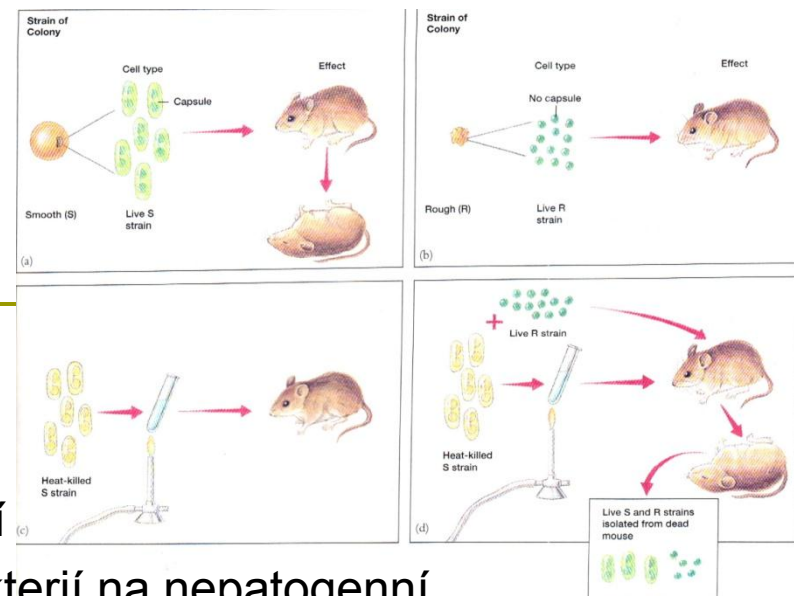


# Transformace



Molecular Genetics of Bacteria, Snyder and Champness, 2<sup>nd</sup> ed. (ASM Press)

# Transformace



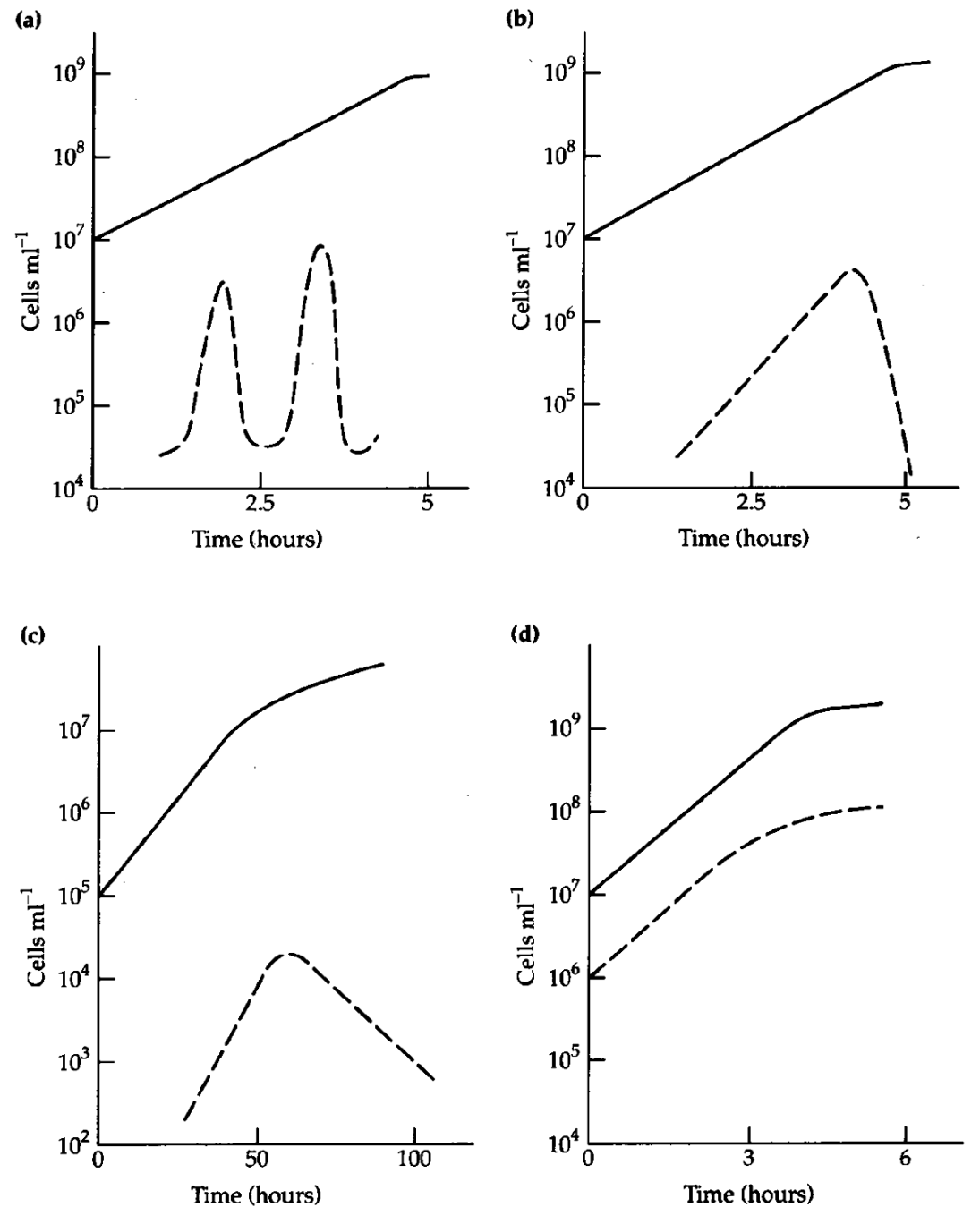
- ❑ Nejstarší pozorovaný přenos genů u bakterií
- ❑ Pozorován přenos DNA od patogenních bakterií na nepatogenní (*Streptococcus pneumoniae*)
  - Griffith 1928 - infikoval myši směsí živých nepatogenních bakterií a usmrcených patogenních.
  - Pozoroval úhyn těchto myší
  - Pokud byli infikováni pouze usmrcenými patogenními nebo pouze nepatogenními, tak nehynuly.
  - Patogenní bakterie předávaly nepatogenním „transformační princip“
  - Avery 1944 – zjistil, že jde o DNA
  - První důkaz, že DNA je zodpovědná za dědičnost
- ❑ přenos volné dsDNA přes bakteriální membránu
  - lineárních fragmentů i cirkulárních plazmidů
- ❑ donor, recipient, transformanty

# Transformace

---

- **přirozená transformace** u rodů:
  - *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Synechococcus*.
  - *Methanococcus voltae*
- **kompetence**
  - fyziologický stav bakterií, kdy jsou schopny přijímat cizorodou DNA
  - je komplexní děj závislý na určitých podmínkách
  - bakterie musí být v určitém fyziologickém stavu
    - *S. pneumoniae* -  $10^7$  buněk
    - *Staphylococcus* - indukovaná fágem
    - *Bacillus* - snížení kultivační teploty, pokles živin
    - *Haemophilus* - rychlý pokles živin
  - sekrece kompetentního faktoru
    - malý peptid spouštějící syntézu proteinů potřebných pro přirozenou kompetenci
- **u ostatních pouze indukovaná**,
  - zvýšením fluidity membrány (teplotní šok, vysoké koncentrace  $\text{CaCl}_2$ )
  - elektroporací

# Stav přirozené kompetence



- a) *S. pneumoniae*
- b) *B. subtilis*
- c) *Synechococcus*
- d) *H. influenzae*

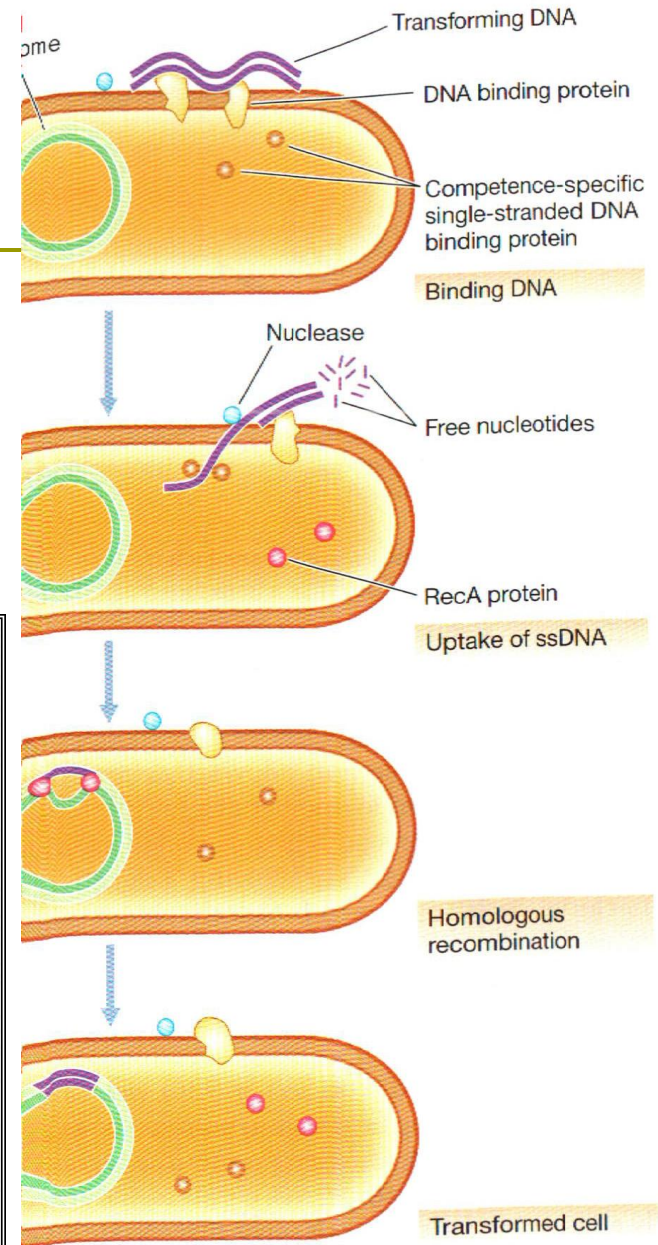
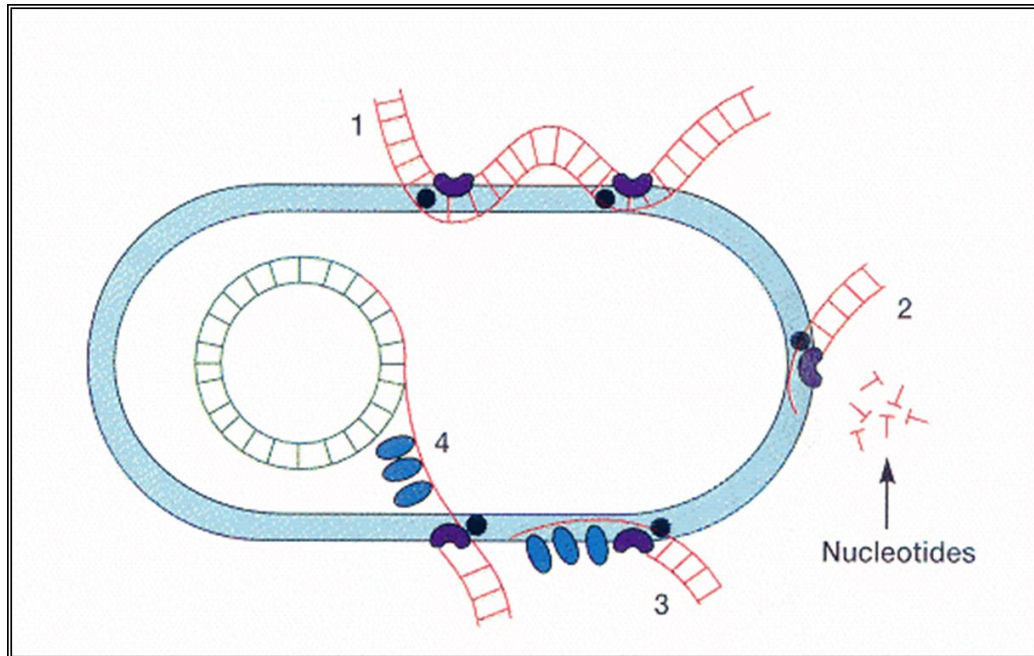
# Mechanismus transformace

---

## □ *S. pneumoniae*, *B. subtilis* - G +

- kompetentní buňky vážou fragment dsDNA na membránové receptory
  - pokud je velký min. 7-9 kb (max. 15 kb)
  - v min. koncentraci 5-10 µg/ml (saturovatelný proces)
- proces je náhodný a fragmenty navzájem kompetují
- děj probíhá na úkor energie (ATP nebo membránový potenciál)
- jedno vlákno je štěpeno membránově vázanou exonucleasou (není specifita)
- druhé vlákno se váže na membránový protein, který jej přenesse přes membránu do cytoplasmy, chráněno specifickými proteiny (cca 30 min.)
- ssDNA je pak homologně integrována do chromosomu nurecipročním rekombinačním mechanismem

# Mechanismus transformace



■ Schéma transformace - Brock

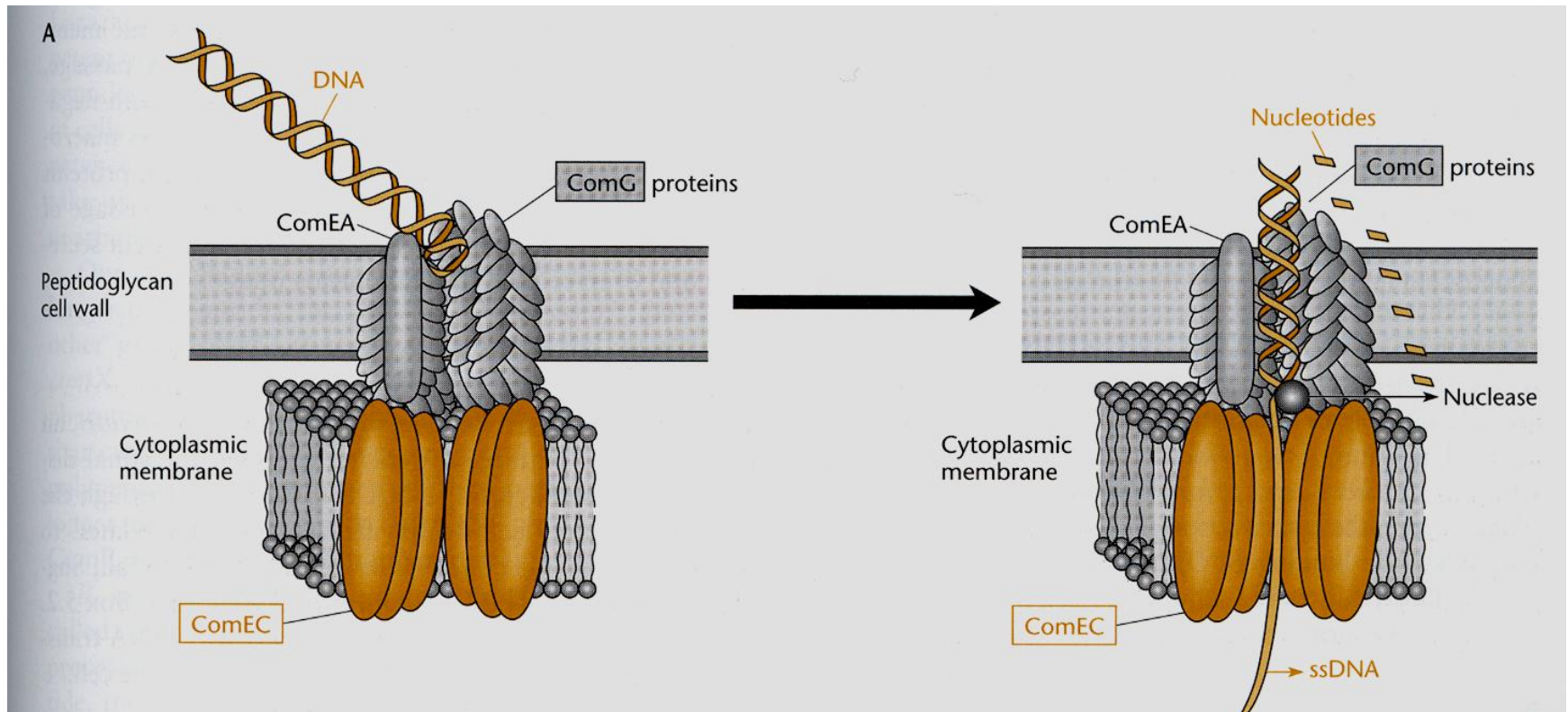
# Mechanismus transformace G+

---

- Proteiny zúčastněné v procesu byly odhaleny na základě analýzy mutant neschopných transformace
- Geny ovlivněné v těchto mutantech byly nazvány **com**
  - *comA*, *comK* – regulace na transkripční úrovni
  - ***comE*, *comF*, *comG*** – strukturní geny pro transport, jsou pod transkripční kontrolou *comK* a ten je pod kontrolou *comA*
- Některé proteiny nejsou označeny *com*, byly objeveny a participují též na jiných procesech
  - ***nucA*** – nukleáza štěpící extracelulární dsDNA – volné DNA konce jsou substráty pro kompetentní proteiny
  - **SSB proteiny** – (single stranded DNA binding)
- **Regulace** – dvoukomponentový systém – kompetenční feromony
  - ComP – histidinová kinasa
  - ComA – transkripční aktivátor



# Mechanismus transformace G+



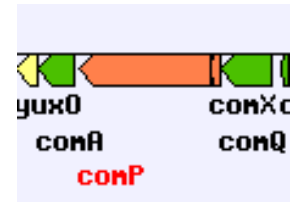
*comE* – vytvářejí pór, ComEA - váže extracelulární DNA

*comG* – vytvářejí proteiny póru

*comF* geny – přenášejí DNA do buněk



# Mechanismus transformace G+



## Regulace kompetence u *B. subtilis*

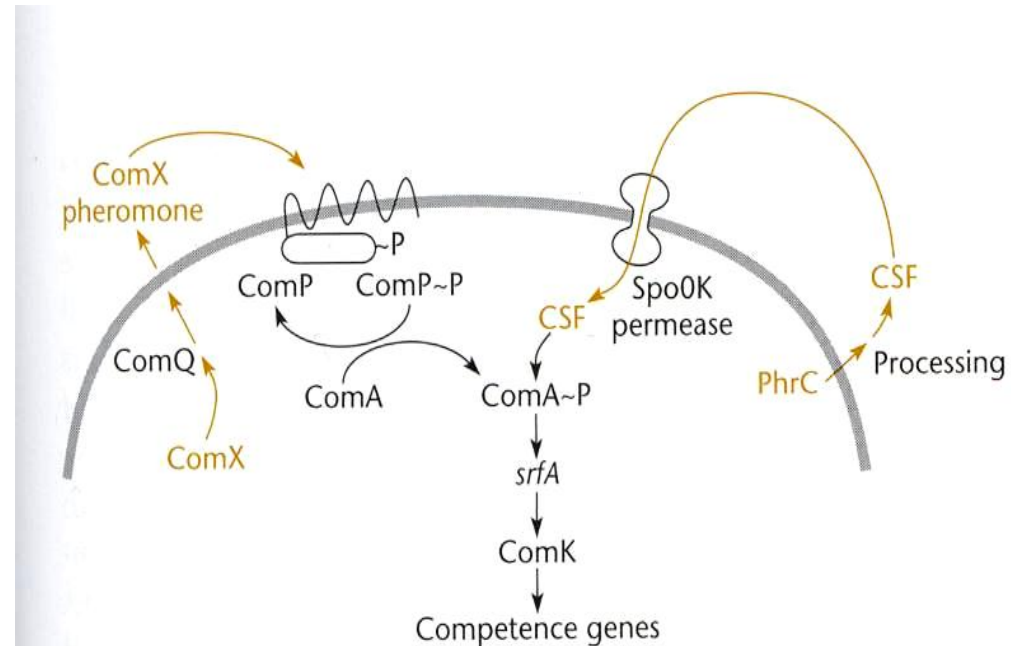
Prostřednictvím dvoukomponentového regulačního systému

