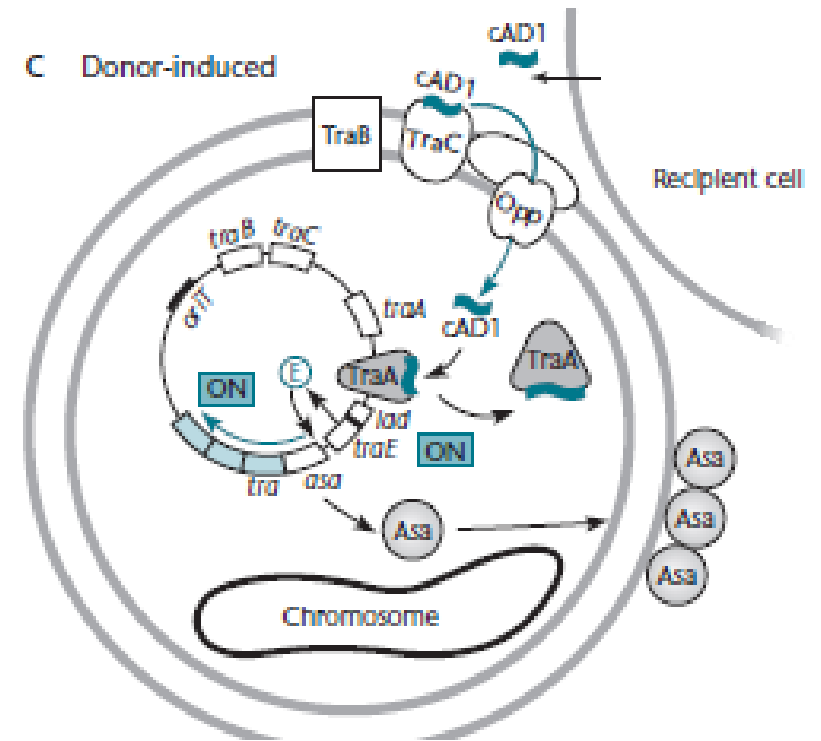
# ROLE FEROMONŮ V PŘENOSU PLAZMIDŮ



A. Feromony lokalizované na chromozomu recipienta. Pro-feromony → Feromony



B. Plazmid donora exprimuje TraA – represor *tra* genů kromě *traC*  
TraC – povrchový protein citlivý k feromonům

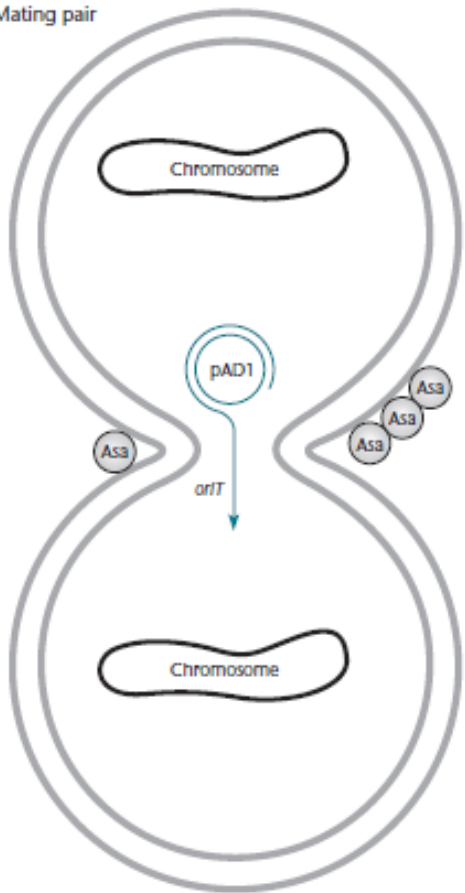


C. Vazba feromonu na TraC – indukce – feromon se váže na represor TraA

D Mating pair

Donor cell

Recipient cell

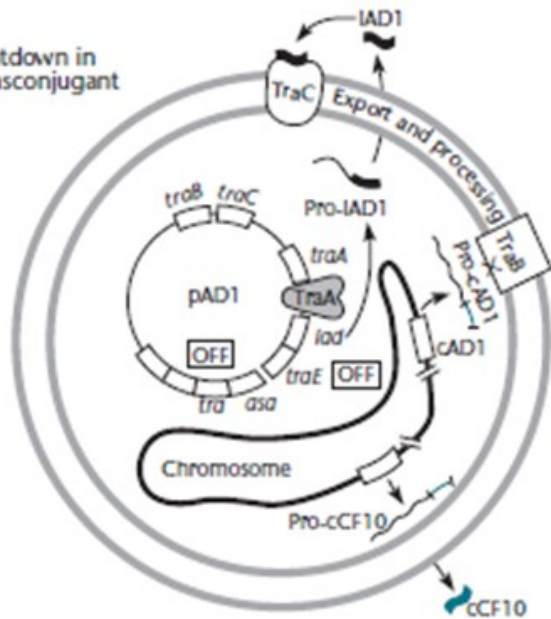


**A. Recipientní buňka tvoří feromony:**

geny pro feromony jsou umístěny na chromozomu. Feromony vznikají odštěpením signálních sekvencí z proferomonů (Pro-cAD1) při jejich exportu z buňky. „Quorum sensing“. Na povrchu se vytváří binding substance (BS).

