

KOMMENTARER TILL KAPITEL 10

Bakterier saknar sexuella processer - förökar sig genom **enkel tudelning** ⇒ ingen förändring av det genetiska materialet ⇒ bakterier är i princip klonala.

Högre organismer har sexuella processer - dessa kan på detta sätt förändra sitt genetiska material.

Prokaryota celler kan **förändra sin genotyp** på två olika sätt:

I. Mutationer - förändring av bassekvensen i DNA.

II. Genetisk rekombination - DNA från två olika genom sammanförs och utbyte av genetisk information kan ske. Ingen sammansmältning av celler sker.

Mutationer och rekombinering ger genetisk variation biologisk variation, selektionen verkar på de olika genetiska varianterna och de som är bäst i konkurrens med övriga ger mest antal genotyper i nästa generation och selekteras därmed, detta är grundstenen i evolutionsprocessen.

GENETISK REKOMBINATION HOS PROKARYOTER

För att en rekombination skall kunna ske krävs **ANTINGEN** att sekvenser av baspar hos **INKOMMANDE** DNA visar **homologi** (sekvenslikhet) med genomet i cellen så att det kan ske homolog rekombinering (se 267, om du är osäker på detta begrepp). Ju mer besläktade bakterier - desto större homologi - desto effektivare rekombination. Det andra som kan hända är att det **INKOMMANDE** DNA't har en egen replikation, dvs plasmider, som kan existera självständigt i cellen parallellt med kromosomen.

DNA kan överföras på tre olika sätt till en mottagarcell, jfr fig. 10.11:

A. Transformation - fritt DNA tas upp.

B. Transduktion - överföring mha virus.

C. Konjugation – en plasmid överförs via cell-till-cell-kontakt

A. TRANSFORMATION

Upptag av fritt DNA.

DNA från omgivningen (exv från en cell som lyserat) kommer ut i omgivningen, detta fria DNA kan tas upp av vissa bakterier.

Man skiljer mellan **Naturlig transformation - Naturlig kompetens** och **Artificiell inducerbar kompetens**.

Naturligt transformerbara bakterier kan ta upp DNA från omgivningen utan speciell behandling. **Naturlig kompetens**: Det stadium i vilket bakterier kan ta upp DNA.

Bakterier som uppvisar naturlig kompetens är bl a *Bacillus subtilis* G+, *Streptococcus pneumoniae* G+ och *Haemophilus influenzae* G-.

Till gruppen med artificiell inducerbar kompetens hör bl a *Escherichia coli* G-, *Salmonella typhimurium* G- och vissa *Pseudomonas* G-.

Naturlig kompetens

Mottagarcellen måste vara kompetent dvs ha förmåga att ta upp DNA. Naturlig kompetens är ofta en konsekvens av näringsmässig shift-down - uppnås ofta just innan stationärfasen (jfr kap 6) vid höga cellkoncentrationer. Bara vissa stammar är kompetenta.

Bacillus subtilis* och *Streptococcus pneumoniae

Kompetenssignaler utsöndras av bakterier då de växer. Celler blir kompetenta endast vid höga koncentrationer av dessa signaler, alltså endast vid höga celltätheter. Ytan på bakterierna ändras så att DNA kan binda. Cellpermeabiliteten ökar drastiskt - man kan mäta ett läckage av cytoplasmatiska metaboliter - det bildas troligen kanaler i membranet ⇒ DNA kan passera.

Transformation - tre olika faser, jfr fig. 10.14:

- 1. Adsorption av DNA**
- 2. Penetration - transport av DNA till kromosomen**
- 3. Rekombination**

Bitar av dubbelsträngat (ds) DNA binder reversibelt till specifika proteiner på ytan av kompetenta celler. Enkelsträngat (ss) DNA kan inte binda. Bindningen av DNA blir så småningom irreversibel.

