

Konjugace

Bi7120 Molekulární biologie prokaryot

podzim 2024

Přednášející: Ivana Mašlaňová

Ivana Mašlaňová a Jiří Doškař

iva.maslanova@gmail.com, doskar@sci.muni.cz

549 49 7973, bud. E25/212, <https://ogmb.sci.muni.cz/lmdm>

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**)

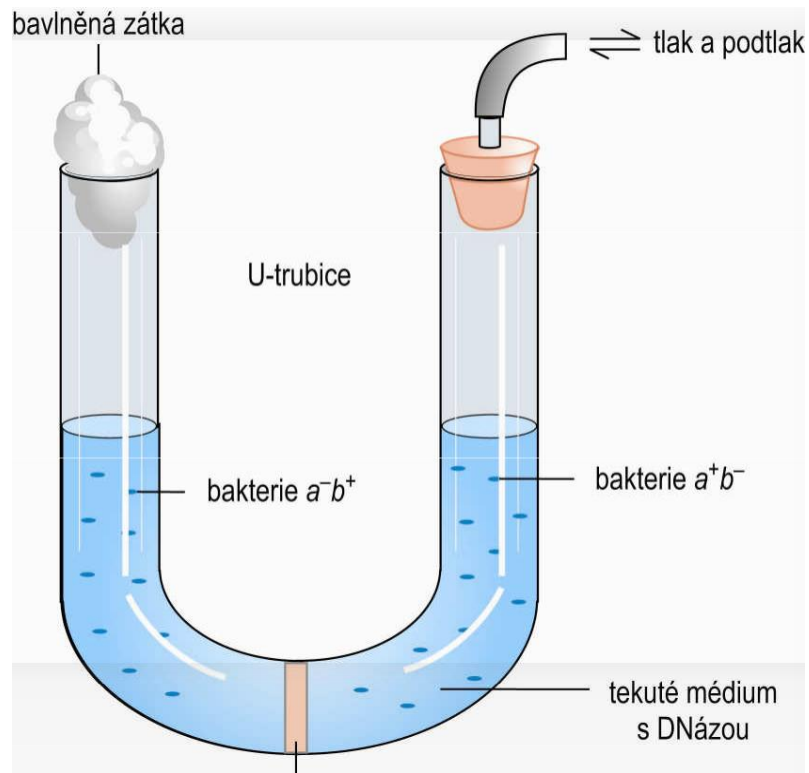
Videa Konjugace Bakterií:

<https://www.youtube.com/watch?v=hm8SZaFmIWg>

https://www.youtube.com/watch?v=Hio0Hys_UaU

Konjugace - historie

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



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 gram pozitivních a gram negativních bakterií.

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*)

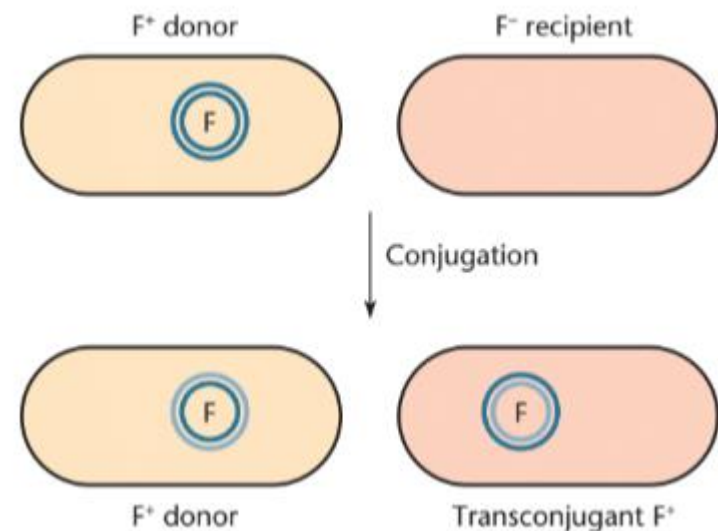
- prototypem je konjugace zprostředkovaná pAD1
- mnoho plazmidů má široké rozmezí hostitelů

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).



Struktura F plazmidu (100 kb, 49% GC)

60 genů rozdělených podle funkce do 5 oblastí

1. Tranferová oblast

33 kb, 31 genů všechny funkce nezbytné pro přenos.

Biosyntéza a sestavování F pilu (traA,B,C,E,F,G,H,L,K,Q,U,V,W)

Stabilizace párujících se buněk (traG,N)

Konjugativní metabolismus DNA (traD,I,M,Y,Z)

Regulace přenostu (traJ,finO,finP)

Povrchová exkluze (traS,T)

2. Vedoucí oblast

Oblast, která je při přenosu DNA přenášena jako první. 13 kb.

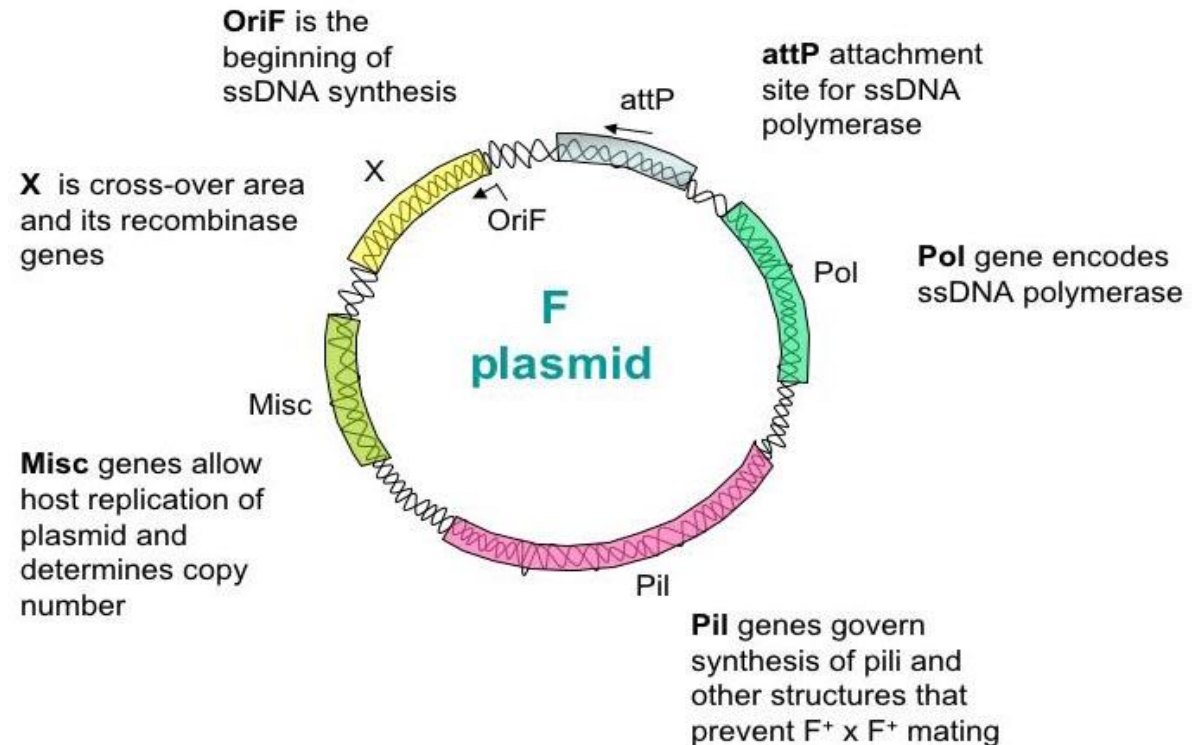
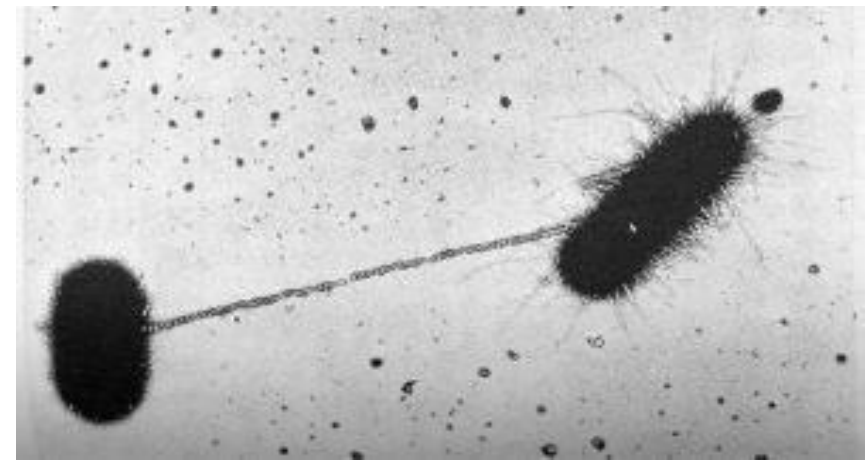
3. Oblast replikace

Tři oblasti s geny a sekvencemi podílejícími se na replikaci.

4. Oblast s inzerčními sekvencemi (IS3a,b, IS2, Tn1000)

5. Pif oblast

Pif (phage inhibition by F). Tři geny pifC.



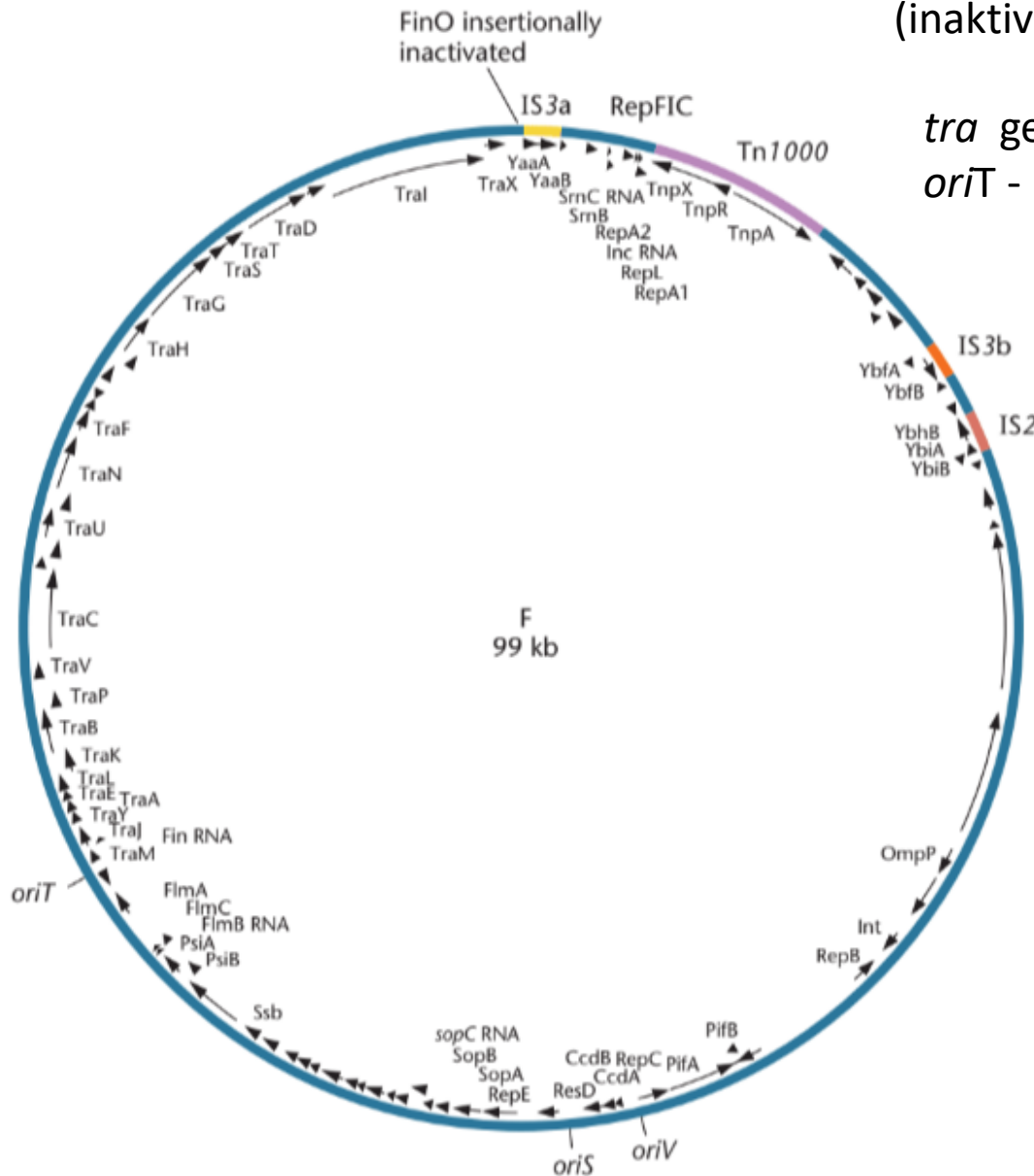
Genetická mapa F plazmidu

F plazmid

- tři počátky replikace: RepFIA/oriV, RepFIB/oriS, RepFIC (inaktivovaný Tn1000)

tra geny – „trans acting genes“

oriT - „cis acting site“



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, and SopC sites
Postsegregational killing	SrnC (RNA) and SrnB CcdA and CcdB FimA, FimC, FimB (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 (DNA transfer and replication): **geny pro přenos DNA a replikaci**

Mpf (mating-pair formation): **geny pro s membránou asociovanou strukturou – pilus**

Komunikaci mezi *Dtr* a *Mpf* zajišťuje „coupling protein (TraD)“.

Transferová oblast F plazmidu (*1/3 velikosti 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:

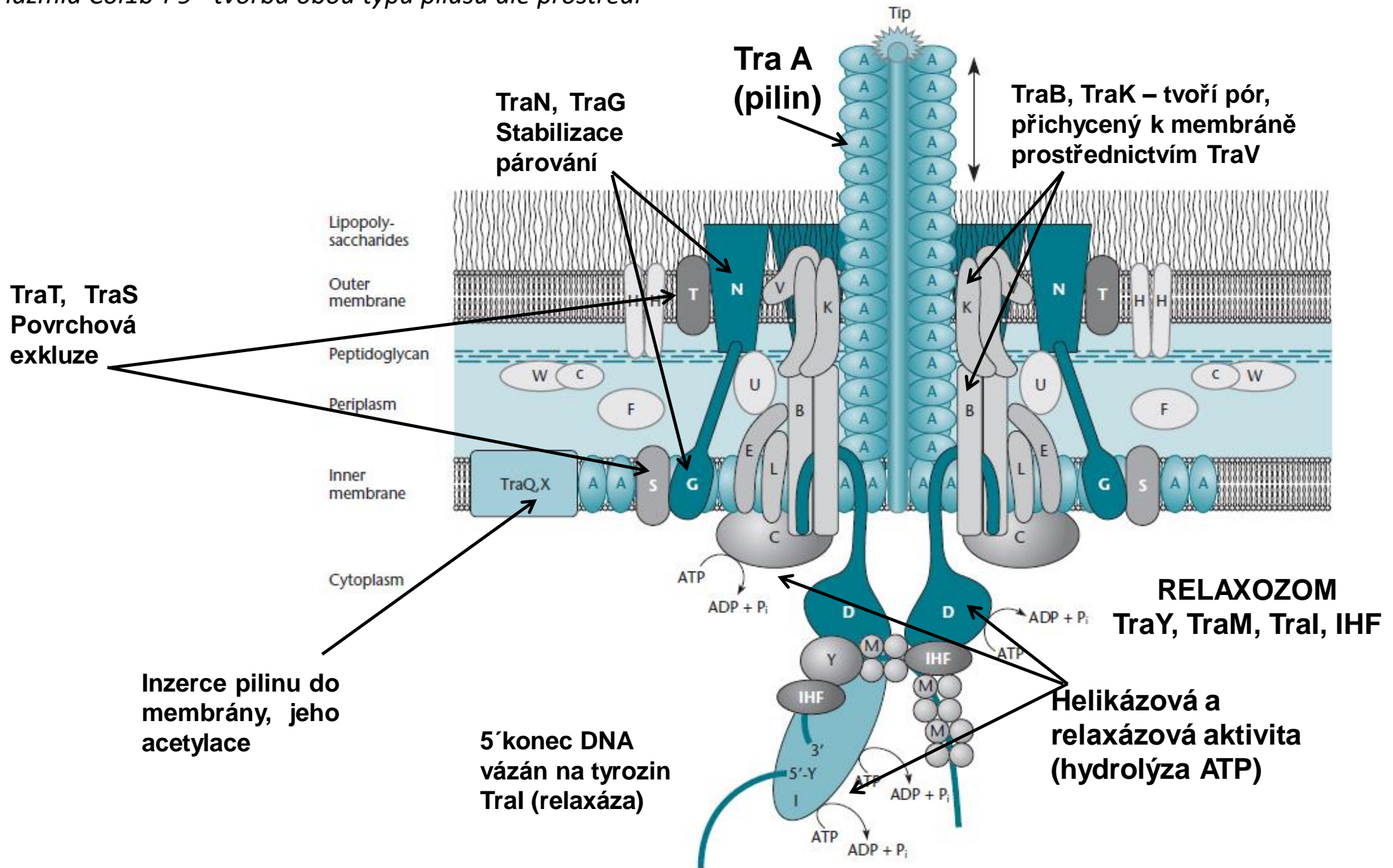
1. Donorová buňka naváže kontakt s recipientní pomocí pilusu
2. Následuje přibližování buněk depolymerizací pilusu (retrakce pilusu)
3. **Probíhá syntéza plazmidové DNA – chromozom se nereplikuje**
4. Dochází k aktivní disagregaci donorových a recipientních buněk

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

- Dochází k jednořetězcovému zlomu v $oriT$ v místě nic
- Odvíjení 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 a struktura pilusu u G-bakterií

Rozlišují se **flexibilní** (ohybné, např. u F plazmidu) a **neohebné** (tuhé) pilusy (např. plazmid PKM101).
Plazmid Col1b-P9 - tvorba obou typů pilusů dle prostředí



MpF komponenta

Funkce - párování donorové a recipientní buňky, vytvoření proteinové struktury (pilus) pro přenos DNA.