- **ComP** – **sensorová kinasa** – aktivovaná kompetenčními feromony – quorum sensing

- **ComA** – **respons regulátor** – **transkripční aktivátor** – fosforylovaná forma

- **Spo0K** – **permeasa** – transportuje do buňky CSF peptid

- Některé společné geny podílející se na sporulaci –

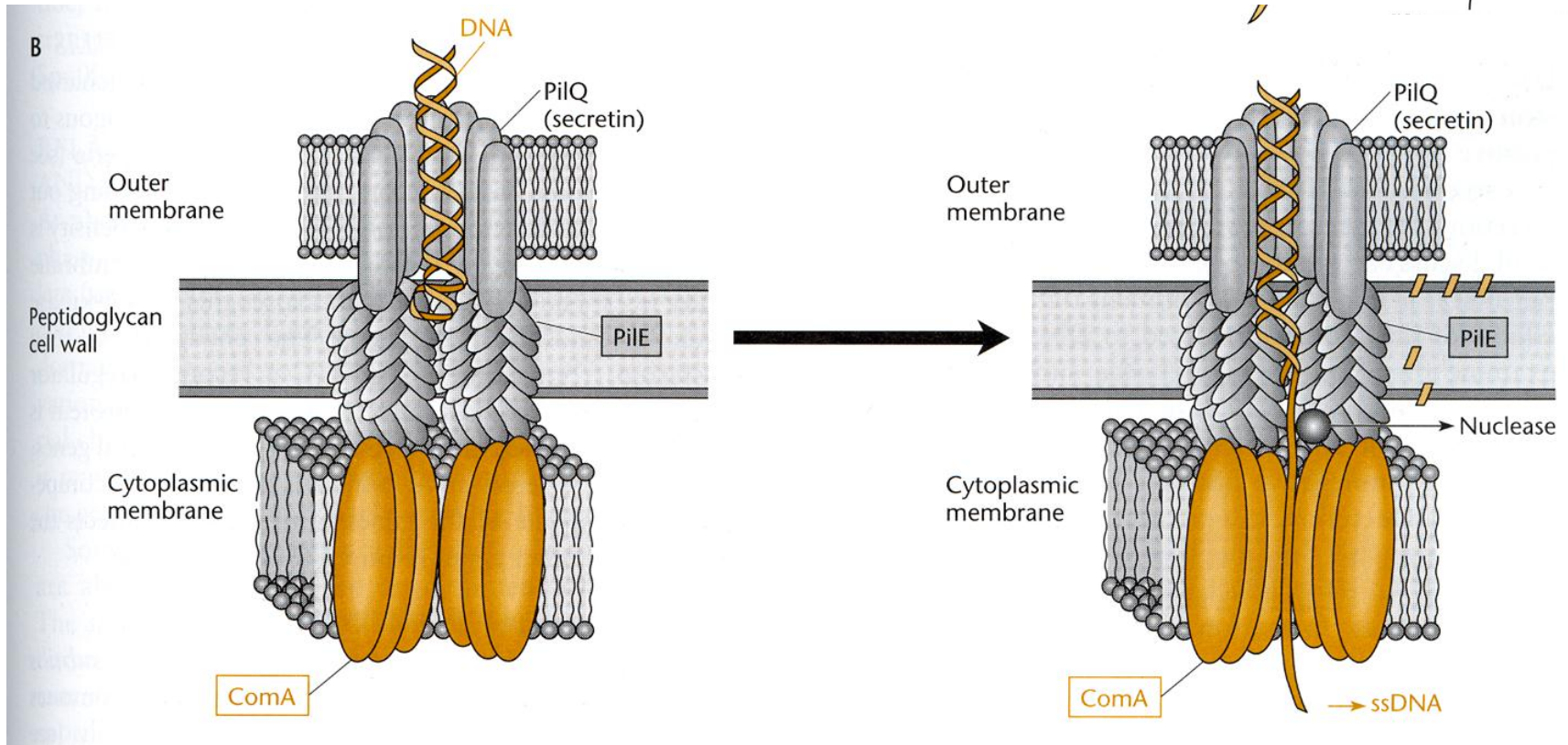
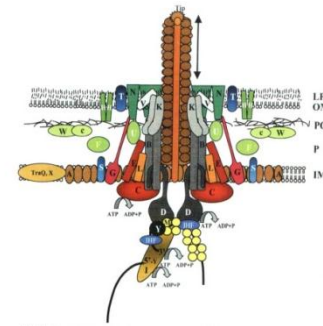


# Mechanismus transformace G-

---

- dva typy mechanismů
- dřívější názor: dsDNA se váže na membránový protein a je přenesena do buňky v membránovém vesikulu
- **I. typ** - *Haemophilus influenzae* - G<sup>-</sup>
  - Mechanismus podobný jako u G<sup>+</sup> - strukturní podobnosti
  - Podobné s ComG u *Bacillus* ale nazvané Pil – objevené na základě jejich podílu též na formování pilusů – pomáhají překonávat bariéru vnější membrány
  - akceptuje DNA pouze od blízce příbuzných druhů
    - specifita je dána speciální sekvencí DNA -  
*Haemophilus* 5' AAGTGCGGTCA 3'  
*Neisseria* 5' GCCGTCTCAA 3'
- **II. typ** - *Helicobacter pylori*, *Acinetobacter*, *Neisseria*
  - Strukturní podobnost s proteiny podílející se na konjugaci nebo sekreci proteinů IV typu
  - U *Neisseria* též podobnost s proteiny podílející se na jevu zvaným „twitching motility“
  - PSTC proteiny – pilus formation, secretion, twitching motility, competence.
  - Obousměrný transport DNA

# Mechanismus transformace G-



- ❑ PilE – podobný ComG
- ❑ ComA – ortologní k ComEC

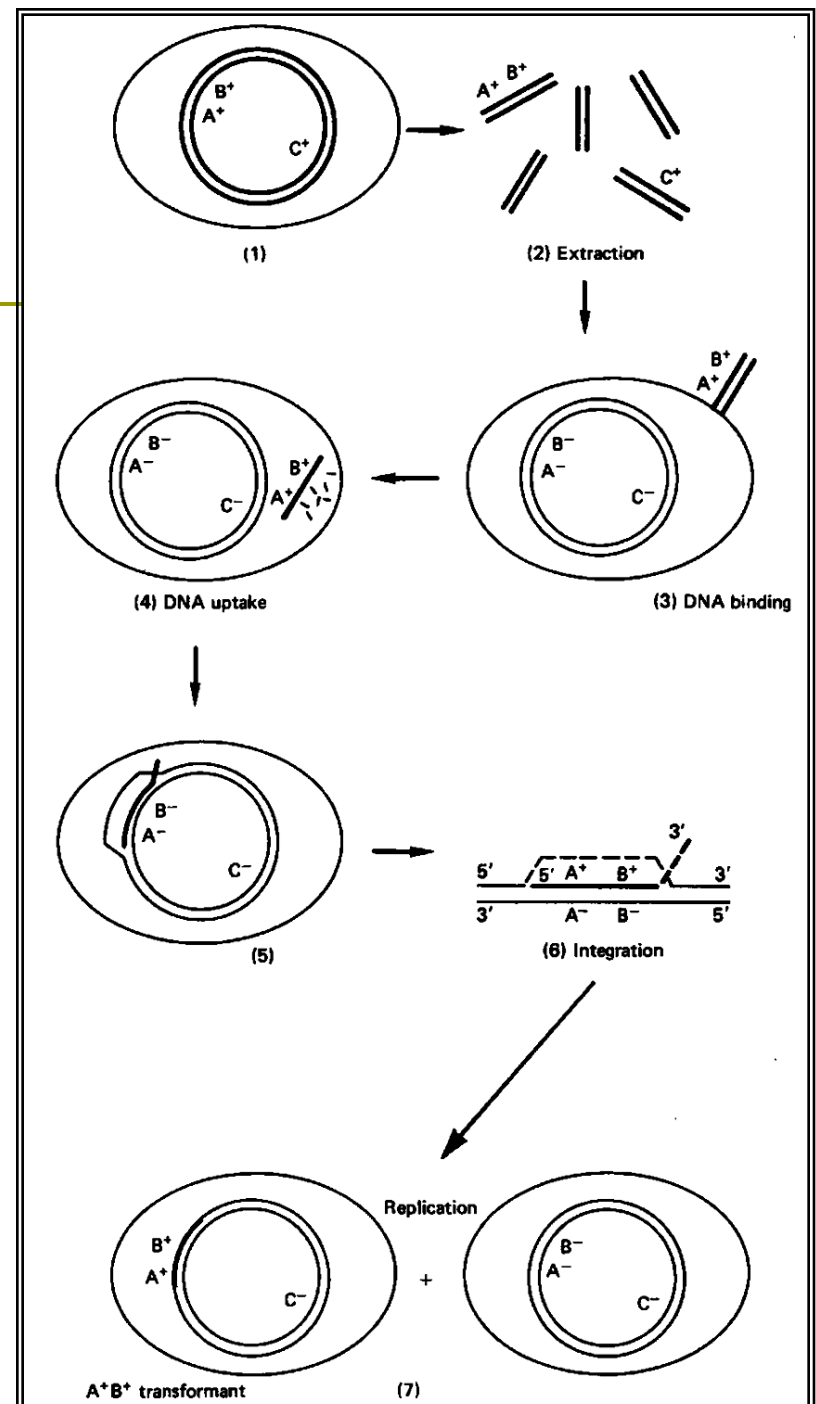
# Mechanismus transformace

---

- **Za podmínek přirozené kompetence**
  - do buňky se dostane pouze jedno vlákno DNA
    - plazmidová DNA 10-100x méně efektivně (pouze dimerizovaná)
  - může být inkorporováno do chromosomu
    - na základě homologních sekvencí dvojnásobným crossing overem (nereciproční rekombinační mechanismus - Meselson a Rading)
    - vyžaduje u recipientní buňky kompletně funkční rekombinační systém, polymerasu a ligasu
  - sekvence nemusí být zcela identická - mohou být malé rozdíly
    - vznik heteroduplexu a následně dvou druhů transformantů
    - efektivnost snížena opravným mechanismem mismatch repair
  - fyziologická role stále spekulativní
  - využití při tvorbě mutant (s bodovou mutací i inserce genových kazet)
  - při mapování k určování vzájemné polohy genů

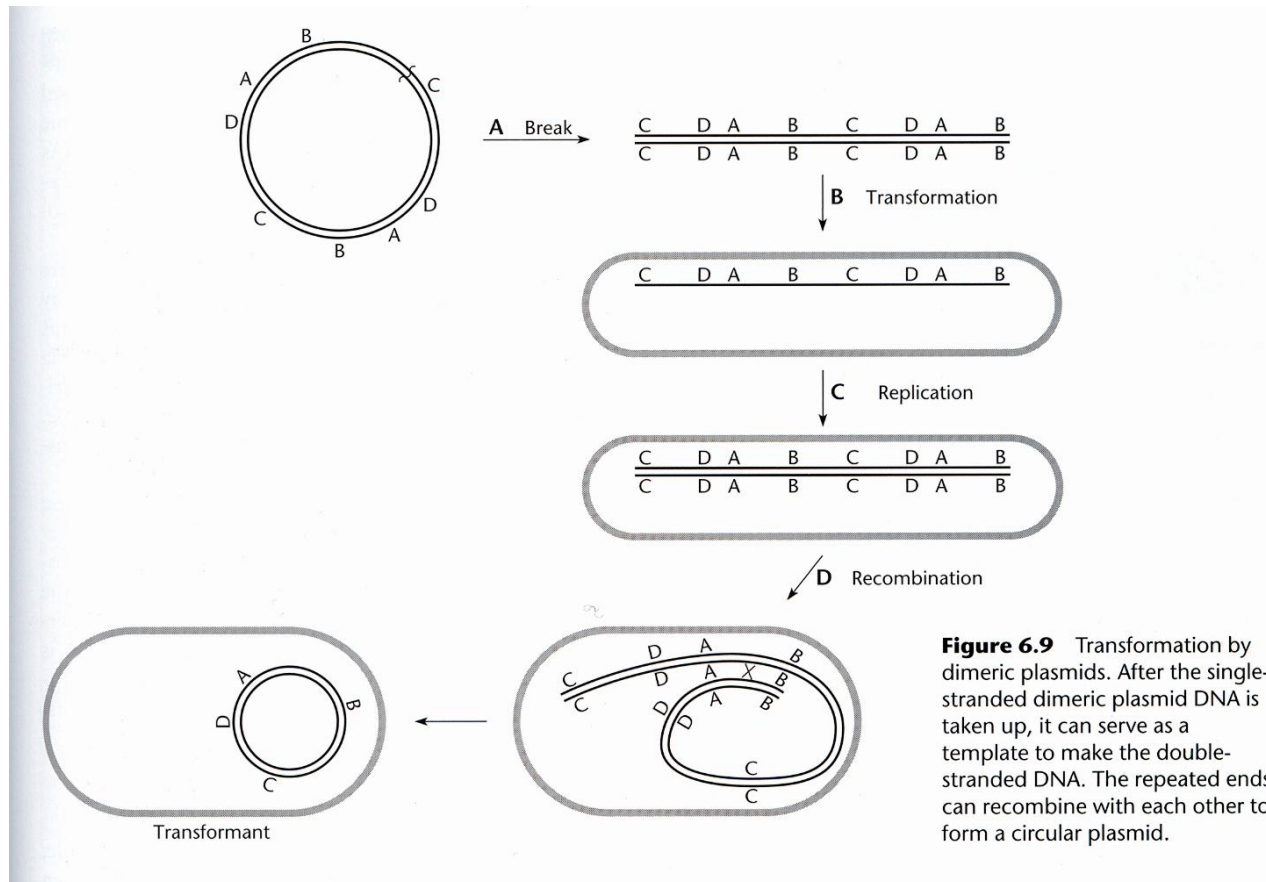
# Nereciproční rekombinace

- párování homologní sekvence s recipientní
- lokální rozpletení DNA duplexu
- exonukleásově rozštěpení duplikované oblasti v obou molekulách
- ligace a vznik heteroduplexu
- po rozdělení mutovaný transformant a genotypově původní buňka



# Mechanismus transformace

- Pravděpodobný mechanismus transformace kruhových plazmidů a jejich recirkularizace



**Figure 6.9** Transformation by dimeric plasmids. After the single-stranded dimeric plasmid DNA is taken up, it can serve as a template to make the double-stranded DNA. The repeated ends can recombine with each other to form a circular plasmid.

# Fyziologická role přirozené kompetence

---

## □ Nutriční

### ■ Pro –

- Buněčná smrt a kanibalismus, pozorovaný jev u bakterií jako součást diferenciačního procesu - vyžaduje určení konzumenta
- Pouze část buněk je kompetentních, vždy reakce na hladovění

### ■ Proti –

- Pro buňku je energeticky nevýhodné
- Výhodnější degradovat vně a transportovat nukleotidy
- Proč selektivita u některých druhů

## □ Oprava DNA

### ■ Pro –

- buňky mají možnost získat materiál na opravu vlastní DNA – pozorováno u buněk osvícených DNA
- Specifita transformace DNA pouze od příbuzných druhů

### ■ Proti -

- Není experimentální důkaz souvislosti indukce kompetence, repair aparátu a expozice UV
- Není důkaz indukce kompetence poškozenou DNA



# Fyziologická role přirozené kompetence

---

## □ Rekombinace

### ■ Pro –

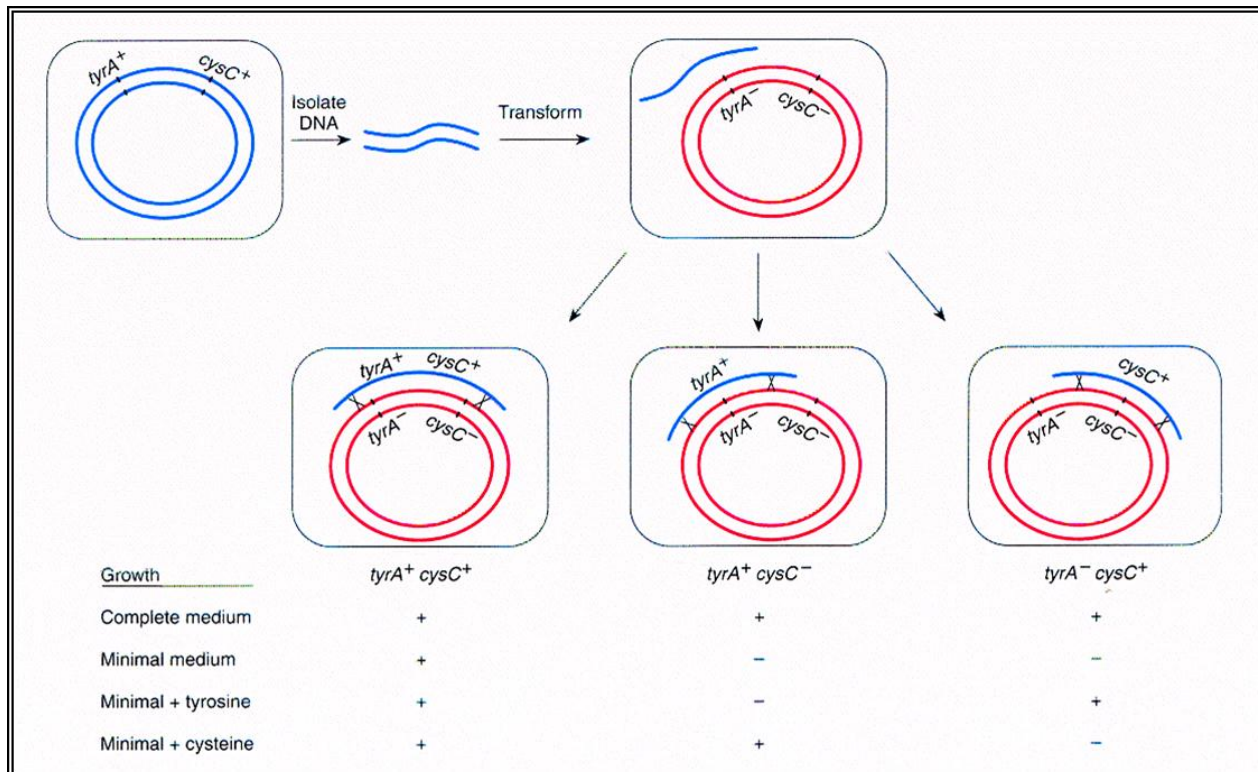
- Je logické, ale špatně prokazatelné
- Umožňuje nové kombinace genů a evoluci bakteriím, které nemají jiný způsob genetické výměny
- Některé bakterie uvolňují DNA během růstu
- U *Neisseria* umožňuje například antigenní variabilitu

### ■ Proti –

- Nevíme proč některé bakterie jsou a některé nejsou přirozeně kompetentní
- Funkce kompetence u různých druhů různá

# Využití transformace

- Přenos allel – mapování, vytváření mutant.
  - jeden crossover zlomí chromosom a je letální
    - životaschopné (selektovatelné) jsou pouze rekombinanty se sudými crossovery
    - Přeneseny jsou geny, které jsou blízko sebe –
      - čím jsou geny blíže, tím se přenesou současně s větší pravděpodobností.