I samband med intransporten bryts den ena DNA-strängen ned av exonukleaser. Plasmider kan inte tas upp. Om inkommande DNA uppvisar homologi med DNA't i cellen så sker en rekombination. OBS att i fig 10-14 så bildas från cell "c" en transformerad cell (som visas som "d" i figuren) OCH en cell med "original" uppsättningen av DNA't som dumt nog inte visas i figuren.

Haemophilus influenzae

En membranreceptor binder DNA. Bakterierna bildar många små **membranvesiklar (transformasomer)** samtidigt som det bildas nya proteiner i cellhöljet. Dessa ökar kontakten mellan utsida och insida - cellväggens innehåll förändras. **Transformasomerna medverkar vid DNA-igenkänning, DNA-upptag och skydd mot nukleaser.** Ds DNA tas upp i transformasomerna.

Inkommande DNA innehåller en specifik upptagssekvens (10-12bp) hos dessa bakterier:

5' AAGTGCGGTCA 3' *Haemophilus influenzae*

Ds DNA penetrerar men den ena strängen bryts ned i cytoplasman. Plasmider kan inte tas upp. Rekombination sker på samma sätt som hos *Bacillus* och *Streptococcus*.

Specifitet

B. subtilis och *S. pneumoniae* kan ta upp nästan **vilket DNA som helst.**

Haemophilus kan **diskriminera mellan heterogent och homologt DNA** pga av den specifika upptagssekvensen, dvs transformationen är mycket högre för DNA från den egna arten än från andra arter. Detta påminner om hur rekombineringen hos växter och djur går till; rekombinering sker ju genom ett sexuellt system **BARA INOM ARTEN!**

Artificiellt inducerad kompetens

Inga kompetensferomoner medverkar. Kompetens kan induceras genom att använda **specifika odlingsförhållanden.** Ex. *E. coli* odlas i ett medium innehållande Ca^{2+} -joner och i kyla. Både ds DNA och ss DNA kan tas upp. I detta fall kan också plasmider tas upp. Används inom gentekniken.

B. TRANSDUKTION

Man skiljer mellan två typer av transduktion:

1. **Generell transduktion**

2. **Specialiserad transduktion**

1. **Generell transduktion** innebär en slumpmässig överföring av gener från givare till mottagare. Överföringsfrekvensen för varje enskild gen är låg. Både virulenta och temperata fager kan mediera generell transduktion, **jfr fig. 10.15**.

Vid en produktiv infektion av en bakteriofag kan värdcellens DNA spjälkas i mindre fragment av nukleaser som utgör tidiga proteiner i bakteriofagens infektionsförlopp. Om något av dessa DNA fragment har samma storlek som faggenomet kan det inkorporeras i bakteriofagens kapsid i stället för faggenomet. Efter lysering av värdcellen kan denna defekta viruspartikel fästa till en ny mottagarcell och injicera sitt DNA. Om homologi föreligger kan det då ske en rekombination.

2. **Specialiserad transduktion** innebär en effektiv överföring av speciella gener med hjälp av en temperat fag, **jfr fig. 10.16**

Vid lysogeni inkorporeras faggenomet i värdcellens DNA på ett specifikt ställe. Vid induktion kan av misstag gener från värdcellen skäras ut tillsammans med delar av faggenomet. De defekta fagera kan efter lysering av värdcellen infektera en mottagarcell.

PLASMIDER

Ej nödvändiga för överlevnad i enkla miljöer som tex i våra laboriermedier - av stort intresse ur medicinsk, ekologisk och praktisk synpunkt.

De flesta plasmider är **cirkulära**, supercoilade med **ds DNA** men det finns även långa linjära t ex hos *Borrelia* och *Streptomyces*.

Det är ibland svårt att dra gränser mellan plasmider - kromosom (minikromosom). *Bacillus thuringiensis* innehåller troligen gener som är essentiella. **Generellt innehåller dock inte plasmider essentiella gener.**

Plasmider använder i huvudsak värdcellens replikationsmaskineri.