Struktura:

TraA – pilin, 5 monomerů na jednu otáčku v helikální struktuře

TraQ – inzerce TraA do IM

TraX – acetylace TraA

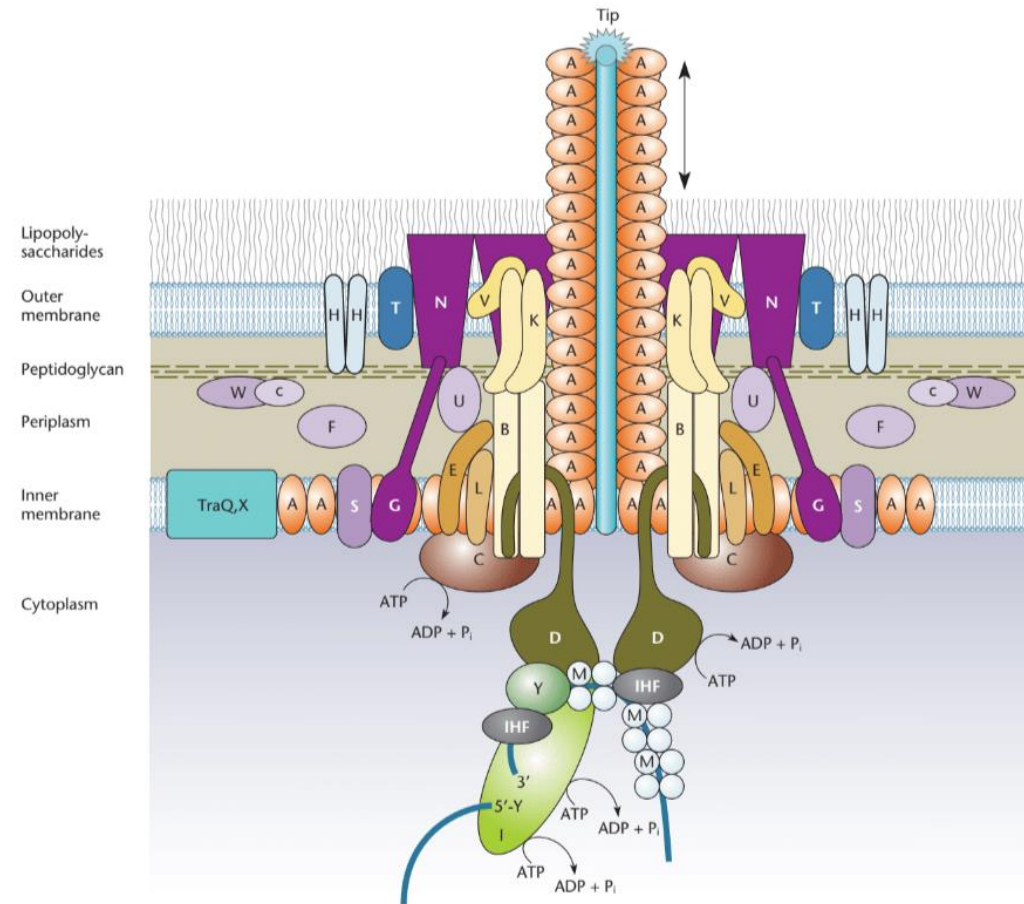
TraB, TraK – vytvoření póru pro pilus, lipoprotein

TraV propojení komplexu do OM

TraL – ukotvení pilu v IM

TraC – přenos ATP

TraG, TraN – stabilizace struktury; TraS, TraT – rozklad MpF



Dtr komponenta – přenos DNA skrz pilus

Relaxáza (Tral):

Místně-specifická endonukleáza – vytvoření ssDNA zlomu v místě „nick“ v blízkosti *oriT*

Relaxosome:

Multimerní struktura tvořena více proteiny, v normálních podmínkách se jedná o proteiny vázající se na sekvenci v blízkosti *oriT*.

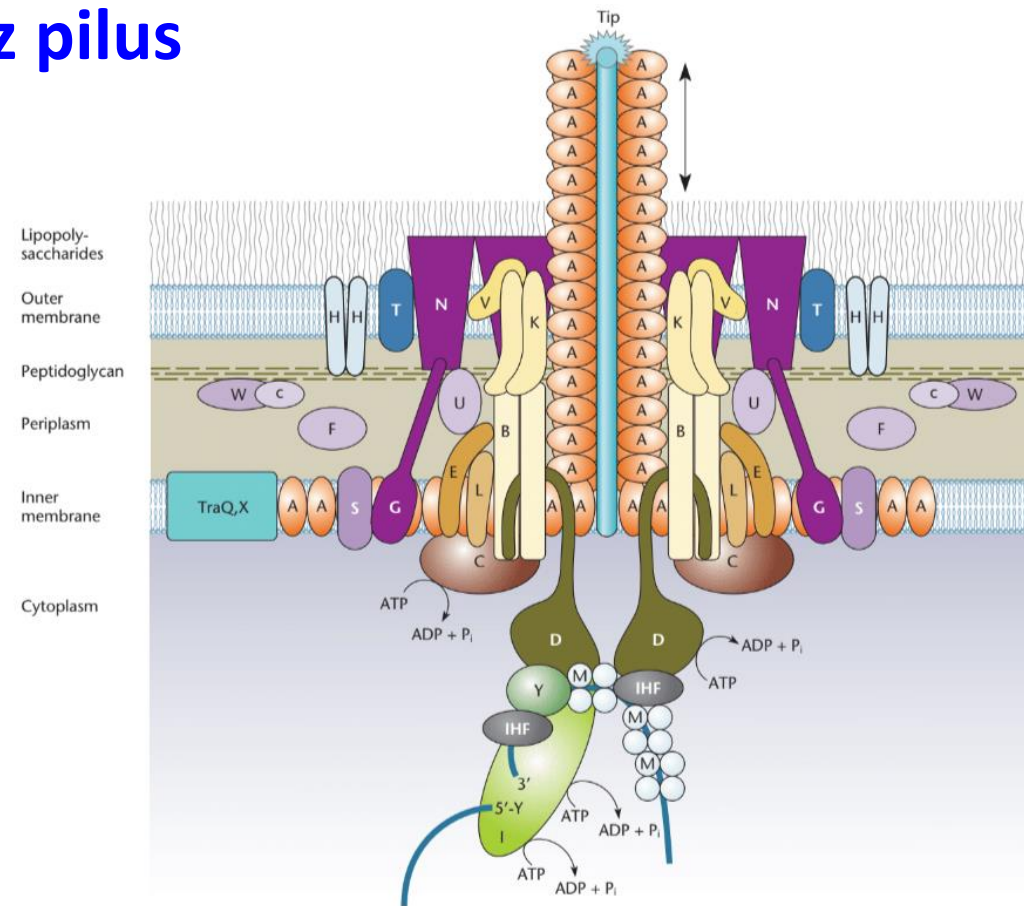
TraU, TraM, TraY, IHF (bakteriální protein) – vazba na DNA v místě *oriT* (nick), 5' konec naštěpeného řetězce se váže na tyrosinový zbytek vázaný na TraY, 3' konec je také asociován s TraY

TraC, TraD, TraI - vazba ATP

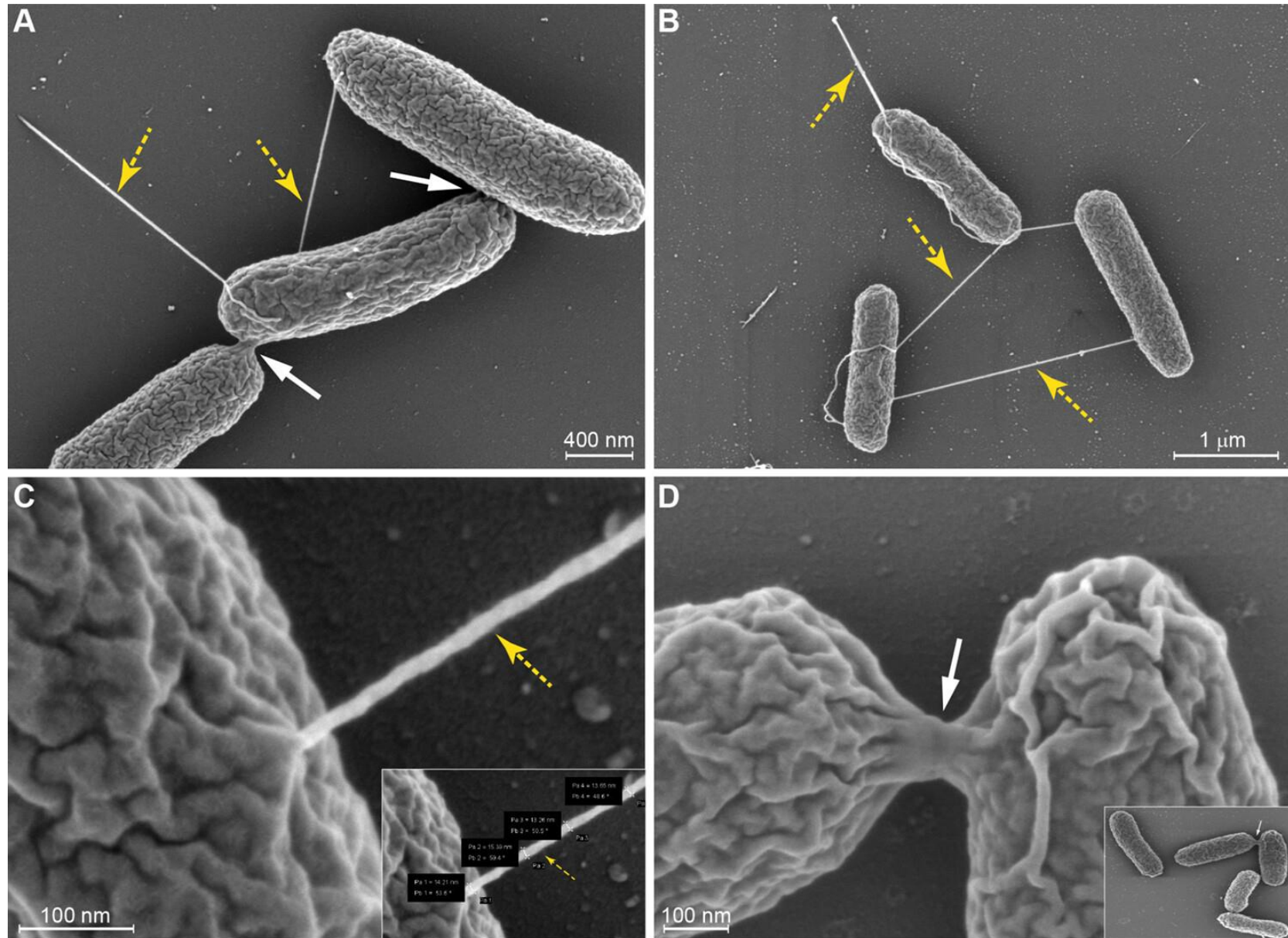
- helikázová aktivita, rozpoznání DNA polymerázou III

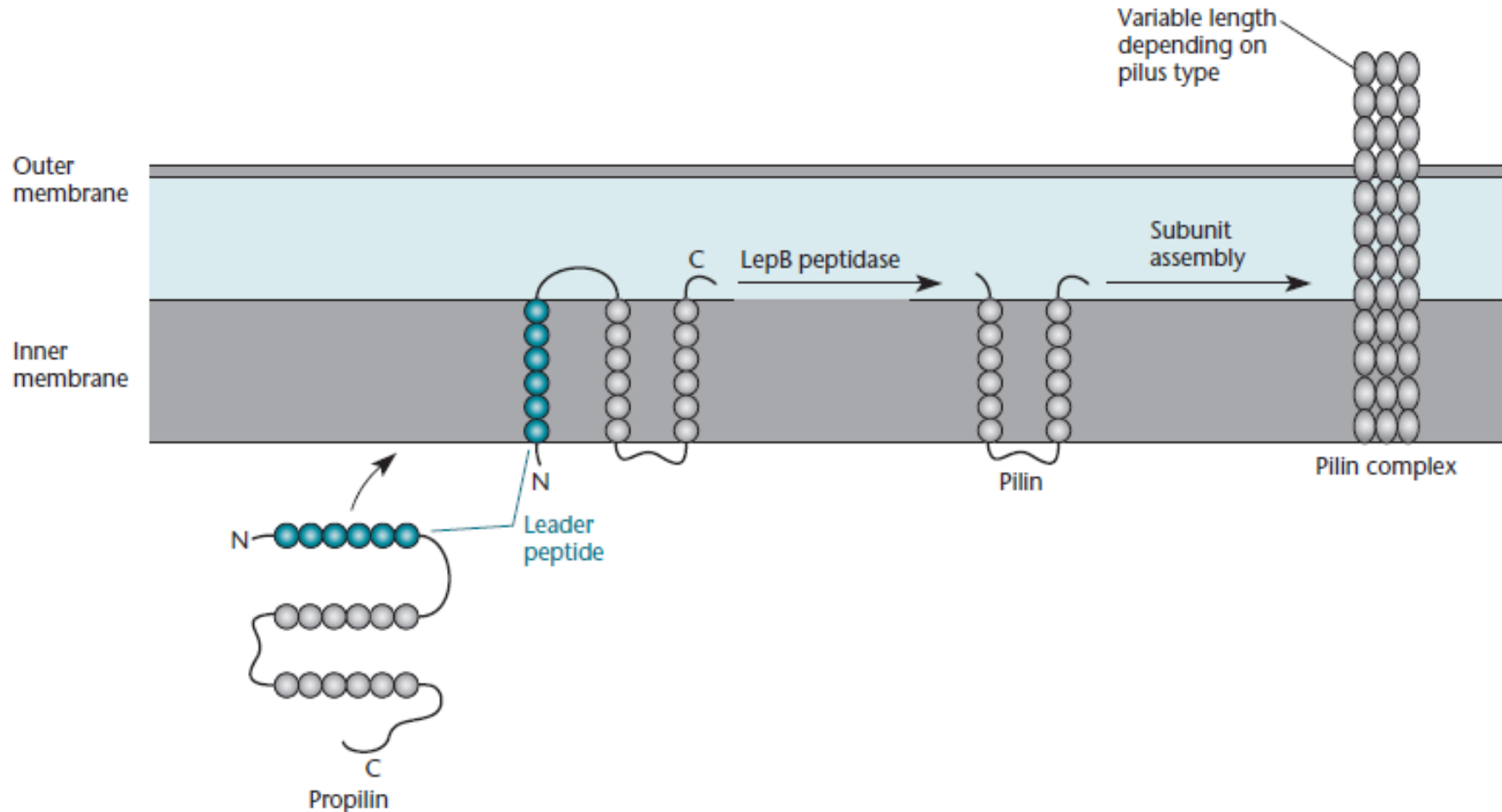
oriT

- Začátek přenosu DNA, recirkularizace plazmidu
- Regulece proteiny IHF, TraY, TraM
- Primase



Skenovací EM zobrazení konjugativních pilusů a MPF u plazmidu pN3. (A) Žluté šipky ukazují na konjugativní pili a bílé šipky označují místa kontaktu mezi buňkami a tvorbu MPF. (B) Morfologie konjugačních pilusů, 1 až 2 pil na buňku. (C) Délka (průměr $1,89 \pm 1,2 \mu\text{m}$) a průměr (průměr $14,85 \pm 1,89 \text{ nm}$) konjugačních pilů pN3. (D) Zvětšený obrázek konjugativního můstku vytvořeného dvěma párujícími se buňkami.