# Mechanismus transformace

---

## □ Při navození kompetenci

- jiný mechanismus
  - zvýšením fluidity membrány (teplotní šok, vysoké koncentrace  $\text{CaCl}_2$ )
  - elektroporací
- do buňky se dostanou obě vlákna
- málo efektivní proces
  - cccDNA - 1 transformant na  $10^4 - 10^5$  buněk
  - lineární DNA - 1 transformant na  $10^8 - 10^9$  buněk
- může i nemusí dojít k rekombinaci s chromosomem
- je potřeba používat mutanty
  - defektní v nukleázové aktivitě ( $\text{recBC}^-$ ,  $\text{sbcB}^-$ , exonukleasa V a exonukleasa I
  - defektní v restričním systému  $\text{hsdR}^-$ ,  $\text{hsdS}^-$ , napadající cizorodou DNA

# Bakteriofagy



Literatura:

- ▣Bacteriophages, J. Maniloff – introductory article ELS
- ▣Bacteriophages: Tailed – H-W. Ackermann – secondary article ELS
- ▣Bacteriophage T4 – C.K. Mathews - secondary article ELS
- ▣Bacteriophage Lambda and its relatives – S.R. Casjens, R.W. Hendrix - secondary article ELS
- ▣Bacteriophages with ssRNA – J. van Diun - secondary article ELS
  
- ▣Molecular genetics of bacteria kap.7
- ▣Prokaryotic genetics part1, kak4

# Bakteriofágy

---

- Obligátní intracelulární parazité bakterií
  - viry, které napadají bakterie
  - mnoho druhů s různou specifitou k hostitelskému organismu (140 bakteriálních rodů)
  - částečně nebo úplně využívají metabolický aparát hostitelského organismu
  - mají mnoho podobností s viry vyšších organismů
- objeveny nezávisle dvěma vědci
  - 1915 - Angličan Frederick Tworst
  - 1917 - francouzský Kanadčan - Félix D'Herelle
- znalost životního cyklu bakteriofágů přispívá k porozumění mechanismů přenosu genů mezi bakteriemi
- na bakteriofágovém modelu byly prováděny studie replikačních, transkripčních i translačních mechanismů
- využití v rekombinantních technikách, např. jako klonovací vektory
- v diagnostice patogenních bakterií
- nový trend využití v léčbě bakteriálních onemocnění

# Bakteriofágy - struktura

---

- taxonomická podobnost
  - sekvenční podobnost (sekvenace, hybridizace)
  - sérologická křížená reaktivita
  - morfologická podobnost
- Struktura se příliš neliší - 96 % (4600) proteinová kapsida s nukleovou kyselinou, bičík, někdy různý počet bičků
  - nukleová kyselina je převážně dsDNA, může být ssDNA nebo RNA
    - vždy pouze jeden druh a jedna molekula
    - často obsahuje neobvyklé báze - ochrana před nukleasami hostitele
  - proteiny vytvářejí obal na DNA - kapsida (ikozaedr)
  - bičík -24% dlouhý kontraktilní bičík , 62% má dlouhý nekontraktilní bičík, 14% krátký nekontraktilní bičík
- Zbylá 4% (170 fágů) má polyhedrální, filamentosní, či komplexní morfologii
- velikostně se liší
  - nejmenší levivirusy 3,5 kb (4 geny), průměr 50 kb (lambda), T4 skupina 50 kb, největší 650 kb skupina G virů
  - mnoho genomů bakteriofágů je osekvenováno a evidováno v databázích (např. GenBank)

# Bakteriofágy - nomenklatura

---

- systém klasifikace bakteriofágů byl vyvinut v poslední dekádě Mezinárodní komisi pro taxonomii virů (International Committee on Taxonomy of Viruses)
- v současné době jsou bakteriofágy rozděleny do 13 rodin
- ds-DNA
  - *Myoviridae* - kontraktilní - *T4*, *P1*, *P2*, *Mu*, *SPO1*,  $\Phi H$
  - *Siphoviridae* - dlouhý nekontraktilní -  $\lambda$ , *T1*, *T5*, *L5*,
  - *Podoviridae* - krátký nekontraktilní - *T7*,  $\Phi 29$ , *P22* (*Salmonella*)
  - *Tectiviridae* – lipidy obsahující, linear dsDNA – *PRD1*
- ssDNA
  - *Microviridae* - icosahedral, cirkulární ssDNA) -  $\Phi X174$ ,
- dsRNA
  - *Cystoviridae* (enveloped, icosahedralní, segmentovaná lineární dsRNA) -  $\Phi 6$  (*Pseudomonas*)
- ssRNA
  - *Leviviridae* (nonenveloped, icosahedralní, lineární ssRNA) - MS2



# Bakteriofágy – elektron mikroskopický snímek

---

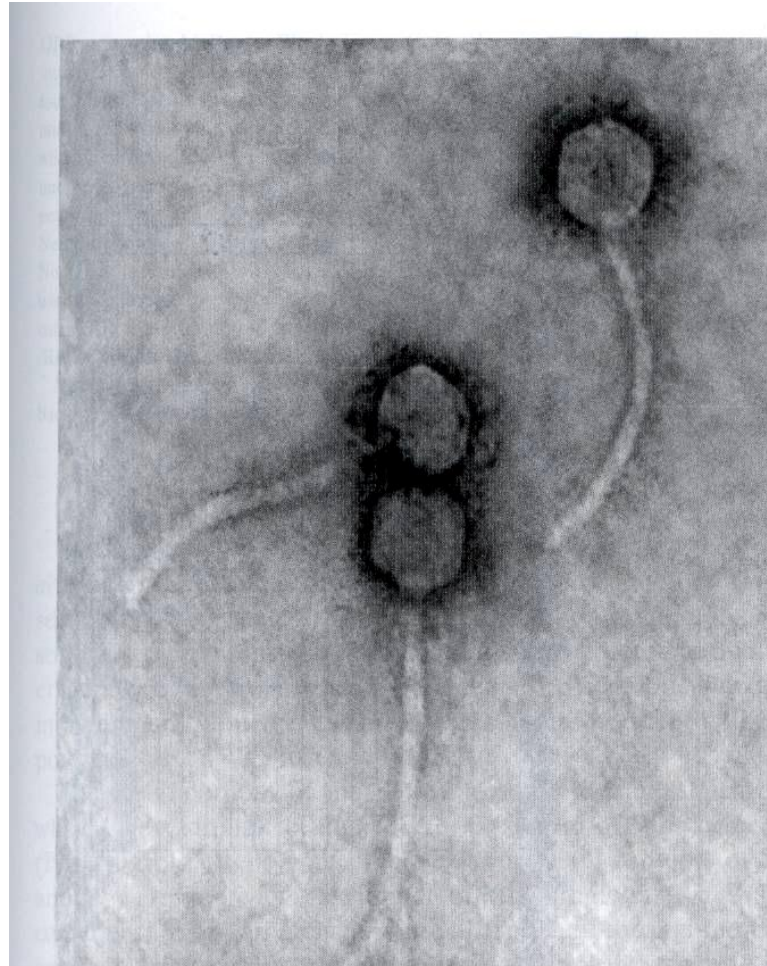
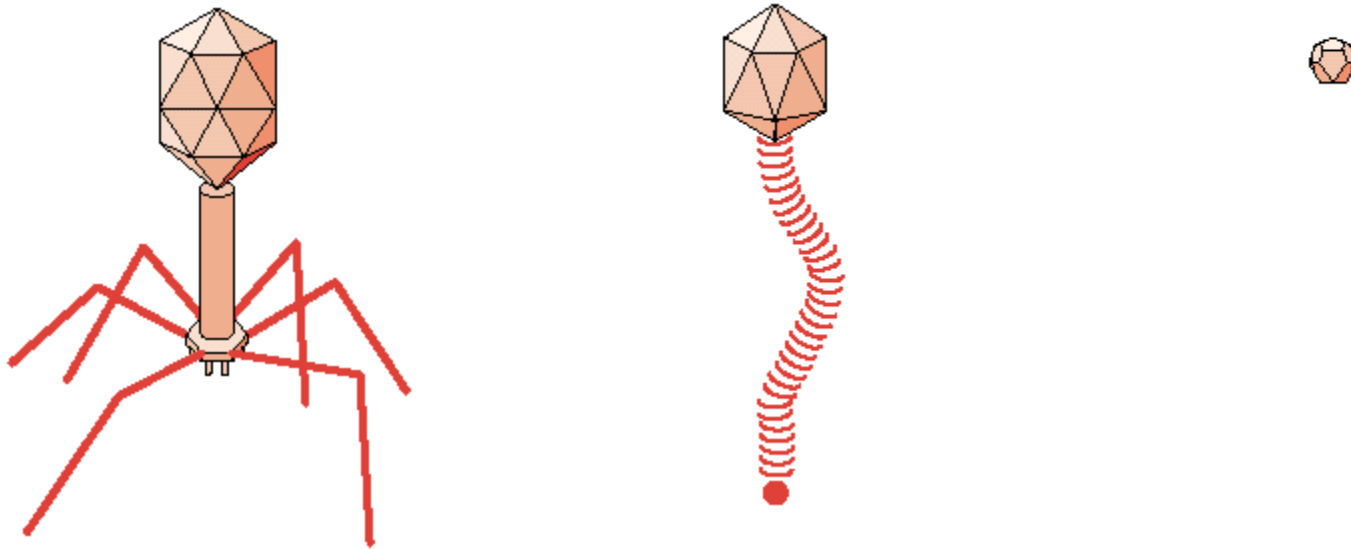


FIG. 1. Electron micrograph of D3112 bacteriophages, negatively stained with 2% uranyl acetate.

# Bakteriofágy - struktúra

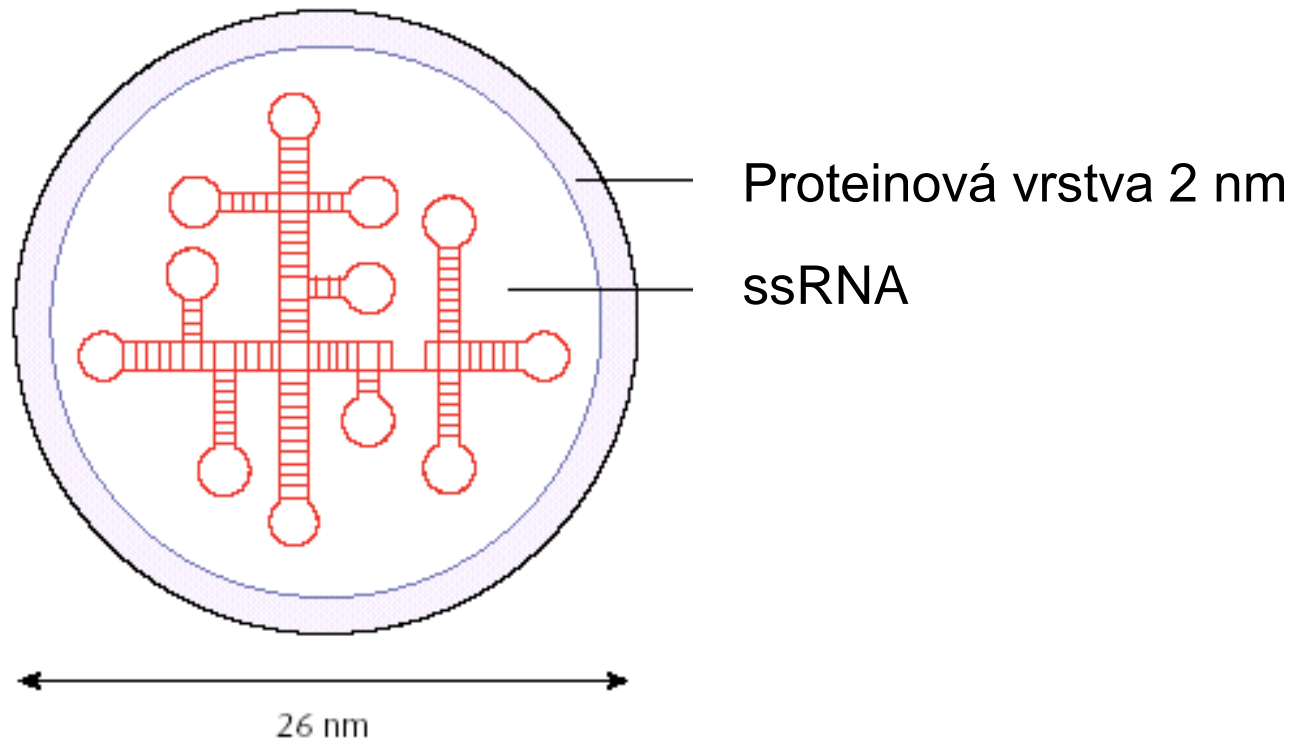
---



T-even viruses (Myoviridae); Coliphage I (Siphoviridae); Coliphage  $\Phi X174$  (Microviridae);

# Bakteriofág - struktura

---

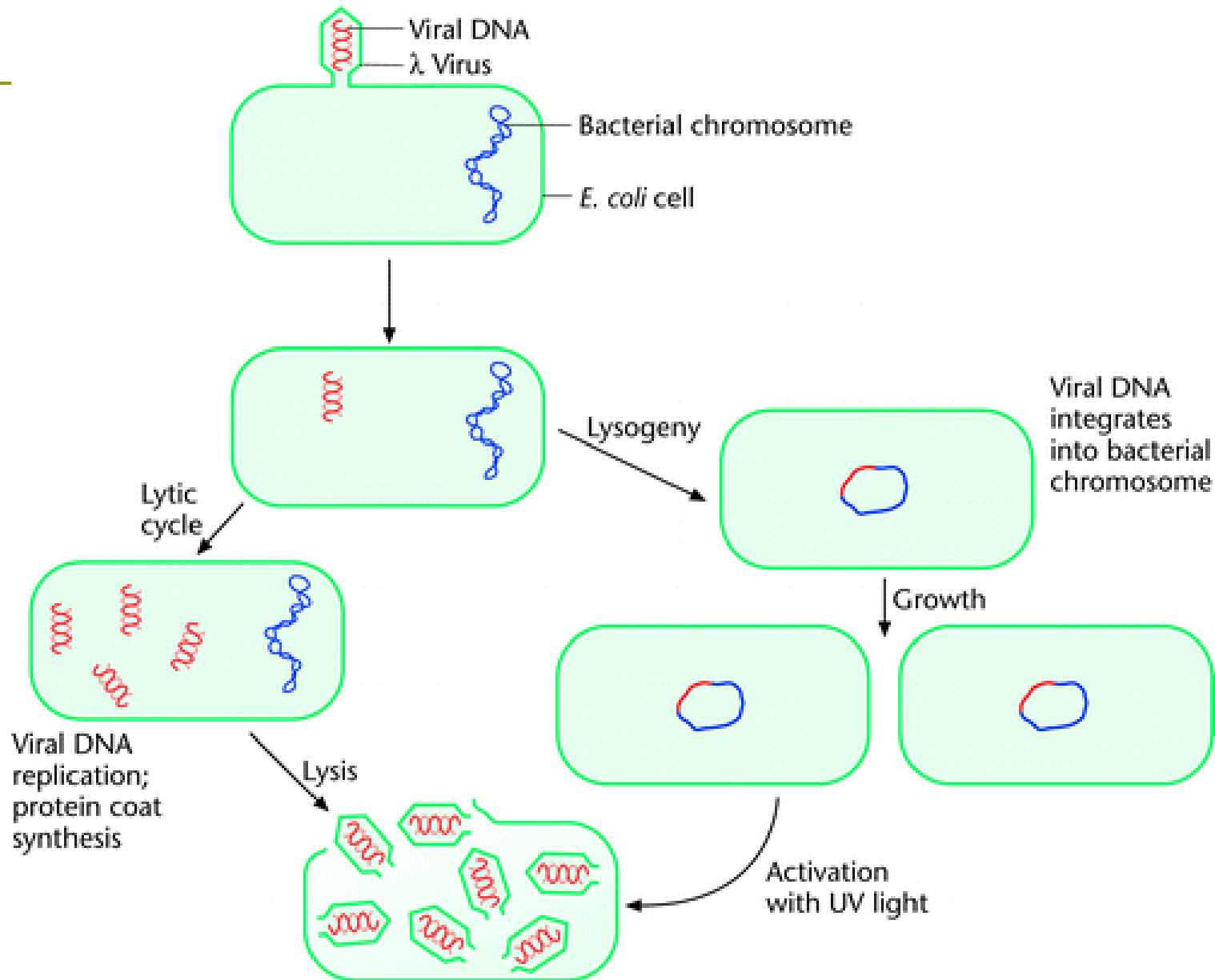


# Bakteriofágy - replikace

---

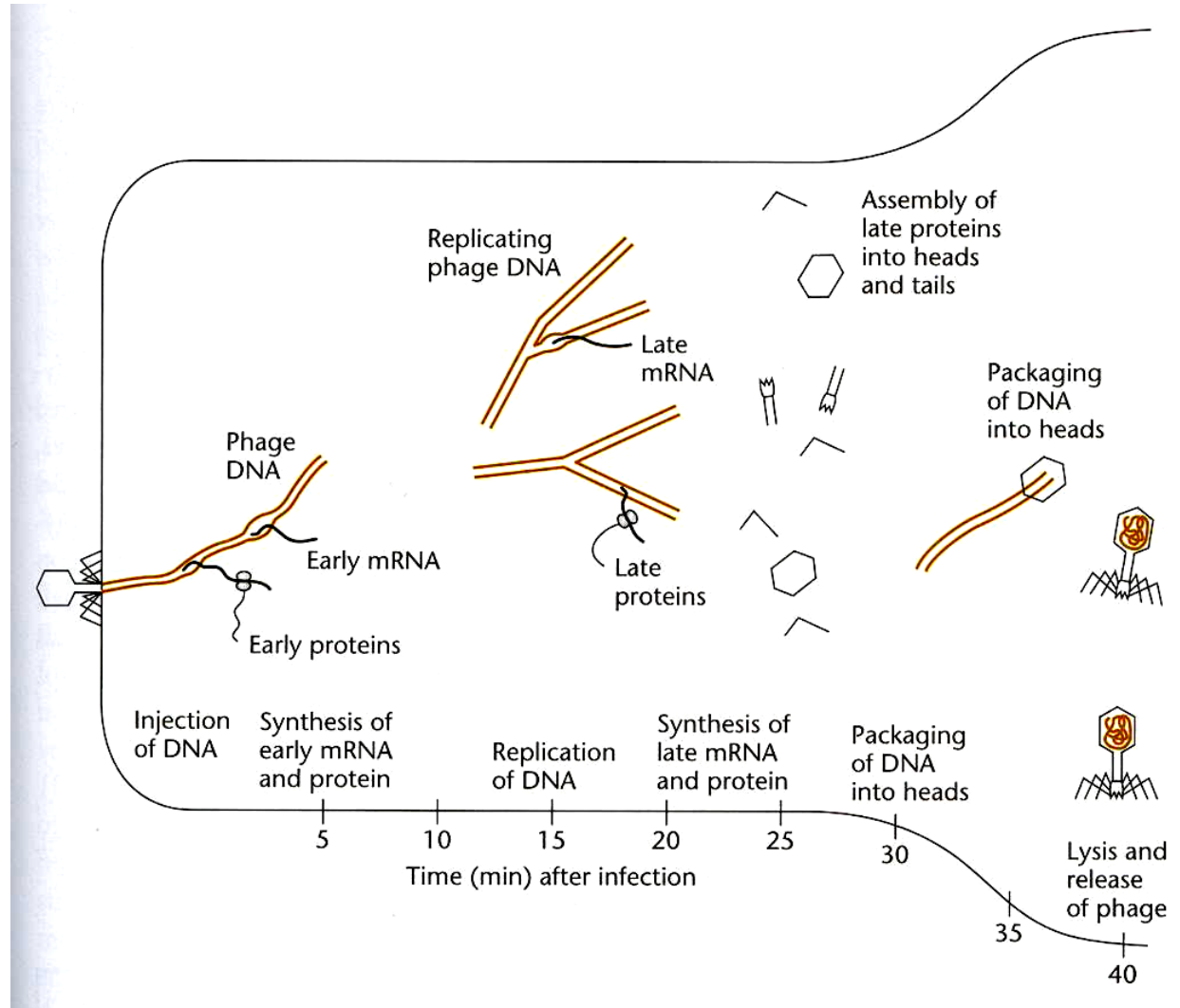
- Množení bakteriofágů může obecně probíhat dvěma životními cykly
  - lytickým - virulentní fágy
  - lysogenním - temperované fágy
- Lytický cyklus - kroky
  - attachment (adsorpce),
  - penetrace (injekce),
  - multiplikace (replikace),
  - kompletace a sbalení (maturace)
  - Uvolnění (lyse)
- Lysogenní cyklus
  - attachment (adsorpce),
  - penetrace (injekce),
  - integrace do hostileského chromosomu (latentní infekce - profág) nebo latentní přetrvávání ve formě plazmidu
  - může pozměnit vlastnosti hostitele (*Corynebacterium phage b* nese gen pro diphtheria toxin)
  - vždy může přejít do lytického cyklu - regulace