Plasmider har gener som reglerar **när** syntes skall ske samt **kopietal** (dvs antalet plasmidkopior i en cell). Kopietalet för en plasmid är relativt konstant hos en specifik värd under konstanta fysiologiska förhållanden.

High-copy-number plasmids (plasmider med ett högt kopietal) - ofta små - upp till **100 kopior/cell**.

Low-copy-number plasmids (plasmider med ett lågt kopietal) - ofta stora - ned till **1 kopia/cell**. Väl reglerad replikation.

Vid delning sker en slumpvis distribution av high-copy-number plasmider. Low-copy number plasmider har en reglerad distribution av plasmidkopior till dottercellerna.

Plasmidinkompatibilitet - närbesläktade plasmider kan inte båda finnas i en cell under en längre tid. Kontrollsystemen för replikation interfererar med varandra ⇒ avkomma med endast en sorts plasmid efter en tid.

Dvs om två plasmider är lika (och båda har ett kopietal på ett) är deras replikationssystem också lika och de "känner inte skillnad på varandra", innan celledelning kan då slumpvis antingen den ena eller den andra plasmiden replikeras varvid båda plasmiderna "känner" av att kopietalet är tillräckligt för att kunna fördelas mellan dottercellerna. Men eftersom det då kan finnas tex en av den ena och tre av den andra får inte båda dottercellerna plasmider av båda typerna.

Plasmidinkompatibilitet används för klassificering av plasmider; inkompatibla plasmider är lika och förs till samma grupp.

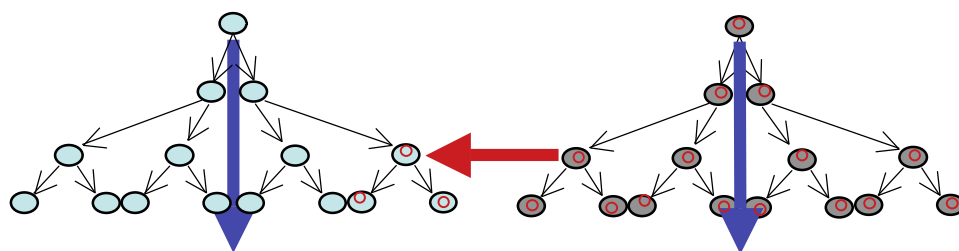
Olika typer av plasmider

Självöverförande plasmid - konjugativa plasmid. En stor del av plasmidens gener upptas av den sk transferfunktionen - **gener nödvändiga för överföring (transferregionen)**. Bland annat finns det gener som kodar för syntes av pili ⇒ en bakterie som har en konjugativ plasmid kan skapa kontakt med en mottagarbakterie och förmedla överföring av sin konjugativa plasmid.

Mobiliserbara plasmider har inte full genuppsättning för att kunna koda för överföring men kan följa med, åka snålskjuts på en konjugativ plasmid.

Icke-mobiliserbara plasmider. Dessa följer oftast med från förälder till avkomma.

Plasmider ger selektiva fördelar. Kostar också (energimässigt) att ha plasmider. Förlust av plasmid kan minska generationstiden.



**Vertikal
nedärvning**

**Horisontell
genöverföring**

En del plasmider kan överföras mellan helt olika arter av bakterier, men en del har en relativt snäv värdgrupp där de kan existera.

Plasmider kan tillföra värdcellen specifika egenskaper, jfr tabell 10.3:

1. **Antibiotikaresisten (R-plasmid), jfr fig. 10.20**
2. **Förmåga att bryta ned komplexa organiska ämnen (Tol-plasmid)**
3. **Resistens mot tungmetaller**
4. **Toxinproduktion (Ent-plasmid)**
5. **Bacterocinproduktion (Col-plasmid)**

Närbesläktade plasmider t ex olika R-plasmider kan undergå genetisk rekombination \Rightarrow multipel antibiotikaresistens.