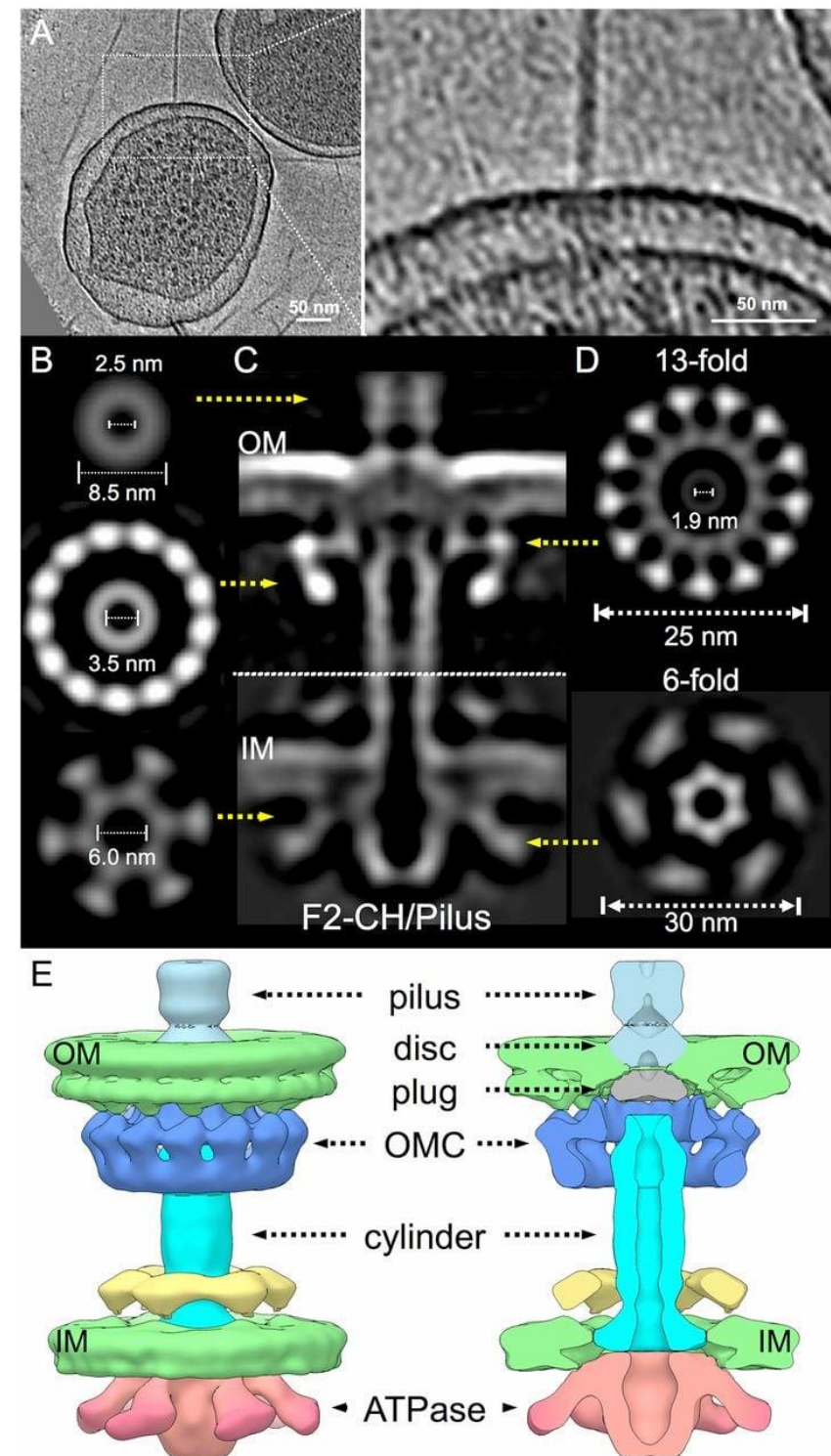
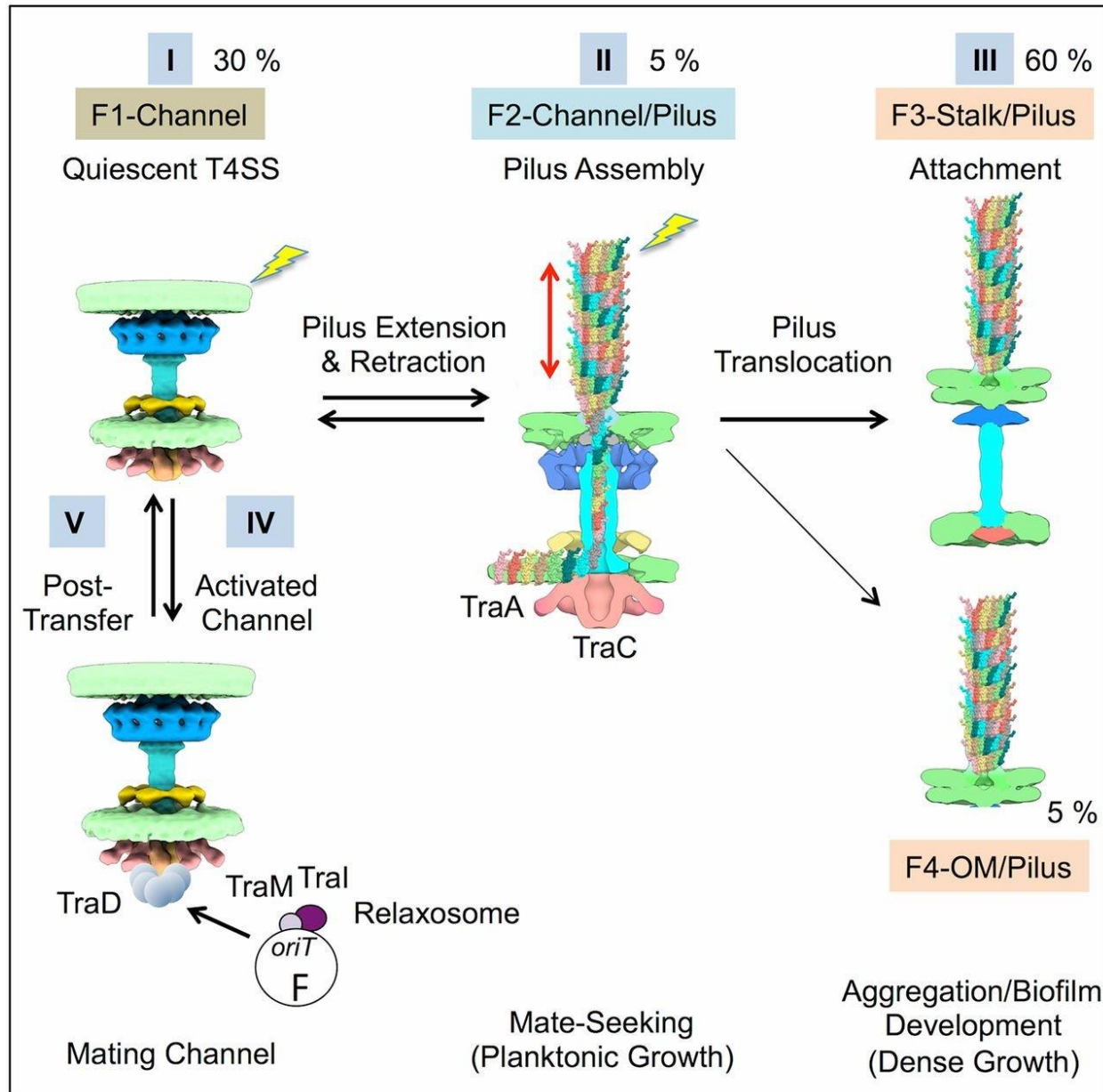


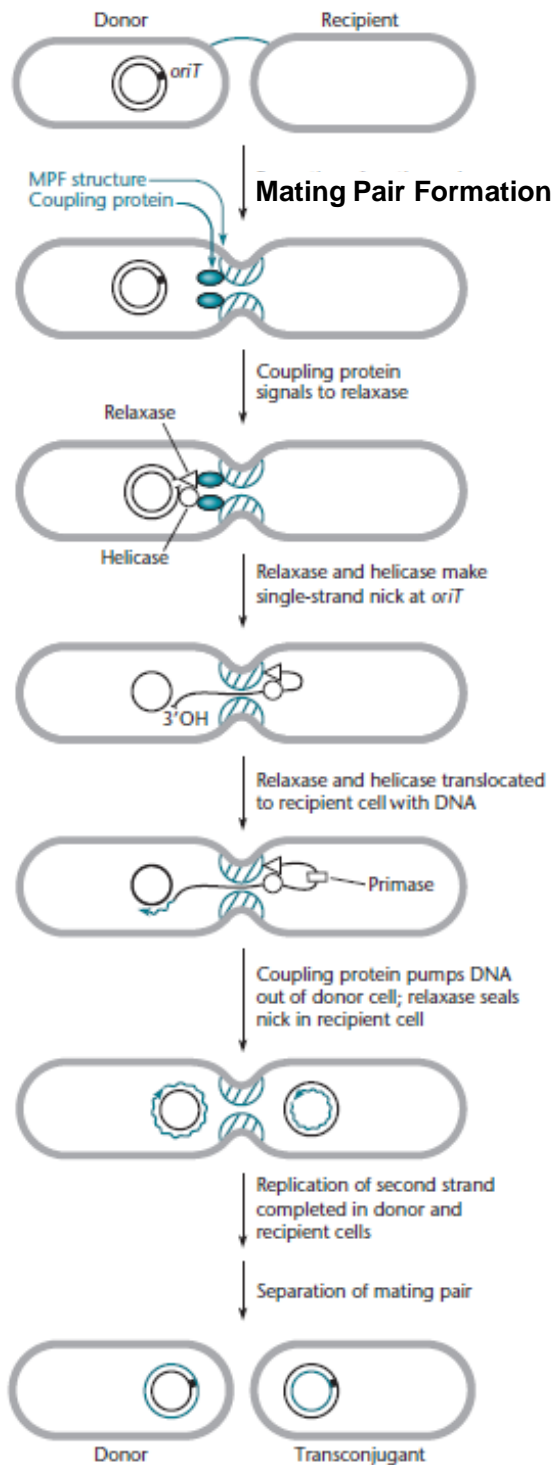
Sestavování pilu na povrchu buňky

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

Struktura pilusu

System přenosu F plazmidů je paradigmatem pro bakteriální sekreční systémy typu IV (T4SS).





Donorová buňka vytváří pilus, kterým kontaktuje recipientní buňku.

(povaha signálu není známa)

Dochází k vytvoření póru mezi oběma buňkami

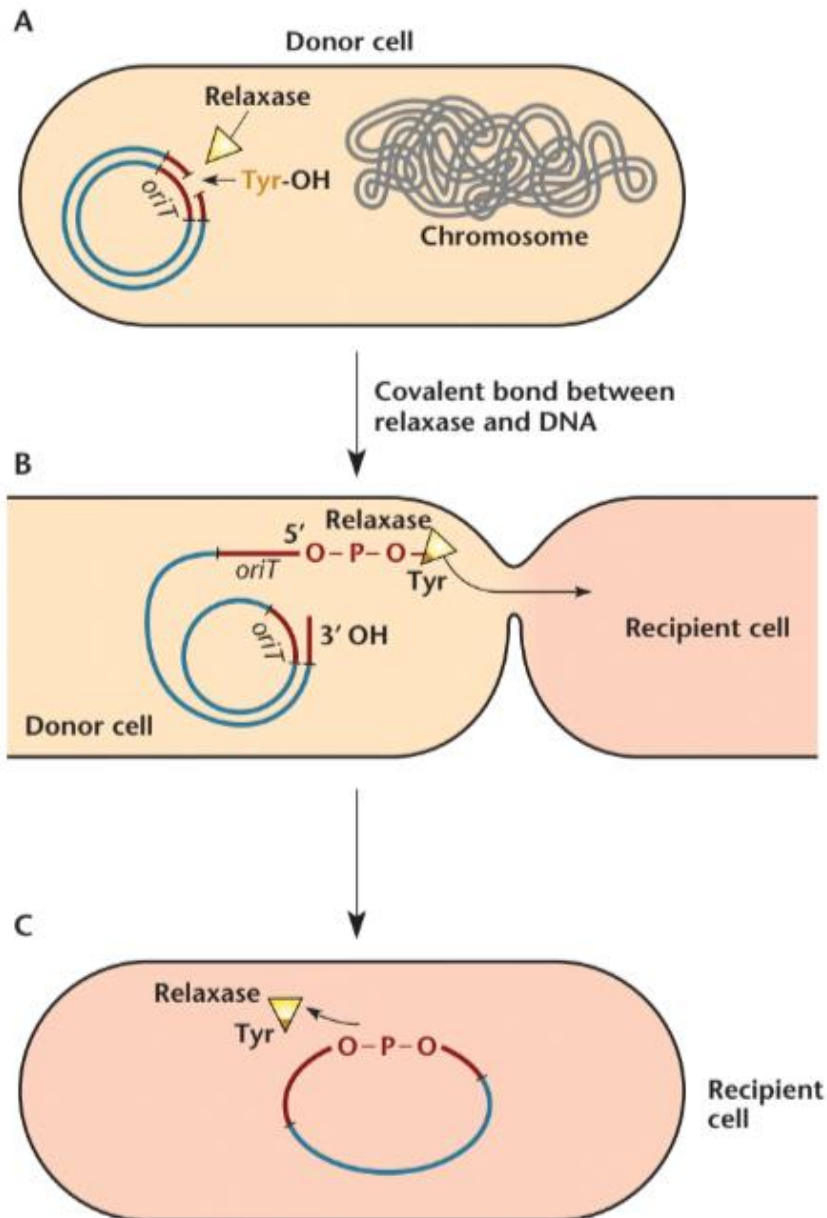
Relaxáza aktivovaná „**coupling**“ **proteiny** vytvoří zlom v *oriT* na DNA

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

Působení relaxázy při přenosu plazmidu konjugací



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

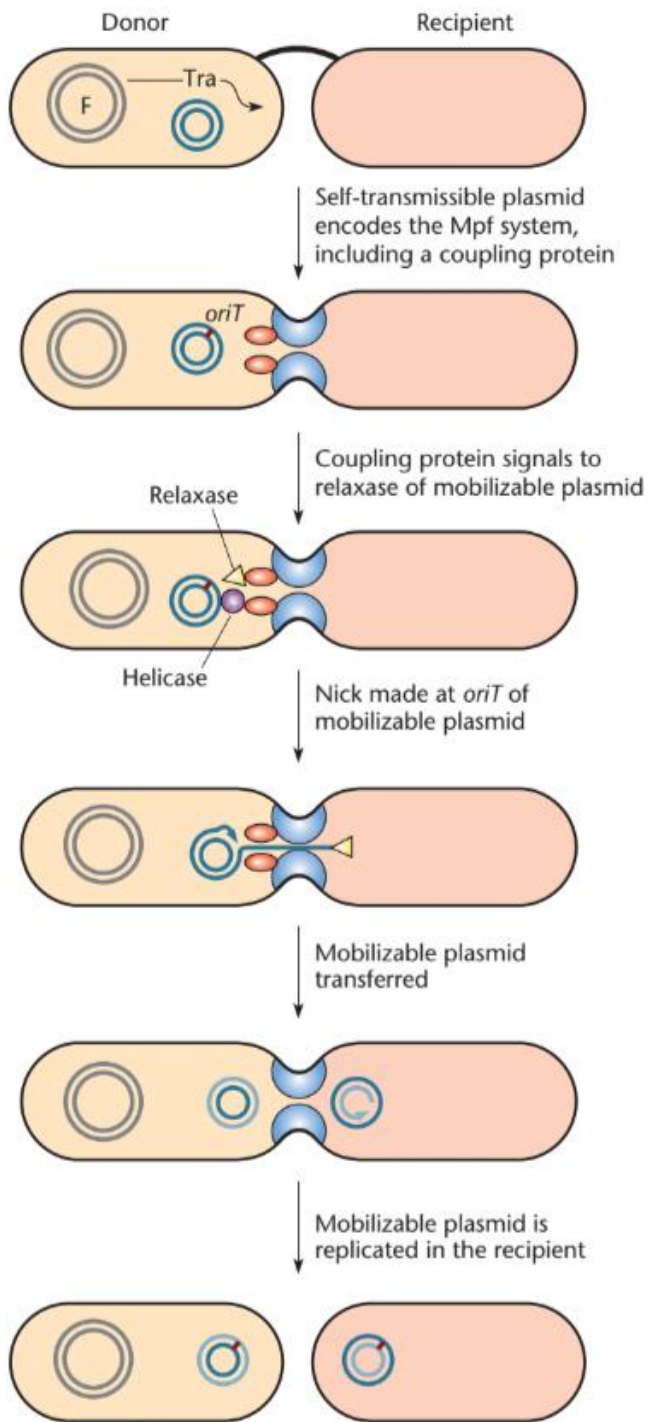
TraM protein se váže na ss zlom a rozšíří mezeru na 200 bp ve směru 5-3.

Na tuto mezeru se váže protein *Tral* (helikáza I), která vytváří další odvinutí DNA za spotřeby ATP.

Tak se odvine 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



Mobilizace mobilizovatelných plazmidů

Složky mobilizovatelných plazmidů:

oriT

Dtr systém – *mob* geny (mob region)

Mpf systém je kódován na F plazmidu.

Mechanismus mobilizace plazmidů:

Donorové buňky nesou dva plazmidy – F plazmid (*tra* geny), mobilizovatelný plazmid (modře)

Plazmidy musí mít kompatibilní *oriT*.

Do recipientní buňky je přenášen jen jeden ze dvou plazmidů – kompetice o „coupling“ protein.

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**.
3. Gen *traJ* má funkci transkripčního aktivátoru – inicializace RNA syntézy.
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.

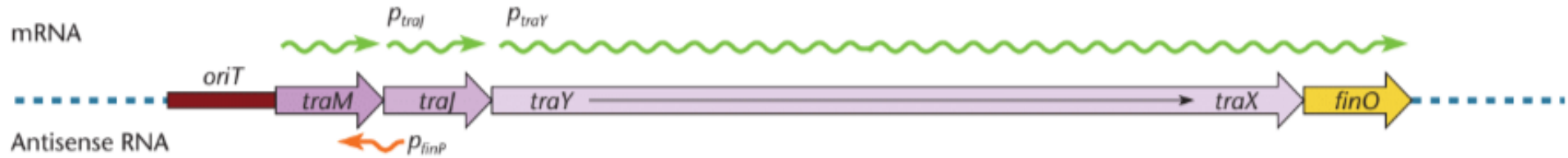
Produkt FinP RNA a transkriptu genu *traJ* reguluje operon negativně:

1. Blokace RBS genu *traJ*, ale RNA transkript je cílem působení Rnase E.
2. FinO stabilizuje FinP antisense RNA.

Ve formě dsDNA je tra-operon reprimován, k expresi dochází při iniciaci přenosu do recipienta, působení relaxázy.