# Bakteriofág - životní cykly



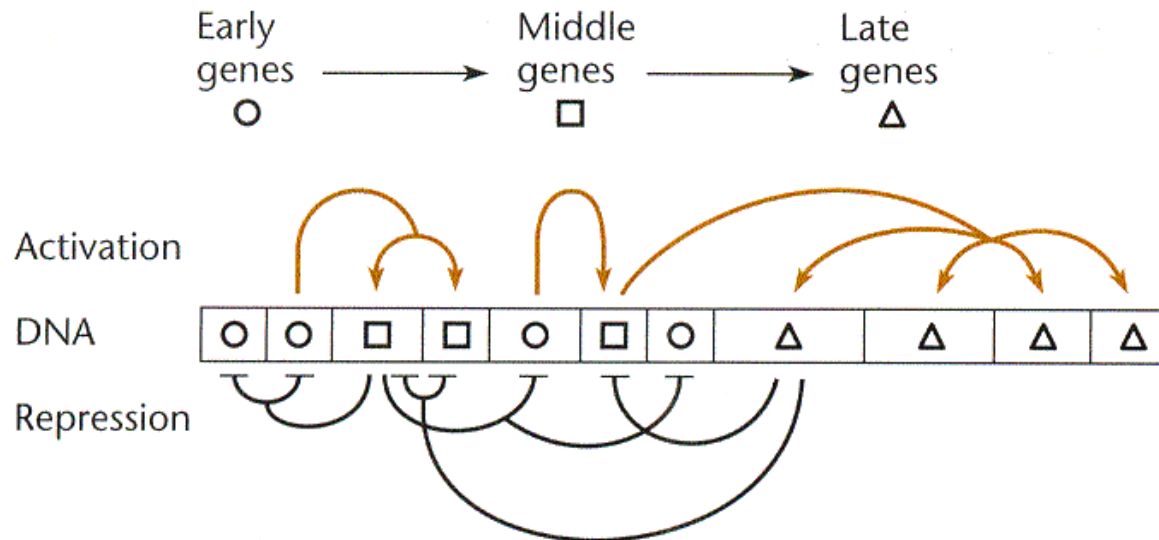
# Typický multiplikační cyklus bakteriofágů

- Po penetraci transkripce a translace časných genů – účast na replikaci DNA
- Po replikaci - transkripce a translace pozdních genů – strukturní proteiny virů
- DNA je zabalena do hlaviček a viry jsou složeny
- Virové partikule jsou uvolněny lysis buněk
- Každé stadium infekce vyžaduje expresi patřičného genu a fungování příslušného enzymového produktu či regulačního mechanismu



# Transkripční regulace dsDNA bakteriofágů

- Regulace jednotlivých fází na transkripční úrovni – regulační kaskáda
- V první fázi transkripce a translace regulačních genů (časné geny)
- Regulují transkripci středních a pozdních genů



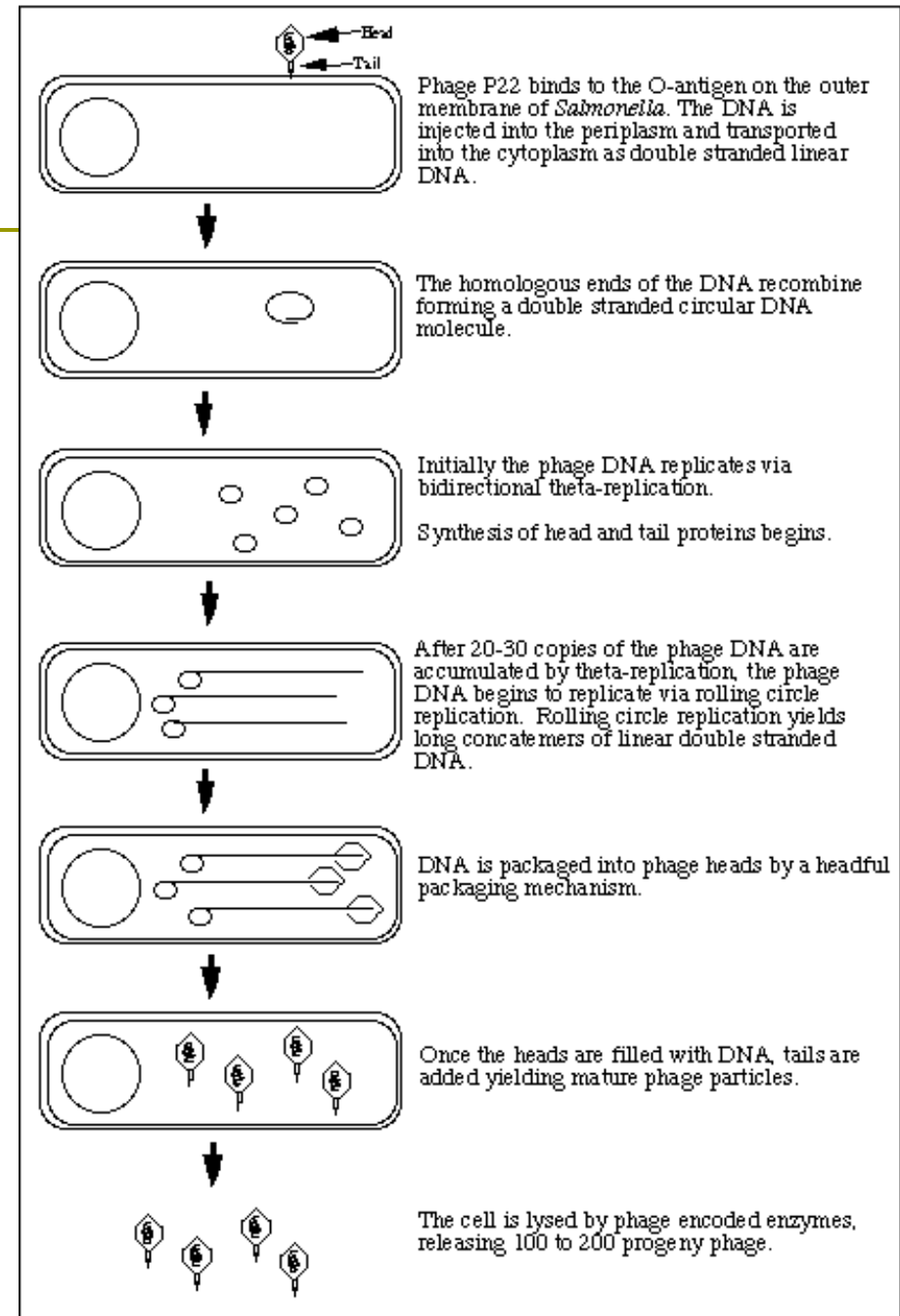
**Figure 7.3** Transcriptional regulation during development of a typical large DNA phage. The arrows indicate activation of gene expression; the bars indicate repression of gene expression.



# Bakteriofágy - - lytický růst

- adsorbce - vyžaduje přítomnost kofaktorů
  - Iontů (Ca, Mg, Na, NH<sup>4</sup>)
  - tryptofan
- cirkulace fágové DNA
  - (fágy s kohezími konci)
- replikace  $\theta$  mechanismem - 20 -30 kopií
- replikace mechanismem valivé kružnice
  - pouze jedno vlákno
  - vznik konkatemery - restriční místa (pac sekvence)
- iniciace exprese fágových proteinů
- enkapsidace -
  - partikule některých fágů pojmu více DNA než je velikost genomu
  - někdy i chromosomální DNA
- lyse enzymy kodované fágem
  - 100 až 200 virionů
  - tvorba plaků - charakt. morfologie

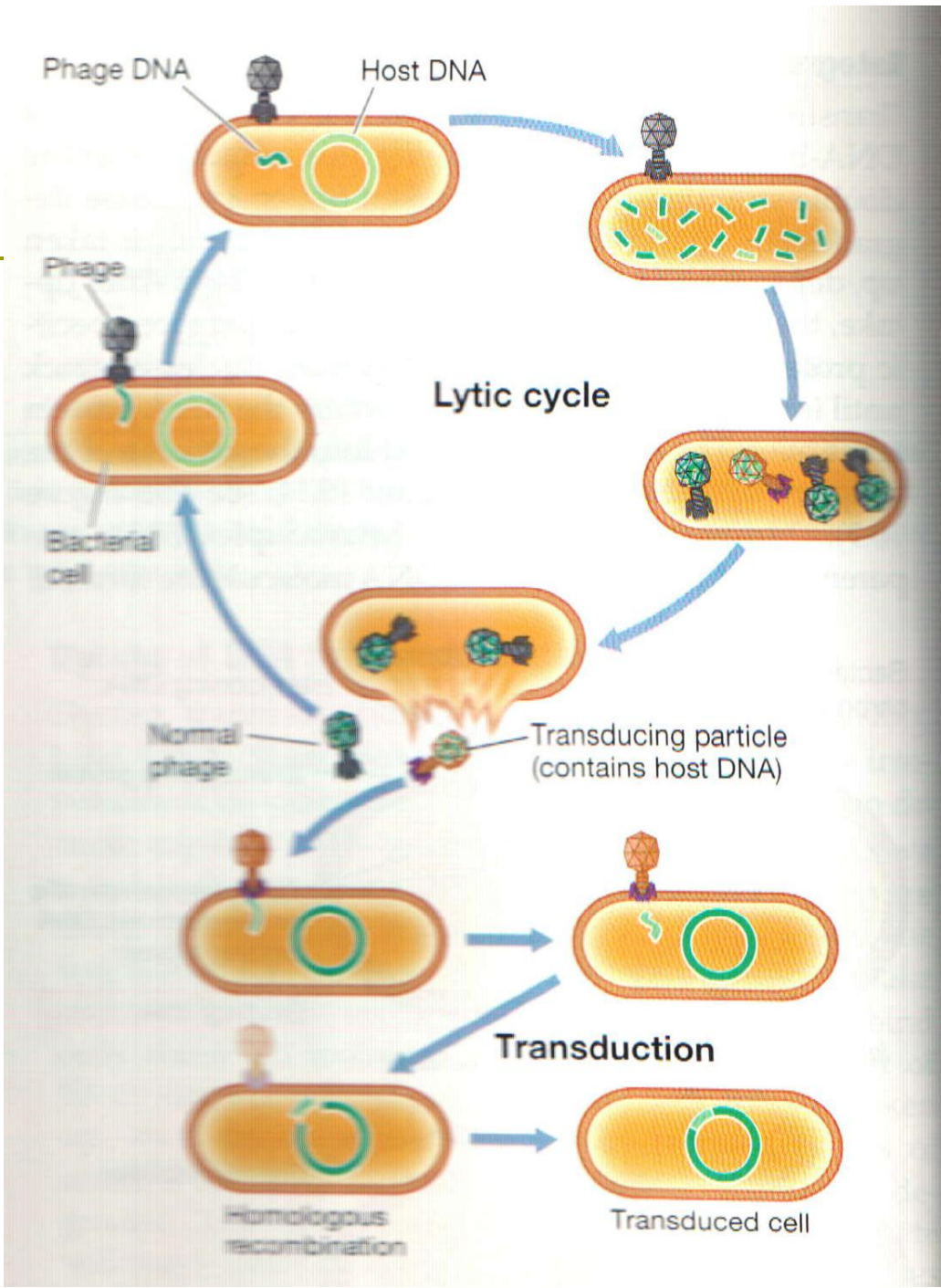
Lytic life cycle of phage P22



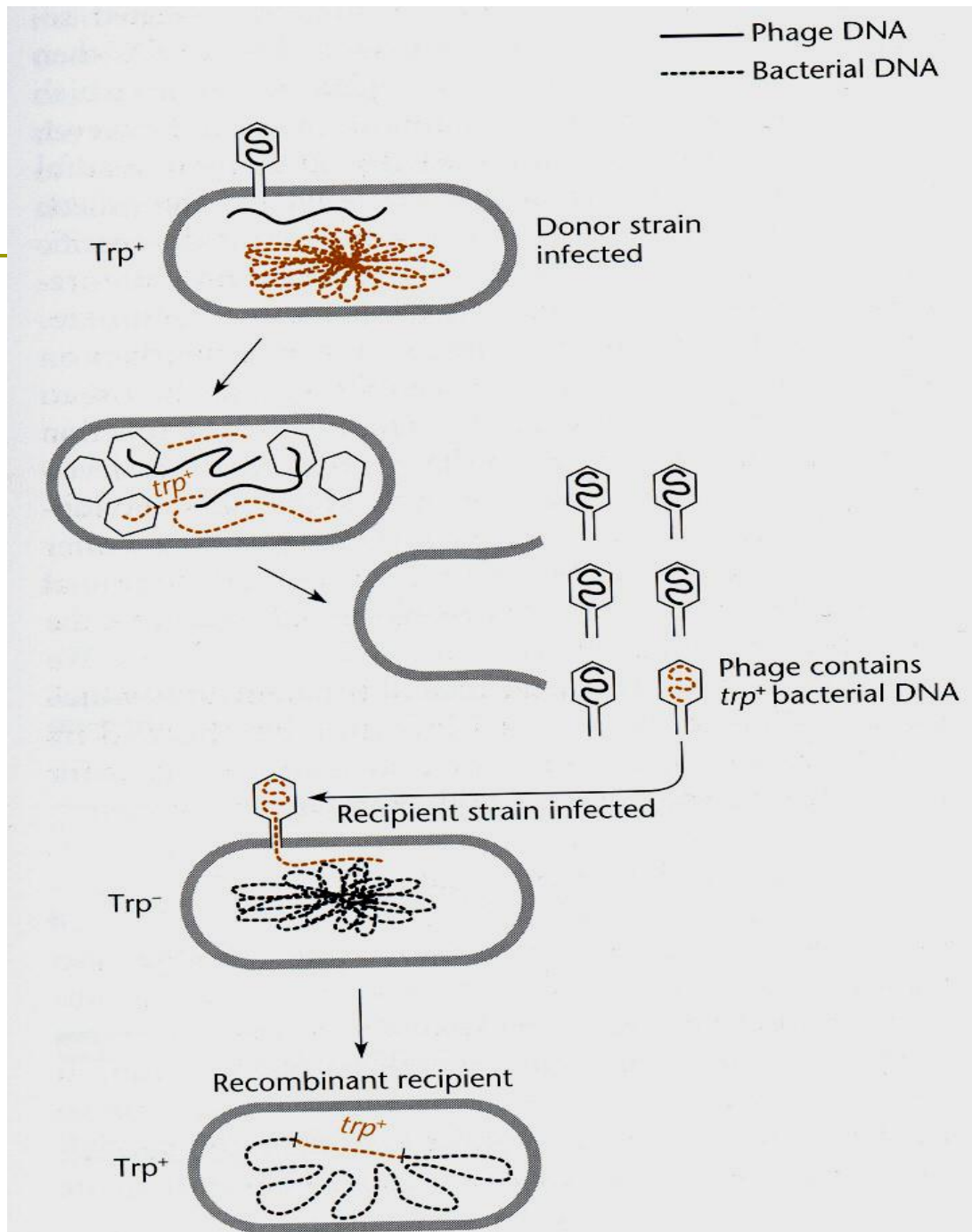
# Nespecifická (generalisovaná) transdukce