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

E Shutdown in transconjugant



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

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

**E. V recipientní buňce (transkonjugantu) se přestává vytvářet zralý feromon.**

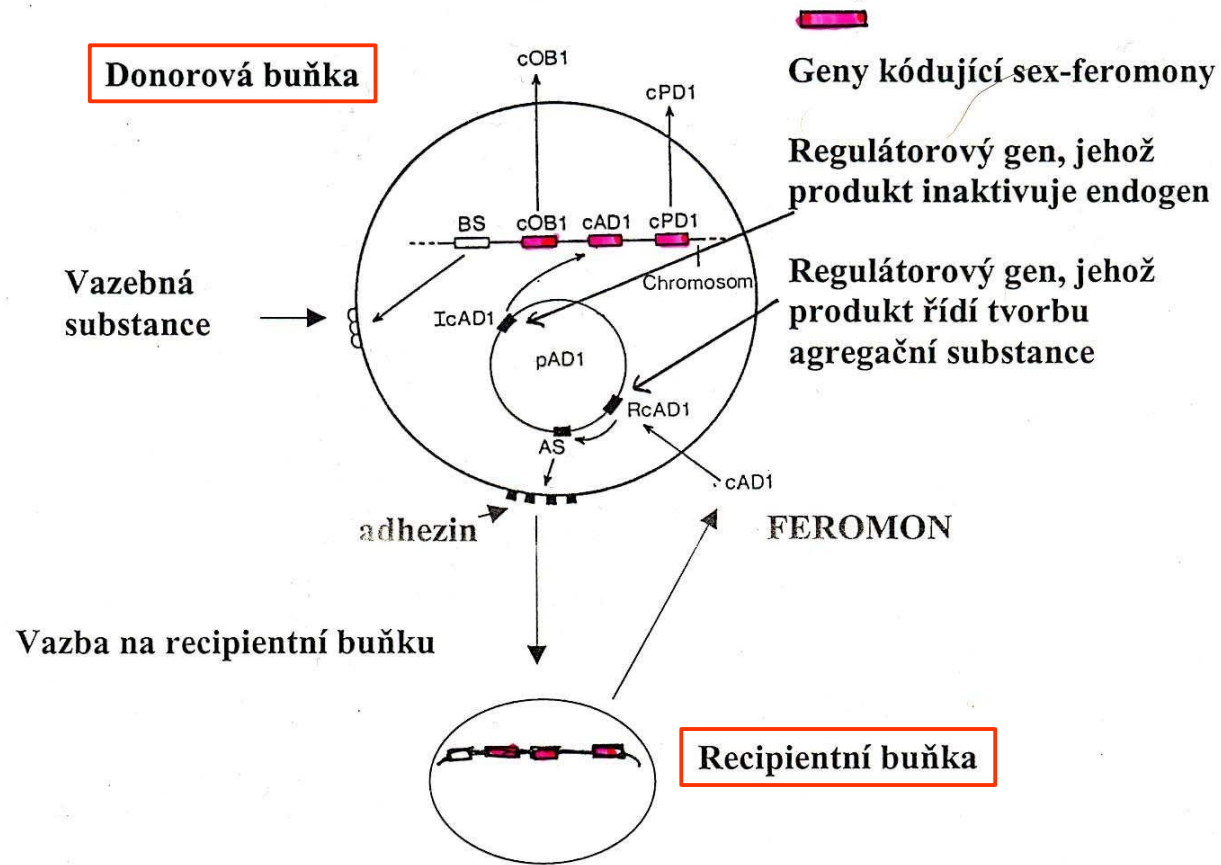
Inhibitorový peptid iAD1 se váže na TraC a zabraňuje párování dvou donorových buněk. TraB je inhibitorový protein, který brání exkreci feromonu.