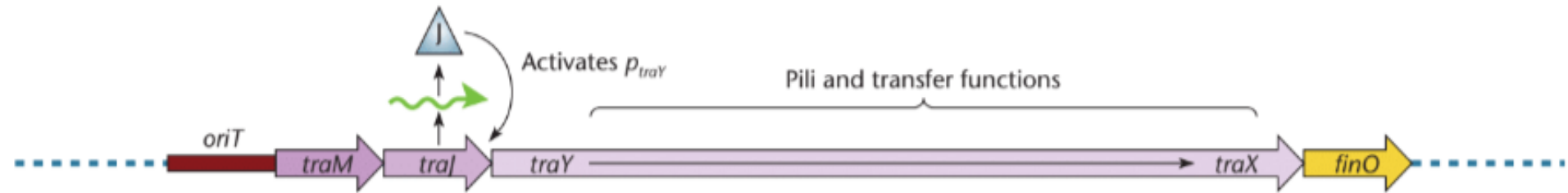
TraJ = transkripční aktivátor – protein nutný pro RNA syntézu

A Genetic organization of *tra* region



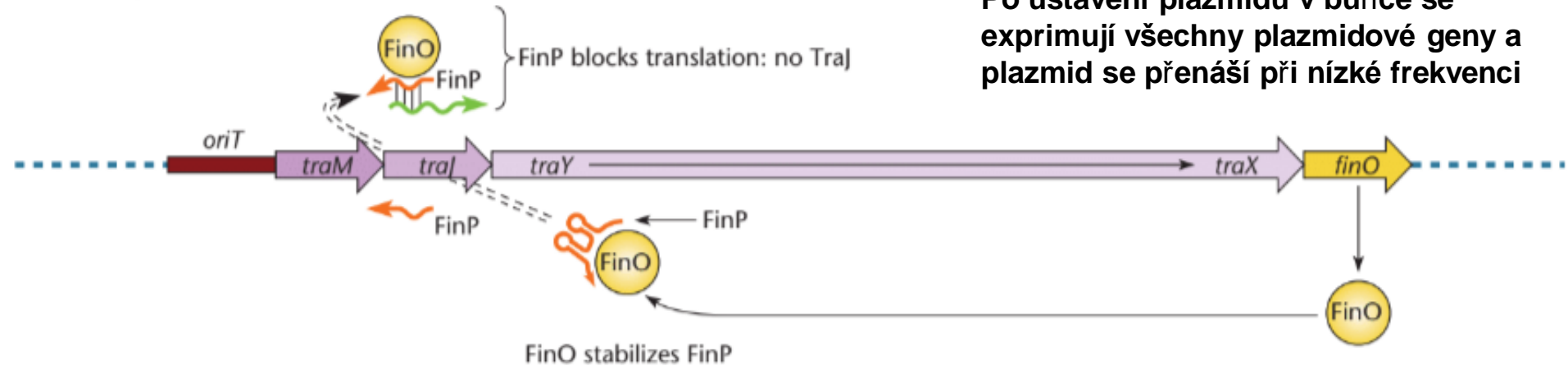
B Immediately after entry into cell

Nově vzniklý konjugant přenáší plazmid do dalších buněk s vysokou účinností

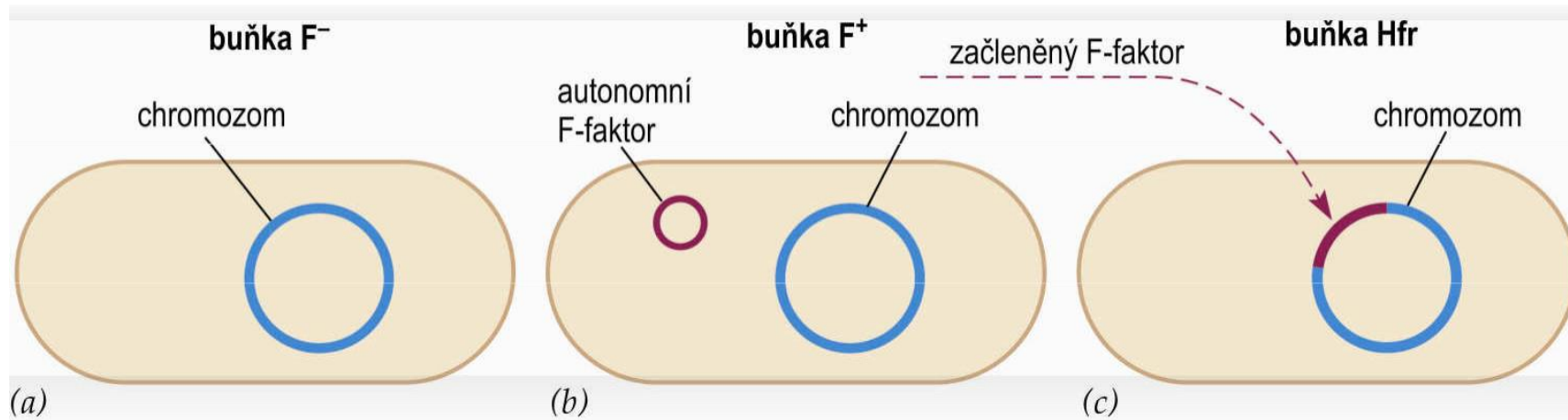


C After plasmid establishment

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



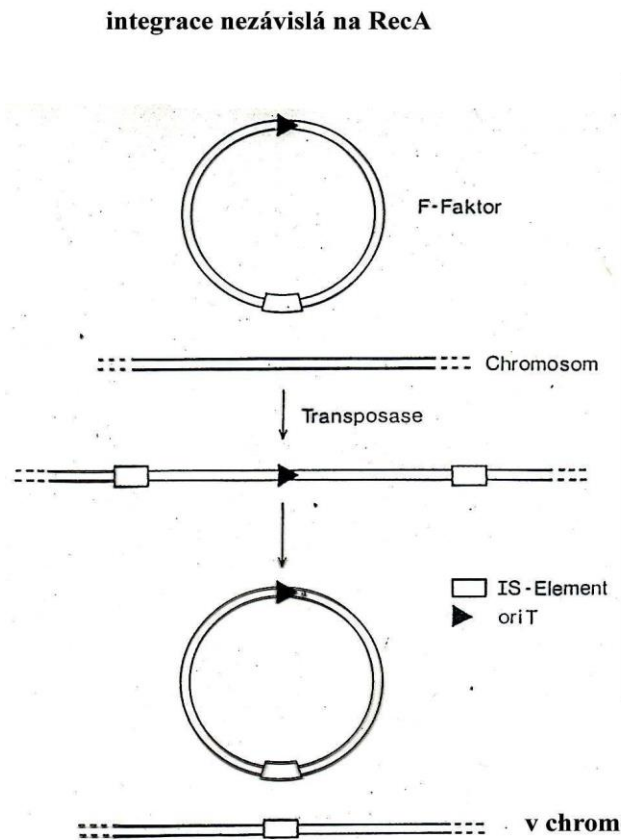
Charakter buněk F⁻, F⁺ a Hfr



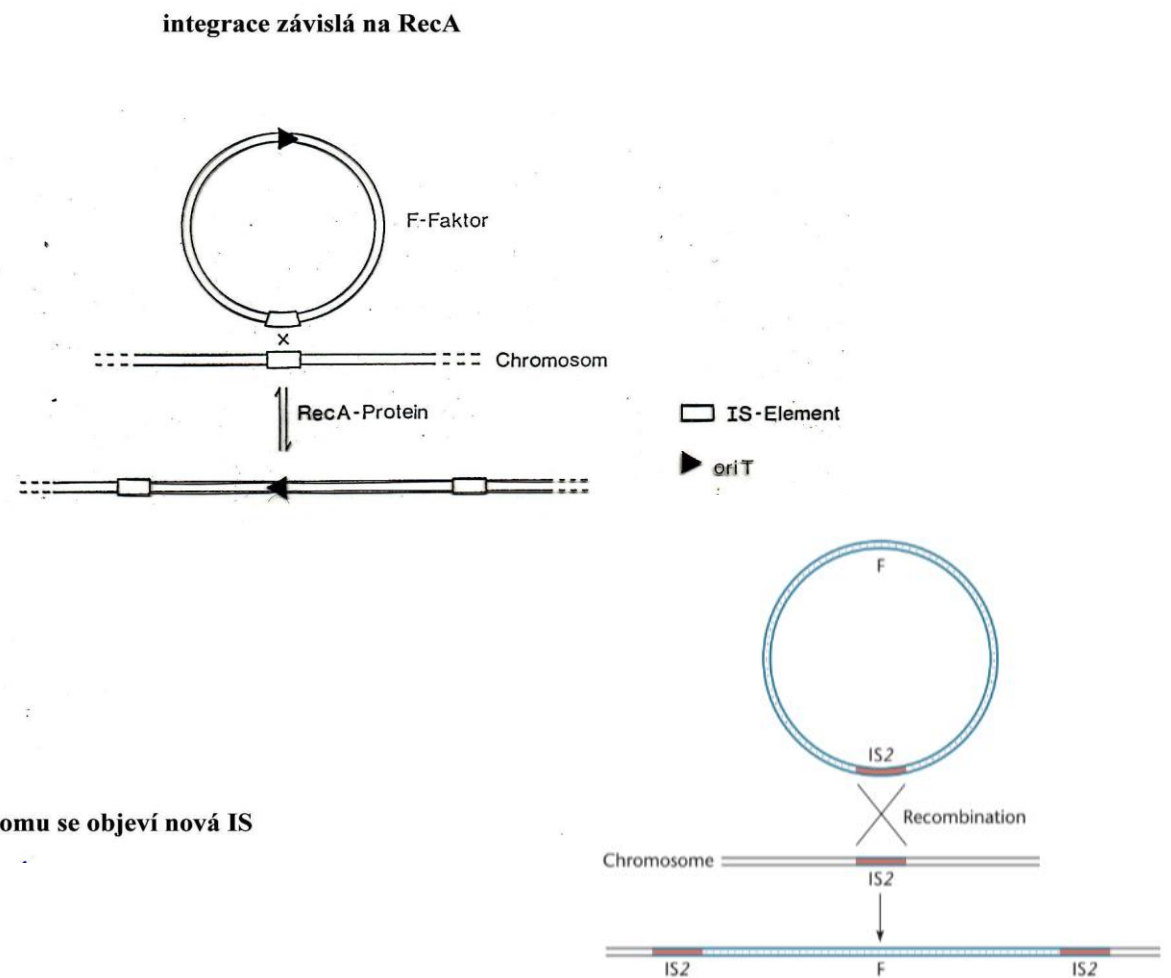
Integrace F plazmidu do chromozomu hostitele

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

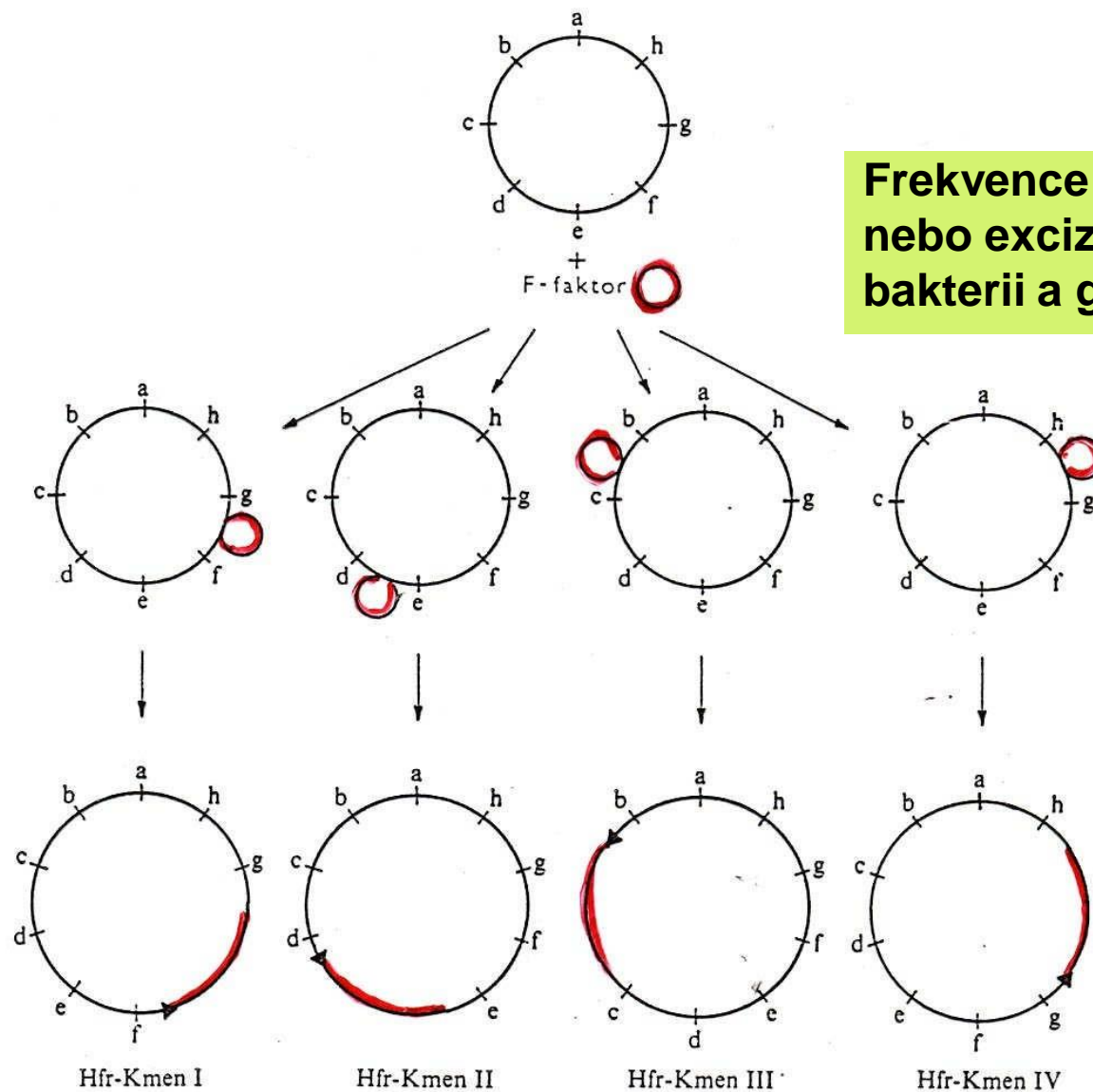
Integrace nezávislá na RecA proteinu
Transpozice



Integrace závislá na RecA proteinu
Homologní rekombinace

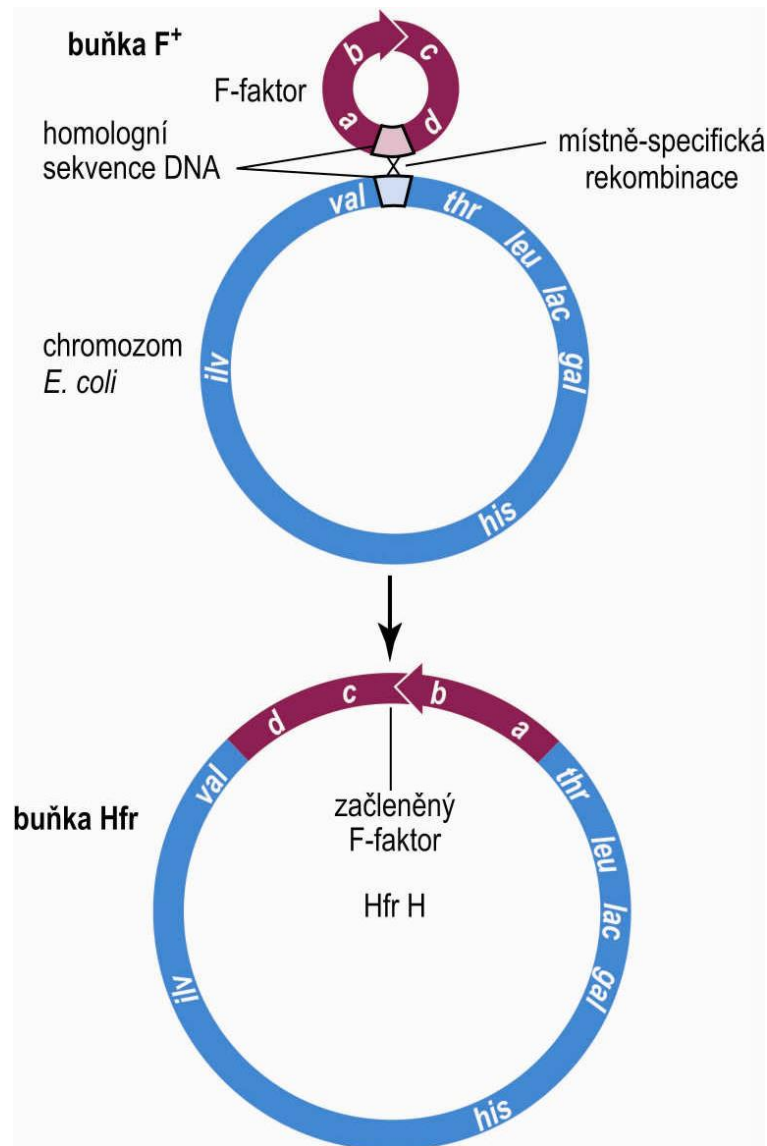


Vznik kmenů Hfr začleněním F plazmidu do různých míst chromozomu E. coli. Začlenění probíhá v místech IS.