---

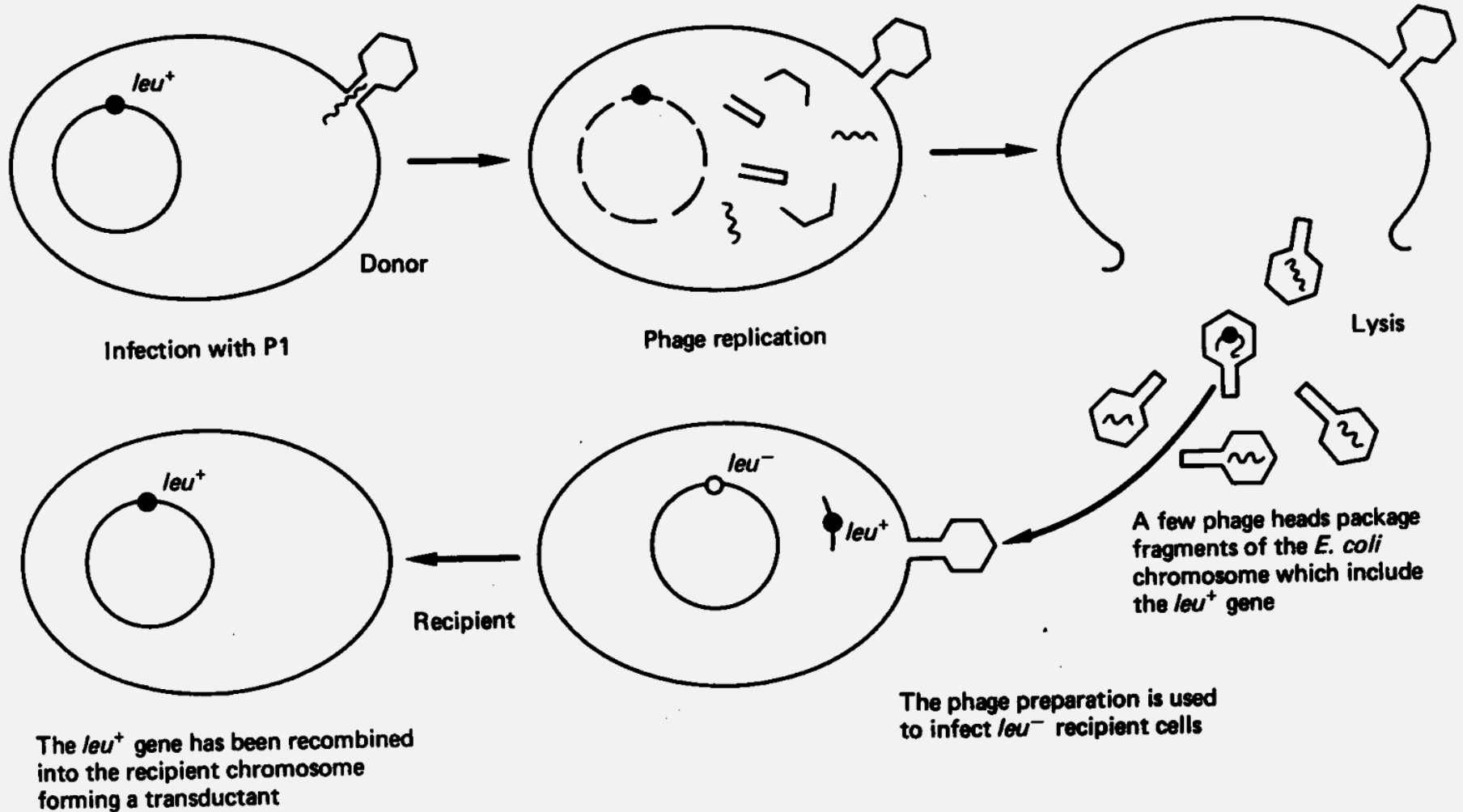
- u některých fágů při enkapsidaci dochází též ke sbalení chromosomální DNA
  - chyba při rozpoznání vlastní DNA
  - partikule je schopna infikovat, ale již se nemůže dále množit
  - chDNA se rekombinuje s hostitelským chromosomem
  - Pokud je obsažen transposon může se transponovat do chromosomu
  - 90% přetrvává v cytoplasmě - abortivní transduktant
    - resistentní k exonukleasám - v cirkulární formě držena pomocí DNA vazebného proteinu, ale není kovalentní spojení - lineární molekula
    - není schopen se replikovat - vždy je děděn pouze jednou buňkou (unilineární dědičnost)
    - je transkribován a translatován - schopnost komplementace kodovaných funkcí
    - některé dceřinné buňky mohou mít zbytkovou enzymovou aktivitu – mohou interagovat při selekci
  - obvyklé v případě P22 (*S. typhimurium*) P1 (*E. coli*)
  - zřídka u  $\lambda$  (*E. coli*) – specifická *pac* místa
  - T4 – pokud jsou inaktivovány geny pro degradaci hostitelské DNA



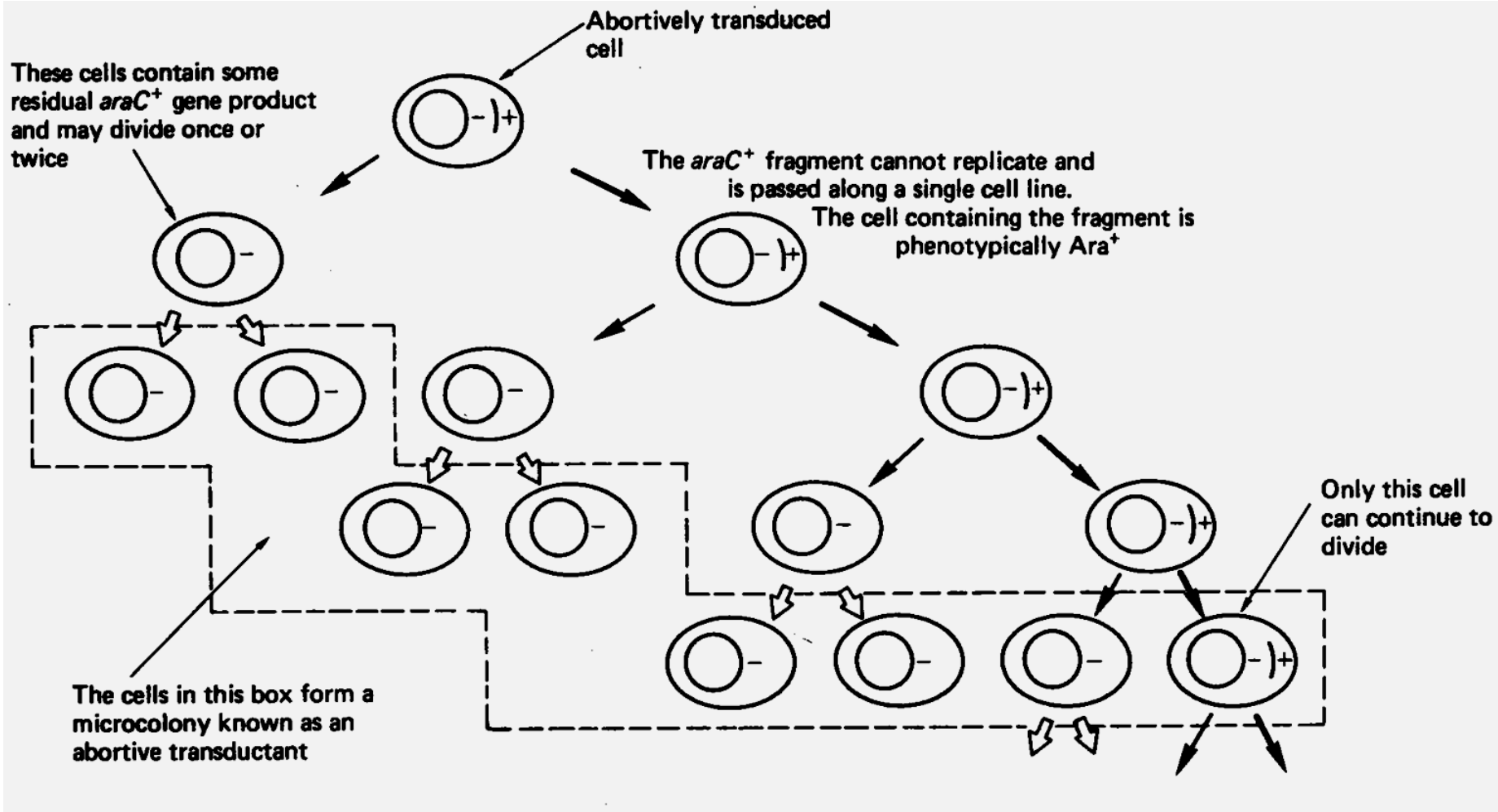
# Nespecifická transdukce



# Nespecifická transdukce



# Nespecifická transdukce - abortivní transduktanty





# Nespecifická transdukce - využití

---

- využití v genetických studiích mutantů a mapování
  - dva kroky
    - 1. Infekce jedné mutanty fágem - příprava bezbuněčné fágové suspenze
      - Vysoká infekční multiplicita
      - pravděpodobnost chybné enkapsidace  $10^{-3}$ , fragment 100 kb
    - 2. Infekce druhé mutanty a selekce sledovaných rekombinantů
      - je potřeba dodržet pravděpodobnost infekce jedné buňky jedním fágem
      - druhá infekce je třeba provést v infekční multiplicitě 0.01 (MOI) - zabránění multiplicitní infekci a nadbytečné lysi recipienta
      - $10^8$  recipientních bakterií na  $10^6$  P1 fágových partikulí
  - nízká pravděpodobnost transdukce 2 genů na různých segmentech –
    - pokud jsou dva geny transdukovány společně musí být blízko sebe
  - jeden crossover zlomí chromosom a je letální
    - životaschopné (selektovatelné) jsou pouze rekombinanty se sudými crossovery

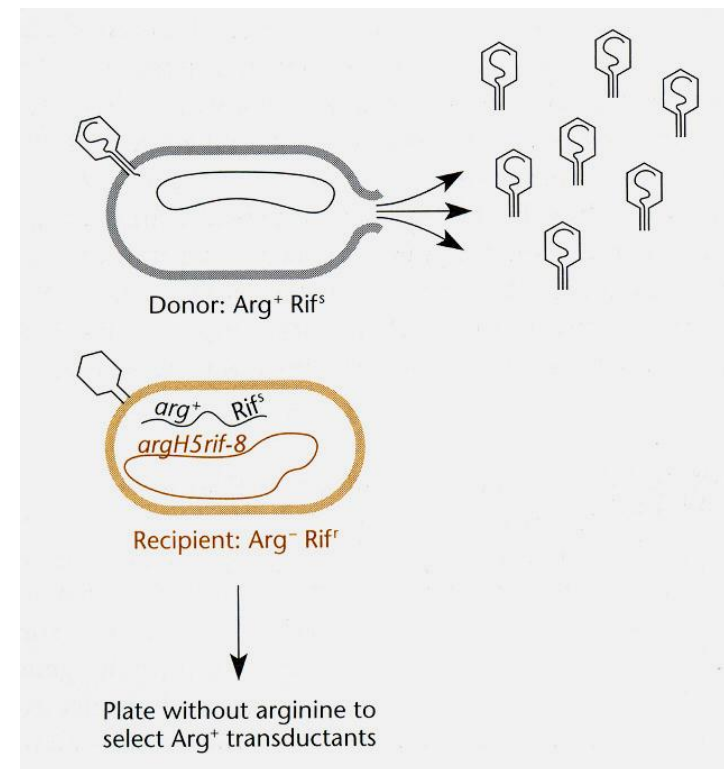


# Transdukční mapování - příklad

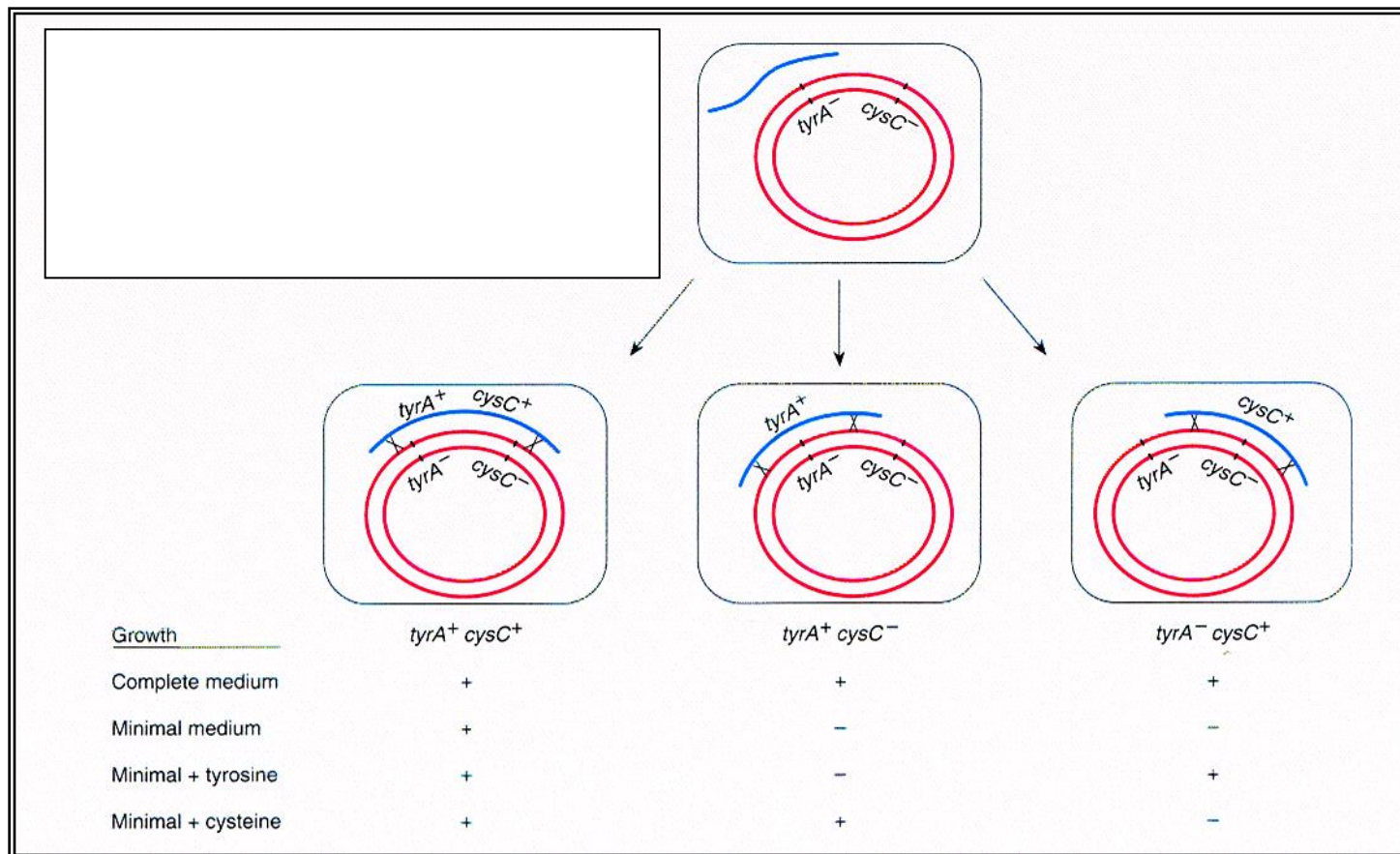
## stanovení relativní pozice

### dvou markerů na genetické mapě:

- zjištění relativní pozice *rif* a *arg* genů na genetické mapě *E. coli*.
  - Kotransdukce *arg*, *rif<sup>r</sup>* recipienta *arg*<sup>+</sup>, *rif<sup>s</sup>* donorem fágem P1
  - Selektovaný marker Arg<sup>+</sup> (je výhodnější selektovat Arg<sup>+</sup> než Arg<sup>-</sup>)
  - Neselektovaný marker Rif<sup>s</sup>, (Arg<sup>+</sup> jsou testovány na Rif<sup>s</sup>)
  - Zjištění frekvence kotransdukce obou markerů –
    - vyjádřeno v procentech k selektovanému markeru
    - Pokud je 33% - dva markery jsou kotransdukovatelné s frekvencí 33%
  - Dá se zjistit relativní vzdálenost obou markerů
    - Chromosom – 100 min
    - P1 – 2% délky chromosomu
    - Oba markery nejsou od sebe dál než dvě minuty (90kb)



□ Rekombinace lineárního fragmentu DNA – pravděpodobnost přenesení dvou znaků



# Lysogenní fáze

---

- Určitá forma stabilního vztahu fága s hostitelem
- Lysogenní fágy – schopnost některých fágů inkorporace do chromosomu nebo přetrvávání v jedné kopii ve formě podobné plazmidu
- V lysogenní fázi
  - Malé nároky na hostitele
  - Většina genů v klidové fázi. Není transkribována.
  - Jen některé, které udržují lysogenní stav
- Indikace přítomnosti profága
  - Imunita buňky k superinfekci stejným fágem
- Chromosomy mnoha bakterií obsahují části nefunkčních fágů
  - Vznikají ztrátou esenciálních genů fága
  - Ztráta schopnosti vlastní replikace, excise z chromosomu apod.
  - Nejsou podobné bakteriálním genům
  - Dodávají některé vlastnosti hostiteli

# Bakteriofágy - lysogenizace

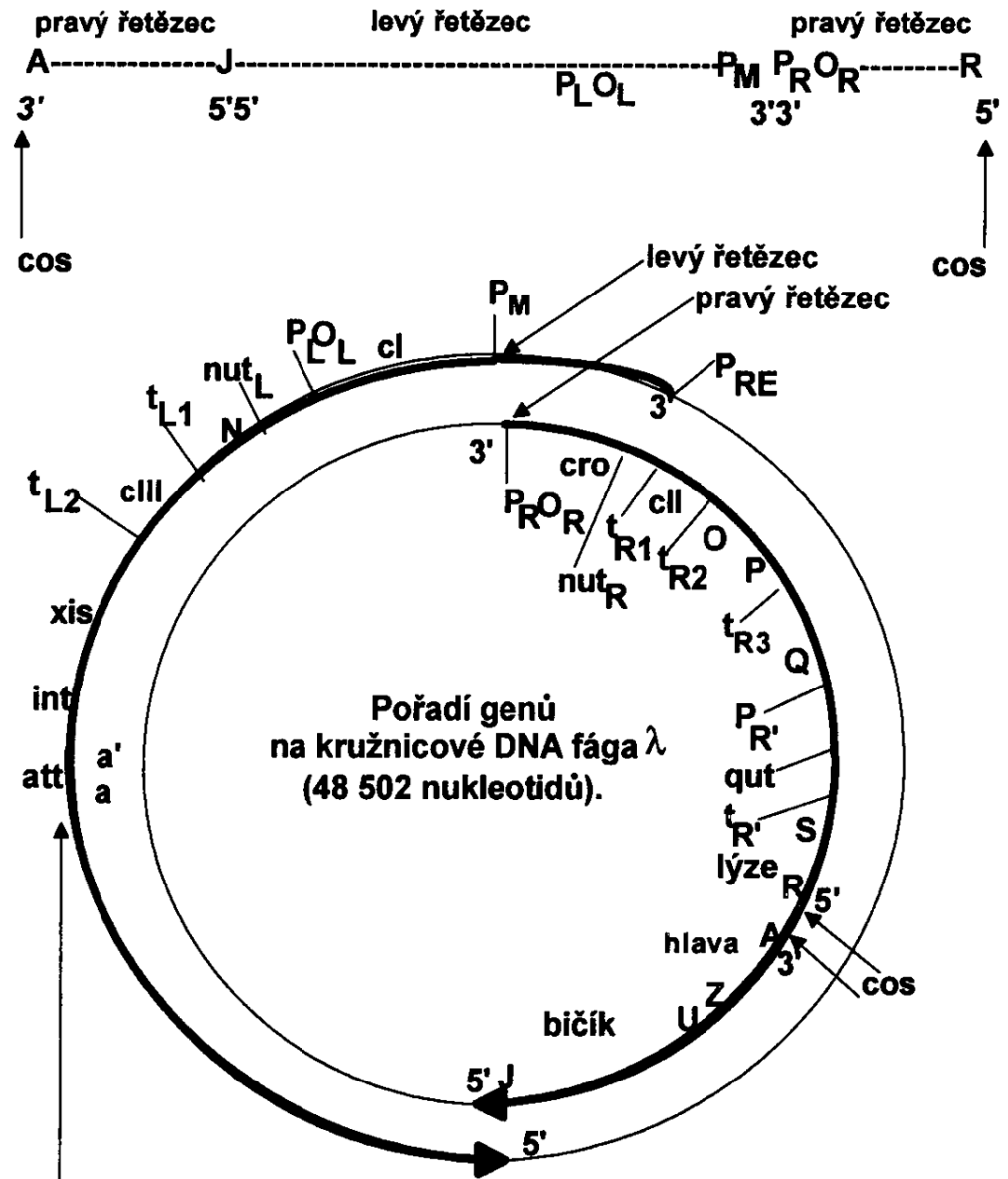
---

- Pro inkorporaci jsou potřebné enzymy - integrasa ( $\lambda$ ), transponasa ( $\text{Mu}$ )
- Po inkorporaci do chromosomu
  - v klidové fázi (profág)
  - je děděn při dělení buněk
- frekvence lysogenizace závisí na kombinaci genetických a enviromentálních faktorů
- **lytická fáze** je upřednostována, pokud hostitelská buňka roste v prostředí bohatém na živiny
- **lysogenní fáze** v podmínkách snížení živin
- lysogenní fáze je určována genovým produktem fága ( $\lambda\text{CI}$ ), jeho exprese může být regulována hostitelskou buňkou
  - brání tak replikaci fága