**Mechanismy zábrany příjmu homologního plazmidu:**

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

Model konjugativního přenosu plazmidů u  
*Streptococcus faecalis*

*Enterococcus (Streptococcus) faecalis*



Feromony = hydrofobní okta- nebo heptapeptidy odvozené úpravami signálních sekvencí lipoproteinových prekurzorů (7-8 aa z C-konce)

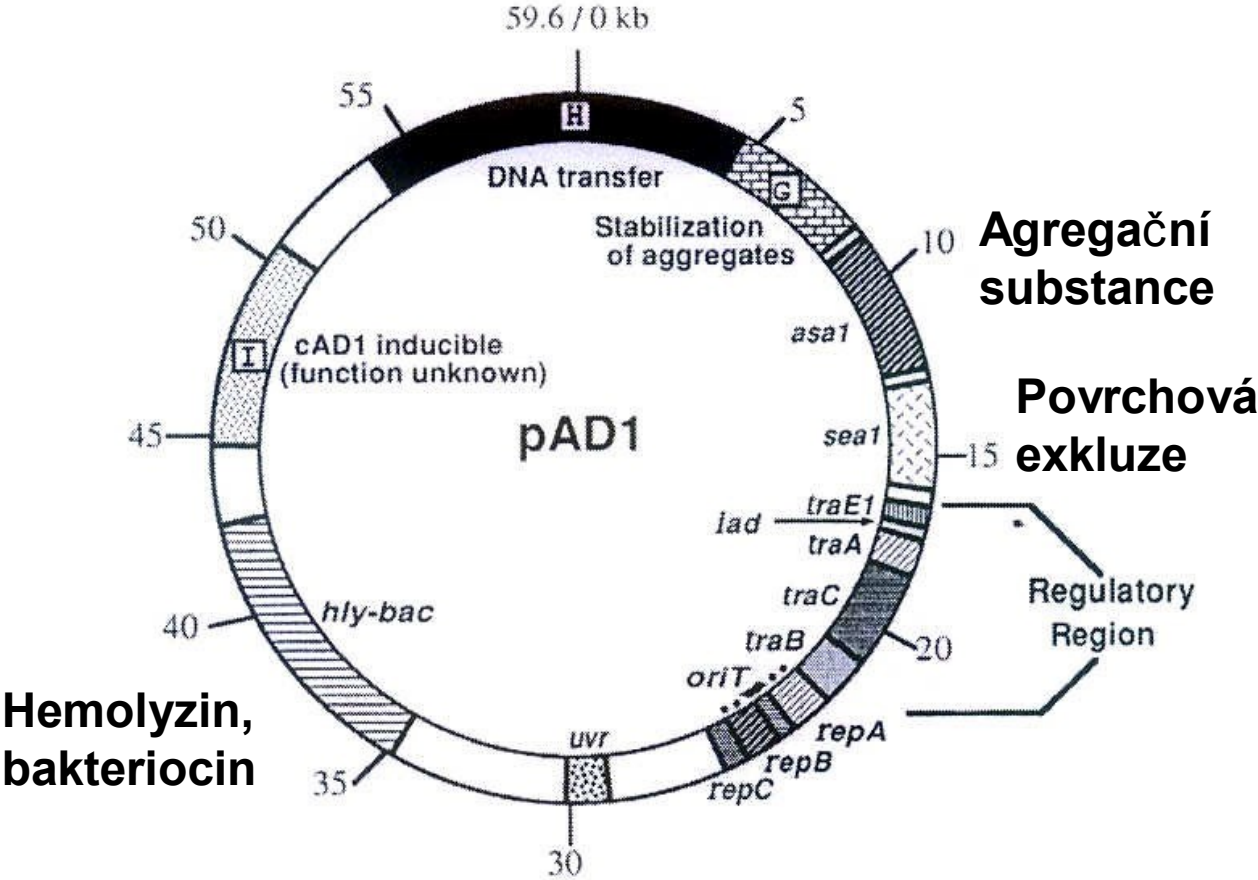


## sex-feromony streptokoků

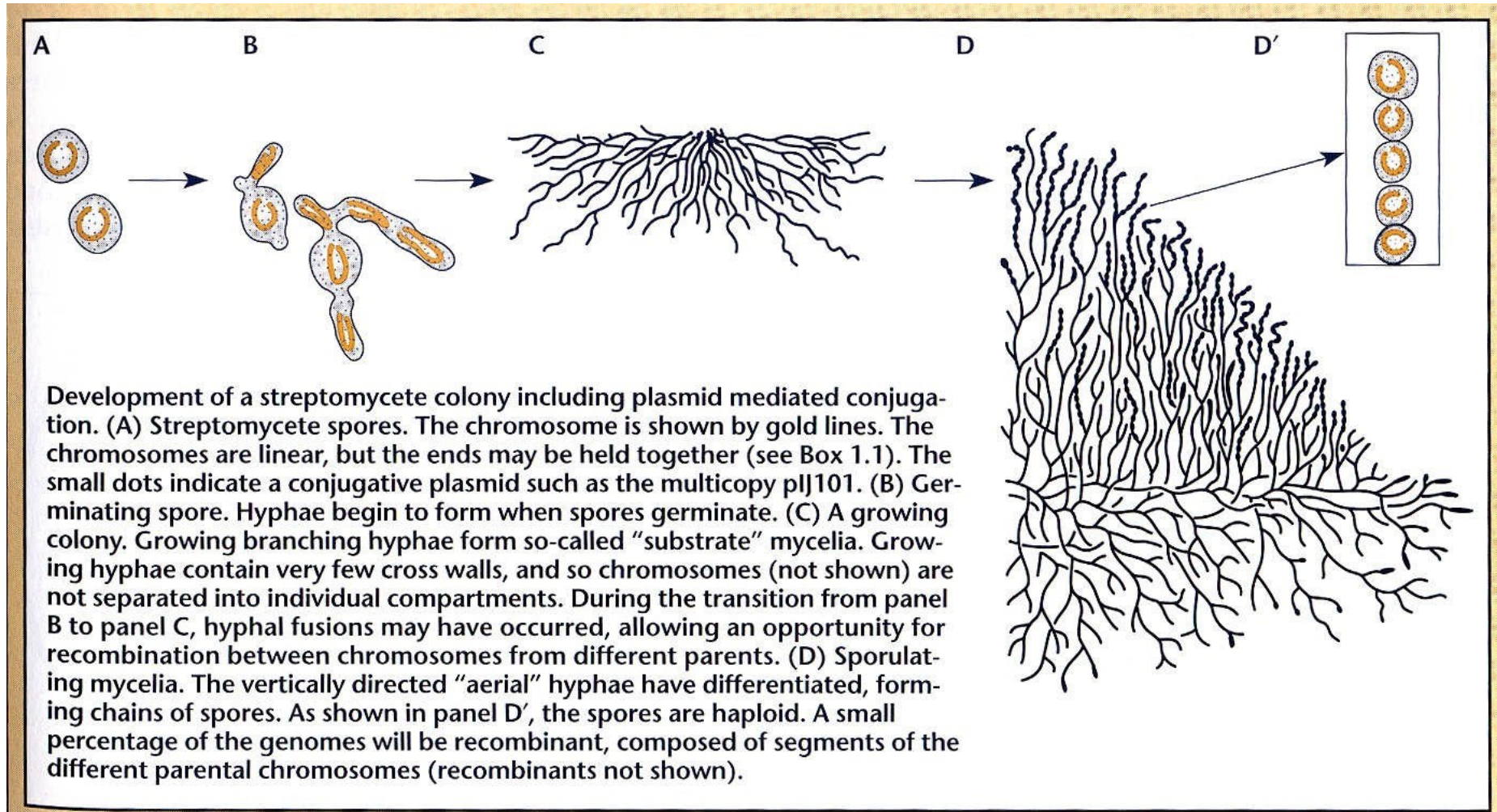
Plazmid	Velikost (kb)	Feromon
pAD1	59,6	cAD1
pOB1	71	cOB1
pPD1	54	cPD1
pAM $\gamma$ 1	60	cAM $\gamma$ 1
pAM $\gamma$ 2	~ 60	cAM $\gamma$ 2
pAM $\gamma$ 3	~ 60	cAM $\gamma$ 3
pAM373	36	cAM373
pCF10	54	cCF10

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

# Struktura plazmidu pAD1 (~60 kb)



# KONJUGACE U STREPTOMYCET



# SPECIFICKÉ RYSY KONJUGATIVNÍHO PŘENOSU U STREPTOMYCET

- D Konjugace nevyžaduje plazmidově-kódované geny pro kontakt buněk (hyf)
- D Není známo, zda přenos plazmidů nebo chromozomové DNA vyžaduje jednořetězcový zlom, a zda se přenáší jednořetězec
- D Chromozomy se přenášejí obousměrně, aniž v nich je plazmid začleněn: není pozorován gradient přenosu chromozomových genů
- D 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 na nárůstu recipientních buněk pocky (pocks)**

## Závěry, které vyplynuly z prvních experimentů

1. Počet rekombinant přibývá s dobou trvání konjugace, lineárně až po dosažení vrcholu.
2. Různé markery jsou přenášeny s různou frekvencí, když byly srovnány stejné doby trvání konjugace.

Přenos z Hfr do F- probíhal řízeným způsobem (geny měly své přesné pořadí a přesný čas přenosu). Přenos chromozomu probíhal od pevného místa (ori) orientovaně.

Závěr: pokud probíhá přenos chromozomu konstantní rychlostí, je doba přenosu genů úměrná vzdálenosti mezi nimi. To umožnilo použít minuty jako jednotky genové mapy.