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

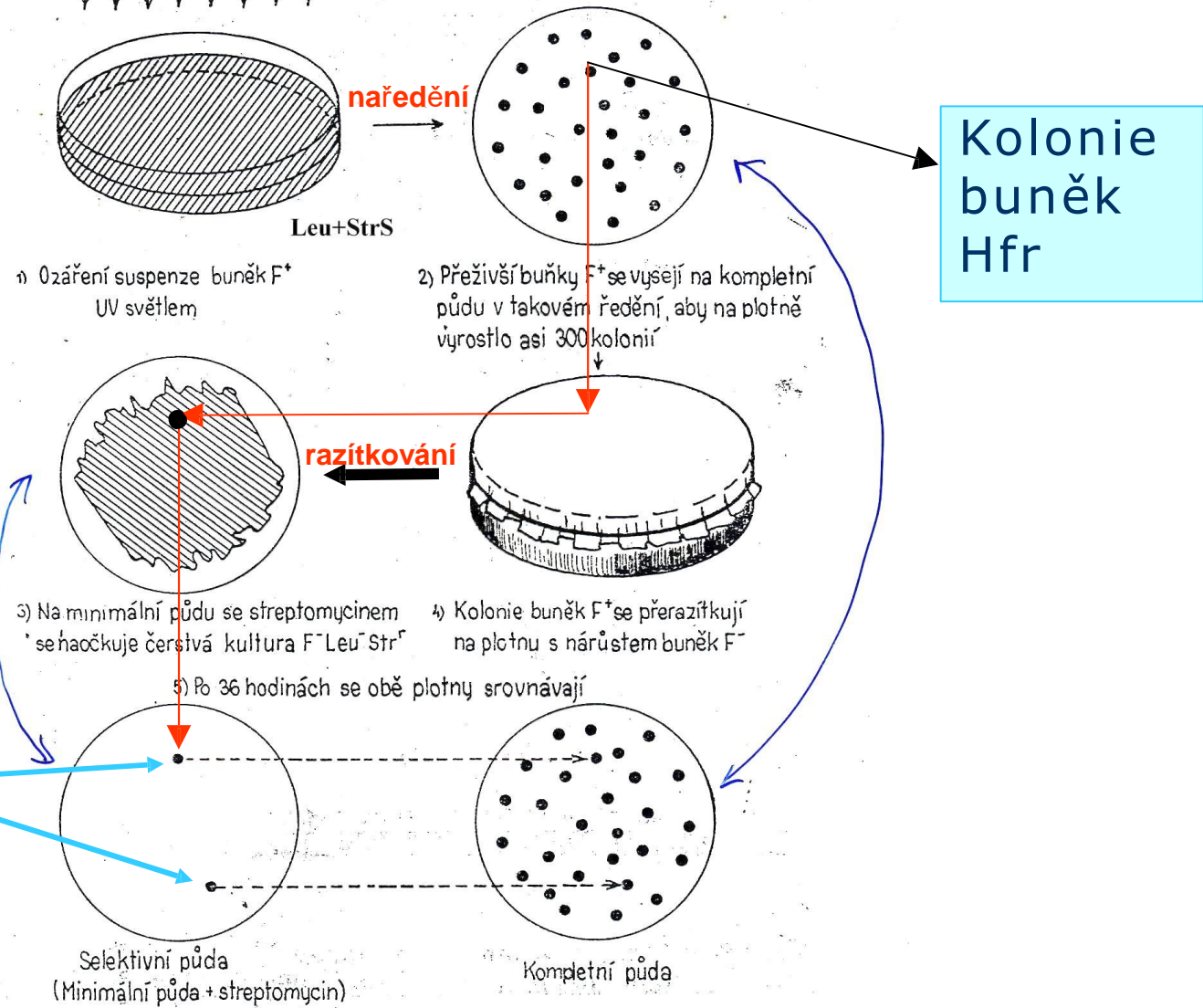
Vznik buňky Hfr (HfrH) začleněním F-plazmidu do chromozomu *E. coli*



IZOLACE KMENŮ HFR

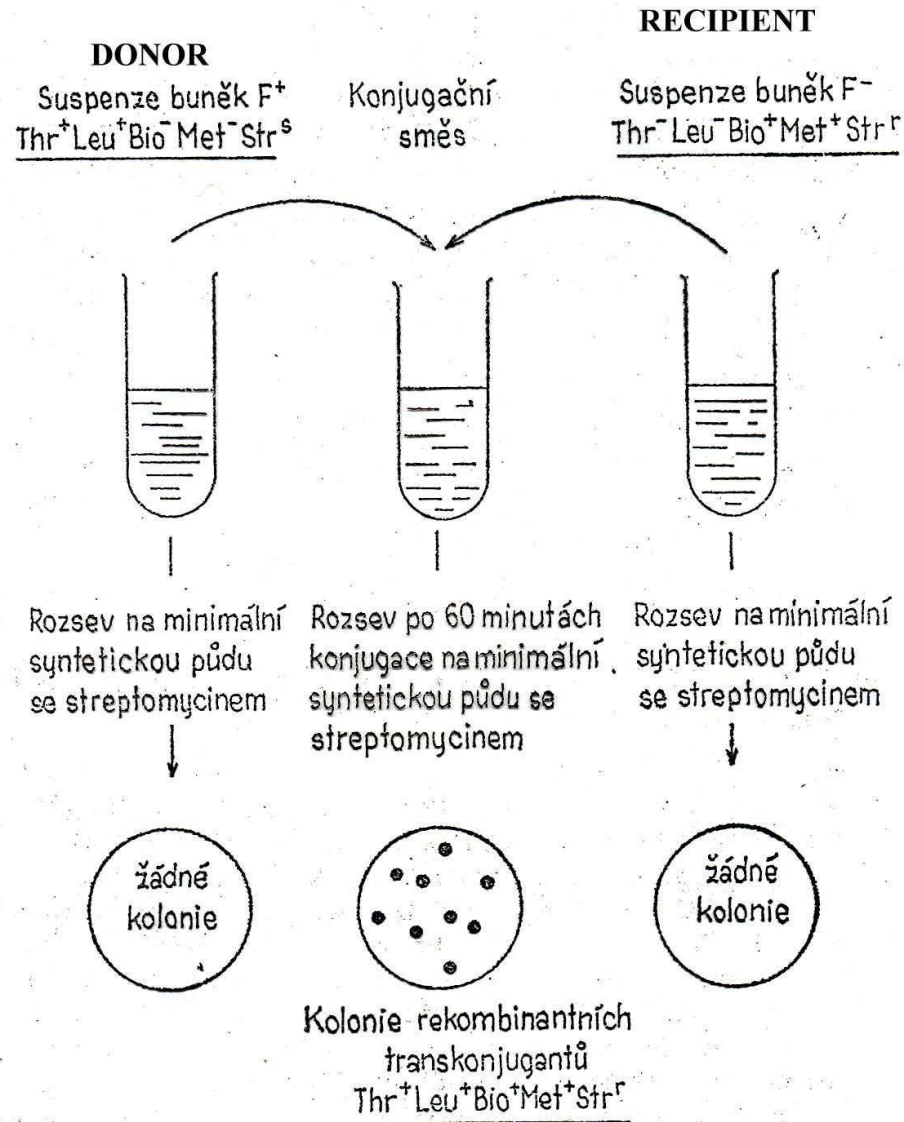
F+ = Leu+ StrS
 F- = Leu- StrR

Rekombinanty
 = Leu+ StrR



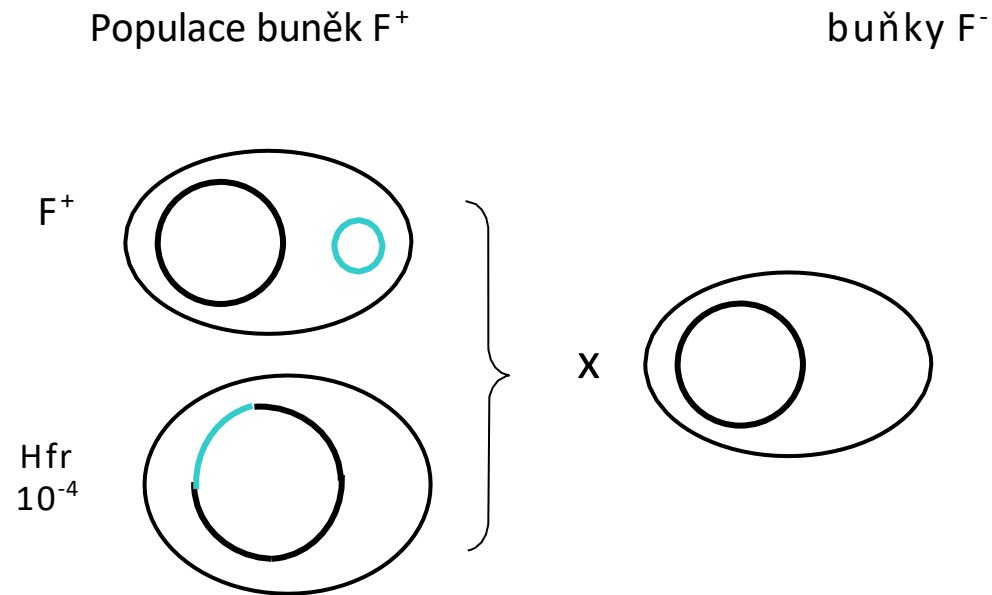
Místa na minimální půdě vyznačující se hustým nárůstem představují rekombinanty Leu+ StrR, které vznikly konjugací buněk F- s buňkami Hfr přenesenými na plotnu razítkem

Křížení kmene F+ a F-



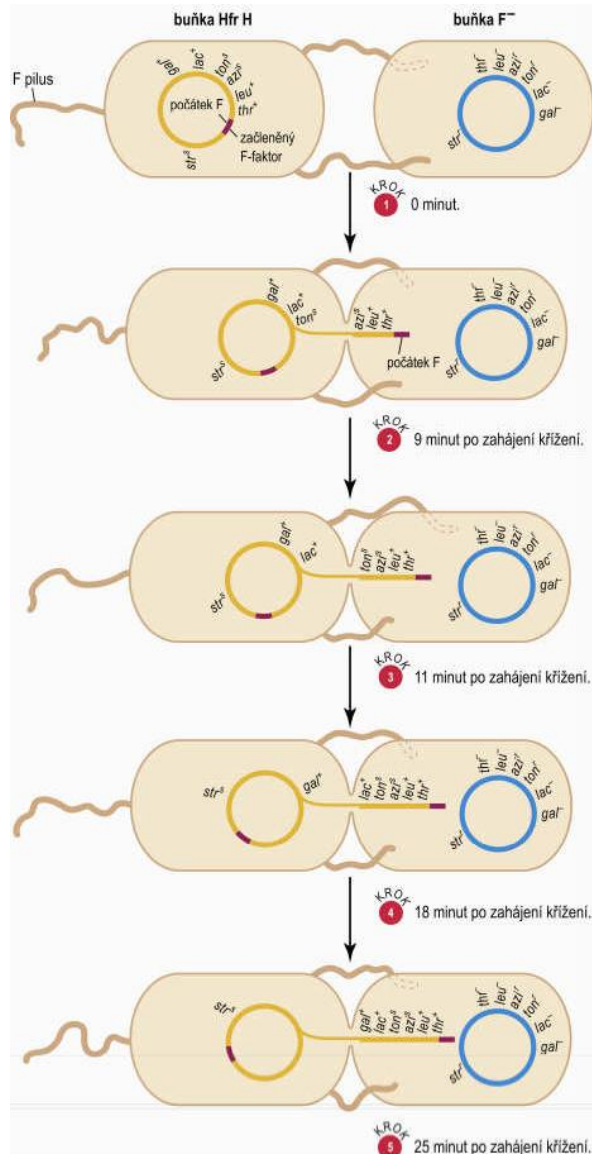
Za vznik rekombinantů jsou zodpovědné buňky Hfr

Křížení kmenů F^+ x F^-



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

Konkrétní příklad nepřerušované konjugace

Křížení:

HfrH Leu⁺Pro⁺Lac⁺Gal⁺Trp⁺Str^s x F⁻ Leu⁻Pro⁻Lac⁻Gal⁻Trp⁻Str^r

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 ⁺ Str ^r	: + pro, glu, trp	0,20
2. Pro ⁺ Str ^r	: + leu, glu, try	0,15
3. Lac ⁺ Str ^r	: + leu, pro, lak, trp	0,13
4. Gal ⁺ Str ^r	: + leu, pro, gal, trp	0,078
5. Trp ⁺ Str ^r	: + leu, pro, glu	0,044

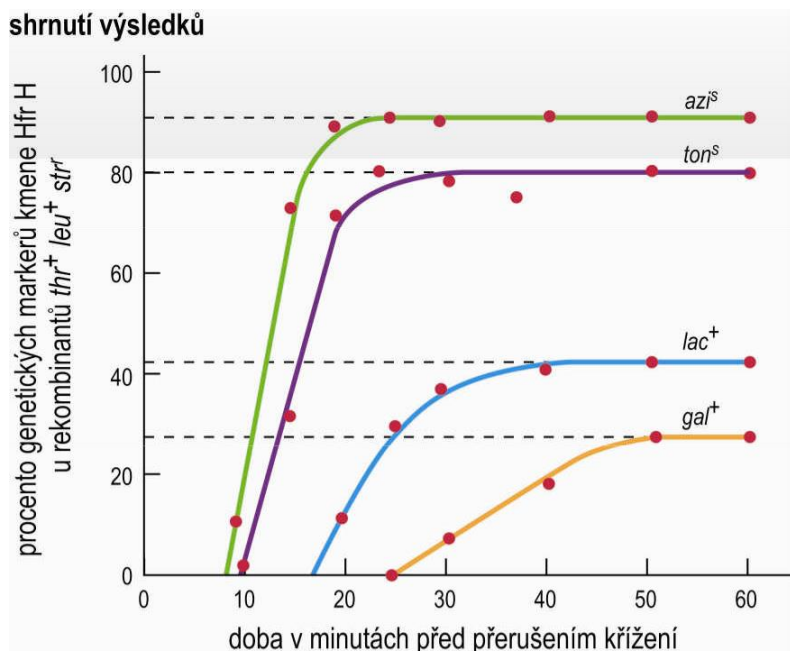
$$\text{FREKVENCE REKOMBINANTŮ} = \frac{\text{počet rekombinantů daného typu}}{\text{počet buněk Hfr}}$$

Odvozené pořadí genů na chromozomu kmene HfrH:

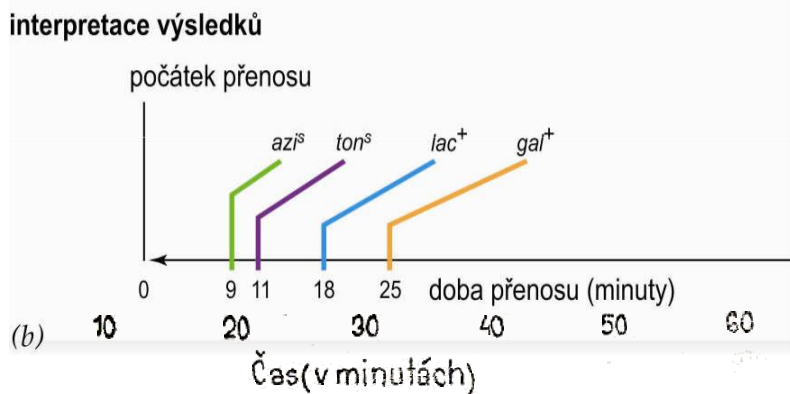
O-leu-pro-lac-gal-trp

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

Četnost neselektovaných markerů u rekombinant $thr^+ str^R$ při přerušované konjugaci jako funkce časového intervalu, v němž bylo křížení přerušeno



(a)



(b)

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

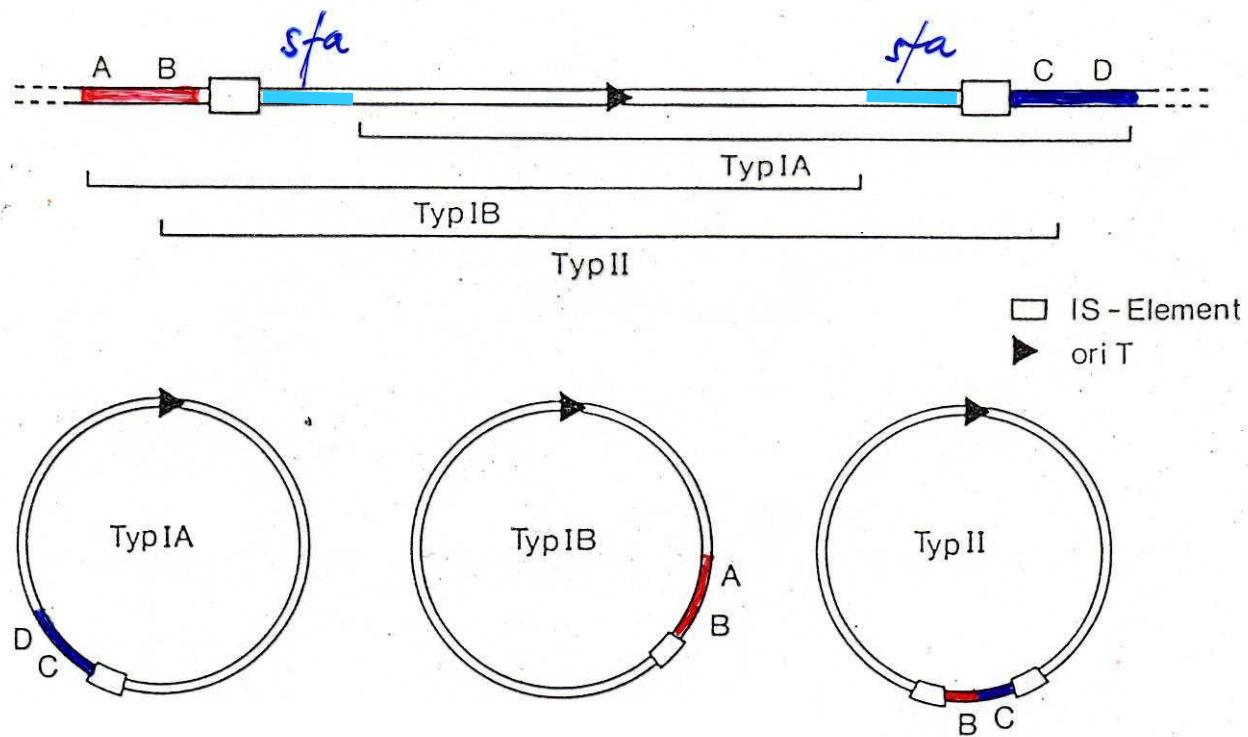
Geny thr a leu přenášené jako první (vysoká pravděpodobnost přenosu)