# Bakteriofág $\lambda$ genetická mapa

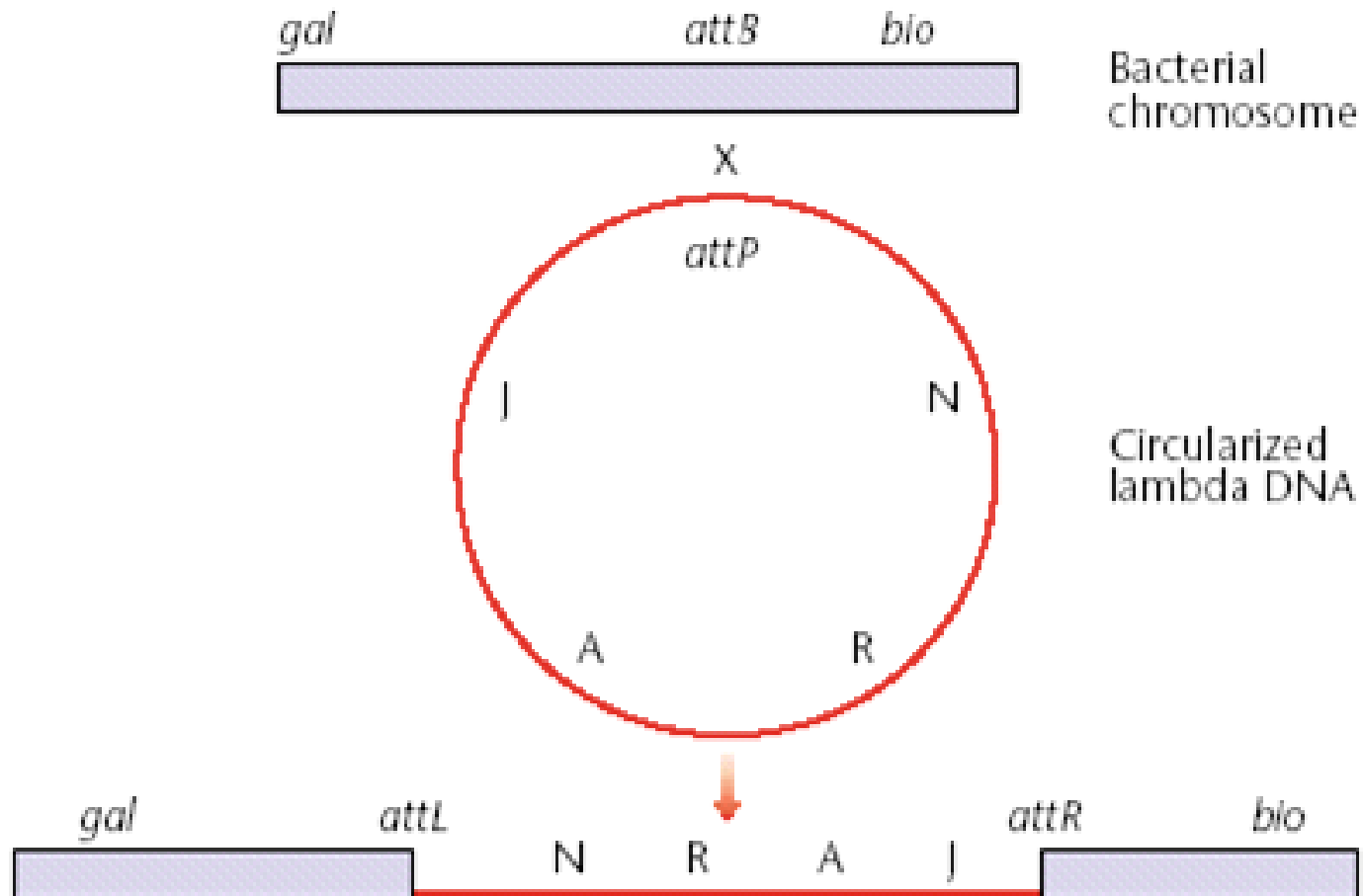
- Po infekci transkripce z promotorů  $P_R$  a  $P_L$ 
  - N – antiterminační faktor
    - váže se na místo nut
    - transkripce pokračuje přes terminátor t1
  - Cro - inhibitor cl
- cII a cIII – regulační geny rozhodovací fáze
- $P_M$  a  $P_{RE}$  – promotory pro cl
- cl – represor transkripce z promotorů  $P_R$  a  $P_L$
- O, P – proteiny pro iniciaci replikace
- Q – antiterminační faktor pro geny hlavy a bičíku
- Xis - excizionáza
- Int - integráza
- att - integrační místo
- cos – terminální sekvence

Pořadí genů na virionové lineární DNA fága  $\lambda$   
(konce jsou označeny podle směru transkripce).

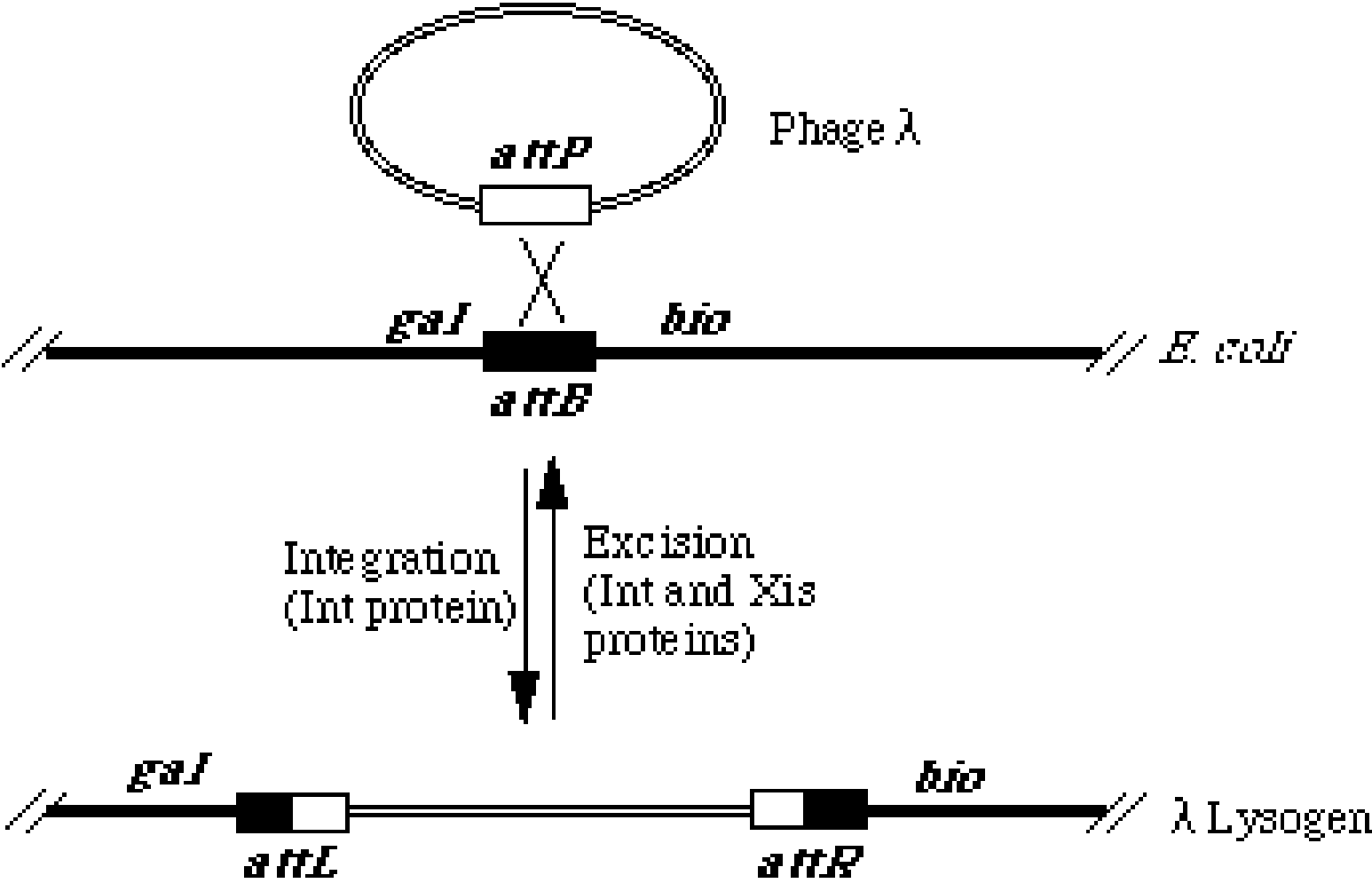


V tomto místě rekombinuje  
s bakteriálním chromozomem.

# Bakteriofág $\lambda$ - integrace

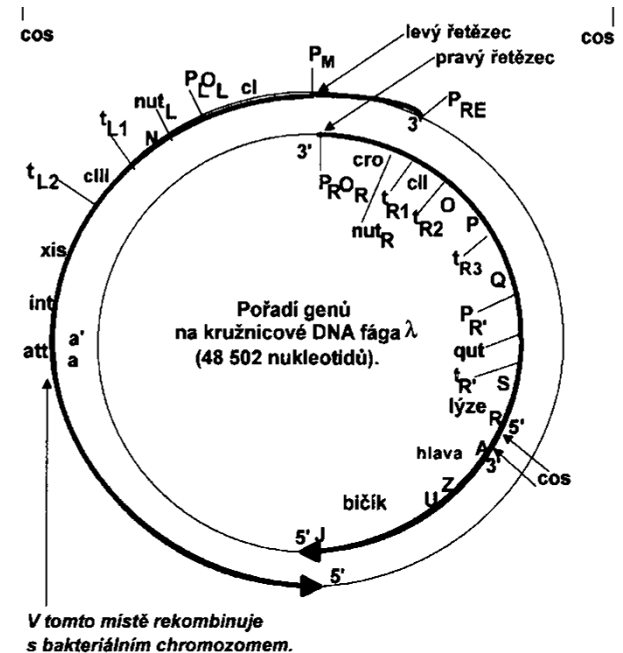


# Bakteriofág $\lambda$ - integrace



# Specializovaná transdukce

- Při excisi fága před vstoupením do lytické fáze může dojít k nepřesnému vyštěpení -
  - fág pak nese část chDNA hostitele –  $10^{-6}$
- v chromosomu zůstane část fágové DNA
- fágový genom je defektní a nemá část att lokusu – (má att lokus integrovaného fága)
- u  $\lambda$  att lokus vždy mezi geny *gal* a *bio*,
  - defektní fág vždy nese jeden z těchto genů
    - $\lambda$  ***dgal*** – snadná selekce – infekce Gal- bakterií – selekce s galaktozou
      - Nemají geny pro hlavu a bičík – může se stabilně inkorporovat, ale nemůže se bez asistence reprodukovat
    - $\lambda$  ***pbio*** – jsou schopny se množit, ale nemohou bez asistence vytvářet lysogeny
      - Nemají geny pro integrasu





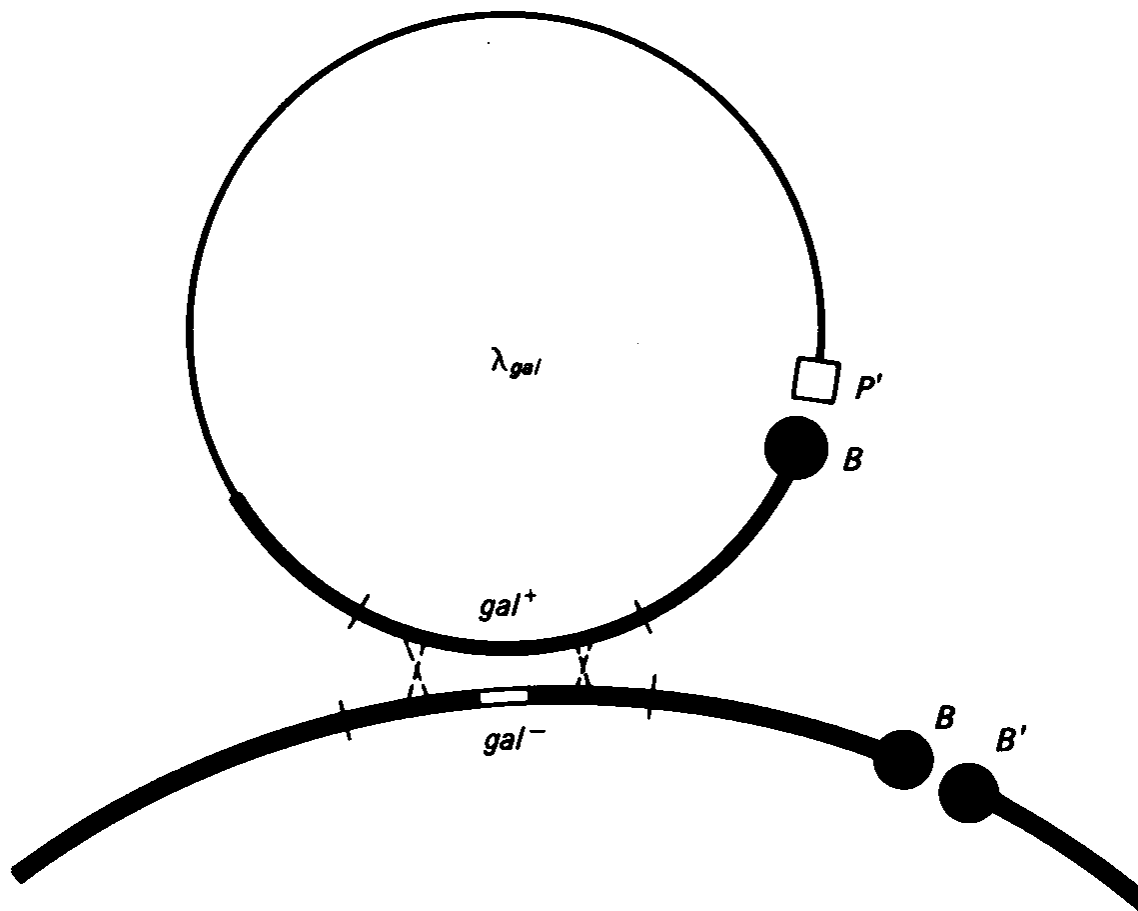
# Specializovaná transdukce

---

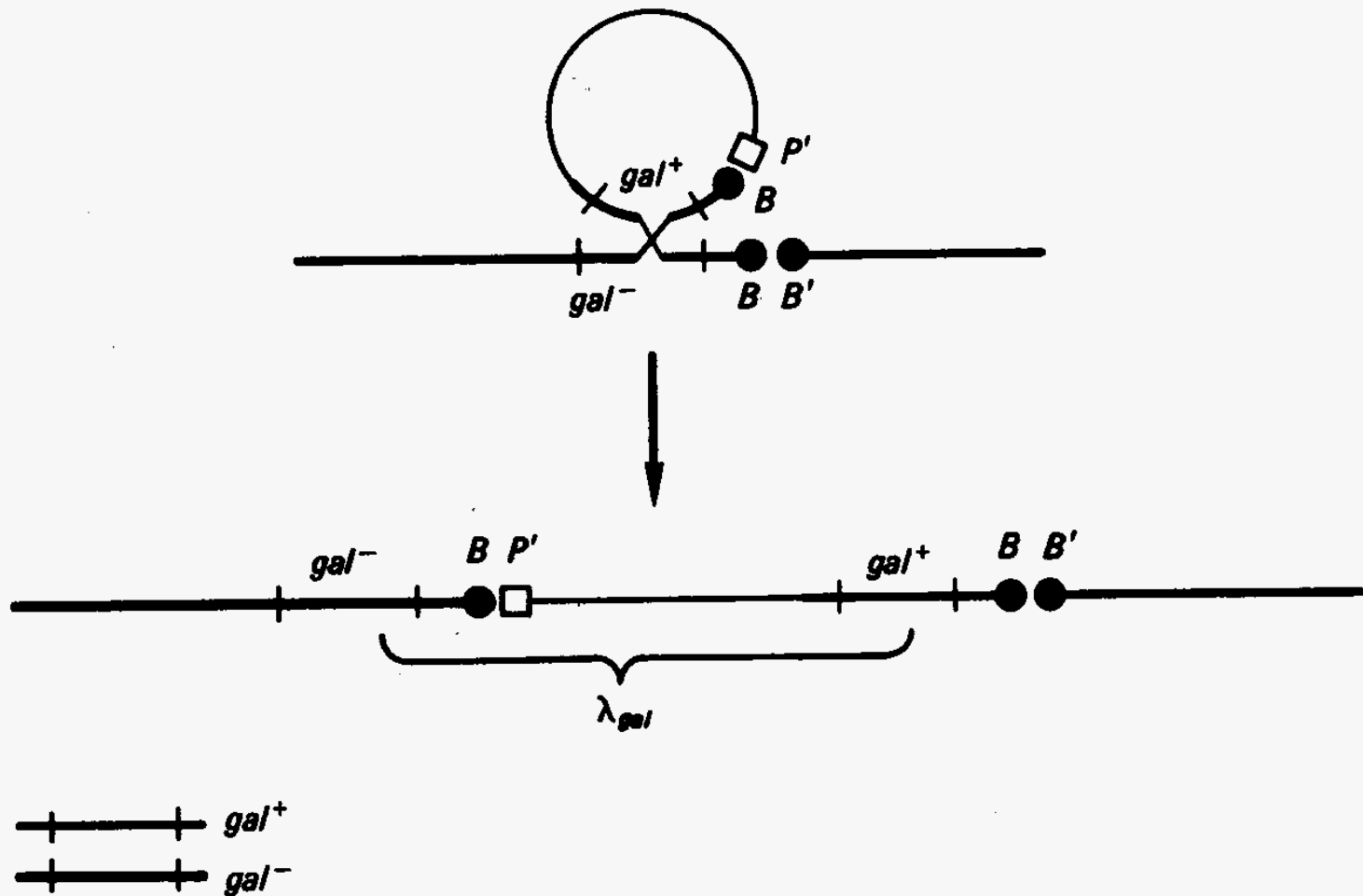
- lysáty vždy obsahují jen malé množství defektních fágů - LFT lysáty
  - nízkofrekvenční transdukce - nestabilní transduktanty (Campbell mechanismus) - duplikace fága v chromosomu
  - integrace přes *gal* stabilní transduktanty (2 cross-overs),
  