Antibiotikaresistens i plasmider påvisades i början av 1960-talet i Japan. Man fann att flera *Shigella* -stammar uppvisade resistens mot två eller flera olika antibiotika. Denna resistens kunde överföras till andra bakteriestammar t ex *E. coli* och *Salmonella* mha plasmider. Före 1960 trodde man att fenomenet berodde på mutationer.

C. KONJUGATION

a. Gramnegativa bakterier

Fordrar **cell-till-cell-kontakt** - direkt överföring av gener från en cell till en annan. Förmedlare: **Plasmider**.

Vid **konjugation** överförs genetiskt material från en givarcell till en mottagarcell. Enkelriktad överföring.

F-plasmiden var den första som upptäcktes och kallas F efter "fertility-factor".

F⁺/F⁻-konjugation

Givarcellen - F⁺-cell - innehåller F-plasmiden.

Mottagarcellen - F⁻-cell - saknar F-plasmid.

F-plasmiden styr konjugationen - beror på överföringsegenskaperna (tra-generna).

För att konjugation skall kunna ske måste givar- och mottagarcellerna komma i nära kontakt. Detta kan ske pga att givarcellen har speciella ytstrukturer sk **F-pili** (sex-pili). Dessa består av **protein** (pilin) - 1-2 µm. Tra-generna kontrollerar också bildningen av F-pilus.

F-pili känner igen en struktur på **mottagarcellens yta** och **binder till denna** och därmed **dras cellerna ihop** och en cell - till - cell kontakt etableras. En **konjugationsbro** bildas = **por** genom vilken **DNA kan passera**.
Överföring av F-plasmiden.

En sträng på F-plasmiden bryts i ori T och överförs till mottagarcellen där den replikeras och cirkulariseras och. Den kvarvarande strängen i givarcellen tjänar som mall för syntes av en ny sträng, **jfr fig. 10.22**.

Resultat: Mottagarcellen blir en givarcell - F⁺ och givarcellen behåller en kopia av plasmiden

OBS att det är FEL i fig 10.22 båda cellerna blir F⁺!

Hfr/F⁻ konjugation

OBS: Exemplet som finns i alla grundkursböcker är F-plasmiden, även så här. Den är en av väldigt många plasmider, det finns alltså andra mekanismer. En ovanlig sak med F är att den kan integrera sig i kromosomen hos E. coli. Hfr är alltså inte vanligt hos andra plasmider.

F-plasmiden innehåller flera olika sk **insättningssekvenser - IS-sekvenser**. *E. coli* **kromosom** innehåller också **IS-sekvenser**. **Rekombination** mellan dessa IS-sekvenser \Rightarrow **F-plasmiden integreras i kromosomen** \Rightarrow **Hfr-cell**. **F-plasmidens gener uttrycks fortfarande, jfr fig. 10.23** (till skillnad från de flesta profagers).

Inkorporering relativt ovanlig. 1 cell på 10^4 . I och med att F-plasmiden är inkorporerad kan även **kromosomala gener överföras** (high frequency of recombination).

Om en **Hfr-cell** får **kontakt** med en **F⁻ cell** börjar en **överföring av F-plasmiden samt av kromosomen** eftersom F-plasmiden är kovalent bunden till kromosomen. Plasmiden fungera som ett "lok" och drar kromosomen efter sig in i mottagarcellen. **Kontakten mellan Hfr cellen och F⁻ cellen är skör** och därför sker mycket **sällan överföring av hela kromosomen** (100 min - *E. coli*). **Mottagarcellen blir då inte F⁺** eftersom inte hela F-plasmiden överförs (överföringen startar ju från en sekvens inne i F-plasmiden).

Kromosomala gener som ligger nära insättningen av F-plasmiden överförs med hög frekvens, jfr fig. 10.24, 10.25.

Interrupted mating

Konjugationen mellan Hfr och F⁻ kan lätt avbrytas \Rightarrow ett sätt att bestämma **gens läge på kromosomen**.