Gen gal a další přenášené později (nízká pravděpodobnost přenosu)

Křivky vycházejí ze sledování průběhu konjugace v populaci



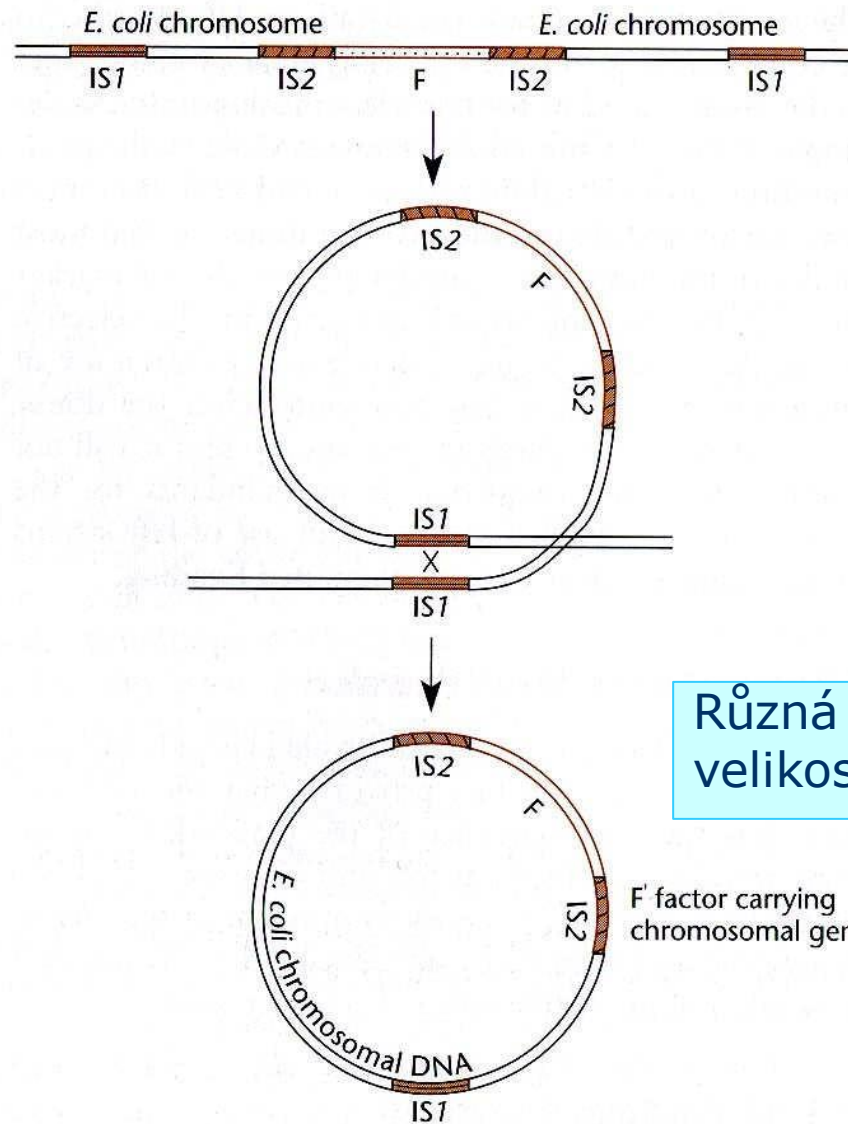
Vznik plazmidů F'



v chromozomu zůstává část F plazmidu

sfa = Sex factor affinity

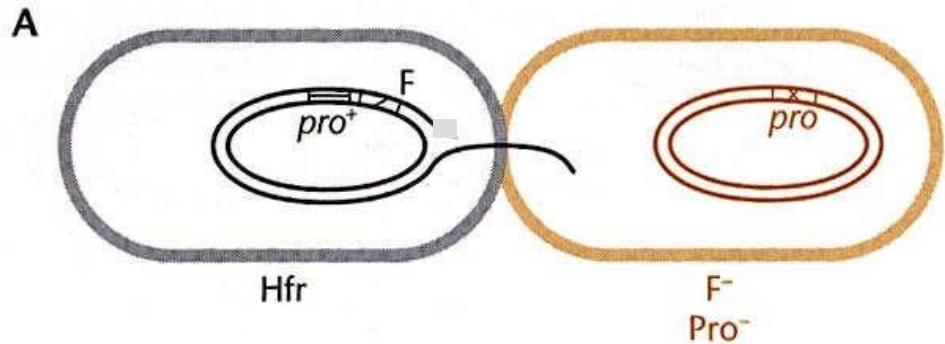
VZNIK F' PLAZMIDŮ HOMOLOGNÍ REKOMBINACÍ MEZI IDENTICKÝMI IS ELEMENTY



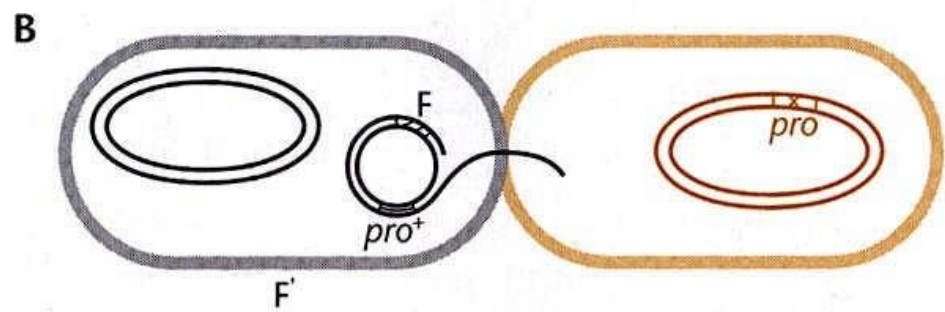
Různá konstituce a velikost F' plazmidů

F' factor carrying chromosomal genes

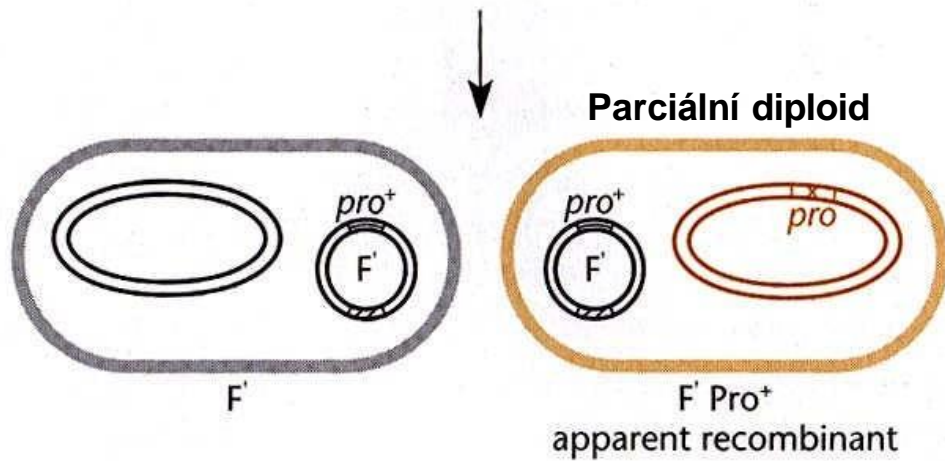
SELEKCE F' PLAZMIDU NA ZÁKLADĚ ČASNÉHO PŘENOSU **pozdního** MARKERU



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' plasmidu se začleněním 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

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.

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. 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.

KONJUGACE U G⁺ BAKTERIÍ

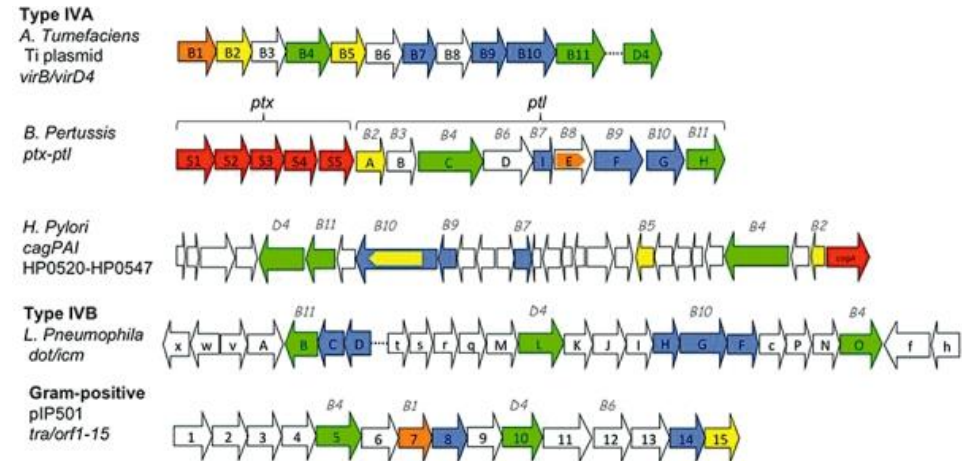
Několik mechanismů konjugativního přenosu u G⁺ bakterií:

a. přenos ssDNA (sekreční systém typu 4 – T4SS)

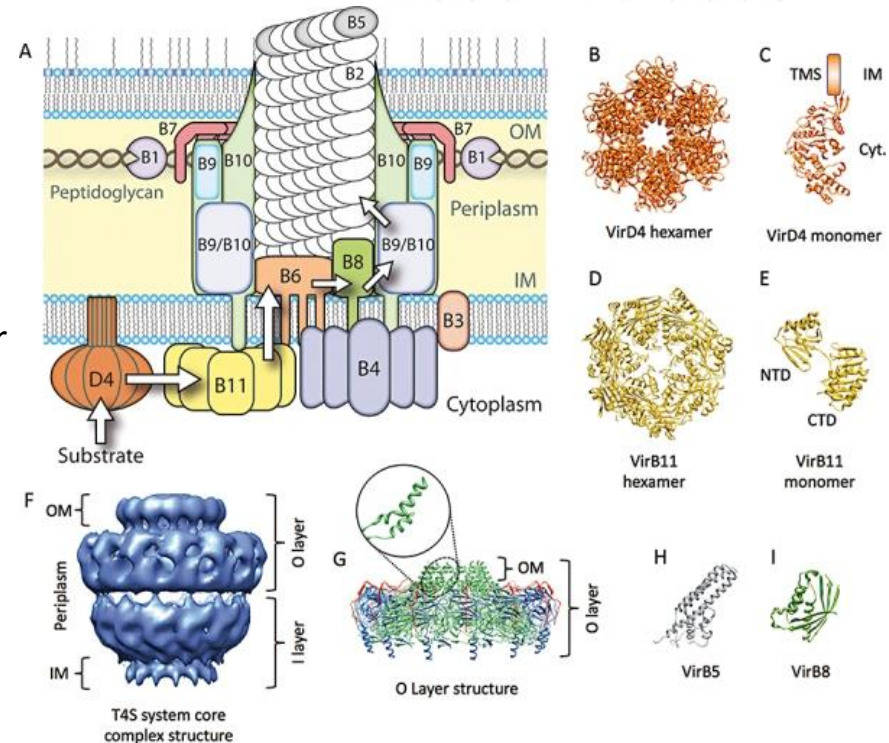
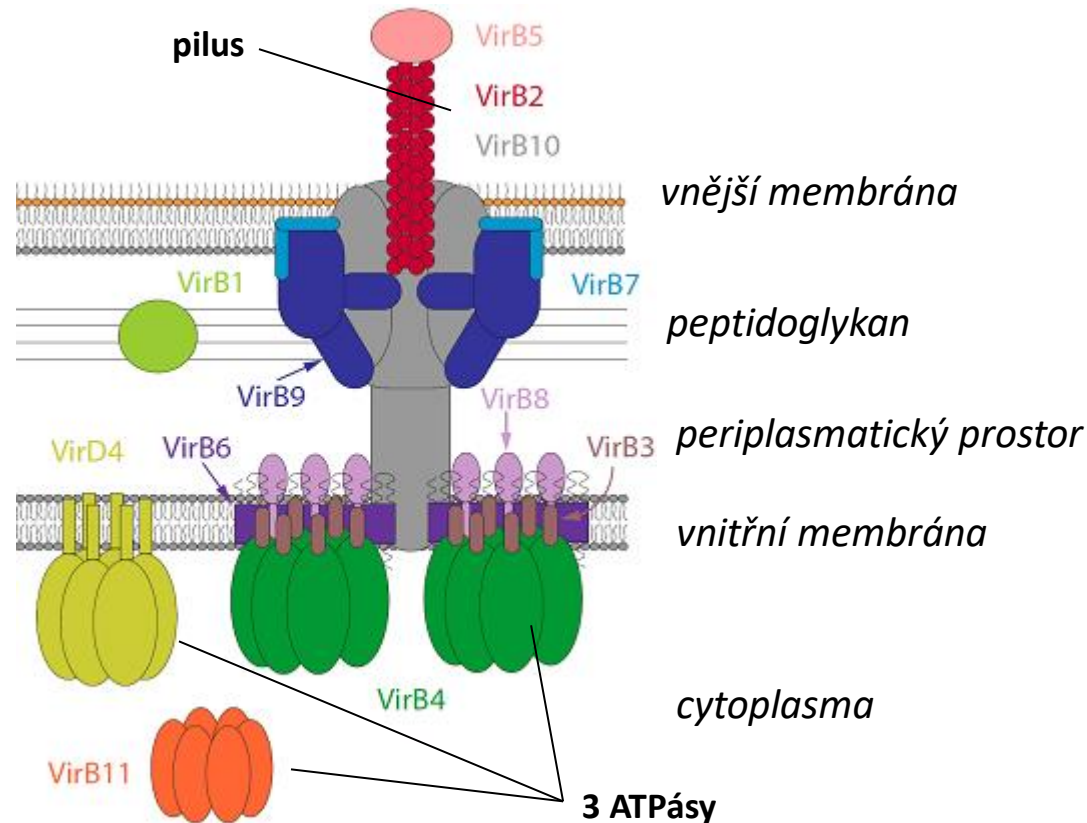
- plazmidy s širokým rozmezím hostitele Inc18 (např. pIP501)
- plazmidy rodu *Enterococcus* – pCF10 „sex pheromone-responsive“

b. přenos dsDNA

- plazmidy rodu *Streptomyces*

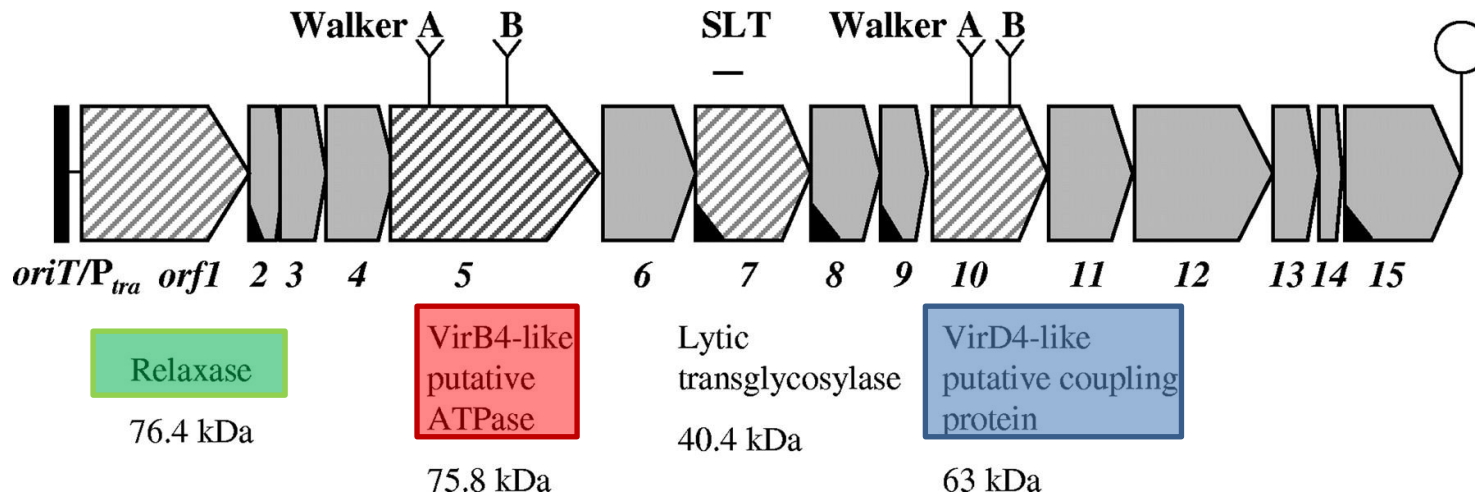


Obecná struktura a organizace T4SS



piP501 – plazmid s širokým spektrem hostitelů

- původ u *Streptococcus agalactiae*, přenositelný do téměř všech G+ bakterií a *E. coli*



TraA relaxáza – místně specifická DNA nikáza, negativní regulátor exprese všech proteinů T4SS kódovaných v *tra* operonu