- reinfekce - vytvoření velkého množství transduktantů - 0,1 - 0,5
  - integrace přes att místo - pokud existuje integrovaný fág - helper
  - nestabilní transduktanty (Campbell mechanismus) - duplikace fága v chromosomu
  - při excisi stejný počet defektních a normálních fágů - HFT lysáty
  - vysokofrekvenční transdukce
  
- Využití –
  - komplementace – vytváření částečných diploidů
  - Mapování
  - Vytváření mutant

# Stabilní transduktanty - LFT

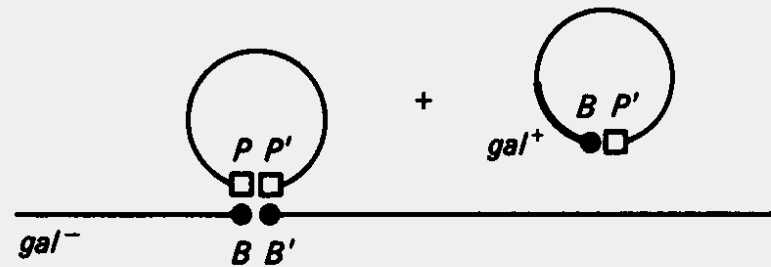
---



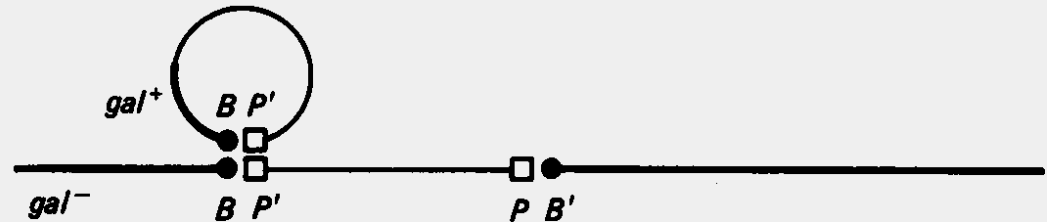
# Nestabilní transduktanty - LFT



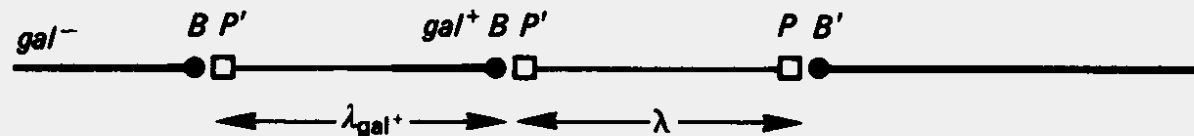
# Nestabilní transduktanty - HFT



1.  $gal^-$  cells are infected by both a  $\lambda_{gal^+}$  and by a  $\lambda^+$  particle.  $\lambda^+$  first integrates at  $BB'$  as in normal lysogenisation

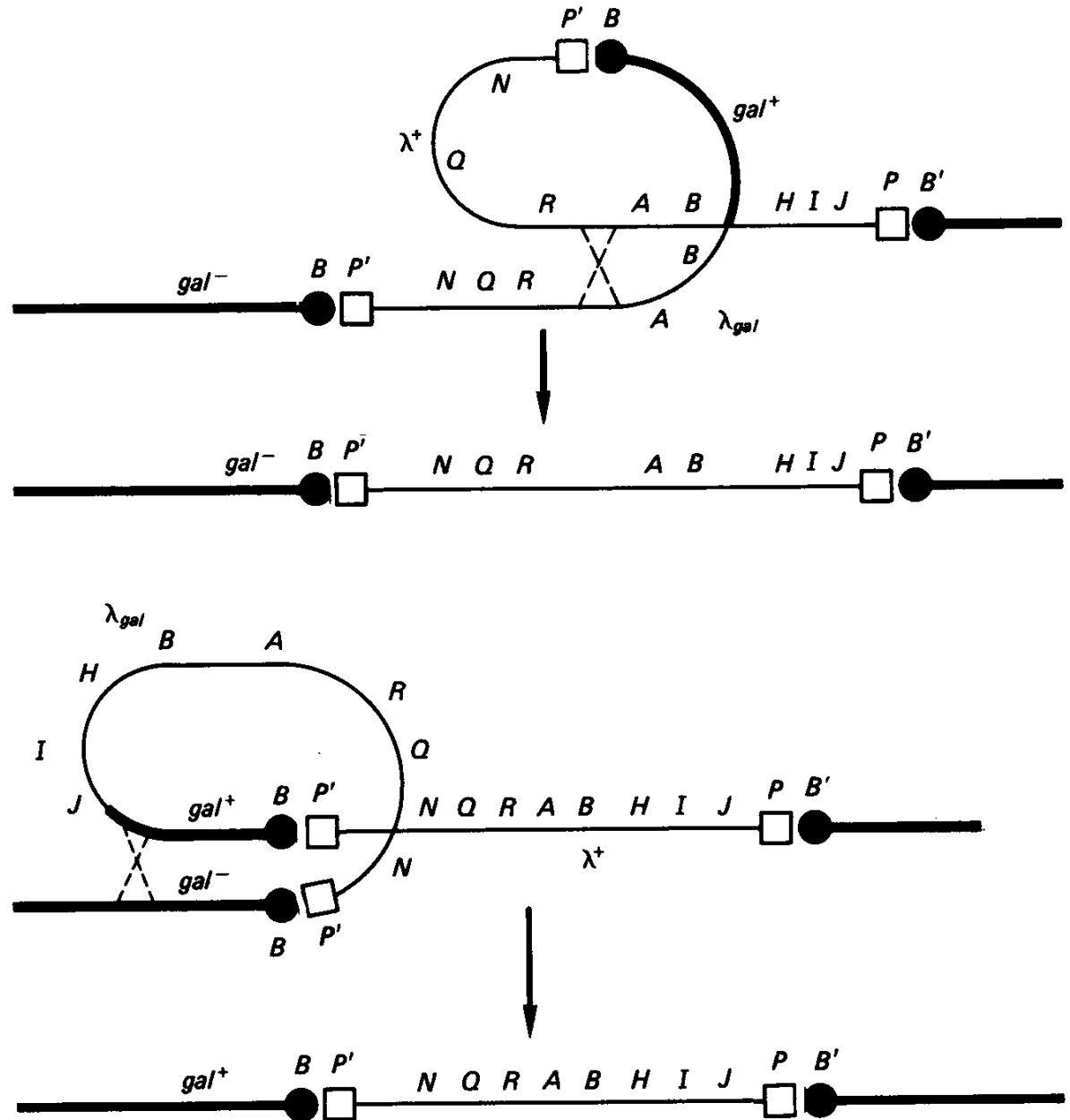


2. The  $BP'$  site on  $\lambda_{gal^+}$  can now undergo site-specific recombination with the hybrid attachment site  $BP'$  (frequently) or  $PB'$  (rarely)



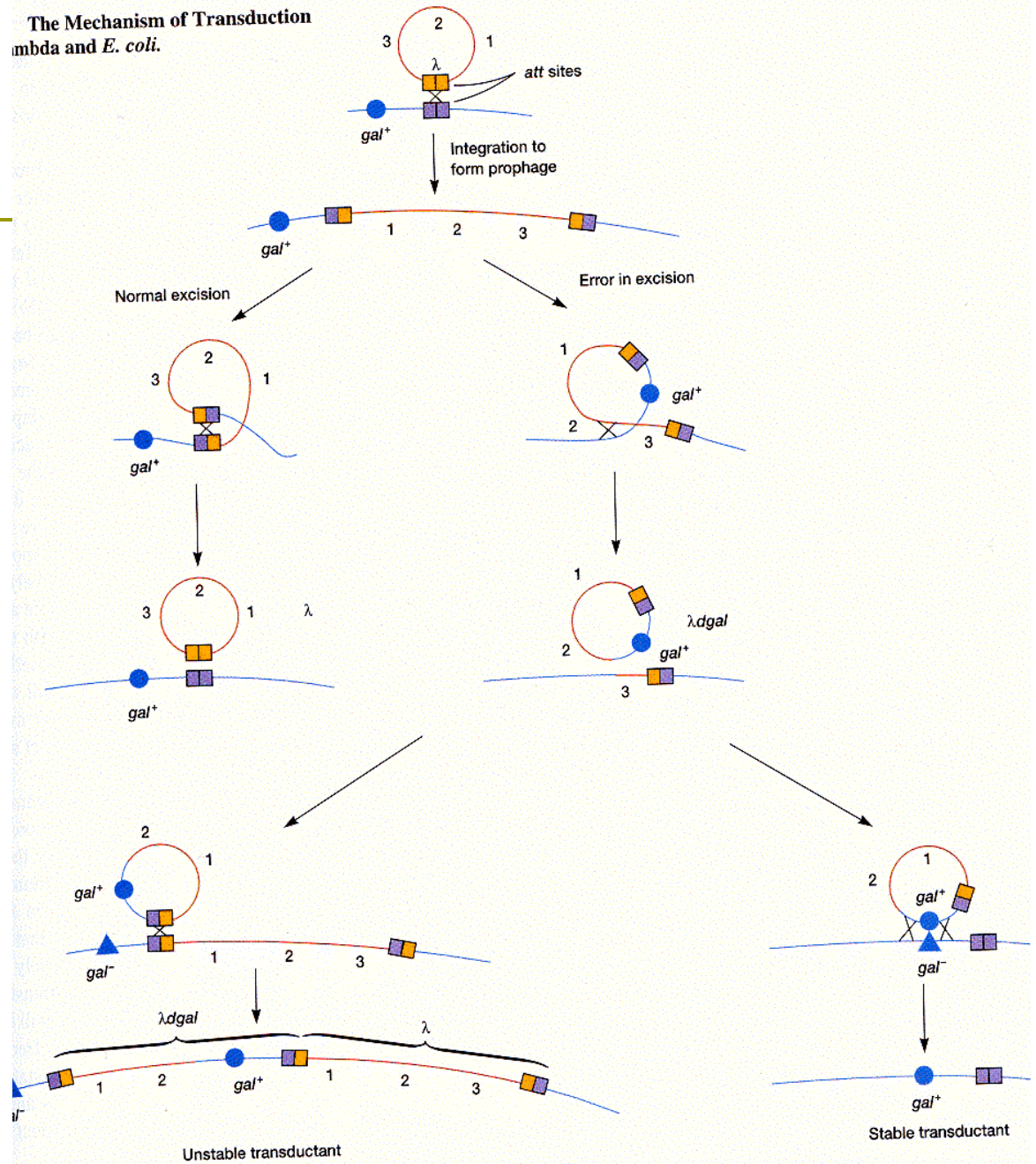
3. This integrates  $\lambda_{gal^+}$  into the recipient chromosome, creating a  $\lambda^+/\lambda_{gal^+}$  double lysogen

# Stabilní transduktanty HFT

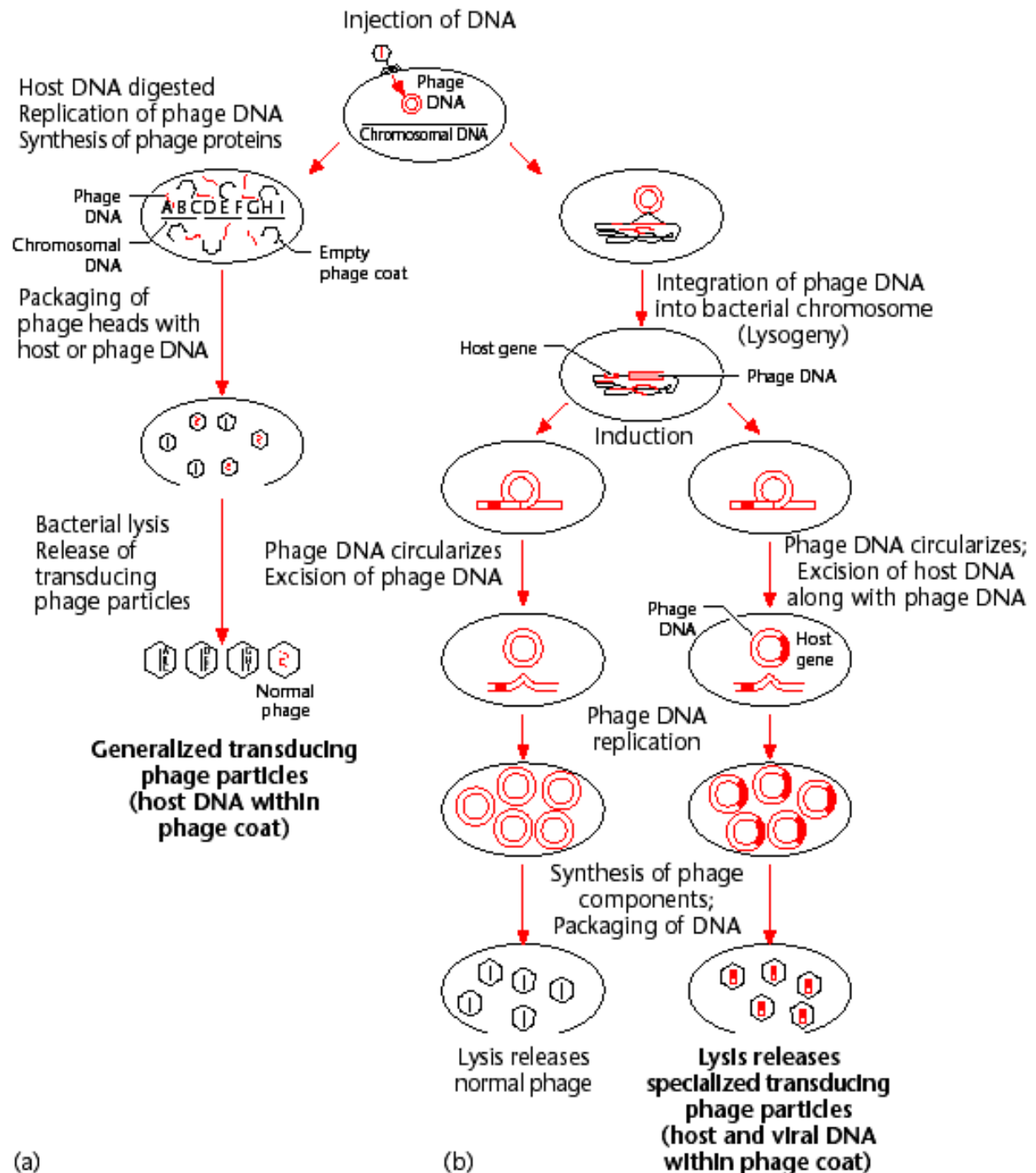


# Specializovaná transdukcce

The Mechanism of Transduction of  $\lambda$  and *E. coli*.



# Bakteriofágy - životní cykly



(a)

(b)

# Další lysogenní fágy

---

- Fág P2 – další lysogenní fág *E. coli* , též *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*
  - Lineární DNA, po infekci cirkularizace přes kohezní konce
  - Nevytváří konkatamery – DNA je pakována z kruhů
  - Může se integrovat do mnoha míst v chromosomu
  - Nesnadná aktivace excise – pouze reinfekcí dalším fágem P2 nebo P4
- Fág P4 – satelitní virus – k multiplikaci vyžaduje další virus
  - Neobsahuje geny pro hlavu a bičíky
  - Může se multiplikovat v buňkách lysogenních P2
  - Aktivuje transkripci pozdních genů P2 – inhibuje represor
- Fág P1 – neintegruje se – replikuje se jako plazmid
  - Udržují si jednu kopii na buňku
  - Mechanismus podobný jako plazmidy
  - Invertující segment – změna hostitelského rozhraní



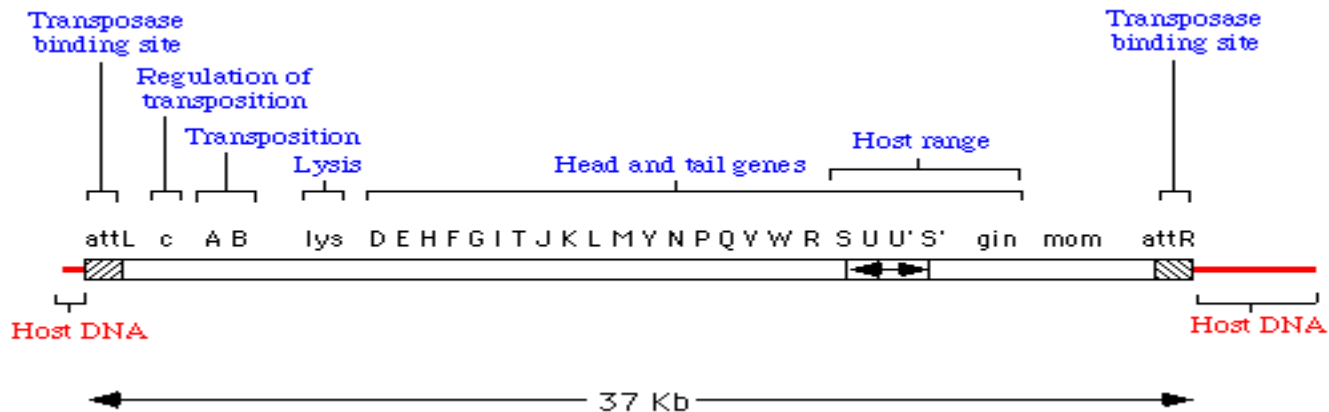
# Bakteriofág Mu

---

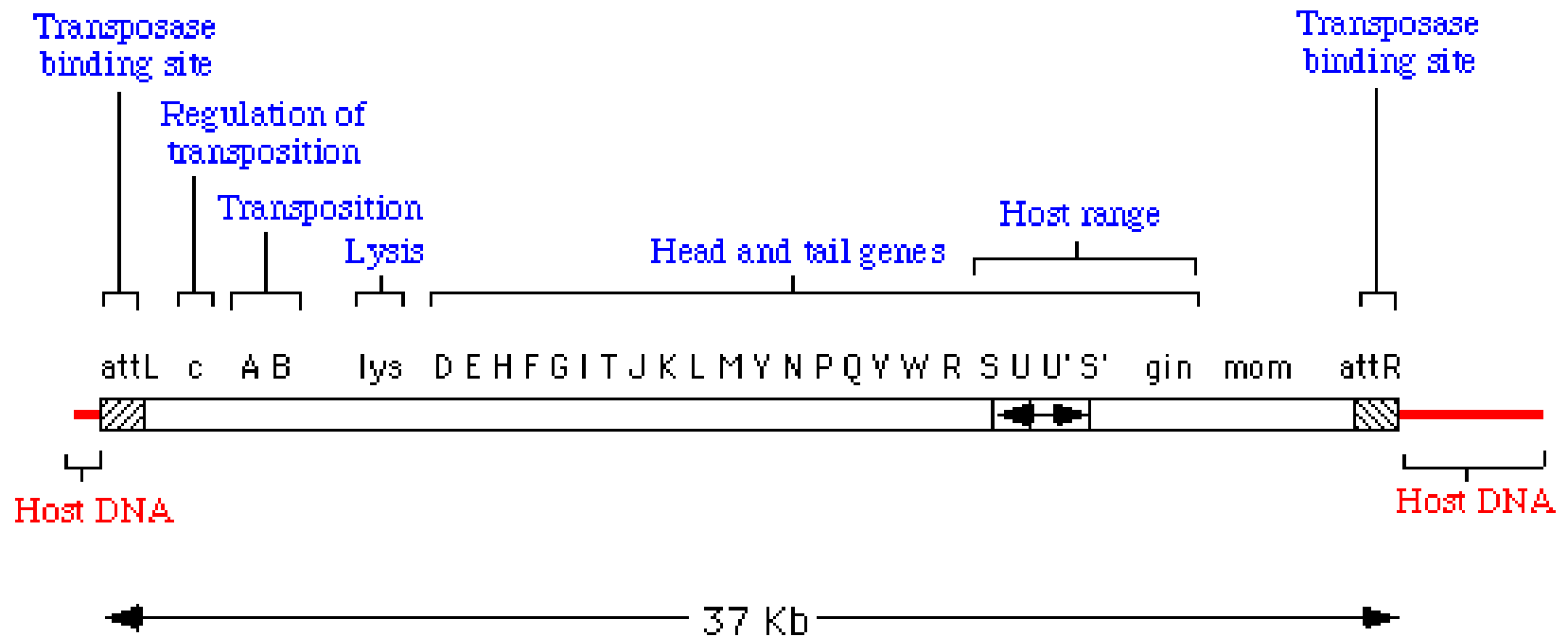
- Struktura velmi podobná lambda
  - polyhedrální hlava (60 nm průměr)
  - kontraktilní bičík a bičíková vlákna (hostitelská specifita)
  - temperovaný fág
- Genom fága Mu
  - lineární dsDNA 39 kb
  - prostřední část - 37 kb - nepermutovaná fágová DNA
  - na obou koncích DNA předchozího hostitele
    - 50 - 150 bp v pravo
    - 150 - bp vlevo
  - nemá kohezní konce (oproti lambda)
  - nemá terminální redundance (koncová opakování)
  - nemůže se cirkularizovat a integrovat do hostitelského chromosomu jako ostatní fágy
  - insertuje se konservativní transpozicí
  - je nezbytná jak pro lysogenní tak i pro lytický cyklus
  - integrace je více méně náhodný proces
    - (určitá specifita do lac operonu)