Genom att man har flera olika Hfr-stammar där överföringen börjar på olika ställen på kromosomen och går i olika riktning kan en grov karta över hela kromosomen konstrueras, **jfr fig. 10.26, 10.27.**

OBS i fig 10.27 finns ett FEL! Här har Gal⁺ och Trp⁺ blivit omkastade i diagrammet.

F'-faktor.

I sällsynta fall kan en inkorporerad F-plasmid frigöras från kromosomen (jfr profag) och övergå i en fri F-plasmid.

Av misstag kan det komma med **kromosomala gener i F plasmiden, en sådan F plasmid med kromosomala gener kallas F'** (F prim). Vid konjugation av en **F'** till en annan cell sker alltså en överföring av dels plasmiden men även av en del kromosomala gener.

b. Grampositiva bakterier

Pili finns inte vid konjugation mellan G+ bakterier.

Hos vissa G+ finns ett speciellt signalsystem.

Mottagarcellen som är plasmidfri producerar mating-protein - **feromoner** (polypeptider). I **givarcellen induceras** då syntes av ett protein - **adhesin** - som **stimulerar aggregering** av celler och konjugering.

Plasmider hos G+ bakterier har en mindre tra-region.

Promiskuösa plasmider.

Fördelaktigt med att ett feromonsystem inducerar expressionen av tra-gener. Plasmiden behöver inte uttrycka generna om det inte finns någon mottagare.

EVOLUTIONÄRA ASPEKTER

Plasmidens evolution och selektion förstås bäst om man antar att plasmiden är en egen enhet som selektionen kan verka på, dvs inte som en del av bakterievärdens genom. Detta för att plasmiden bär på en typ av gener och funktioner som är bra för plasmiden (konjugation, replikation mm) men bara är en kostnad för cellen; det är ju ingen vits för cellen att ha en energimässigt kostbar konjugationsmekanism där de delar med sig av information till sina konkurrenter.

Plasmiden utgör en kostnad för cellen. För att (evolutionärt) kunna existera får man tänka sig att plasmiden balanserar denna kostnad med att "betala hyra" genom att ha andra gener som är bra för värdcellen, exv antibiotikaresistens.

TRANSPOSONER

Hoppande gener!

En gen kan förflyttas från ett ställe på kromosomen till ett annat ställe eller till en plasmid mha av transposoner. Sällsynt händelse.

Transposoner finns som **insertionsekvenser (IS)** eller **transposoner (Tn)** jfr fig. 10.29 Tn5 är en så kallad "composit" Tn som består av två IS element (IS50L & IS50R), mellan dessa sitter olika antibiotikaresistensgener. Både IS och Tn har

speciella, inverterade sekvenser i ändarna och båda innehåller gener som kodar för ett **transposas** – ett enzym som är nödvändigt för att en förflyttning skall kunna ske. Transposoner är större än insertionsekvenser och bär gener som ger värdorganismen speciella egenskaper t ex **antibiotikaresistens**.

Det sker en rekombination mellan DNA sekvenserna i ändarna av transposonen och sekvenser (targets) i kromosomen eller plasmider, **jfr fig. 10.30**. En transposon kan flytta från ett ställe till ett annat utan att replikeras eller så sker en replikation, **jfr fig. 10.31**.

Transposonmutagenes. Transposoner kan helt förstöra en gens funktion, **jfr fig. 10.33**. Transposoner är en mycket viktig orsak till mutationer hos många organismer. Viktig orsak till mutationer som leder till genetiska sjukdomar hos människor. Transposoner används ofta för att experimentellt inducera mutationer.

Transposoner finns hos de flesta organismer – bakterier har få transposoner jämfört med människa.

Integroner är ett slags genetiska element som har förmåga att integrera sk. genkassetter. Hittills har de flesta genkassetter visat sig ha antibiotikaresistensgener, möjligen beroende på att dessa är lättast att hitta. Integronen har en promotor som den förser genkassetternas gener med så att dessa kan avläsas. Genom sin förmåga att ”samla på sig” flera olika antibiotikaresistensgener är detta en av mekanismerna för bildning av multiresistens (se vidare kap 20).