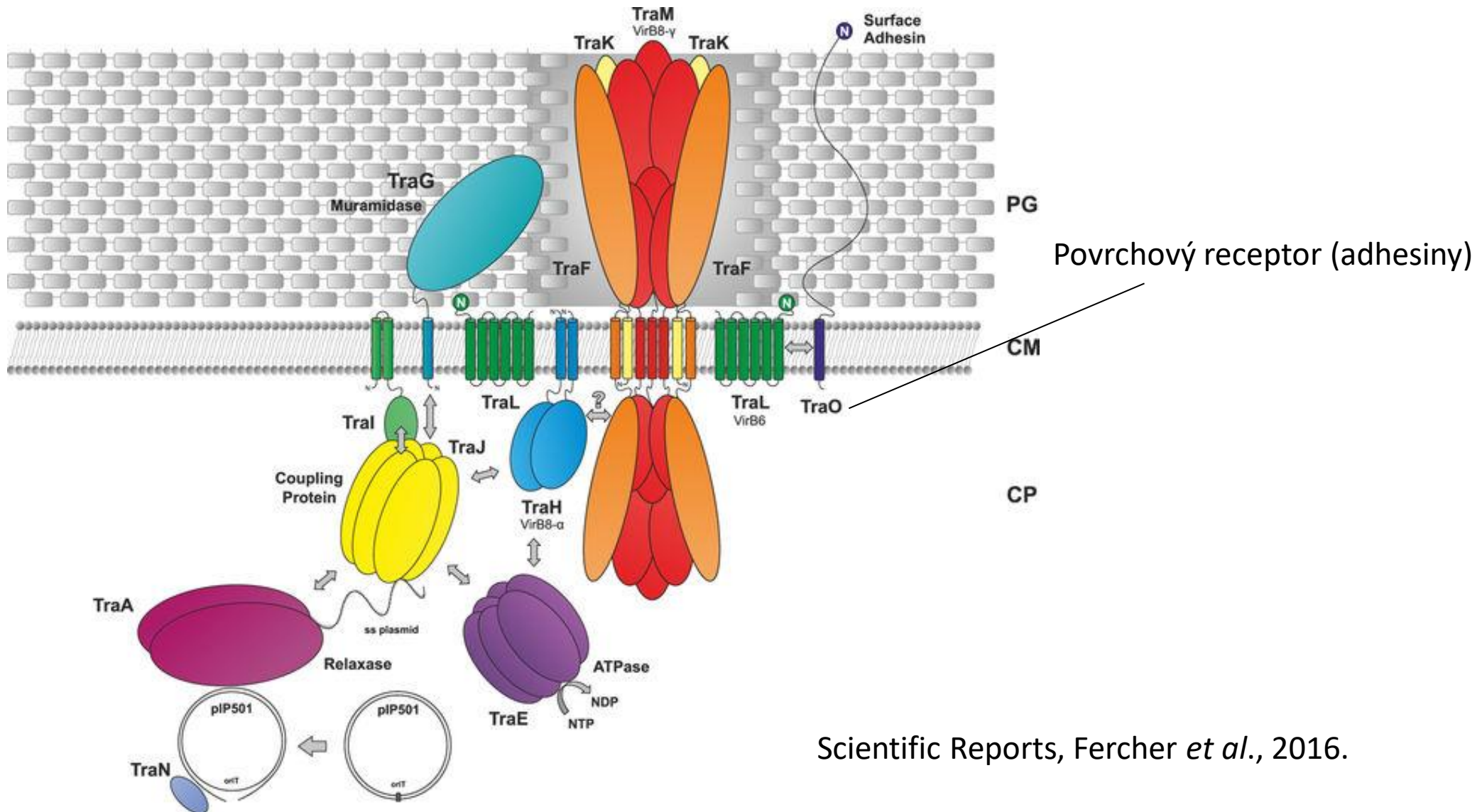
„**Motor Protein family**“ – TraE, TraJ (*ekvivalent VirB, VirD*) – ATPázy – proteiny interagují s dalšími geny (traE, traH) účastníci se DNA translokace přes vnitřní membránu

T4SS kanál – TraJ (coupling protein) přenos plazmidu + TraI – vazba na buněčnou membránu

TraA + TraJ - **RELAXOZOM**

Model přenosu DNA plazmidu pIP501

1. Na *oriT* se naváže relaxáza (TraA).
2. Po naštěpení se ssDNA plazmidu odvíjí a směřuje do kanálu v membráně – dva proteiny (TraJ).
3. TraG (peptidoglykoláza) rozvolňuje strukturu PG.
4. Vytvoření T4SS.

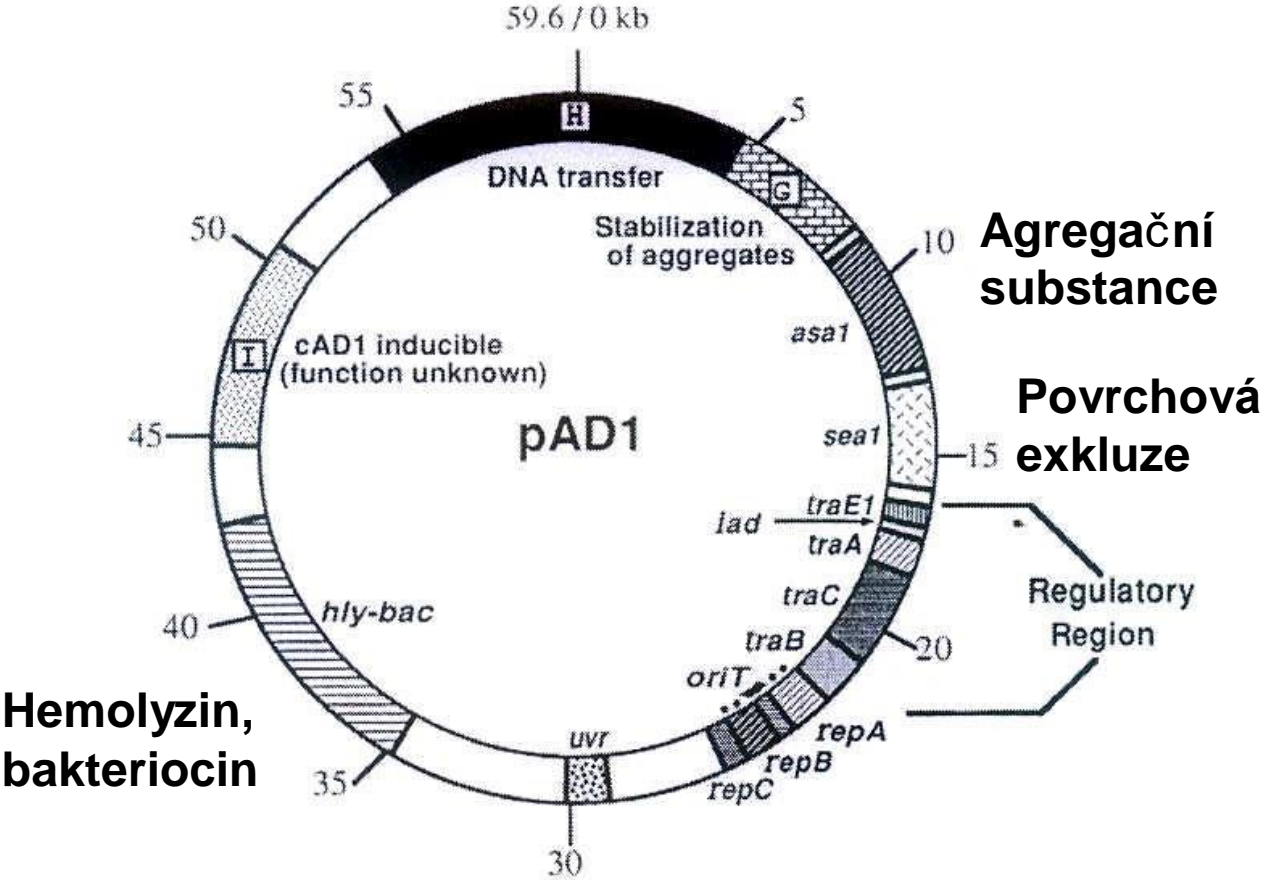


sex-feromony streptokoků

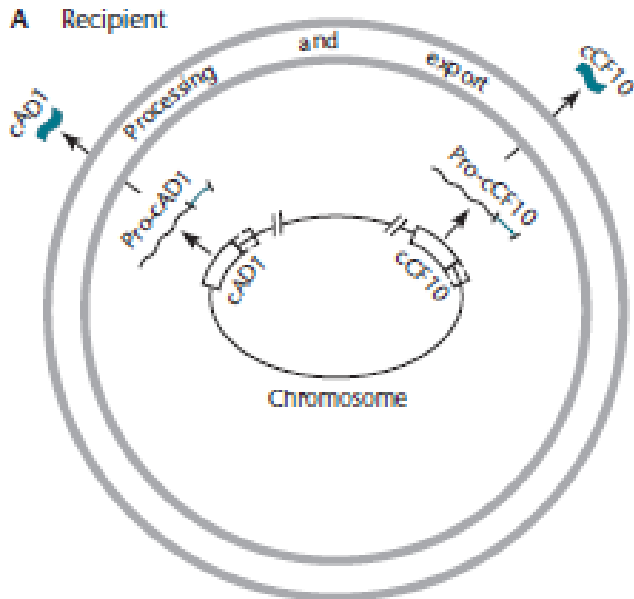
Plazmid	Velikost (kb)	Feromon
pAD1	59,6	cAD1
pOB1	71	cOB1
pPD1	54	cPD1
pAM γ 1	60	cAM γ 1
pAM γ 2	~ 60	cAM γ 2
pAM γ 3	~ 60	cAM γ 3
pAM373	36	cAM373
pCF10	54	cCF10

- * 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*)

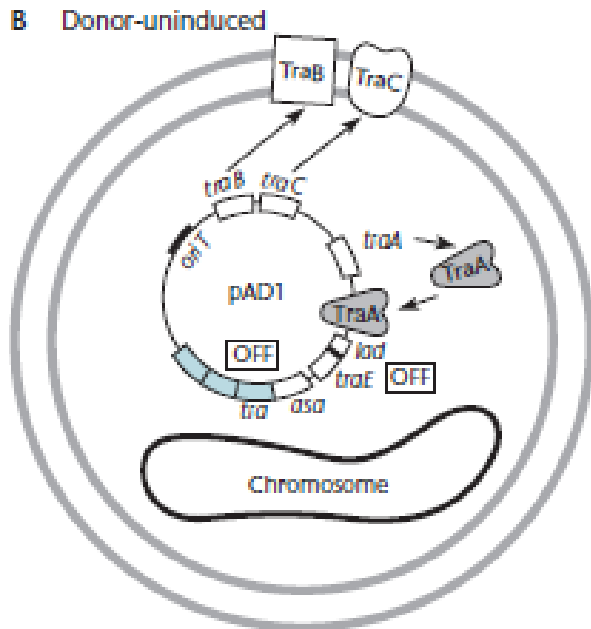
Struktura plazmidu pAD1 (~60 kb)



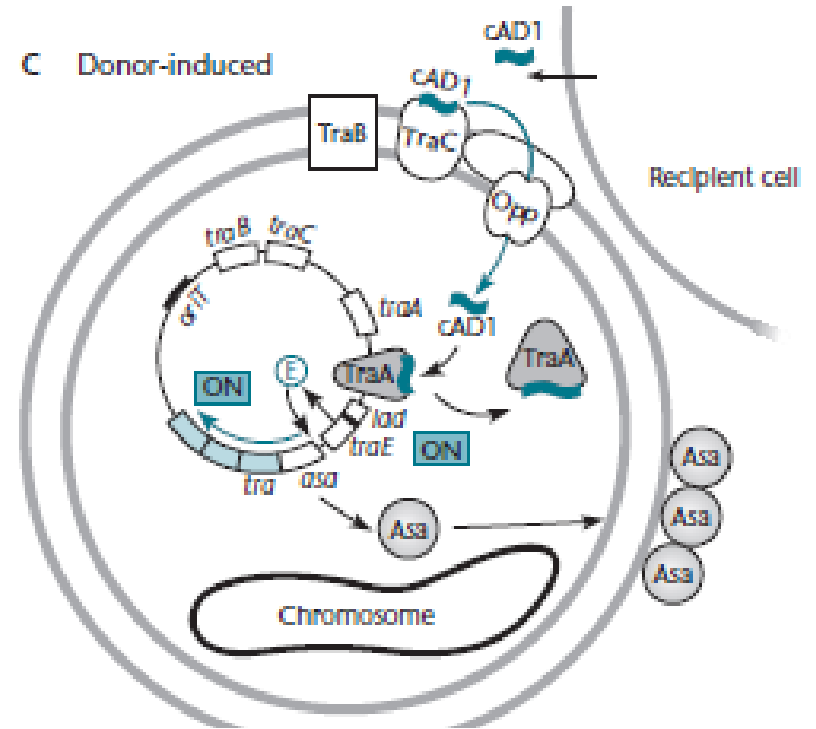
ROLE FEROMONŮ V PŘENOSU PLAZMIDŮ



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



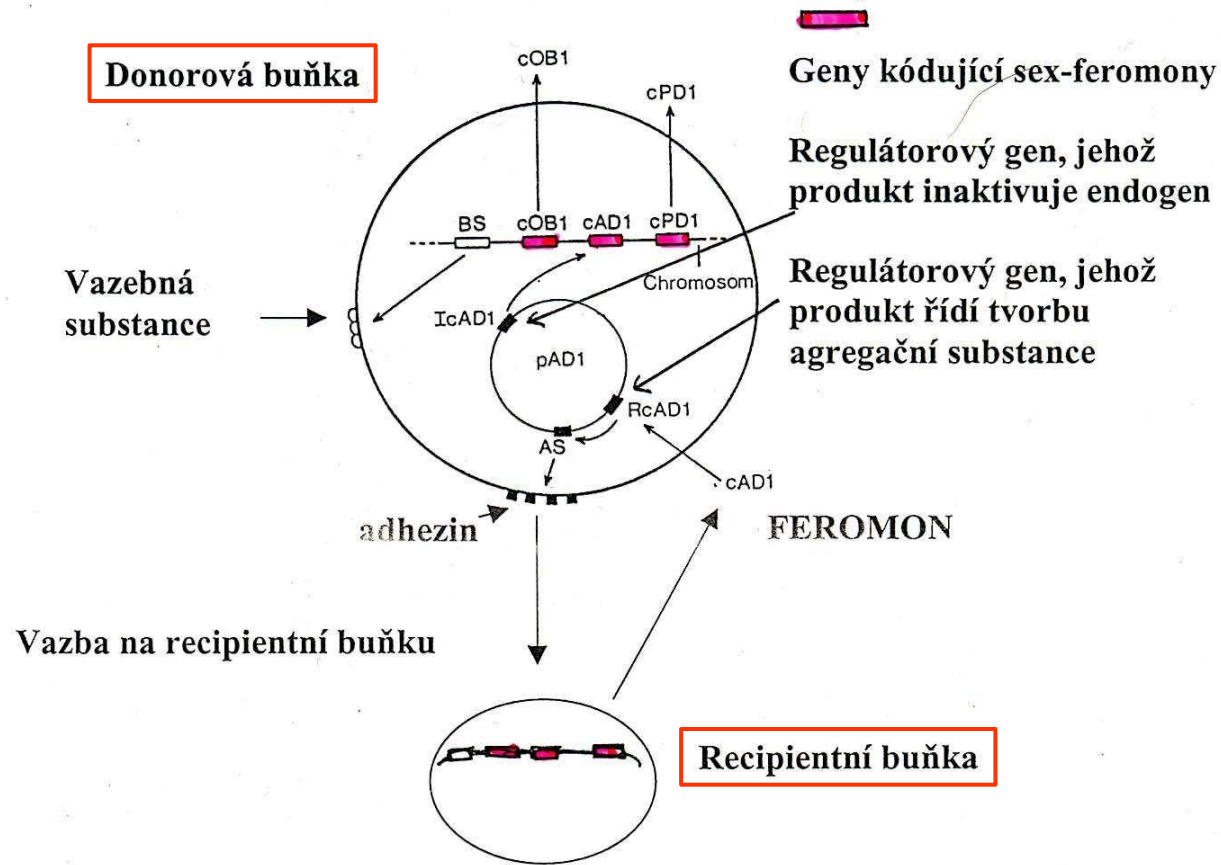
B. Plazmid donora exprimuje TraA – represor *tra* genů kromě *traC*
TraC – povrchový protein citlivý k feromonům



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

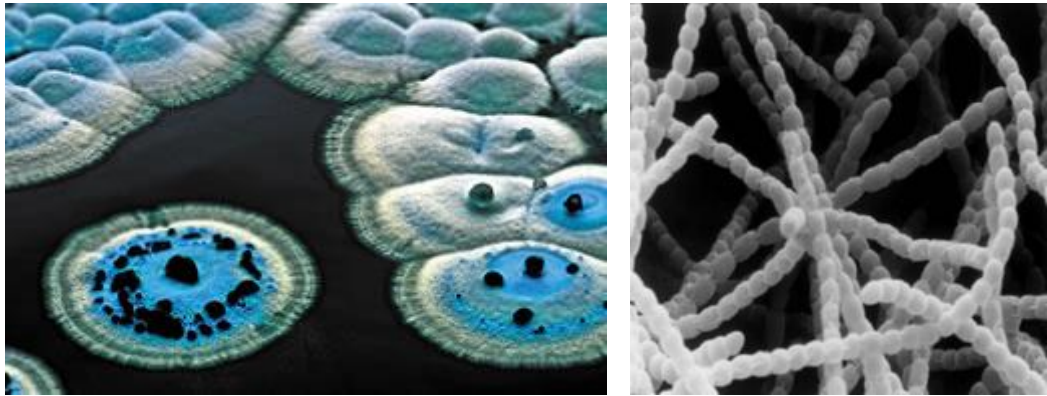
Model konjugativního přenosu plazmidů u
Streptococcus faecalis