# Bakteriofág Mu

- genom je rozdělený na 3 regiony
  - $\alpha$  region - 33kb - obsahuje 32 dosud identifikovaných genů
    - c - Mu represor - váže se operátorové místo a reprimuje většinu genů
    - A - Mu transponasa
    - B - transpoziční replikační protein
    - geny pro vytvoření hlavy a bičíku
  - G - segment 3 kb, invertovatelná oblast kodující hostitelskou specifitu
  - $\beta$  segment - 1,7 kb - 2 geny odpovědné za inverzi G segmentu
- pro transposici jsou důležité konce attL a attR (někdy značované jako MuL a MuR)



# Bakteriofág Mu – struktura genu



# Bakteriofág Mu

---

## Lytický cyklus

- při lytické fázi dochází k aktivaci transponasy a inserci fága do 50 - 100 míst hostitelského chromosomu replikativní transpozicí
  - cílová sekvence má konsensus NYG/CRN (Ypyrimidin, R purine)
- v průběhu tohoto procesu dojde též k syntéze a sestavení hlavy, bičíku a lytických enzymů
- DNA je zabalena metodou plné hlavy
  - virion je velký 37 kb, do hlavy je zabaleno 39 kb
  - vždy dochází k zabalení i hostitelské DNA (50 - 150 bp vlevo a 200 bp vpravo, záleží na velikosti fága)
  - přesný mechanismus není znám, ale je zajímavé, že velikost přidané DNA je násobkem 11bp, což je velikost jedné spirály
  - pokud je fág deletován na pravém konci zabalí se víc hostitelské DNA
  - každý virion je unikátní v obsahu části hostitelské DNA
  - deriváty Mu (Mud) se využívají ke konstrukci operonových a genových fúzí a pro in vivo klonování

# Bakteriofág Mu

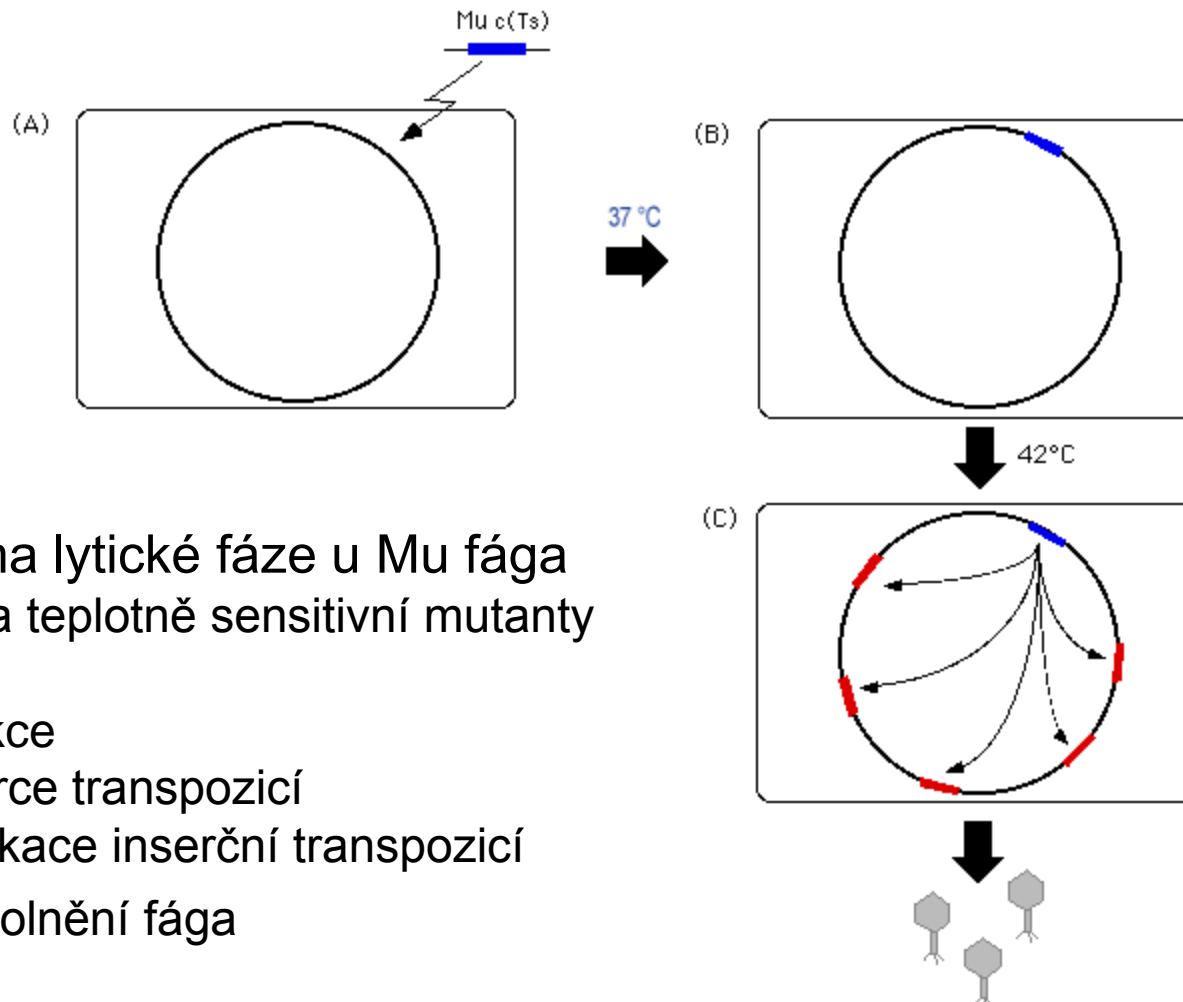
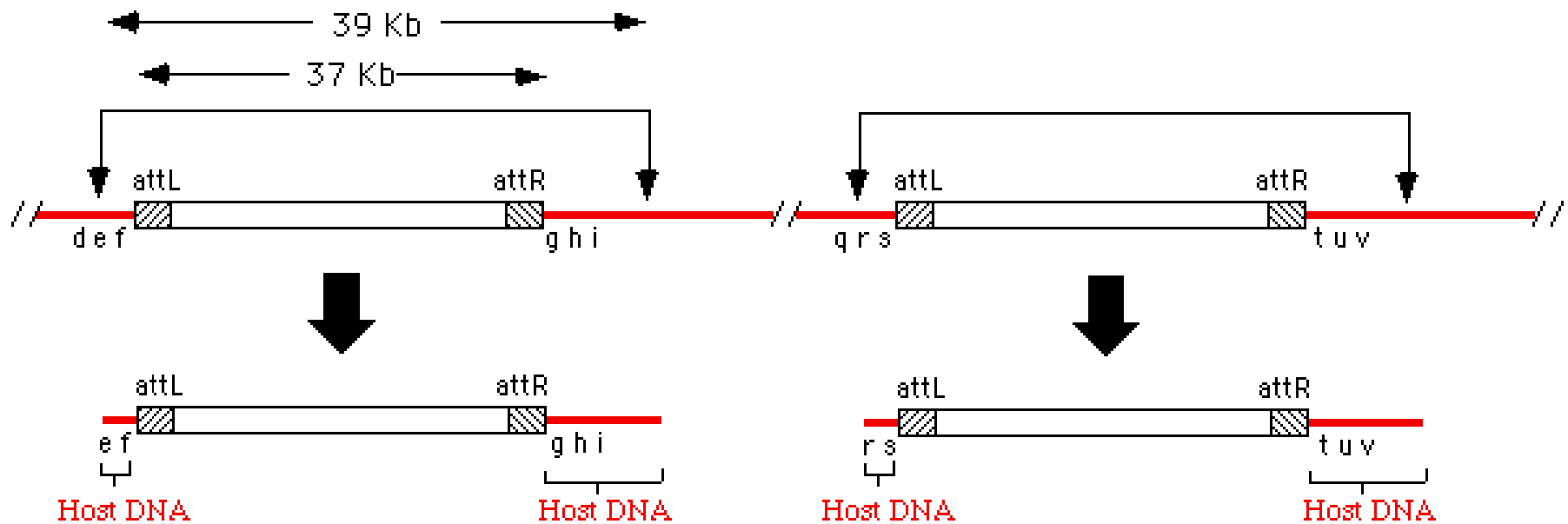


Schéma lytické fáze u Mu fága  
varianta teplotně sensitivní mutanty

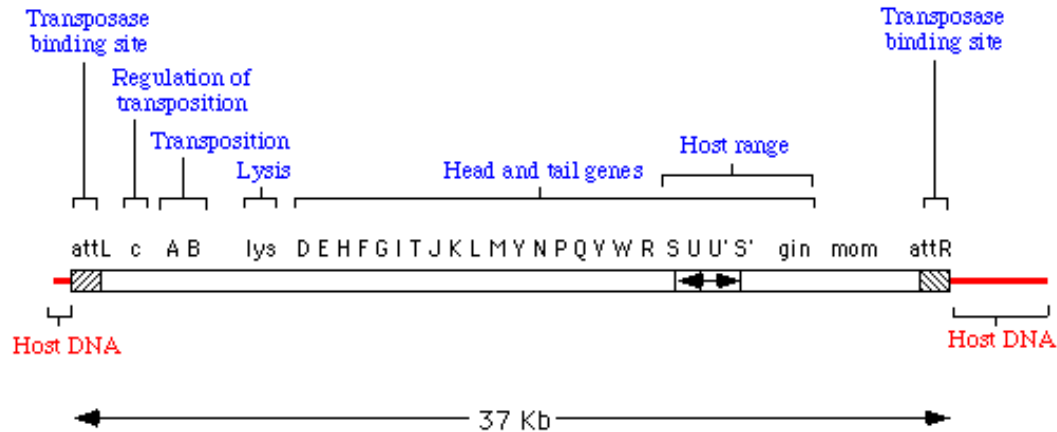
- A) infekce
- B) inserce transpozicí
- C) replikace inserční transpozicí  
a uvolnění fága

# Bakteriofág Mu



pakování DNA do hlavy bakteriofága Mu

# Bakteriofág Mu



□ Invertovatelný G segment

□ obsahuje geny S U

- podílejí se na tvorbě fágových bičíkových vláken
- struktura Sv - U - Sv' - S a S' proteiny mají stejnou H<sub>2</sub>N koncovou sekvenci a různou na COOH konci
- G segment je ohraničen párem (34 bp) inverzních opakování
- inverze prostřednictvím produktu genu *gin* (transponasa)
- v orientaci (+) infikuje *E. coli* K12, *Salmonella*
- v orientaci (-) infikuje *E. coli* C, *Citrobacter*, *Serratia*, *Shigella*, *Erwinia*, *Enterobacter*
- inverze je relativně řídký proces ( 1 až 3 krát za generaci) - gin protein se produkuje pouze v lysogenním stav

# Bakteriofág Mu

---

## Lysogenizace

- po infekci sensitivních buněk a injekci lineární DNA do hostitelské buňky dojde vždy k transpoziční integraci fága
- integrace je více méně náhodný proces
  - interaguje se do chromosomu i plazmidů
  - integrace do strukturních genů inaktivace genu - mutator phage
- ztráta heterogenní sekvence předchozího hostitele
- generování 5 bp přímé repetice
- lysogeny jsou stálé a nejsou indukovatelné UV světlem
- byly izolovány teplotně sensitivní deriváty Mu c(Ts), u kterých je možné lytický cyklus vyvolat zvýšením teploty na 42 °C



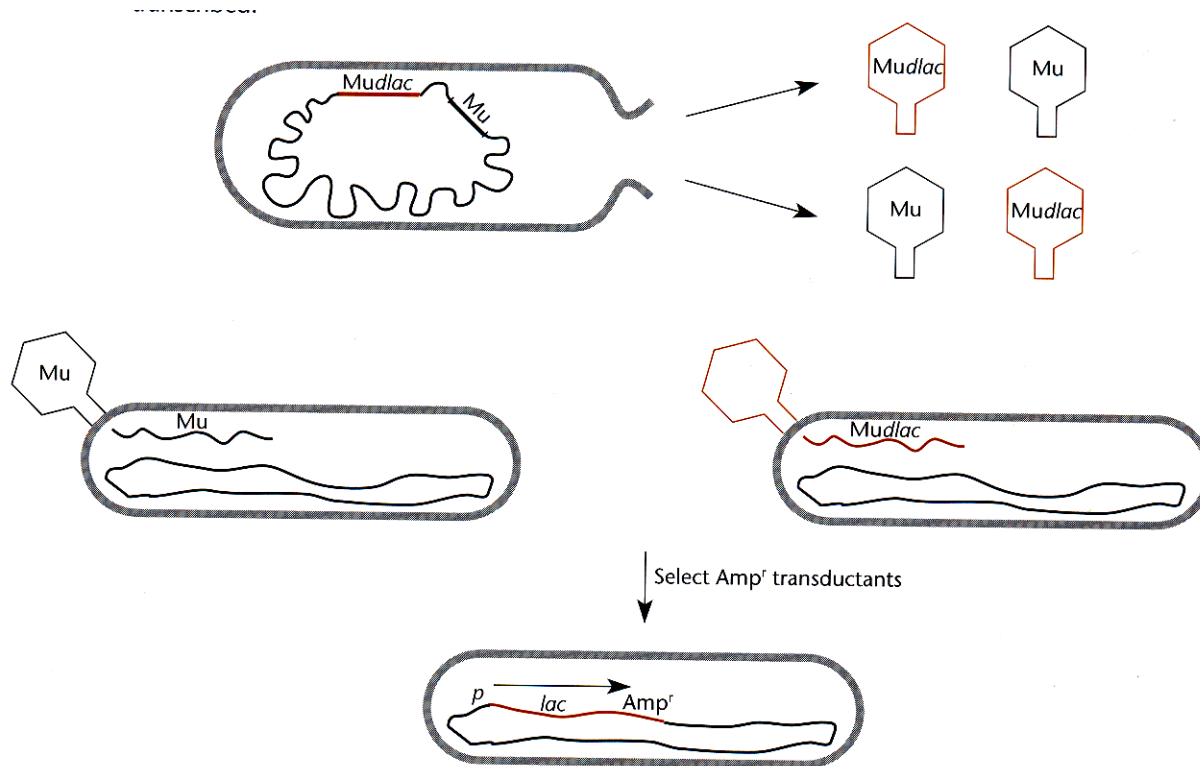
# Vytváření genových fúzí

---

- Transkripční fúze
  - Jeden gen je fúsován (přiřazen) k promotoru druhého genu – oba geny jsou transkribovány do jedné mRNA ale vytvářejí dva proteiny.
  - Deriváty transposonů obsahují reportérový gen (*lac*, *lux* atd.) s vlastní oblastí iniciace translace.
- Translační fúze
  - ORF dvou proteinů jsou fúzovány dohromady a vytvářejí jeden společný ORF – vznik jednoho fúzního proteinu.
  - Deriváty transposonů obsahují reportérový gen (*lac*, *lux* atd.) ale bez oblasti iniciace translace.
- Nejvíce používané jsou deriváty Mu fága
  - Široké spektrum hostitele u G- bakterií (*Erwinia*, *Citrobacter*, *E.coli*)
  - *Mud*(*Amp<sup>r</sup>*, *lac*) derivát – je odstraněna většina genů s výjimkou konců fága a genu pro transponasu, *lacZ* je bez promotoru
  - Po inserci ve správné orientaci downstream k promotoru – dochází k aktivaci reportérového genu.
  - Studium inducibilních genů

# Vytváření genových fúzí

- Použití derivátů Mu fága s reportérovým genem (lacZ)



# Bakteriofág Mu - vybrané vektory

## Some useful Mud vectors

	NAME	SIZE (Kb)	USE (Reference)
	MudI (aka Mud1)	37.2	Original operon fusion phage (Casadaban and Cohen, 1979)
	MudII301 (aka Mud2)	35.6	Similar to Mud1 but forms gene fusions (Casadaban and Chou, 1984)
	MudI 1734 (aka MudJ)	11.3	Operon fusion mini-Mud deleted for transposition functions (Beatriz et al., 1984)
	MudII 1734 (aka MudK)	9.7	Gene fusion mini-Mud deleted for transposition functions (Beatriz et al., 1984)
	Mud5005	7.9	In vivo cloning vector (Castilho et al., 1993)

- $tpn^+$  indicates the Mud carries the Mu  $A^+B^+$  genes required for transposition.
- $c(TS)$  is a temperature-sensitive mutation in the Mu  $c$  gene required for repression of transposition.
- Mud1, Mud2, MudJ, and MudK all lack transcriptional start site (i.e. promoter) for the *lac* operon.
- $P_X$  indicates the promoter for gene *X*.
- *ZYA* indicates the *lac* operon; '*ZYA*' indicates that the *lacZ* gene is lacking translational start sites.
- '*trp*' is a short region from the *E. coli trp* operon which provide translational start sites for the *lacZ* gene.
- Ori is the origin of replication from the multicopy plasmid pMB9.
- aka means "also known as".