Enterococcus (Streptococcus) faecalis

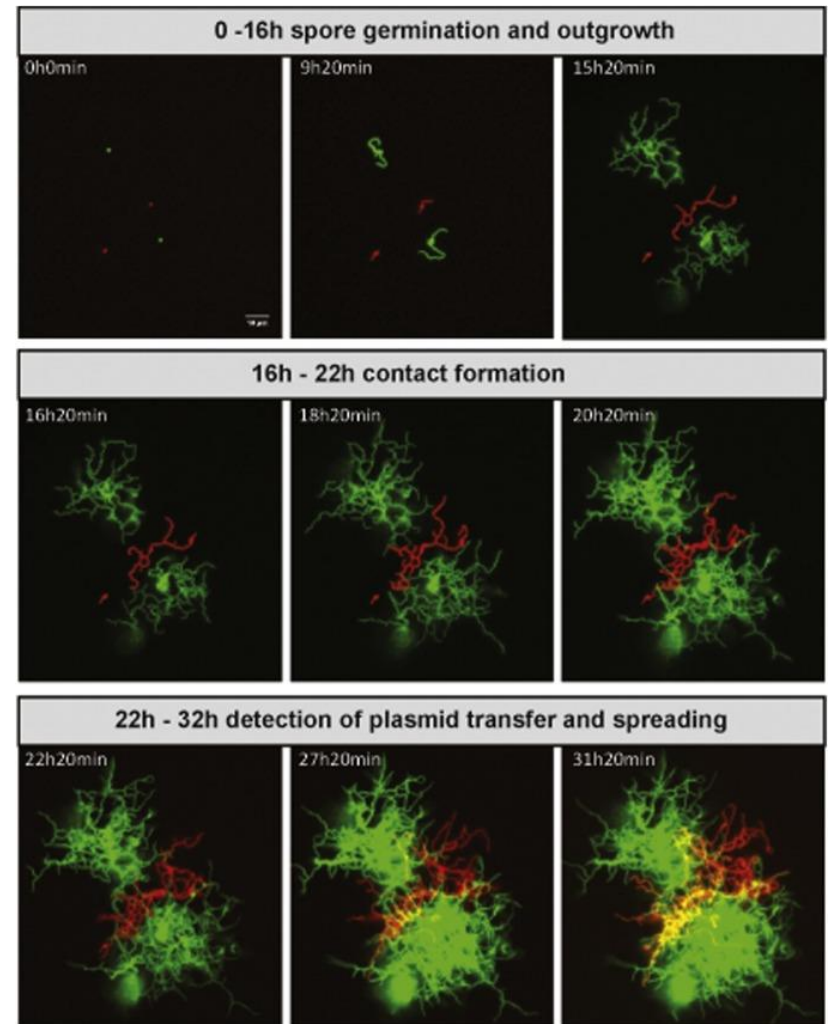
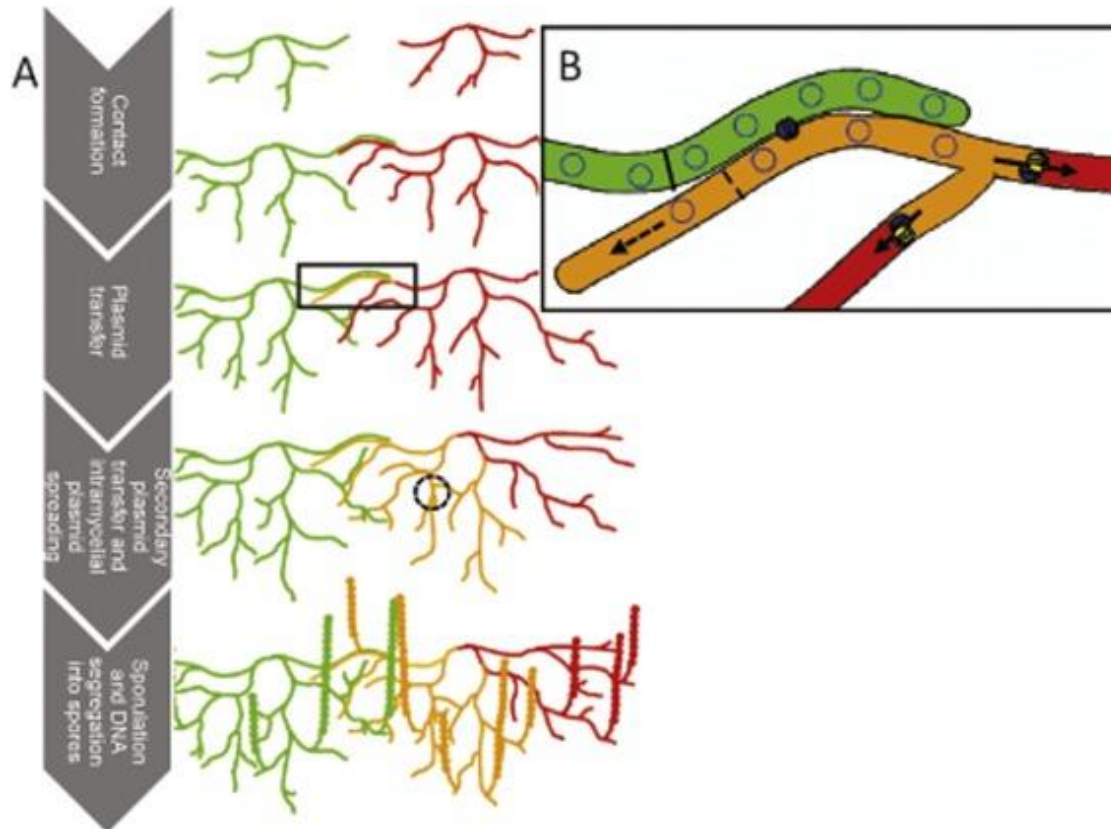


Feromony = hydrofobní okta- nebo heptapeptidy odvozené úpravami signálních sekvencí lipoproteinových prekurzorů (7-8 aa z C-konce)

Konjugace u Streptomycet

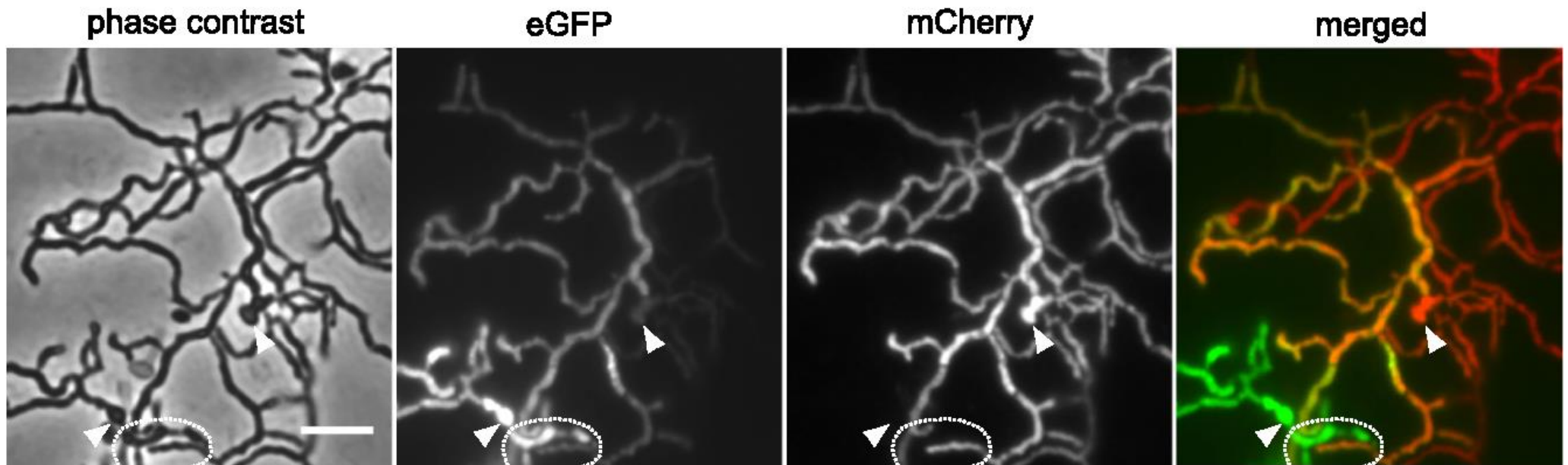


Streptomycety – významní producenti antimikrobiálních látek



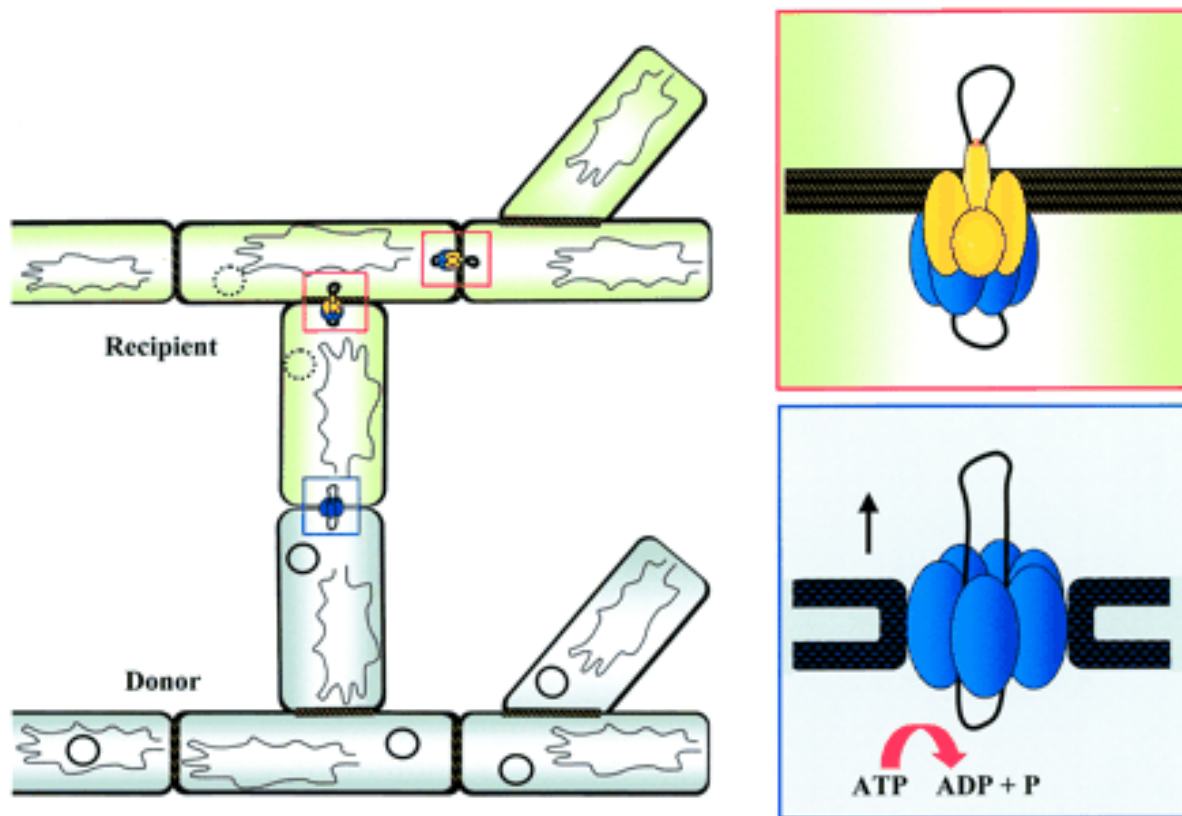
SPECIFICKÉ RYSY KONJUGATIVNÍHO PŘENOSU U STREPTOMYCET

- Konjugace nevyžaduje plazmidem kódované geny pro kontakt buněk (hyf)
- Přenos dsDNA zprostředkovaný proteinem TraB
- 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.



Model konjugativního přenosu u Streptomycet:

- Vlákna hyf donora i recipienta rostou pohromadě a přenos plazmidů nevyžaduje plazmidy kódované geny pro agregaci.
- K spojení hyf dochází působením proteinu **TraB**, multimery Tra proteinu vytváří prstencovou strukturu kolem **dsDNA** plazmidu.
- Přenos plazmidu je závislý **na ATP**, nově získaný plazmid je v mycéliu distribuován prostřednictvím hydrofóbního proteinu **Spd** (tvoří póry v recipientních buňkách).



Shrnutí procesu konjugace

1. Self-transmissible plasmids can transfer themselves to other bacterial cells, a process called conjugation. Some plasmids can transfer themselves into a wide variety of bacteria from different genera. Such plasmids are said to be promiscuous.

2. The plasmid genes whose products are involved in transfer are called the *tra* genes. The site on the plasmid DNA at which transfer initiates is called the origin of transfer (*oriT*). The *tra* genes can be divided into two groups, those whose products are involved in mating pair formation (Mpf) and those whose products are involved in processing the plasmid DNA for transfer (Dtr).

3. The Mpf component includes a sex pilus that extrudes from the cell and holds mating cells together. The pilus is the site to which male-specific phages adsorb. The Mpf system also includes the channel in the membrane through which DNA and proteins pass, as well as a coupling protein that lies on the channel, docks with the relaxase of the Dtr component, and translocates DNA through the channel.

4. The Dtr component includes the relaxase, which makes a nick within the *oriT* sequence and rejoins the ends of the

plasmid in the recipient cell. The relaxase often contains a helicase activity, which separates the strands of DNA during transfer. The Dtr component also includes proteins that bind to the *oriT* sequence to form the multiprotein complex called the relaxosome and a primase that primes replication in the recipient cell and is sometimes transferred along with the DNA.

5. Most plasmids transiently express their Mpf *tra* genes immediately after transfer to a recipient cell and only intermittently thereafter.

6. Mobilizable plasmids cannot transfer themselves but can be transferred by other plasmids. Mobilizable plasmids encode only a Dtr component; they lack genes to encode an Mpf component. In the context of a mobilizable plasmid, the genes that encode the Dtr component are called the *mob* genes. A mobilizable plasmid can be mobilized by a self-transmissible plasmid only if the coupling protein of the self-transmissible plasmid can dock with the relaxase of the mobilizable plasmid. Because they lack an Mpf component, mobilizable plasmids can be much smaller than

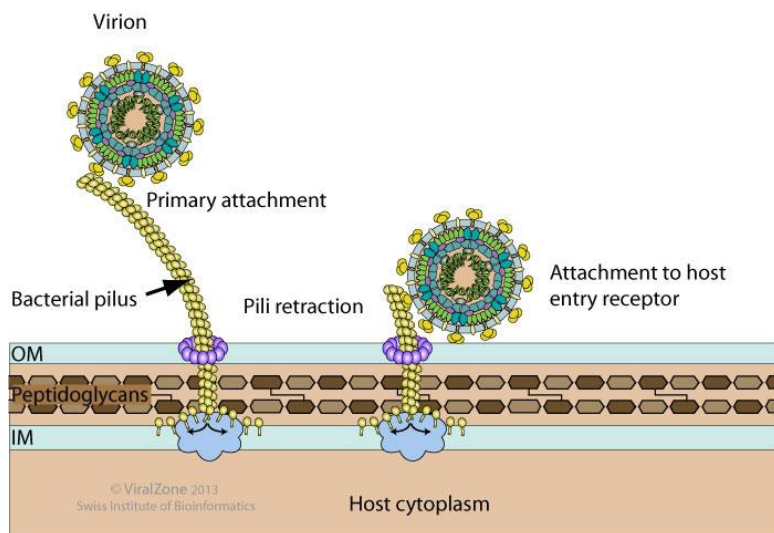
Shrnutí procesu konjugace

self-transmissible plasmids, which makes them very useful in molecular genetics and biotechnology.

7. Hfr strains of bacteria have a self-transmissible plasmid integrated into their chromosomes. Hfr strains have historically been useful for genetic mapping in bacteria because they transfer chromosomal DNA in a gradient, beginning at the site of integration of the plasmid. Hfr crosses were an important early tool for ordering genetic markers on the entire genome.

8. Prime factors are self-transmissible plasmids that have picked up part of the bacterial chromosome. They can be used to make partial diploids for complementation tests. If a prime factor is transferred into a cell, the cell will be a partial diploid (merodiploid) for the region of the chromosome carried on the prime factor, making it useful for complementation experiments.

9. Self-transmissible plasmids are found in a wide variety of bacteria and also in archaea. Almost all of the systems use certain type IV secretion systems and Mpf and Dtr complexes and appear to be related. *Firmicutes*, which lack an outer membrane, use adhesins instead of a pilus to hold mating pairs together.



Bakteriofágy - zajímavost

Pilus-Specific Phages

Some types of phages only infect cells that express a certain type of conjugation-associated pilus on their surfaces. All phages adsorb to specific sites on the cell surface to initiate infection (see chapter 7), and some phages use the pilus of a self-transmissible plasmid as their adsorption site. Phages that adsorb to the conjugation pilus of a self-transmissible plasmid are called **pilus-specific phages** because they infect only donor cells. Pilus-specific phages are also known as male-specific phages because only "male" (e.g., F^+) cells produce the pilus. Examples of pilus-specific phages are M13 and R17, which infect only cells carrying the F plasmid, and Pf3 and PRR1, which infect cells containing plasmid RP4 and related plasmids.

The susceptibility of pilus-expressing cells to certain phages may in part explain why the *tra* genes of plasmids are usually tightly regulated. Most self-transmissible plasmids express a pi-

lus only immediately after entering a cell and only intermittently thereafter (see "Example: Regulation of *tra* Genes in F Plasmids"). If cells containing the plasmid always expressed the pilus, a pilus-specific phage could spread quickly through the population, destroying many of the cells and with them the plasmids they contain. By only intermittently expressing a pilus, cells containing a self-transmissible plasmid limit their susceptibility to phages that use their pilus as an adsorption site. For bacteria that reside in animal hosts, pili might also be expected to be highly immunogenic; therefore, regulating the expression of proteins on the cell surface should also limit detection and clearance of the plasmid's bacterial host in the host animal. Expression of the *tra* genes could also be a significant burden on cellular resources and reduce host competitiveness if not regulated.